

УДК 637.055

Влияние условий ферментации белков молока на пептидный профиль гидролизатов

Д.т.н. Забодалова Л.А., к.х.н. Скворцова Н.Н.,
Данилов И.М., к.б.н. Касумов М.К.

danilovivan86@gmail.com

Санкт-Петербургский государственный университет
низкотемпературных и пищевых технологий;
Санкт-Петербургская государственная академия
ветеринарной медицины

В статье исследовано получение фракций низкомолекулярных пептидов посредством ограниченного протеолиза обезжиренного молока ферментным препаратом «Панкреатин». Определены рациональные параметры ферментации, проведена сравнительная характеристика молекулярно-массового распределения полученных гидролизатов методом гель-хроматографии.

Ключевые слова: белки молока, ферментативный гидролиз, низкомолекулярные пептиды

Effect of fermentation conditions for milk proteins in the peptide profile of hydrolysates

Zabodalova L.A., Skvortsova N.N., Danilov I.M. , Kasumov M.K.

Saint-Petersburg State University of Refrigeration and Food
Engineering
Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

In the article to obtain fractions of low molecular weight peptides by limited proteolysis of skim milk enzyme preparation "Pancreatin. The rational parameters of fermentation, the comparative characterization of the molecular weight distribution of hydrolysates obtained by gel chromatography.

Keywords: milk proteins, enzymatic hydrolysis, low molecular weight peptides.

Низкомолекулярные вещества пептидной природы, получаемые в результате ограниченного протеолиза белков молока обладают широким спектром биологической активности, воздействуя на иммунную, нервную, сердечно-сосудистую системы организма [1]. За рубежом налажено производство кисломолочных напитков функционального назначения, содержащих в качестве одного из биологически активных компонентов низкомолекулярные пептиды (НМП), способствующие, в основном, понижению артериального давления [2]. Вместе с тем, дальнейшие изыскания в данном направлении, по-прежнему, представляются актуальной задачей.

В данной работе исследовались биотехнологические и физико-химические закономерности молекулярно-массового распределения (ММР) продуктов протеолиза и накопления пептидов в диапазоне молекулярных масс 1,4-4,6 кДа в процессе расщепления белков молока многокомпонентным ферментным препаратом «Панкреатин».

ММР продуктов расщепления белков молока анализировали методом эксклюзионной аналитической гель-проникающей хроматографии на колонках с носителями, обладающими характеристиками пористости, наиболее подходящими для получаемых ферментативных гидролизатов молочных белков. Линейные области частных калибровочных кривых для Sephadex G-75-medium ($y = -0,0546x + 5,8857$, стандартная ошибка 0,0349, коэффициент корреляции 0,9951) и G-50-medium ($y = -0,0727x + 6,3127$, стандартная ошибка 0,2045, коэффициент корреляции: 0,9624) представлены на рисунках 1 и 2 соответственно. Математическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием пакетов программ MS Office 2010, CurveExpert 1.4.

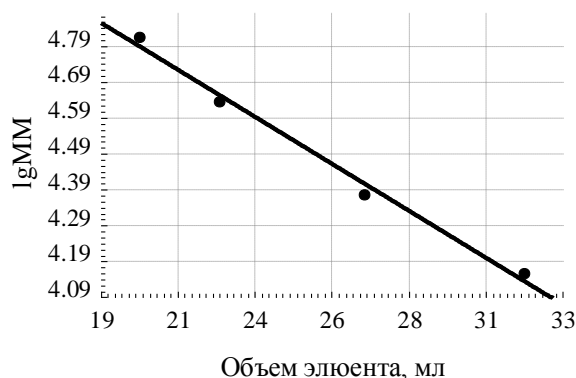


Рисунок 1. Калибровочная кривая Sephadex G-75-medium

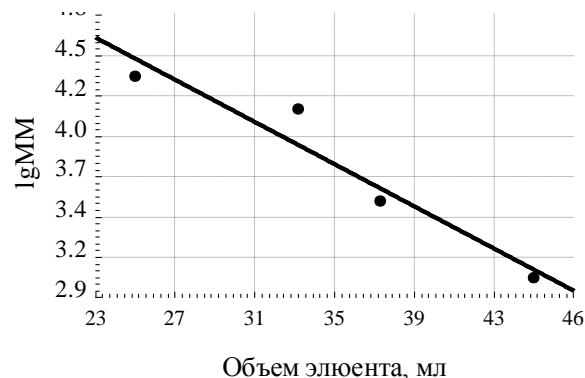


Рисунок 2. Калибровочная кривая

Sephadex G-50-medium

Ферментный препарат «Панкреатин» наиболее активен при рН 5,5-5,7, в то время как отдельно взятые трипсин и химотрипсин, входящие в него имеют оптимумы каталитической активности при рН 7,8-8,0 и 7,9-9,0 соответственно.

В процессе протеолиза происходит высвобождение карбоксильных групп, которые способны снижать кислотность среды, что приводит к ингибированию ферментов [2]. В связи с этим, было изучено ММР низкомолекулярных фракций пептидов, а также зависимость выхода НМП от рН молока в диапазоне 6,5-8,5 (таблица 1).

Таблица 1. Зависимость ММР гидролизатов от рН-статирования

№	Диапазон молекулярных масс, кДа	Относительное распределение фракций, %				
		рН 6,5	рН 7,0	рН 7,5	рН 8,0	рН 8,5
1	Более 98	21,7	13,7	6,1	5,5	5,9
2	6,5 – 98	7,6	7,1	5,2	5,9	8,1
3	4,6 – 6,5	11,6	12,4	14,4	14,7	14,8
4	1,4 – 4,6	59,1	66,8	74,3	73,9	71,2

Как следует из данных таблицы 1, наибольший выход низкомолекулярных фракций 1,4 – 4,6 кДа происходит в интервале рН 7,5-8,0. Необходимо отметить, что первоначальное значение рН реакционной смеси 6,65-6,68 уменьшалось на 0,6-0,7 единиц в течение первых двух часов термостатирования и далее оставалось неизменным на протяжении всего процесса, что, по-видимому, косвенно свидетельствует о компенсаторном влиянии высвобождающихся при протеолизе кислотных и основных групп.

Согласно экспериментальным данным, приведенным в таблице 2, накопление НМП в продуктах протеолиза после 4 часов увеличивалось незначительно, в то время как большая продолжительность ферментации повышала вероятность микробиальной молока. В дальнейших исследованиях продолжительность ферментации принята равной 4 ч.

Таблица 2. Зависимость ММР гидролизатов от продолжительности ферментации

№	Диапазон молекулярных масс, кД	Относительное распределение фракций, %					
		2 ч	4 ч	8 ч	12 ч	24 ч	48 ч
1	Более 98	7,3	5,6	4,8	2,2	2,6	2,2
2	6,5 – 98	7,8	8,0	8,1	9,7	9,5	8,3
3	4,6 – 6,5	17,6	12,5	11,9	11,4	9,8	12,1
4	1,4 – 4,6	67,3	73,9	75,2	76,7	78,1	77,4

Рационализация по температурному показателю выявила, что наибольшее относительное содержание НМП образуется при $43 \pm 1^\circ\text{C}$ (таблица 3).

Таблица 3. Зависимость ММР гидролизатов от температуры ферментации

№	Диапазон молекулярных масс, кД	Относительное распределение фракций, %			
		35°C	43°C	50°C	55°C
1	Более 98	18,6	4,9	6,8	11,7
2	6,5 – 98	29,5	7,2	6,2	3,2
3	4,6 – 6,5	38,7	15,1	17,7	19,0
4	1,4 – 4,6	13,2	72,8	69,3	66,1

Исследования влияния ФСС на выход различных фракций гидролизата (таблица 4), показали, что относительное содержание всех фракций, кроме НМП, с уменьшением ФСС постепенно снижается. Фракция НМП достигает высокого значения при соотношении фермент÷субстрат $1 \div 25$ и дальнейшее увеличение данного показателя не вызывает повышение содержания НМП.

Таблица 4. Зависимость ММР гидролизатов от ФСС

№	Диапазон молекулярных масс, кДа	Относительное распределение фракций, %				
		ФСС				
		1÷100	1÷50	1÷25	1÷12	1÷6
1	Более 98	11,6	7,7	5,3	4,9	4,2
2	6,5 – 98	20,1	13,4	4,5	4,8	6,1
3	4,6 – 6,5	19,0	16,8	14,4	14,0	13,7
4	1,4 – 4,6	49,3	62,1	75,8	76,3	76,0

На заключительном этапе работы проведены исследования по влиянию высокотемпературной обработки ($86\pm 1^\circ\text{C}$, продолжительность 15 мин) на НМП, с целью инактивации ферментного препарата, которые показали отсутствие значительных изменений пептидного профиля в целом и выхода фракции НМП в частности.

Выводы.

1. Определены качественный и количественный составы пептидных фракций, и ММР продуктов ограниченного протеолиза белков молока ферментным препаратом «Панкреатин»;
2. Длительность процесса ферментации свыше 4-х часов нецелесообразна;
3. Целесообразные условия ферментации молока с целью получения фракции НМП: без использования рН-стагирования, температура и продолжительность ферментации $43\pm 1^\circ\text{C}$ 4 ч соответственно, фермент-субстратное соотношение 1:25.

Список литературы:

1. Bahareh Hajirostamloo. Bioactive Component in Milk and Dairy Product. World Academy of Science, Engineering and Technology. №72. 2010.
2. Handbook of Food Products Manufacturing. Edited by Y. H. Hui. Western California. 2009. 1131 pp.
3. Круглик В.И. Теоретическое обоснование и практическая реализация технологий гидролизатов молочных белков и специализированных продуктов с их использованием: Автореферат диссертации на соиск. уч. степ. докт. техн. наук / В. И. Круглик. - Кемерово, 2008.