

УДК 637.147.2:577.122.2

М.Г. Курбанова, О.Н. Бондарчук, С.М. Масленникова**ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГИДРОЛИЗА КАЗЕИНА МОЛОКА
ЭНДОПЕПТИДАЗАМИ**

Представлено описание биологической и пищевой ценности белков, в том числе и казеина, рассмотрен аминокислотный состав всех фракций казеина. Пептиды, полученные в результате гидролиза эндопептидазами, способны в большей степени, чем свободные аминокислоты, повышать биодоступность эссенциальных микронутриентов: кальция, цинка и, возможно, железа. Также представлены результаты исследований ферментативного гидролиза казеина под действием эндопептидаз: степень гидролиза, фракционный состав казеина в результате его обработки ферментами и аминокислотный состав полученных гидролизатов.

Казеин, ферменты, пептиды, аминокислоты, эндопептидазы, гидролиз.

Введение

Среди всех пищевых веществ белок играет наиболее важную, уникальную роль в жизнедеятельности живого организма. Он характеризуется исключительным разнообразием биологических функций, включая пластическую, каталитическую (ферментативную), структурную, двигательную-сократительную, защитную (иммунную), регуляторную (гормональную), транспортную, рецепторную и другие [1, 4, 5]. В процессах обмена веществ большие количества белка постоянно подвергаются катаболическому распаду с образованием в конечном счете низкомолекулярных азотистых продуктов, которые выводятся с мочой.

Биологическая ценность белков пищевых продуктов зависит от количества и соотношения в них аминокислот, в частности незаменимых, каждая из которых играет определенную биологическую роль. Особо дефицитными являются лизин, метионин и триптофан. Потребность взрослого человека в лизине 3–5 г в сутки; недостаток его в организме приводит к нарушению роста, кровообращения, кальцификации костей, уменьшению содержания гемоглобина в крови. Метионин участвует в обмене жиров и фосфатидов, является наиболее сильным липотропным (предупреждающим ожирение печени) средством, участвует в обмене цианокобаламина (витамина В₁₂) и фолиевой кислоты. Он необходим для нормальной деятельности надпочечников. Суточная потребность человека в метионине – 1 г. Триптофан способствует росту, образованию гемоглобина, сывороточных белков, участвует в процессе восстановления тканей. Потребность в нем организма составляет 1 г в сутки. Фенилаланин участвует в обеспечении функции щитовидной железы и надпочечников. Лейцин, изолейцин и треонин влияют на процессы роста. При недостатке лейцина уменьшается масса тела, возникают изменения в почках и щитовидной железе. Недостаток валина приводит к расстройству координации движений. Гистидин входит в состав гемоглобина, его недостаток или избыток в организме ухудшает условнорефлекторную деятельность. Аргинин

принимает участие в образовании мочевины – конечного продукта обмена белков.

Заменимые аминокислоты выполняют в организме разнообразные функции и играют не меньшую физиологическую роль, чем незаменимые. Так, например, глутаминовая кислота является единственной кислотой, поддерживающей дыхание клеток мозга. Высокая биологическая ценность белков молока обусловлена составом, сбалансированностью незаменимыми аминокислотами, их хорошей перевариваемостью и усвояемостью в живом организме. Такие незаменимые аминокислоты, как триптофан, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин и валин, содержатся в белках молока в больших количествах, чем в белках рыбных, мясных и растительных продуктов. Молочные белки обогащены лизином и треонином.

Одним из наиболее ценных белков молока является казеин, его содержание колеблется от 2,3 до 2,9 %. Он является собственно пищевым белком, выполняющим в организме структурную функцию. Кроме того, казеин транспортирует в составе своих частиц кальций, фосфор и магний. Транспортные функции также выполняют лактоферрин и β-лактоглобулин, иммуноглобулины обладают защитными свойствами, α-лактальбумин – регуляторными и т. д. Казеин содержит несколько фракций, отличающихся аминокислотным составом, отношением к ионам кальция и сычужному ферменту. В молоке казеин находится в виде специфических частиц, представляющих собой сложные комплексы фракции с коллоидным фосфатом кальция, представленных на рис. 1.

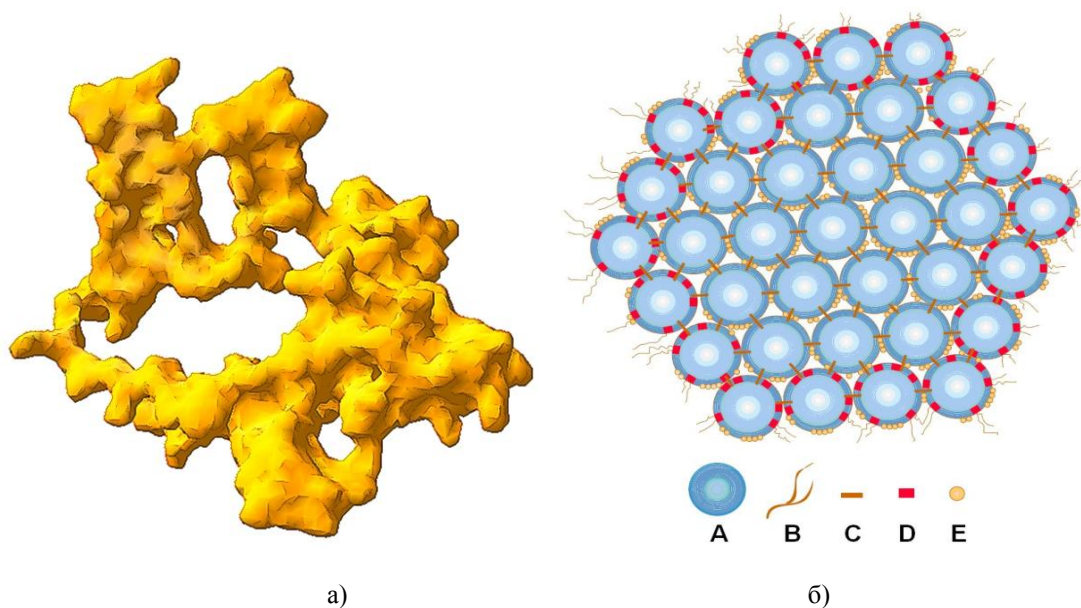


Рис. 1. Мицелла казеина: а – молекулярная поверхностная модель γ -казеина; б – модель мицеллы казеина: А – субмицелла $d = 10\text{--}20$ нм; В – казеинмакропептид; С – фосфат кальция; D – γ -казеин; Е – группы фосфата (ККФК)

В практике под казеином понимают комплекс фракций (α_{S1} -, α_{S2} -, χ -, β -, γ_1 -казеинов), осаждаемых из обезжиренного молока при подкислении его до рН 4,6. Очищенный казеин, выделенный из молока с помощью уксусной кислоты, представляет собой аморфный порошок белого цвета, без запаха и вкуса, практически не растворимый в воде, растворимый в слабых растворах щелочей, солей щелочных и щелочноземельных металлов и минеральных кислот. Он может быть разделен на фракции, различающиеся по составу и свойствам. Элементарный средний состав нефракционированного казеина (в %) следующий: углерод – 53; водород – 7,1; азот – 15,63; кислород – 22,6; сера – 0,82; фосфор – 0,85 [1, 3]. Аминокислотный состав фракций казеина представлен в табл. 1.

Гидролиз белков направлен на расщепление пептидной связи при участии молекулы воды. Реакция протеолиза казеина протекает постепенно и ступенчато: полипептид – пептон – олигопептид – дипептиды – аминокислоты. Ее можно остановить на любой стадии, изменив одно из условий.

Белковый гидролизат – продукт с содержанием свободных аминокислот и низкомолекулярных полипептидов. Ферментативный способ гидролиза является более предпочтительным по сравнению с химическим, так как проводится в более мягких условиях (при температуре 30–65 °С, среда рН может колебаться от 4,0 до 8,5 в зависимости от ферментного препарата) [5]. При этом не происходит разрушения аминокислот, однако образуется сложная смесь продуктов распада белков с различной молекулярной массой. Это позволяет перевести белковый материал в хорошо растворимые пептидно-аминокислотные смеси [2, 4].

Таблица 1

Аминокислотный состав фракций казеина

Аминокислота	Содержание, %, в			
	α_{S1} -казеине	χ -казеине	β -казеине	γ_1 -казеине
Глицин	3,00	1,31	2,40	1,50
Аланин	3,40	5,41	1,70	2,30
Валин	5,60	5,10	10,20	0,50
Лейцин	9,40	6,08	11,60	12,00
Изолейцин	6,00	6,14	5,50	4,40
Пролин	8,20	8,78	16,00	17,00
Фенилаланин	5,60	4,07	5,80	5,80
Цистеин + цистин	–	1,40	–	–
Метионин	3,00	1,00	3,40	4,10
Триптофан	2,00	1,05	0,83	1,20
Аргинин	4,40	4,00	3,40	1,90
Гистидин	3,30	1,67	3,10	3,70
Лизин	8,70	5,76	6,50	6,20
Аспарагиновая кислота	8,44	7,30	4,90	4,00
Глутаминовая кислота	23,60	17,35	23,20	22,90
Серин	6,40	6,09	6,80	5,50
Треонин	2,50	6,64	5,10	4,40
Тирозин	7,40	7,40	3,20	3,70

Их соотношение зависит от свойств фермента, используемого сырья и условий проведения процесса. С целью получения гидролизата с максимальным содержанием низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот отработаны оптимальные условия для проведения гидролиза пищевых белков [3].

За последние годы значительно изменились представления о протеолитических ферментах. Согласно классификации Бергмана, подкласс пептид-гидролаз

делится на две группы: эндопептидазы и экзопептидазы, которые различаются специфичностью действия на субстрат. Эндопептидазы гидролизуют пептидные связи, отщепляя последовательно концевые аминокислоты. Эндопептидазы могут действовать на центральные участки пептидной связи и расщеплять молекулу белка на более мелкие фрагменты. Экзопептидазы не могут гидролизовать пептидные связи, находящиеся в середине цепи, и действуют, отщепляя последовательно одну за другой концевые аминокислоты [2, 3, 4].

Максимально достигаемый уровень гидролиза зависит от природы белка и специфичности ферментов [1, 2].

В последние 10–15 лет в педиатрической практике широко применяют продукты со специально заданным составом, созданные на основе гидролизатов молочного белка. В качестве основы указанных продуктов используют казеин. Ферментативный гидролиз белковой основы продукта позволяет существенно снизить ее антигенные свойства. Чем выше степень гидролиза, тем ниже антигенный потенциал смеси.

Целью работы являлось изучение гидролиза казеина молока под действием протеолитических ферментов.

Объекты и методы исследований

Экспериментальные исследования проводили с учетом современной методологии исследования сложных явлений с помощью общепринятых, стандартных и оригинальных методов биохимического, физико-химического анализа с использованием последних достижений науки и техники. В качестве объекта исследований использовали казеин пищевой по ГОСТ Р 53667. Ферментативный гидролиз проводили статическим методом в термостате с перемешиванием при температуре и pH, оптимальных для используемого ферментного препарата, а также согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Гидролиз вели в течение (10,00±0,05) ч, соотношении концентрации фермента к концентрации субстрата-белка 1:50. pH-стагирование осуществляли добавлением 1М раствора гидроокиси натрия или 1М соляной кислоты. По окончании процесса ферментный препарат в составе гидролизата инактивировали нагреванием до температуры 90–95 °С в течение 5–10 мин.

Результаты исследований и их обсуждение

В организме белок под действием пищеварительных ферментов расщепляется до пептидов и аминокислот, аналогичное расщепление можно провести и вне организма. Однако в настоящее время все чаще используют искусственные смеси аминокислот с целью обогащения ими продуктов до физиологической потребности организма согласно утвержденным нормативным документам.

Всасывание коротких пептидов происходит более быстро и полно в сравнении с эквивалентными по составу смесями аминокислот; пептидные смеси в сравнении с аминокислотными имеют значительно меньшую осмолярность, что улучшает их усвоение в организме человека; некоторые пептиды, образующиеся при ограниченном протеолизе белков молока,

могут обладать определенными важными видами биологической активности, отсутствующими у свободных аминокислот.

Нами выбраны два ферментных препарата, которые обладают эндопептидазной активностью (табл. 2).

На первом этапе изучали влияние технологических факторов на закономерности процесса ферментного гидролиза казеина такими ферментными препаратами протеолитического действия, как химотрипсин и бромелайн, подвергающих гидролизу пептидные связи молекулы белка. Процесс ферментации вели при активной кислотности 7,0, оптимальной температуре для энзиматической системы (55±3) °С в течение (10,00±0,05) ч, при фермент-субстратном соотношении 1:50.

Таблица 2

Характеристика используемых ферментных препаратов

Фермент	Вид фермента	Оптимальный pH	Молекулярная масса, Да	Удельная активность, усл. ед./мг
Химотрипсин	Эндопептидаза	7,0–9,0	27 000	40
Бромелайн		6,8–7,6	33 000	60

В табл. 3 представлен детальный анализ фракционного состава казеина до и после процесса ферментации в присутствии химотрипсина и бромелайна.

Таблица 3

Фракционный состав казеина в результате обработки эндопептидазами

Исходный образец казеина	Массовая доля азота во фракциях, %				
	общее содержание	α_s	β	γ	χ
До ферментации	13,33±0,93	7,17±0,52	2,94±0,23	0,68±0,06	2,54±0,21
После ферментации химотрипсином	4,54±0,36	2,39±0,19	1,12±0,09	0,35±0,03	0,68±0,05
После ферментации бромелайном	4,82±0,39	2,41±0,21	1,04±0,07	0,34±0,02	1,03±0,09

Установлено, что в процессе гидролиза казеина химотрипсином и бромелайном массовая доля азота снизилась соответственно α_s -фракции в 3 раза, β -фракции – в 2,6 и 2,8 раза, γ -фракции – в 2 раза по сравнению с нативным состоянием. При ферментации казеина химотрипсином наибольшей степени биохимических изменений подверглась χ -фракция, массовая доля которой сократилась в 3,73 раза. При таких изменениях общее содержание азота казеиновых фракций снизилось на 8,79 и 8,51 %. Такие биохимические изменения объясняются отщеплением гликомакропептида и его переходом в раствор при ферментатив-

ном гидролизе химотрипсином.

Сравнительный анализ результатов, представленных в табл. 3, свидетельствует о том, что практически все фракции, входящие в состав казеина, наполовину биотрансформировались по сравнению с неферментированным казеином. Степень гидролиза полипептидной цепи с накоплением свободных аминокислот и пептидов в результате 10-часового гидролиза в присутствии химотрипсина и бромелайна составила 32,84 и 34,78 % соответственно, что не превышает 35 % и не противоречит литературным

данным [2, 5]. При этом наибольшая степень гидролиза полипептидной цепи с накоплением свободных аминокислот и пептидов достигается в результате гидролиза таким ферментным препаратом, как бромелайн.

Следующим этапом исследований с целью изучения свойств полученных гидролизатов исследована динамика накопления свободных аминокислот в процессе ферментативного гидролиза химотрипсином и бромелайном. Результаты исследований представлены на рис. 2 и в табл. 4.

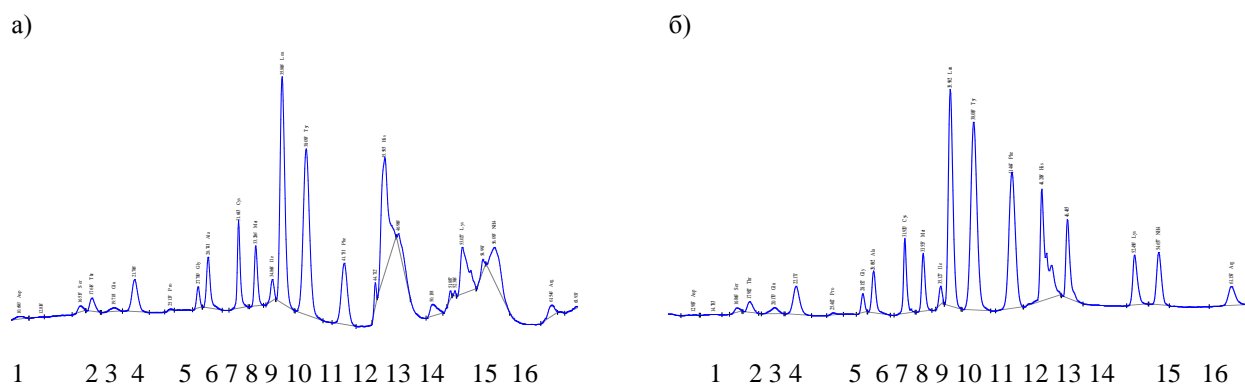


Рис. 2. Хроматографический профиль свободных аминокислот, полученных в результате гидролиза казеина: а) химотрипсином; б) бромелайном; 1 – аспарагиновая кислота; 2 – серин; 3 – треонин; 4 – глутаминовая кислота; 5 – пролин; 6 – глицин; 7 – аланин; 8 – цистеин; 9 – метионин; 10 – изолейцин; 11 – лейцин; 12 – тирозин; 13 – фенилаланин; 14 – гистидин; 15 – лизин; 16 – аргинин

Таблица 4

Динамика накопления свободных аминокислот в результате обработки казеина эндопептидазами, %

Аминокислота	Исходный образец казеина (связанные)	Химотрипсин (свободные)	Бромелайн (свободные)
Незаменимые:			
Валин	6,47±0,40	2,12±0,14	2,33±0,15
Изолейцин	5,48±0,33	1,80±0,13	1,89±0,13
Лейцин	8,27±0,50	2,72±0,22	2,85±0,25
Лизин	7,37±0,45	2,42±0,21	2,54±0,20
Метионин	2,52±0,15	0,83±0,05	0,87±0,07
Треонин	4,40±0,26	1,44±0,11	1,52±0,10
Триптофан	1,08±0,06	0,35±0,02	0,37±0,02
Фенилаланин	4,49±0,26	1,47±0,13	1,55±0,13
Всего	40,08±2,41	13,15±1,01	13,92±1,05
Заменимые:			
Аланин	2,70±0,16	0,89±0,07	0,93±0,06
Аргинин	3,69±0,22	1,21±0,09	1,37±0,11
Аспарагиновая кислота	6,38±0,38	2,10±0,18	2,20±0,17
Гистидин	2,79±0,16	0,92±0,07	0,96±0,07
Глицин	2,43±0,14	0,80±0,05	0,84±0,05
Глутаминовая кислота	20,14±1,20	6,61±0,52	6,94±0,55
Пролин	10,16±0,61	3,34±0,27	3,60±0,24
Серин	5,66±0,34	1,86±0,16	1,95±0,17
Тирозин	5,66±0,34	1,86±0,16	1,95±0,17
Цистеин	0,31±0,01	0,10±0,01	0,11±0,01
Всего	100,00±6,00	32,84±2,62	34,78±1,15

При обработке казеина бромелайном наблюдается наибольшее накопление таких аминокислот, как глутаминовая кислота (массовая доля увеличилась на 4,9 %) и пролин (массовая доля увеличилась на 4,7 %), по сравнению с обработкой химотрипсином. Также можно наблюдать увеличение массовой доли незаменимых аминокислот: концентрация лизина увеличилась на 4,9 %, массовая доля лейцина – на 4,7 %, а концентрация валина в гидролизате, полученном ферментацией бромелайном, увеличилась на 5,2 % по сравнению с гидролизатом, полученным при ферментации химотрипсином. Полученные результаты не противоречат литературным данным [3, 4, 5].

Обобщая результаты экспериментов, следует отметить, что, несмотря на высокую специфичность, исследуемые ферментные препараты различаются способностью к ферментации. Это не противоречит декларируемым свойствам исследуемых ферментных препаратов. Степень гидролиза полипептидной цепи казеина под действием только эндопептидаз невысока, поэтому с целью более полного гидролиза казеина дальнейшие исследования будут направлены на изучение влияния технологических факторов на закономерности процесса ферментативного гидролиза казеина при использовании энзиматических систем, состоящих из экзо- и эндопептидаз, что позволит получить гидролизаты казеина необходимого качества с заданными свойствами для дальнейшего их использования в качестве функциональных добавок.

Список литературы

1. Витолло, А.С. Изучение биологической ценности и усвояемости молочного белка и его гидролизатов / А.С. Витолло, А.М. Сафронова, В.И. Круглик // Пути развития науки и техники в мясной и молочной промышленности: тезисы докладов Всесоюзной конференции. – Углич, 1988. – С. 136.
2. Влияние фракционного состава и степени гидролиза на биологическую ценность и усвояемость молочных белков / А.М. Сафронова, А.С. Витолло, В.И. Круглик и др. // Актуальные проблемы переработки молока и производства молочных продуктов: тезисы докладов Всесоюзного научно-технического симпозиума. – Вологда, 1989. – С. 167–168.
3. Воробьев, М.М. Кинетика ферментативного гидролиза полипептидов и гидрофобные эффекты: дис. ... д-ра хим. наук / Воробьев М.М. – М., 2009. – 273 с.
4. Максимюк, Н.Н. Использование протеолитических ферментов для получения белковых гидролизатов / Н.Н. Максимюк, Л.Я. Телишевская, А.А. Комаров // Ветеринария. – 1993. – № 7. – С. 28–30.
5. Курбанова, М.Г. Исследование и разработка полифункциональных добавок на основе гидролизатов казеина и практическая реализация технологий пищевых продуктов с их использованием: дис. ... д-ра техн. наук / Курбанова М.Г. – Кемерово, 2012. – 394 с.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный
сельскохозяйственный институт»,
650056, Россия, г. Кемерово, ул. Марковцева, 5.
Тел.: (3842) 60-45-70
e-mail: kurbanova-mg@mail.ru

SUMMARY

M.G. Kurbanova, O.N. Bondarchuk, S.M. Maslennikova

**PRACTICAL ASPECTS OF HYDROLYSIS OF MILK CASEIN
BY ENDOPEPTIDASES**

The description of a biological and nutritional value of proteins including casein is presented in this article. The amino acid composition of all casein fractions is considered. The peptides obtained as a result of hydrolysis by endopeptidases are able to increase significantly the bioavailability of essential micronutrients such as calcium, zinc and, possibly, iron. Enzymatic hydrolysates of proteins in comparison with the free amino acids have much better functional properties. The results of studies of enzymatic casein hydrolysis under the action of endopeptidases: the degree of hydrolysis, fractional composition of casein as a result of its processing by enzymes, as well as the amino acid composition of obtained hydrolysates, are shown.

Casein, enzymes, peptides, amino acids, endopeptidases, hydrolysis.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia.
Phone/fax: +7 (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

Kemerovo State Agricultural Institute
5, Street Markovtseva, Kemerovo, 650056, Russia.
Phone: +7 (3842) 60-45-70
e-mail: kurbanova-mg@mail.ru

