

# ДОСЛІДЖЕННЯ СТУПЕНЮ ПРОТЕОЛІЗУ КОНЦЕНТРАТУ БІЛКОВОГО ІЗ МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ ТА ІЗОЛЬОВАНОГО СОЄВОГО БІЛКА В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД МАСОВОЇ ЧАСТКИ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ

Декуша Г.В., Козак М.М.

Інститут технічної теплофізики НАН України, [tbds\\_ittf@ukr.net](mailto:tbds_ittf@ukr.net)

## Abstract

*The article is devoted to the study of proteolysis of whey protein concentrate (WPC) and isolated soy protein (ISP). The results of experimental studies of the process of enzymatic hydrolysis of ISB and WPC by enzyme preparations "Protamex", "Protease C" and "ORBAProteo P-1200", which are currently available on the domestic market, showed a high specificity to proteins.*

**Keywords:** *whey proteins, soy proteins, proteolysis, degree of hydrolysis.*

**Вступ.** Протеїнова підтримка є одним з потужних факторів в оздоровчому харчуванні, оскільки відіграє виключно важливу роль при відновленні порушеного гомеостазу в організмі [1–3]. Особливо високу ефективність проявляють білки в гідролізованій формі – суміші пептидів та вільних амінокислот. Завдяки високій харчовій та біологічній цінності, легкому засвоєнню та низькому прояву алергічних реакцій, білкові гідролізати вводять до складу ряду продуктів спеціального та дієтичного призначення, таких як: суміші для ентерального харчування, гіпоалергенні замітники жіночого молока в сухій формі для дітей першого року життя та раннього віку, білкові добавки для спортивного харчування, тощо.

На ринку України основний асортимент продукції з гідролізованими білками представлено зарубіжними корпораціями-виробниками ( «Nestle», Швейцарія; «Danon», «Nutricia», Франція; «Optimum Nutrition», США та ін.). Українські виробники пропонують переважно КСБ, що містять різну частку білка, однак у негідролізованому вигляді (КСБ-УФ-65, ВАТ «Техмолпром», м. Гадяч; КСБ-70, ТОВ «Бучацький сирзавод», м. Бучач та ін.) і в основному в якості протеїнових складових для продуктів спортивного харчування.

Найбільше застосування в продуктах харчування та дієтичних добавках знайшли гідролізати молочної сироватки, соєвих протеїнів та їх сумішей завдяки високій біологічній цінності, збалансованому амінокислотному складу (крім дефіциту сірковмісних незамінних амінокислот в соєвих протеїнах) та високій субстратній специфічності до дії серинових протеаз. Найчастіше використовуваними для протеолізу комерційними ферментними препаратами є «Alcalase», «Protamex», «Flavourzyme», «Neutrase», трипсин, а також папаїн, бромелаїн та ін. [4, 5].

Направлена структурна модифікація протеїнів до необхідного ступеня гідролізу, проведена за рахунок варіювання режимних параметрів гідролізу білків та виду протеаз, дозволяє покращити функціонально-технологічні властивості білків та знизити питомі енерговитрати у виробничому циклі. Так, після проведення протеолізу в'язкість утворених розчинів гідролізованих білків зменшується [6], що дозволяє використовувати стандартні насоси меншої

потужності при подачі їх на розпилювальне сушіння. Після проведення гідролізу соєвих протеїнів «Протамексом» («Novozymes», Данія) утворений розчин гідролізованих білків характеризується підвищеними технологічними показниками: індекс розчинності – 84%, емульгуюча здатність – 95м<sup>2</sup>/г, антиоксидантна активність – 62%, піноутворювальна здатність – 94%, та жируотримуюча здатність – 4,5 г/г [4]. Притаманний для гідролізатів гіркуватий присмак зменшують додаванням мікрокапсулюючих сумішей (КСБ з альгінатом натрію або мальтодекстрин з β-циклодекстрином) [7].

В умовах збільшення попиту на вітчизняну продукцію створення продуктів харчування спеціального призначення, що містять білки в гідролізованій формі, залишається перспективним напрямком в вітчизняній харчовій галузі.

Метою роботи є визначення раціональних режимних параметрів ферментативного гідролізу білків молочної сироватки та соєвих білків для подальшого створення продуктів спеціального призначення.

**Матеріали та методи.** Ізольований соєвий білок Supro 500E («Solae Europe, S.A.», USA), далі ІСБ, що містить масові частки: білка – 90,0 %, жиру – 0,5 %, золи – 5,5 %, вологи – 4,0%. Концентрат білковий із молочної сироватки WPC 80, («Agri-Mark Inc.», США), далі КСБ, що містить масові частки: білка – 82,5%, жиру – 5,2%, золи – 2,3%, вуглеводів – 6%, вологи – 4%. «Протамекс» – нейтральна протеаза із штаму *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* ("Novozymes", Данія), температурний оптимум  $t=35-60^{\circ}\text{C}$ , рН – 5.5–7.5, активність – 1,5 AU/g. «Протеаза С» – грибна лужна протеаза (Завод препаратів мікробіологічного синтезу «Ензим», Ладизин, Україна), температурний оптимум становить  $t=30-70^{\circ}\text{C}$ , рН 5–11, ферментна активність – 50000 од/г. *ORBAproteo P-1200* – фермент Протеази, що продукується штамом *Bacillus subtilis* (Китай), температурний оптимум  $20-50^{\circ}\text{C}$ , рН 5–8, протеазна активність 3500 PU/g.

Ступінь гідролізу білків визначали спектрофотометричним методом за зміною світлопоглинання при довжині хвилі  $\lambda=280$  нм [8] на спектрофотометрі СФ-26. Результати представлено у відсотках (%) по відношенню до загальної маси білка у зразку. Індекс розчинності ІСБ та КСБ визначали згідно з ISO 8156:2005 Dried milk and dried milk products – Determination of insolubility index.

**Результати та обговорення.** Одним з ключових технологічних етапів, що в подальшому має значний вплив на швидкість і ступінь протеолізу білків – гідролітичної реакції, є процес відновлення протеїнів у водному середовищі для забезпечення максимальної дії протеаз. Альбуміни, які становлять біля половини білків КСБ, за рахунок великої кількості полярних груп на поверхні молекули легко зв'язуються з молекулами води, мають велику гідратну оболонку і, відповідно, розчинність. Соєві білки, які на 85–95% представлені глобулінами, розчиняються у воді значно менше. Крім того, на розчинність білків впливає ряд інших факторів: рН середовища, кількість присутніх електролітів, температура, метод отримання білків, тощо.

Одним із енергоощадних способів відновлення білків є метод дискретно-імпульсного введення енергії (ДІВЕ), розроблений в Інституті технічної теплофізики НАН України. В роторно-пульсаційних апаратах (РПА), в яких реалізований цей метод при відновленні дисперсних систем, відбувається інтенсифікація гідродинамічних та тепломасообмінних процесів і максимальне скорочення непродуктивних витрат за рахунок прискорення міжфазного тепло-масопереносу і раціонального використання енергії у порівнянні з традиційними апаратами і способами для відновлення сухого молока [9, 10]. В результаті впливу ДІВЕ підвищується гомогенність відновленої дисперсної системи, відбувається інтенсивне зменшення дисперсності частинок і збільшення площі поверхні. Це в свою чергу, дозволяє покращити умови протеолізу і збільшити активність впливу протеаз.

Про ефективність відновлення ІСБ та КСБ за допомогою методу ДІВЕ можна опосередковано судити за показниками їх розчинності. При відновленні ІСБ за стандартною методикою індекс розчинності становив  $6,0 \text{ см}^3$  нерозчинного осаду, тоді як після ДІВЕ-обробки в РПА його значення знизилось на 25% і становило  $4,5 \text{ см}^3$ . КСБ з індексом розчинності  $0,3 \text{ см}^3$  за цих же умов розчинився практично повністю –  $0,1 \text{ см}^3$  нерозчинного осаду.

Одним з визначальних параметрів, що впливає на ступінь протеолізу, є масова частка ферментного препарату ( $\omega_f$ ) у водному білковому розчині. При невеликій  $\omega_f$  процес гідролізу триватиме довше, що відповідно збільшить енерговитрати, а глибина гідролізу білків може виявитись недостатньою. Підвищення  $\omega_f$  збільшуватиме собівартість продукту, при цьому ступінь гідролізу може зростати незначно.

Експериментально досліджено залежність ступеня гідролізу ІСБ та КСБ від масової частки «Протамексу», «Протеази С» та «ORBAProteo P-1200» при  $\omega_f=1-5\%$  (від маси білка) та масовій частці білка у воді ( $\omega_b$ )  $\omega_b=7,3-8,1\%$ . Гідроліз білків проводили при оптимальній температурі дії ферментних препаратів –  $55-57^\circ\text{C}$  впродовж 60 хв та рН 6,1–6,2.

Встановлено, що у всіх зразках при збільшенні  $\omega_f$  ступінь гідролізу білків зростає, однак в різній мірі в залежності від типу субстрату та ферменту.

Найбільшу величину ступеня гідролізу для соєвих протеїнів отримано при дії «Протамекс», який проявляє досить високу субстратну специфічність. Ступінь гідролізу ІСБ становив близько 54–55% при  $\omega_f=1\%$ , і досягав вже 65–75% при  $\omega_f=5\%$ . Дія «Протеази С» на ІСБ була дещо меншою: 48% при  $\omega_f=1\%$  та 65–68% при  $\omega_f=5\%$ . Це можна пояснити тим, що ферментативний гідроліз проводили при рН нижчому (6,2) від оптимального (8–10). При протеолізі «ORBAproteo P-1200» накопичення пептидів та вільних амінокислот відбувалось найменше, глибина гідролізу ІСБ при  $\omega_f=5\%$  через 60 хв не перевищувала 55–60%.

Найбільшу специфічність до білків молочної сироватки серед обраних ферментних препаратів має «Протеаза С»: до 60–65% при  $\omega_f=5\%$ . Дія «Протамексу» та «ORBAproteo P-1200» була слабшою, ступінь їх гідролізу при  $\omega_f=5\%$  знаходився в межах 52% та 48% відповідно.

Подальше збільшення  $\omega_f$  всіх ферментних препаратів до  $\omega_f=10\%$  не призводить до значного росту ступеня гідролізу як ІСБ, так і КСБ.

**Висновки.** Створення продуктів спеціального призначення, що містять білки в гідролізованій формі, залишається перспективним напрямком в вітчизняній харчовій галузі. Проведені дослідження впливу протеолітичної дії ферментних препаратів, що доступні в теперішній час на вітчизняному ринку, на ІСБ та КСБ свідчать про можливість отримання гідролізатів з високим ступенем гідролізу. Застосування вітчизняного обладнання дозволяє покращити технологічні властивості білків при знижених енерговитратах.

Визначено раціональні енергоощадні режимні параметри ферментативного гідролізу білків молочної сироватки та соєвих білків. Результати експериментальних досліджень процесу ферментативного гідролізу ІСБ та КСБ ферментними препаратами «Протамекс», «Протеаза С» та «ORBAproteo P-1200», що доступні в даний час на вітчизняному ринку, показали високу специфічність обраних протеаз до білків. Отримані результати можуть бути використані при розробці технологій продуктів спеціального або дієтичного призначення.

### Список використаної літератури:

1. Chalamaiah M., Yu W., Wu J. Immunomodulatory and anticancer proteinhydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry* 2018. Vol. 245, P. 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>.
2. Dullius A., Goettert M.I. Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnical facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*. 2018. Vol. 42, P. 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>.
3. Rigo J., Schoen S., Verghote M. et al. Partially hydrolyzed whey-based formulae with reduced protein content support adequate infant growth and are well tolerated: results of a randomized controlled trial in healthy term infants. *Nutrients*. 2019. Vol. 11, P. 1654–1669. <https://doi.org/10.3390/nu11071654>.
4. Islam M., Huang, M., Islam, M.S., Fan, B. Influence of the Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Activity of Enzymatic Soybean Protein Hydrolysates. *Molecules*. 2022. Vol. 27 No. 18. P. 6110. <https://doi.org/10.3390/molecules27186110>.
5. Avdieieva L., Zhukotskyi E., Dekusha H. Influence of technological parameters on the degree of enzymatic hydrolysis of high-protein products. *Ukrainian food journal*. 2019 Vol. 8, Iss. 4. P. 828–839. <https://doi.org/10.24263/2304-974X-2019-8-4-13>.
6. Dermiki M., FitzGerald R.J. Physicochemical and gelling properties of whey protein hydrolysates generated at 5 and 50°C using Alcalase® and Neutralse®, effect of total solids and incubation time. *International Dairy Journal*. 2020. No. 110. 104792. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104792>.
7. Yang S., Mao X.-Y., Li F.-F., Zhan D. et. al. The improving effect of spray-drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*. 2012. Vol. 235. P. 91–97. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1735-6>.
8. Lazarus W. Purification of plant extracts for ion-exchange chromatography of free amino acids. *Journal of Chromatography*. 1973. A, 87 (1), P. 169–178.
9. Долінський А.А., Іваницький Г.К. Тепломасообмін та гідродинаміка у парорідинних дисперсних середовищах. Теплофізичні основи деіскретно-імпульсного введення енергії. Київ : НВП «Видавництво «Наукова думка» НАН України». 2008. 381 с.
10. Мікро- і нано- рівневі процеси в технологіях ДІВЕ : тематичний збірник статей / за заг. ред. А.А. Долінського. Київ : Академперіодика, 2015. 464 с.