

# ТЕХНОЛОГИЯ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

УДК [637.136.5+579.67]:637.045

Поступила в редакцию 5 декабря 2022 года

<https://doi.org/10.47612/2220-8755-2021-16-68-73>

*Е.Д. Шегидевич*

*Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

## ГИДРОЛИЗ МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ ПРОТЕОЛИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ

*K. Shehidzevich*

*Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

## HYDROLYSIS OF DAIRY RAW MATERIAL BY PROTEOLIC ENZYMES TO SEPARATE INDIVIDUAL PROTEIN FRACTIONS

*e-mail: ek.sheg@yandex.ru*

*В статье представлены результаты исследований по подбору ферментных препаратов для выделения отдельных видов молочных белков путем селективного гидролиза. Определены механизмы действия на восстановленный концентрат сывороточный белковый следующих протеолитических ферментов: химотрипсина, трипсина и пепсина. Установлено, что для селективного выделения  $\alpha$ -лактальбумина целесообразно использование химотрипсина при активной кислотности 8,5 ед. pH и температуре 25 °С, а для выделения  $\beta$ -лактоглобулина – пепсина при активной кислотности 2,0 ед. pH и температуре 40 °С.*

*The article presents the results of studies on the selection of enzyme preparations for the isolation of certain types of milk proteins by selective hydrolysis. The mechanisms of action on the reduced whey protein concentrate of the following proteolytic enzymes are determined: chymotrypsin, trypsin and pepsin. It has been established that for the selective isolation of  $\alpha$ -lactalbumin, it is advisable to use chymotrypsin with an active acidity of 8.5 units. pH and a temperature of 25 °C, and for the isolation of  $\beta$ -lactoglobulin - pepsin at an active acidity of 2.0 units. pH and temperature 40 °C.*

**Ключевые слова:** концентрат сывороточный белковый; ферменты; гидролиз; пепсин; трипсин; химотрипсин.

**Keywords:** whey protein concentrate; enzymes; hydrolysis; pepsin; trypsin; chymotrypsin.

**Введение.** Ассортимент выпускаемой молокоперерабатывающими предприятиями Республики Беларусь продукции включает более 1800 наименований. Однако предполагается дальнейшее увеличение производства молока, что будет способствовать наращиванию количества и номенклатуры производимой продукции. Так, перспективным направлением развития отрасли считается углубление переработки сырья, позволяющее выделять либо модифицировать отдельные компоненты.

Гидролиз является одним из способов изменения белкового состава молочного сырья. Следует отметить, что производители пищевых продуктов и ингредиентов отдают предпочтение ферментативному гидролизу ввиду наличия широкого спектра препаратов, которые считаются безопасными и естественными. Наиболее изученными и используемыми ферментами для производства гидролизатов молочного белка являются ферменты животного происхождения трипсин, пепсин и химотрипсин,

растительные ферменты, в основном папаин и бромелайн, бактериальные протеазы, в основном происходящие от *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis* [1, 2]. Ферментативный гидролиз белков в молочной отрасли может использоваться для решения следующих задач: снижения аллергенного потенциала, получения биологически активных пептидов, селективной обработки с целью выделения отдельных видов молочных белков [3–9].

При проведении анализа представленных на рынке ферментов для протеолического гидролиза молочного сырья [10] для дальнейших исследований в области селективного гидролиза белков предварительно отобраны следующие виды: пепсин, трипсин и химотрипсин.

**Цель работы** – подбор ферментных препаратов для выделения отдельных видов молочных белков путем селективного гидролиза на основе исследования механизма действия на молочное сырье химотрипсина, трипсина и пепсина.

**Материалы и методы исследования.** Методология исследований заключается в анализе и систематизации научно-технической информации, представленной в трудах отечественных и зарубежных ученых, информационных ресурсах интернет-источников в области переработки молочного сырья.

Для проведения процесса гидролиза использовали следующие ферментные препараты:

- химотрипсин (код АТХ: D03BA, производитель: ООО «Самсон-Мед»);
- трипсин (код АТХ: D03BA, производитель: ООО «Самсон-Мед»);
- пепсин 1:10000 (CAS Number 9001-75-6, производитель Chem-Imprex International).

В качестве молочного сырья использовали концентрат сывороточный белковый КСБ (производитель – Щучинский филиал ОАО «Молочный мир»), с массовой долей белка 81,8%. Восстановление концентрата сывороточного белкового проводили в следующем соотношении: 5 г сухого продукта на 95 г воды.

Гидролиз молочного сырья проводили с использованием мешалки магнитной с подогревом RCT basic (КА), в комплектацию которой входит датчик РТ 1000.60 из нержавеющей стали, позволяющий контролировать температурные параметры протекания процесса гидролиза.

Оптимальные условия проведения гидролиза (рН, температура) подобраны в соответствии с задачей по выделению отдельных видов белков молочного сырья на основе анализа литературных источников, в которых содержатся сведения о возможных режимах гидролиза молочного сырья указанными выше ферментными препаратами [4, 6, 7, 11–14]. Количество вносимого фермента было подобрано в рамках исследований, проведенных ранее.

Идентификацию белковых фракций по результатам гидролиза молочного сырья осуществляли методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (12%) с добавлением додецилсульфата натрия.

**Результаты и их обсуждение.** В лабораторных условиях проводили гидролиз восстановленного концентрата сывороточного белкового химотрипсином, трипсином и пепсином.

*Гидролиз химотрипсином.* В рамках проведенных предварительных исследований проверяли возможность ферментации восстановленного концентрата сывороточного белкового химотрипсином в концентрациях 0,01%, 0,02% и 0,1%. Для дальнейших исследований была подобрана концентрация 0,1%, что соответствует соотношению фермент/субстрат 2,46%.

Условия проведения гидролиза химотрипсином:

- температура 25°C;

- активная кислотность ферментируемой системы 8,5 ед. рН (доводили рН до необходимого значения путем добавления раствора NaOH);
- продолжительность 100 минут.

Инактивацию фермента проводили термической обработкой при температуре 65°C в течение 10 минут. Результаты идентификации белкового состава отобранных проб ферментируемой системы (20, 40, 60, 80 и 100 минут) представлены на электрофореграмме на рисунке 1.

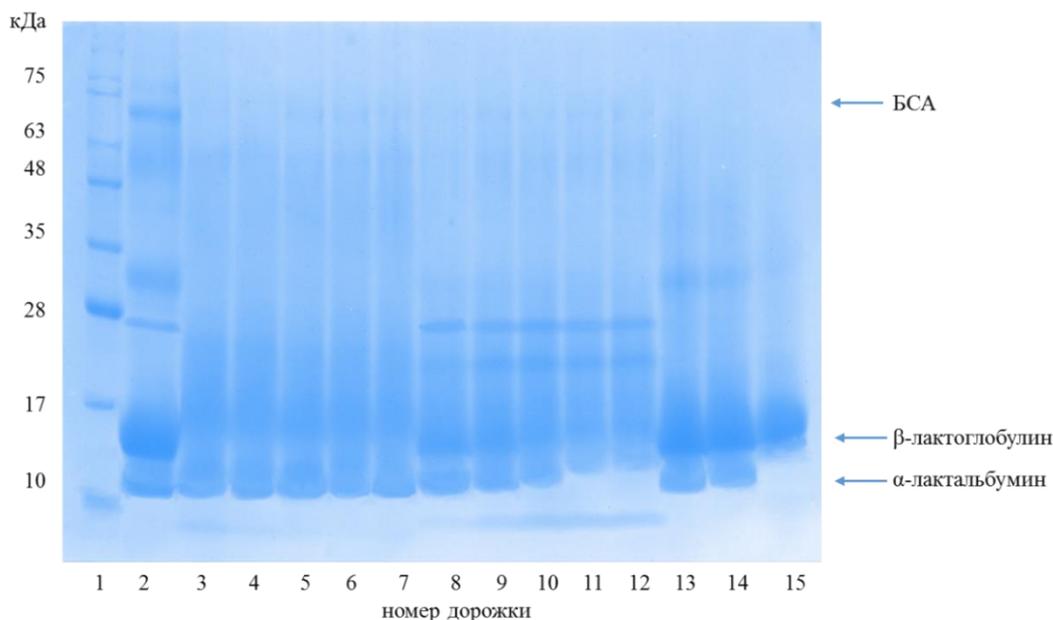


Рисунок 1 – Результаты ДСН-электрофореза гидролиза образцов восстановленного концентрата сывороточного белкового химотрипсином, трипсином, пепсином

Примечание: 1 – маркер молекулярных масс, 2 – контроль; 3 – 0,1% химотрипсина, 20 минут; 4 – 0,1% химотрипсина, 40 минут; 5 – 0,1% химотрипсина, 60 минут; 6 – 0,1% химотрипсина, 80 минут; 7 – 0,1% химотрипсина, 100 минут; 8 – 0,1% трипсина, 20 минут; 9 – 0,1% трипсина, 40 минут; 10 – 0,1% трипсина, 60 минут; 11 – 0,1% трипсина, 80 минут; 12 – 0,1% трипсина, 100 минут; 13 – 0,005% пепсина, 20 минут; 14 – 0,005% пепсина, 40 минут; 15 – 0,005% пепсина, 60 минут.

Источник данных: получен авторами на основании результатов экспериментальных исследований.

Анализ полос с №3 по № 7 на электрофореграмме свидетельствует о том, что в процессе ферментации химотрипсином восстановленного концентрата сывороточного белкового в заданных условиях рН и температуры наблюдается гидролиз β-лактоглобулина и альбумина сыворотки крови (БСА), в незначительной степени наблюдается гидролиз α-лактальбумина.

*Гидролиз трипсином.* Процесс гидролиза восстановленного концентрата сывороточного белкового трипсином предварительно проводили используя следующие концентрации фермента: 0,01%, 0,02%, 0,1%. Для дальнейших исследований была определена концентрация трипсина 0,1% (соотношение фермент/субстрат 2,46%).

Условия проведения гидролиза трипсином:

- температура 42°C;
- активная кислотность ферментируемой системы 7,7 ед. рН (доводили рН до необходимого значения путем добавления раствора NaOH);
- продолжительность 100 минут.

Инактивацию фермента проводили термической обработкой при 70°C в течение 30 минут. Через 20, 40, 60, 80 и 100 минут процесса были отобраны пробы

ферментируемой системы, результаты идентификации белкового состава которых представлены на электрофореграмме на рисунке 1.

Анализ полос с №8 по №12 на электрофореграмме (рисунок 1) свидетельствует о том, что в процессе ферментации трипсином в заданных условиях рН и температуры наблюдается гидролиз  $\alpha$ -лактальбумина,  $\beta$ -лактоглобулина и альбумина сыворотки крови (БСА), при этом селективного действия по отношению к какому-либо виду белка молочного сырья исследуемый фермент не проявляет. Следует отметить наличие по сравнению с дорожкой контроля на дорожках 8-12 новой полосы, которая располагается в интервале значений молекулярной массы от 17 до 28 кДа и может быть характерной для самого фермента трипсина, имеющего молекулярную массу около 24 кДа.

*Гидролиз пепсином.* В рамках предварительных исследований вносили пепсин в ферментируемую систему в следующих концентрациях: 0,005%, 0,01%, 0,02%. Так, концентрация 0,005% была выбрана для дальнейших экспериментов в связи с необходимостью рационального внесения ферментных препаратов. Соотношение фермент/белковый субстрат, исходя из количества вносимого пепсина, составляет 0,125%.

Условия проведения гидролиза пепсином:

- температура 40°C;
- активная кислотность ферментируемой системы 2 ед. рН (доводили рН до необходимого значения путем добавления раствора HCl);
- продолжительность 60 минут.

Инактивацию фермента проводили термической обработкой при температуре 85°C в течение 15 минут.

В процессе гидролиза отобраны три пробы ферментируемой системы: через 20, 40 и 60 минут. Результаты идентификации белкового состава отобранных проб представлены на электрофореграмме на рисунке 1.

На основе проведенного анализа дорожек от № 13 до № 15 электрофореграммы следует отметить, что гидролиз  $\alpha$ -лактальбумина и альбумина сыворотки крови (БСА) начинается уже через 20 минут после внесения фермента, а полный гидролиз указанных фракций наблюдается через 60 минут. Одновременно с тем,  $\beta$ -лактоглобулин проявляет устойчивость к действию пепсина при описанных условиях проведения исследований не зависимо от продолжительности воздействия.

Согласно информации, представленной в [13, 14] четвертичная структура  $\beta$ -лактоглобулина зависит от рН среды следующим образом:

- от 5,2 до 8 ед. рН при комнатной температуре димер;
- от 3,5 до 5,2 ед. рН образует октамер с молекулярной массой около 140000 кДа;
- выше 8,0 ед. рН и ниже 3,0 ед. рН – диссоциирует на мономеры.

В связи с тем, что представленные выше исследования проводилось при значении активной кислотности 2 ед. рН,  $\beta$ -лактоглобулин при воздействии пепсина находился в форме мономера.

**Заключение.** В рамках подбора препаратов, для выделения отдельных видов молочных белков путем селективного гидролиза, в лабораторных условиях проведены исследования по определению механизма действия на восстановленный концентрат сывороточный белковый следующих протеолитических ферментов: химотрипсина, трипсина и пепсина.

Установлено, что под действием химотрипсина в ферментируемой системе при активной кислотности 8,5 ед. рН, температуре 25°C наблюдается гидролиз  $\beta$ -лактоглобулина и альбумина сыворотки крови (БСА), в незначительной степени –  $\alpha$ -лактальбумина. Определено, что трипсин не обладает специфичным действием к

какому-либо белку восстановленного концентрата сывороточного белкового при рН равном 7,7, температуре 42°C, в связи с тем, что происходит расщепление всех белков. Исследования показали, что под действием пепсина при активной кислотности 2 ед. рН, температуре 40°C в процессе гидролиза происходит расщепление  $\alpha$ -лактальбумина и альбумина сыворотки крови, в то время как  $\beta$ -лактоглобулин проявляет устойчивость к действию фермента.

Таким образом, для селективного гидролиза молочного белка при условиях проведения процесса, согласно представленным выше параметрам, могут быть использованы следующие ферментные препараты:

- для выделения  $\alpha$ -лактальбумина – химотрипсин;
- для выделения  $\beta$ -лактоглобулина – пепсин.

Применение трипсина для селективного гидролиза молочного сырья не является целесообразным при описанных условиях проведения гидролиза.

Результаты данного исследования будут использованы в дальнейшем для решения задачи по изменению фракционного состава белков молочного сырья в ходе комбинирования ферментативных и мембранных технологических процессов.

### Список использованных источников

1. Jeewanthi, RKC. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry / RKC Jeewanthi, NK Lee, HD Paik // Korean J Food Sci Anim Resour. – 2015. – Vol. 35, № 3. – P. 350–359.
2. Raghunath T. Mahajan. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review / Raghunath T. Mahajan, Shamkant B. Badgajar // Journal of Pharmacy Research. – 2010. – № 3(9). – P. 2048–2068.
3. Bu, G. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review / G. Bu, Y. Luo, F. Chen, K. Liu, T. Zhu // Dairy Science & Technology. – 2013. – Vol. 93. – P. 211–223.
4. Kim, S. B. Peptic and Tryptic Hydrolysis of Native and Heated Whey Protein to Reduce Its Antigenicity / S. B. Kim, K. S. Kim, A. Khan, W. S. Lee, H. J. Lee, B. S. Ahn, H. S. Kim // Journal of Dairy Science. – 2007. – Vol. 90, Issue 9. – P. 4043–4050.
5. Просеков, А. Ю. Получение ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с использованием протеолитических ферментов / А. Ю. Просеков, Е. В. Ульрих, С. Ю. Носкова, В. Г. Будрик, С. Г. Ботина, Е. Ю. Агаркова, Е. И. Мельникова // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6-5. – С. 1089–1093.
6. Lisak, K. Comparison of selective hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin by acid Protease A and Protease M as alternative to pepsin: potential for  $\beta$ -lactoglobulin purification in whey proteins / K. Lisak, S. Chelulei, U. Kulozik, R. Božanić // Journal of Dairy Research. – 2019. – Vol. 93, Issue 1. – P. 114–119.
7. Lisak, K. Chymotrypsin selectively digests  $\beta$ -lactoglobulin in whey protein isolate away from enzyme optimal conditions: Potential for native  $\alpha$ -lactalbumin purification / K. Lisak, J. Toro-Sierra, U. Kulozik, R. Božanic, S. Chelulei // Cheison //
5. Prosekov, A. Ju. Poluchenie fermentativnyh gidrolizatov belkov molochnoj syvorotki s ispol'zovaniem proteoliticheskikh fermentov / A. Ju. Prosekov, E. V. Ul'rih, S. Ju. Noskova, V. G. Budrik, S. G. Botina, E. Ju. Agarkova, E. I. Mel'nikova // Fundamental'nye issledovaniya. – 2013. – № 6-5. – S. 1089–1093.

Journal of Dairy Research. – 2013. – № 80. – P. 14–20.

8. Курбанова, М. Г. Направленный гидролиз белков молока / М. Г. Курбанова, О. О. Бабич, А. Ю. Просеков // Молочная промышленность. – 2010. – № 10. – С 70–71.

9. Головач, Т. Н. Гидролиз белков молока ферментными препаратами и протеолитическими системами молочнокислых бактерий / Т. Н. Головач, В. П. Курченко // Труды БГУ. – 2017. – Т. 7, ч. 1. – С. 106–126.

10. Шегидевич, Е.Д. Использование селективного гидролиза молочного сырья для выделения отдельных белковых фракций / Е.Д. Шегидевич // Молодёжь в науке – 2022 : тезисы докладов XIX Международной научной конференции «Молодёжь в науке» (Минск, 25–28 октября 2022 г.) : аграрные, биологические, гуманитарные науки и искусства, медицинские, физико-математические, физико-технические, химия и науки о Земле / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых ; редкол.: В.Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2022.

11. Jeewanthi, RKC. Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity / RKC Jeewanthi, MH Kim, NK Lee, YC Yoon, HD Paik // Food Sci. Anim. Resour. – 2017. – №37(1). – P. 62–70.

12. Galvao, C. M. Controlled hydrolysis of cheese whey proteins using trypsin and alpha-chymotrypsin / C. M. Galvao, A. F. Silva, M. F. Custodio, R. Monti, R. L. Giordano // Appl Biochem Biotechnol. – 2001. – № 761. – P. 1–9.

13. Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications / ed.: Mingruo Guo. – Burlington: John Wiley & Sons Ltd., 2019. – 259 p.

14. Whey Proteins From Milk to Medicine / ed.: Hilton C. Deeth, Nidhi Bansal. – Elsevier Inc., 2019. – 724 p.

8. Kurbanova, M. G. Napravlenyj gidroliz belkov moloka / M. G. Kurbanova, O. O. Babich, A. Ju. Prosekov // Molochnaja promyshlennost'. – 2010. – № 10. – S. 70–71.

9. Golovach, T. N. Gidroliz belkov moloka fermentnymi preparatami i proteoliticheskim sistemami molochnokislyh bakterij / T. N. Golovach, V. P. Kurchenko // Trudy BGU. – 2017. – Т. 7, ch. 1. – S. 106–126.

10. Shegidevich, E.D. Ispol'zovanie selektivnogo gidroliza molochnogo syr'ja dlja vydelenija otdel'nyh belkovyh frakcij / E.D. Shegidevich // Molodjozh' v nauke – 2022 : tezisы dokladov XIX Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Molodezh' v nauke» (Minsk, 25–28 oktjabrja 2022 g.) : agrarnye, biologicheskie, gumanitarnye nauki i iskusstva, medicinskie, fiziko-matematicheskie, fiziko-tehnicheskie, himija i nauki o Zemle / Nac. akad. nauk Belarusi, Sovet molodyh uchenyh ; redkol.: V.G. Gusakov (gl. red.) [i dr.]. – Minsk : Belaruskaja navuka, 2022.