

Непрерывный протеолиз в аспекте использования потенциала сывороточных белков

Евгения Юрьевна Агаркова, канд. техн. наук, старший научный сотрудник, руководитель лаборатории технологии молочно-белковых концентратов, пищевых добавок и производства продуктов на их основе

Ксения Александровна Рязанцева, канд. техн. наук, научный сотрудник

Дарья Николаевна Калугина, канд. техн. наук, научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности

E-mail: e_agarkova@vnimi.org

Исследован процесс протеолиза на экспериментальной ультрафильтрационной установке с вращающимся мембранным модулем UF-RDM в непрерывно-дискретном режиме для выявления возможности эффективного получения низкомолекулярных пептидов из молочной сыворотки. В качестве ферментных препаратов использовали трипсин, химотрипсин и «Алкалазу® 2.4 L». Сопоставление содержания низкомолекулярных пептидных остатков показало, что наибольшее их количество было зафиксировано при гидролизе алкалазой. По истечении уже 60 мин их доля в гидролизованном пермеате (42,7 %) была больше зафиксированных максимальных значений, полученных при гидролизе трипсином и химотрипсином – 33,8 % (300 мин) и 40,6 % (240 мин) соответственно. Учитывая, что при гидролизе субстрата трипсином в течение 240 мин и алкалазой в течение 60 мин получены сходные значения, можно сделать вывод о том, что алкалаза наиболее применима для высвобождения низкомолекулярных пептидов с точки зрения сокращения продолжительности процесса. Дальнейшие исследования будут направлены на исследование динамики накопления свободных

аминокислот в пермеате в результате протеолиза алкалазой, а также различными комбинациями ферментных препаратов.

Ключевые слова: ультрафильтрация, ферментативный гидролиз, низкомолекулярные пептиды.

Agarkova E.Yu., Ryazantseva K.A., Kalugina D.N. Continuous proteolysis in terms of utilizing the potential of whey proteins
All-Russian Dairy Research Institute

The aim of the work was to study the proteolysis process on an experimental ultrafiltration unit with a rotating membrane module to identify the possibility of efficient production of low molecular weight peptides from whey. The objects of study were milk serum, permeate, enzyme preparations trypsin, chymotrypsin and «Alcalase® 2.4 L». Fractionation and proteolysis were carried out on an experimental setup with a rotating membrane module UF-RDM in a continuous-discrete mode. Comparison of the content of low molecular weight peptides showed that the largest amount was recorded during hydrolysis with alcalase. After 60 minutes, their share in the hydrolyzed permeate (42,7 %) was higher than the recorded maximum values obtained during hydrolysis with trypsin and chymotrypsin – 33,8 % (300 min) and 40,6 % (240 min), respectively. Considering that similar values were obtained upon hydrolysis of the substrate with trypsin for 240 min and with alcalase for 60 min, it can be concluded that it is most applicable for the release of low molecular weight peptides in terms of reducing the duration of the process. Further studies will be aimed at studying the dynamics of free aminoacid accumulation in the permeate as a result of proteolysis by alcalase, as well as various combinations of enzyme preparations.

Key words: ultrafiltration, enzymatic hydrolysis, low molecular weight peptides.

Н а сегодняшний день ультрафильтрация как наиболее распространенный вид мембранной обработки белков в пищевой промышленности [1]. Благодаря постоянному развитию мембранных процессов акцент в переработке молочной сыворотки сместился на производство ценных продуктов [2]. Поиск и совершенствование методов обработки молочной сыворотки, включающих сочетание ультрафильтрационного концентрирования и ферментативного гидролиза (протеолиза), способствуют получению высококачественных сывороточных ингредиентов с повышенным содержанием различных биологически активных пептидов, в том числе с противодиабетической активностью [3].

Подобное сочетание процессов возможно в ферментативном мембранном реакторе (ФМР) — системе, удерживающей фермент и питающей субстрат на стороне ретентата, в то же время позволяющей вновь образованным биоактивным пептидам проникать через мембрану, создавая поток продукта (пермеат) с повышенной биологической активностью [3]. Применение ФМР также способствует улучшению технологических свойств сывороточных белков. В работе А. Kilara отмечается, что при помощи протеолиза возможно регулировать растворимость, пенообразующие свойства, гелеобразующую способность, а также прочность геля на основе сывороточных белков.

Сывороточные белки обладают хорошей растворимостью в широком диапазоне значений pH и пониженной вязкостью по сравнению с исходными белками, при этом ультрафильтрационное фракционирование способствует повышению их растворимости [4].

В работе J.M.Chobert показано, что для сохранения хороших эмульгирующих свойств триптического гидролизата сывороточных белков молекулярная масса пептидов не должна превышать 5 кДа [5]. В работе S.F.Gauthier с соавторами также при исследовании триптического гидролизата сывороточных белков установлено, что именно низкомолекулярные пептиды с 41 по 60 (2314 Да), с 21 по 40 (2030 Да) и более короткие фрагменты (21–32 и 41–57), полученные из β-лактоглобулина, обладают периодическим распределением полярных и гидрофобных остатков и минимальной молекулярной массой, т.е. являются поверхностно-активными пептидами на границе раздела масло–вода [6]. Кроме того, в результате гидролиза повышается термостабильность пептидов из-за потери вторичной структуры, что способствует уменьшению структурных изменений при термообработке [4].

Несмотря на очевидные преимущества использования ФМР, одним из факторов, ограничивающих их применение, является возникновение концентрационной поляризации, приводящей к загрязнению мембранных пор, падению потока пермеата и, как следствие, увеличению экономических

затрат на обслуживание оборудования [7]. Среди существующих методов контроля возникновения концентрационной поляризации представляет интерес использование вращающегося мембранного модуля. Впервые специалистами ВНИМИ исследован процесс ультрафильтрации подсырной сыворотки на разработанном и созданном в институте опытно образце стендовой установки, оснащенной динамическим мембранным модулем UF-RDM. Результаты исследований показали, что использование принципа вращения позволили значительно интенсифицировать процесс УФ-концентрирования, увеличив продолжительность бесперебойной работы установки на 107 % по сравнению с серийно выпускаемой [7]. С использованием установки разработан способ непрерывного гидролиза в процессе концентрирования молочной сыворотки, являющийся аналогом ферментативного мембранного реактора.

Цель работы — исследование процесса непрерывного гидролиза на экспериментальной ультрафильтрационной установке с вращающимся мембранным модулем для установления возможности эффективного получения низкомолекулярных пептидов из молочной сыворотки.

В качестве объектов исследований были использованы подсырная сыворотка, полученная при производстве полутвердого сыра «Качотта»; ферментные препараты трипсин ЕС (3.4.21.4), химотрипсин ЕС (3.4.21.1) и «Алкалаза® 2.4 L». Молекулярно-массовое распределение полученных гидролизатов белков молочной сыворотки оценивали методом гельпроникающей хроматографии на колонке «BioSep-SEC-S 2000» фирмы Phenomenex (США). Белковый состав сывороточных продуктов определяли методом Кьельдаля: массовую долю белка и содержание общего азота — по ГОСТ 34454–2018; содержание небелкового азота — ГОСТ Р 55246–2012.

При обработке белка алкалазой реакцию гидролиза проводили при 55 °C и pH 7,5, ферментами трипсин и химотрипсин — при 45 °C и pH 8,0. Фракционирование и протеолиз осуществляли на экспериментальной ультрафильтрационной установке с вращающимся мембранным модулем UF-RDM, состоящим из трех плоских керамических мембран диаметром 210 мм и общей полезной площадью фильтрации 0,2 м² с отсечкой по молекулярной массе 5 кДа, расположенных на валу. Конструкция мембранного реактора включала емкость объемом 5 л и рециркуляционный насос [7, 8].

На основе ранее проведенных исследований выбран диапазон скорости вращения мембранного модуля от 450 до 600 об/мин, обеспечивающий максимально возможную бесперебойную продолжительность работы установки [8]. Технологический процесс (рис. 1) относился к классу непрерывно-дискретных, поведение которого описывается бесконечной последовательностью сменяющих друг друга длительных непрерывных и мгновенных дискретных поведения [9]. По достижении прогнозируемой массовой доли белка в концентрате, приближенной к содержанию белка в молоке (3,02 %), регулировали температуру и активную кислотность реакционной смеси в зависимости от используемого ферментного препарата. В процессе протеолиза объем пермеата, выходящий из установки, продолжали компенсировать добавлением молочной сыворотки в рабочую емкость для поддержания постоянного объема реакционной смеси.

Каждые 30 мин в процессе гидролиза отбирались образцы пермеата, в которых определяли содержание бел-

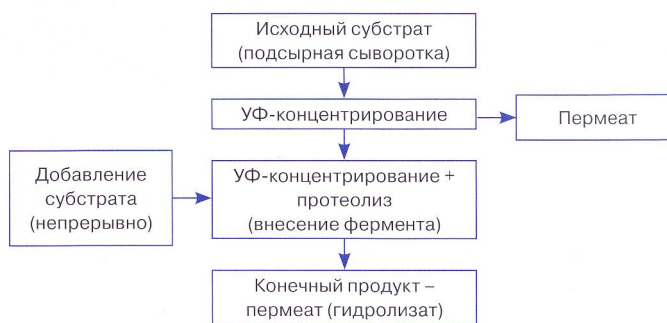


Рис. 1. Непрерывный ферментативный гидролиз

ка, небелкового азота и молекулярно-массовое распределение. Повышение с течением времени содержания небелкового азота в системах, содержащих сывороточные белки, является маркером протеолитического процесса [10]. В ходе ферментативной конверсии содержание небелкового азота в пермеате возрастало при обработке всеми использованными ферментными препаратами, что свидетельствует об эффективности данного процесса (рис. 2).

Молекулярно-массовое распределение гидролизированных пермеатов, полученных при помощи трипсина, показало, что значимое увеличение (на 20 %) доли пептидов с молекулярной массой менее 3,5 кДа по сравнению с контролем отмечено по истечении 120 мин протеолиза (рис. 3). В конечной точке процесса их количество увеличилось всего на 4 % по сравнению с образцом, отобраным после 120 мин. Можно сделать вывод о постепенном снижении активности протеолиза и отсутствии целесообразности его дальнейшего проведения.

При использовании химотрипсина спад нарастания низкомолекулярных фракций отмечен после 240 мин процесса. По сравнению с контролем на 240-й минуте зафиксирован рост низкомолекулярных фракций на 31 %.

Диаграмма нарастания низкомолекулярных фракций при протеолизе алкалазой демонстрирует ошутимое нарастание пептидов с молекулярной массой менее 3,5 кДа с 60-й до 180-й минуты. При этом процентная доля этих пептидов по окончании процесса составила 42,8 %, что аналогично этому показателю по истечении 60 мин. Максимальная доля низкомолекулярных пептидов, которая была получена по прошествии 150 мин протеолиза, соста-

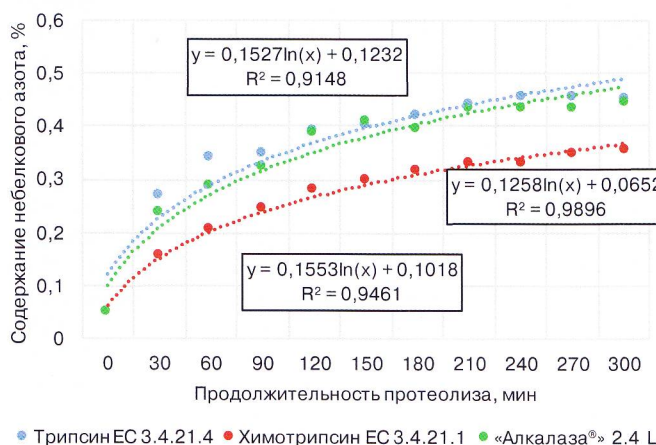


Рис. 2. Динамика накопления небелкового азота в пермеате при гидролизе

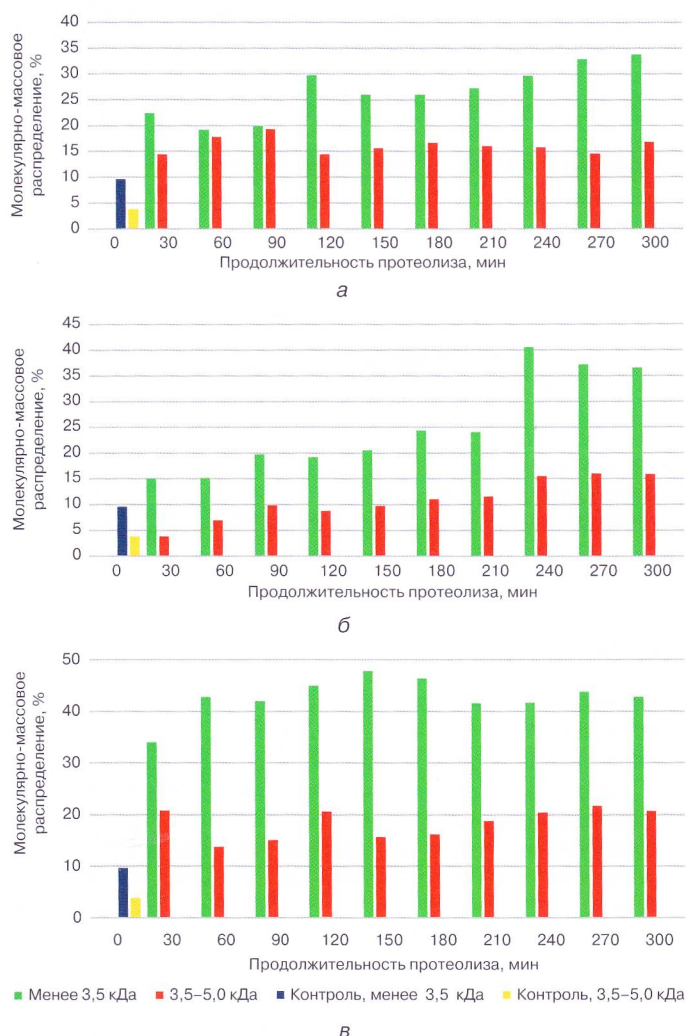


Рис. 3. Зависимость молекулярно-массового распределения от продолжительности процесса при гидролизе различными ферментами: а – трипсином; б – химотрипсином; в – алкалазой

вила 47,8 %, демонстрируя относительно небольшое различие с показателями после 60 мин гидролитической обработки, что почти на 38 % выше, чем у исходного контроля.

Сопоставляя процентное содержание низкомолекулярных пептидных фракций при протеолизе различными ферментными препаратами, можно отметить, что наибольшее их количество было зафиксировано при гидролизе алкалазой. По истечении уже 60 мин их доля в гидролизованном пермеате (42,7 %) была больше зафиксированных максимальных значений, полученных при гидролизе трипсином и химотрипсином — 33,8 % (300 мин) и 40,6 % (240 мин) соответственно. Учитывая, что при гидролизе субстрата трипсином в течение 240 мин и алкалазой в течение 60 мин получены сходные значения, алкалаза является более применимым ферментным препаратом для высвобождения низкомолекулярных пептидов с точки зрения сокращения продолжительности процесса.

Полученные данные позволили установить наиболее рациональную продолжительность протеолиза тремя различными ферментами с точки зрения получения низкомолекулярных пептидов, обладающих рядом ценных технологических и биофункциональных свойств, доказать преимущества применения для этих целей алкалазы в режиме непрерывного процесса.

Для успешного использования полученных гидролизатов при разработке рецептур продуктов функциональной направленности необходимо исследование всех факторов, способных снизить потребительские качества. Основная технологическая проблема — возможное наличие у белковых гидролизатов горьковатого прикуса или послевкуся. Как известно, определенные аминокислоты, зашифрованные в аминокислотной последовательности основных белков молочной сыворотки, имеют горький вкус, и весьма велика возможность их высвобождения в процессе протеолиза. Поэтому важно добиться минимально возможного количества свободных аминокислот (САК). Дальнейшие исследования будут направлены на исследование динамики накопления САК в пермеате в результате протеолиза алкалазой, а также различными комбинациями ферментных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Evdokimov, I.A.** Ultrafiltration concentrating of curd whey after electroflotation treatment/ I.A.Evdokimov [et al.]// *Foods and Raw Materials*. 2017. Vol. 5. № 1. P. 131–136. DOI: <http://doi.org/10.21179/2308-4057-2017-1-131-136>
2. **Донская, Г.А.** Напитки кисломолочные с повышенным содержанием сывороточных белков и водорастворимых антиоксидантов/ Г.А.Донская, В.М.Дрожжин, В.В.Брызгалкина// *Вестник Мурманского государственного технического университета*. 2018. Т. 21. № 3. С. 471–480.
3. **O'Halloran, J.** Production of whey-derived DPP-IV inhibitory peptides using an enzymatic membrane reactor/ J.O'Halloran, M.O'Sullivan, E.Casey// *Food and Bioprocess Technology*. 2019. Vol. 12. № 5. P. 799–808. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02253-7>
4. **Kilara, A.** Whey proteins/ A.Kilara, M.N.Vaghela// *Proteins in food processing*. Woodhead publishing. 2018. P. 93–126. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>
5. **Chobert, J.M.** Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin/ J.M.Chobert, C.Bertrand-Harb, M.G.Nicolas// *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1988. Vol. 36. № 5. P. 883–892. DOI: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00083a002>
6. **Gauthier, S.F.** Pouliot Functional and Biological Properties of Peptides Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins/ S.F.Gauthier, Y.Pouliot// *Journal of Dairy Science*. 2003. Vol. 86. P. E78–E87. DOI: [doi:10.3168/jds.s0022-0302\(03\)74041-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)74041-7)
7. **Агарков, А.А.** Процесс концентрирования подсырной сыворотки с использованием вращения фильтрующих элементов/ А.А.Агарков// тезисы докладов XI Международной научной конференции студентов и аспирантов «Техника и технология пищевых производств». – Могилев, 2019. С. 170.
8. **Агаркова, Е.Ю.** Перспективы использования динамического мембранного модуля фильтрации UF-RDM для концентрирования белков подсырной сыворотки/ Е.Ю.Агаркова [и др.]// *Сыроделие и маслоделие*. 2019. № 6. С. 54 – 56.
9. **Парийская, Е.Ю.** Сравнительный анализ математических моделей и подходов к моделированию и анализу непрерывно-дискретных систем/ Е.Ю.Парийская// *Дифференциальные уравнения и процессы управления*. 1997. № 1. С. 91–120.
10. **Мельденберг, Д.Н.** Оценка показателей гидролиза белка молока в процессе хранения/ Д.Н.Мельденберг, Е.А.Юрова// материалы Международной научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 150-летию со дня рождения В.П.Горячкина. – М., 2018. С. 187–190.