

УДК 577.152.7.049
©Зорин, Баяржаргал

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ПИЩЕВЫХ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕКОТОРЫХ КОММЕРЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ И РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ПРОВЕДЕНИЯ ГИДРОЛИЗА

С.Н. Зорин, М. Баяржаргал*

ГУ НИИ питания РАМН, 109240, Москва, Устьинский пр., д. 2/14; тел.: 698-53-71;
эл. почта: mazo@ion.ru

Разработаны схемы получения гидролизатов пищевых белков из различных источников (белки коровьего молока, изолят соевых белков, белки куриного яйца) с использованием современных ферментных препаратов и мембранных технологий. Полученные ферментативные гидролизаты хорошо растворимы в воде, имеют низкую осмолярность и удовлетворительные органолептические свойства. Они могут использоваться как белковый компонент в составе лечебных и специализированных продуктов питания, так и в качестве пептидной матрицы для получения органических форм некоторых эссенциальных микроэлементов.

Ключевые слова: гидролизаты, пищевые белки, ферменты.

ВВЕДЕНИЕ. В большом количестве лечебных продуктов питания (гипоаллергенные, для энтерального и зондового питания и др.) в качестве белкового компонента используются гидролизаты пищевых белков, полученные с использованием ферментных препаратов различной природы и специфичности.

Согласно положениям теории рационального питания академика АМН СССР А.А. Покровского [1] и теории адекватного питания, сформулированной академиком А.М. Уголевым [2], нутритивные потребности организма в наилучшей степени удовлетворяются теми формами пищевых веществ, к которым организм адаптирован в ходе своего эволюционного развития. Поэтому пептидные препараты имеют ряд преимуществ перед смесями кристаллических L-аминокислот. В их числе - значительно меньшая осмолярность, способность ряда пептидов проявлять полезные виды биологической активности при пероральном приеме: стимулирующее влияние пептидов на активность ферментов пристеночного пищеварения, эффекты усиления абсорбции ряда эссенциальных минеральных веществ (кальций, цинк, медь, возможно железо) под действием пептидных фрагментов пищевых белков, а также существенно лучшие, чем у свободных аминокислот, функциональные свойства (растворимость, эмульгирующая способность) [3, 4].

В зависимости от назначения продукта требуются гидролизаты как с различной степенью гидролиза, так и отличающиеся по аминокислотному составу. Наиболее широко в составе лечебных продуктов представлены ферментативные гидролизаты на основе белков коровьего молока (казеина, сыворотки и целого белка). Они легко гидролизуются в одну стадию с использованием обычных коммерческих ферментных препаратов.

Наряду с использованием в качестве субстрата белков коровьего молока, представляется перспективным получение ферментативных гидролизатов из других источников. Для этой цели нами были выбраны белки куриного яйца и изолята белков сои. Белки куриного яйца имеют сбалансированный аминокислотный состав, а соевые белки наряду с широким использованием в пищевой промышленности обладают гипоаллергенным и гипохолестеринемическим действием.

* - адресат для переписки

ГИДРОЛИЗ ПИЩЕВЫХ БЕЛКОВ КОММЕРЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Кроме этого, ферментативные гидролизаты пищевых белков могут использоваться при проведении реакций комплексообразования с некоторыми переходными металлами II группы для получения органических форм данных элементов. Такие комплексы могут использоваться либо в качестве БАД, либо и в составе лечебных и специализированных продуктов питания как источники эссенциальных микроэлементов [5].

МЕТОДИКА. В работе использованы коммерческие препараты “Панкреатин” (из поджелудочной железы крупного рогатого скота производства Санкт-Петербургского мясокомбината, Россия) и “Флавоэнзим” из *Aspergillus oryzae* (производства “Novozymes”, Дания).

На рисунке 1 приведены схемы ферментативного гидролиза данных пищевых белков и получения на их основе комплексов цинка. Стадия тепловой обработки белка куриного яйца позволила снизить ингибирующую активность овомукоида, а использование последовательного гидролиза флавоэнзимом и панкреатином дало возможность перевести в водорастворимую фазу основную часть пептидного материала.

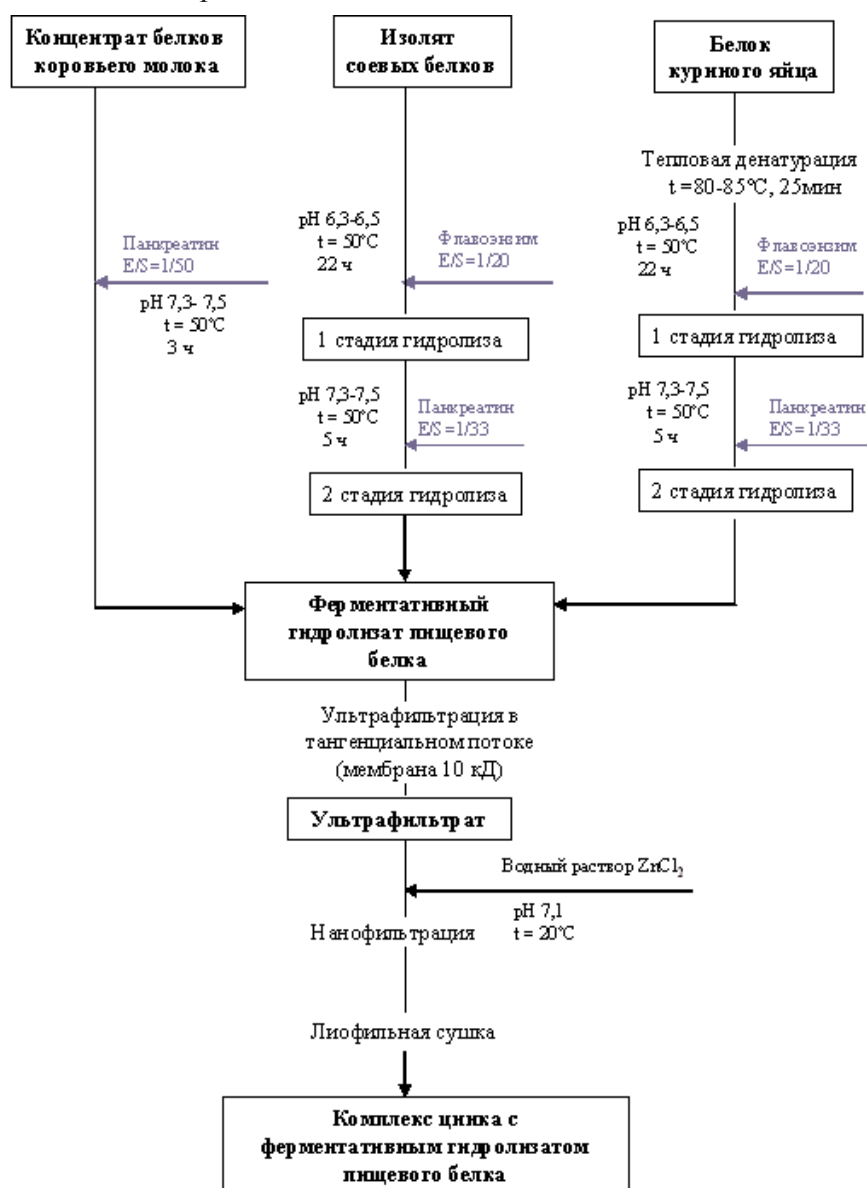


Рисунок 1.

Схема ферментативного гидролиза пищевых белков из различных источников и получения комплексов цинка на их основе.

Содержание ингибитора трипсина определяли по методу Эрлангера в модификации В.А. Шатерникова [6], адаптированному для оценки снижения трипсин-ингибирующей активности овомукоида. Раствор белка куриного яйца подвергали тепловой денатурации при значениях pH 9,6, температуре 80 и 90°C, в течение 15 и 30 минут. Затем растворы охлаждали и центрифугировали при 4000 g 15 минут. В супернатантах оценивали снижение трипсин-ингибирующей активности в результате термической обработки. При проведении анализа использовали трипсин из поджелудочной железы свиньи, тип IX, однократно кристаллизованный, с активностью 17000 ед. БАЭЭ на 1 мг белка ("Sigma", США); субстрат N- α -бензоил-DL-аргинина-4-нитроанилида гидрохлорид (БАПНА) ("Fluka AG", Швейцария); эталонный ингибитор трипсина белков сои (ИТБС), электрофоретически гомогенный, дополнительно очищенный методом аффинной сорбции на трипсин-сефарозе 4В. Содержание ингибитора трипсина в исследуемом образце определяли в условных единицах, эквивалентных содержанию ИТБС, по стандартному графику в координатах: концентрация ИТБС (мг/мл) – ось абсцисс; I (%) – ось ординат.

Ультрафильтрацию ферментативных гидролизатов (для удаления фермента и нерасщепившегося белка) проводили на установке "Минитан" ("Millipore", США) в тангенциальном потоке с использованием мембран с диаметром пор 10 кДа.

Нанофильтрацию (для удаления свободных аминокислот и коротких пептидов, а также неорганических ионов) проводили на лабораторной нанофильтрационной установке производства "Владисарт" (Россия).

Хроматографический анализ проводили методом эксклюзионной хроматографии на колонках Супероза-12 (1,6×50см) и TSK Gel G 2000 SW LX (0,8×30см). В качестве элюента использовали 0,2 М хлористый натрий с добавлением азида Na. Скорость элюирования составляла 2,0 и 0,2 мл/мин соответственно. Регистрацию оптической плотности проводили на проточном ультрафиолетовом детекторе UV-1 ("Pharmacia", Швеция) при длине волны 280 нм [7, 8].

Содержание эссенциальных микроэлементов (цинка, меди, марганца и хрома) в их комплексах с ферментативным гидролизатами определяли методом инверсионной вольтамперометрии на приборе АКВ-07МК ("Аквилон", Россия) по методике фирмы-изготовителя или атомно-абсорбционным методом согласно [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 2 приведены результаты влияния тепловой денатурации на ингибиторную активность овомукоида. Видно, что предварительная тепловая денатурация (90°C, 30 минут при pH 9,6) снизила ингибиторную активность овомукоида более чем в 25 раз. Это позволило путем последовательного использования коммерческих ферментных препаратов ("Флавоэнзим" и панкреатин из поджелудочной железы крупного рогатого скота) получить гидролизаты со средней степенью гидролиза и выходом в растворимую фазу более 95% от исходного белкового материала.

На рисунке 3 приведены эксклюзионные хроматограммы на колонке "Супероза-12" исходного белка куриного яйца, его ферментативного гидролизата и ультрафильтрата (низкомолекулярная фракция, прошедшая через мембрану 10 кДа). Видно, что при данных условиях проведения ферментализации в гидролизате практически отсутствуют высокомолекулярные структуры, которые могут нести антигенные детерминанты исходного белка. Стадия ультрафильтрации лишь незначительно меняет пептидный профиль полученного продукта.

В случае ферментализации изолята белков сои применение аналогичной схемы ферментализации (исключая стадию предварительной тепловой денатурации) также позволило получить гидролизаты с достаточно высокой степенью гидролиза и чрезвычайно высоким (более 97%) выходом белка в водорастворимую фазу.

На рисунке 4 приведены хроматограммы исходного концентрата сывороточных белков коровьего молока Лактопродан 80 (КСБ), а также его гидролизата (при использовании панкреатина) после проведения ультрафильтрации (10 кДа), а также высокомолекулярной и низкомолекулярной фракций, полученных при проведении нанофильтрации данного гидролизата.

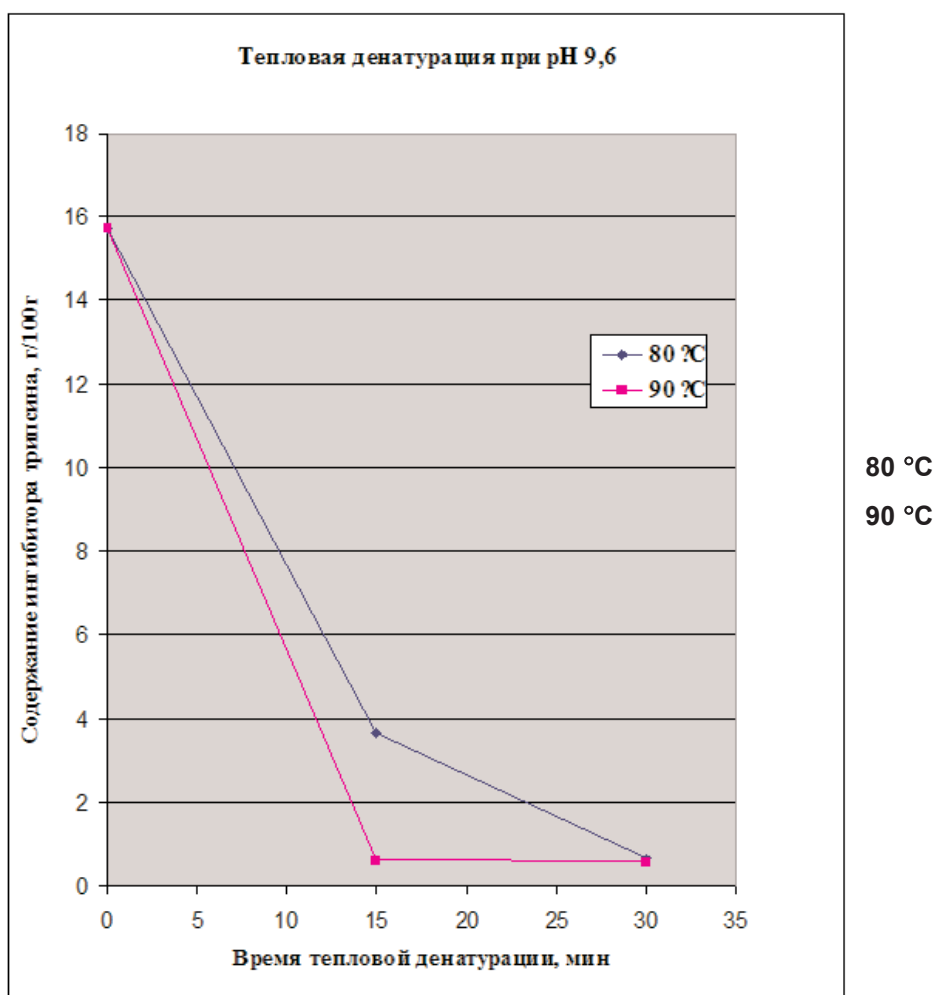


Рисунок 2.

Влияние термической обработки на снижение содержания ингибитора трипсина в растворе яичного белка.

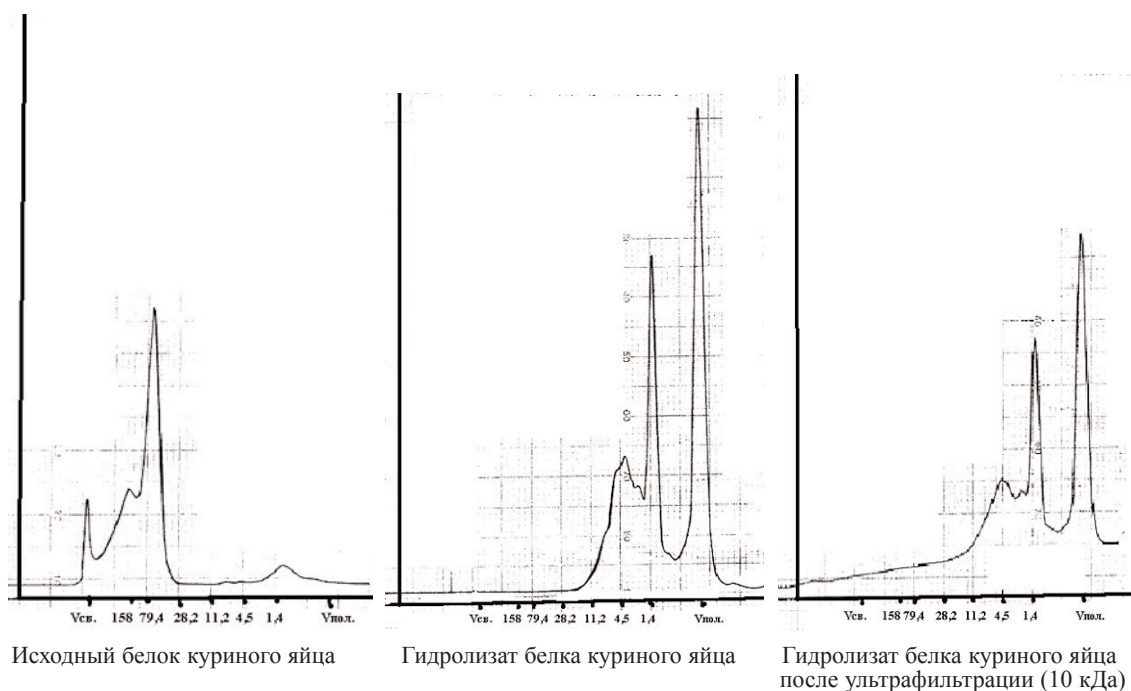


Рисунок 3.

Эксклюзионные хроматограммы (колонка Супероза-12) исходного белка куриного яйца, его гидролизата и ультрафильтрата.
 Колонка - Супероза-12 (1,6×50 см), элюент - 0,2 М NaCl+азид Na. Скорость элюирования 2,0 мл/мин. УФ детектор UV-1 (280 nm). По оси абсцисс - молекулярные массы (кДа).
 По оси ординат - оптическая плотность при 280 нм (отн.ед.).

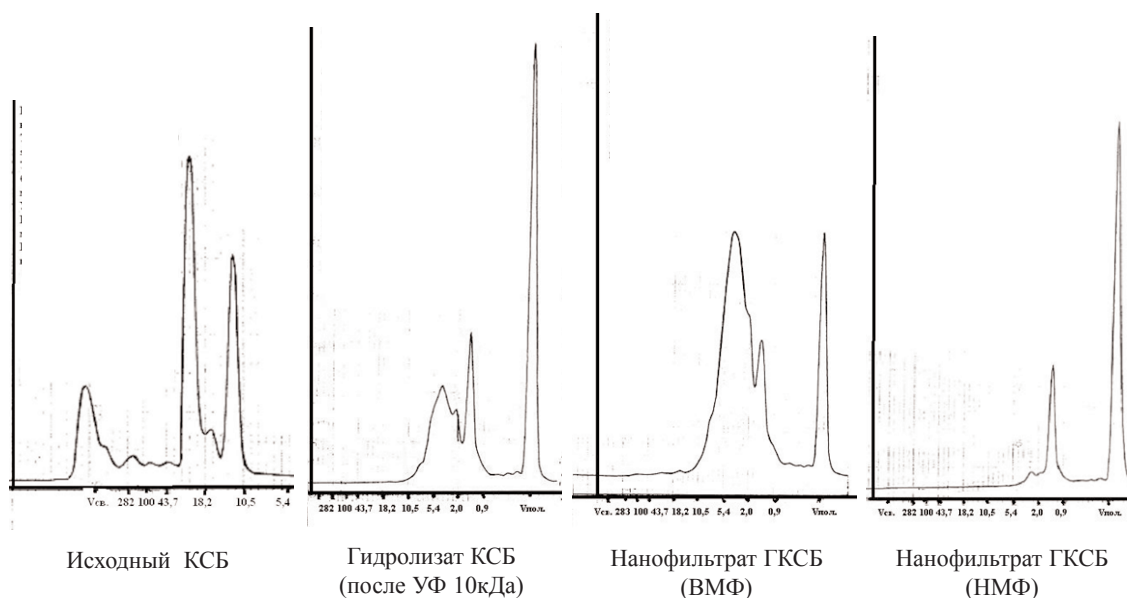


Рисунок 4.

Эксклюзионные хроматограммы. Исходный белок сыворотки коровьего молока (Лактродан 80, Дания), его гидролизат (с ферментом панкреатин) после ультрафильтрации (10 кДа) и нанофильтрации (высокомолекулярная и низкомолекулярная фракции).
 Колонка - TSK GEL G 2000 SWLX (0,8×30 см), элюент - 0,2 М NaCl+азид Na. Скорость элюирования 0,2 мл/мин. УФ детектор 115UV(280 nm).
 По оси абсцисс - молекулярные массы (кДа).
 По оси ординат - оптическая плотность при 280 нм (отн.ед.).

ГИДРОЛИЗ ПИЩЕВЫХ БЕЛКОВ КОММЕРЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Видно, что нанофильтрационная обработка позволяет удалять из пептидно-аминокислотной смеси ионы солей, а также свободные аминокислоты и короткие пептиды. Такая обработка позволяет получать ферментативные гидролизаты пищевых белков с низкой осмолярностью и хорошими органолептическими свойствами (практически отсутствует горечь). Ранее проблема удаления горечи представлялась непреодолимой задачей.

Ферментативные гидролизаты пищевых белков могут использоваться не только как азотистый компонент в составе специализированных продуктов питания различного назначения, но и в качестве исходного сырья для получения органических форм некоторых эссенциальных микроэлементов (цинка, меди, марганца, хрома).

На рисунке 1 приведена общая схема получения комплексов цинка с ферментативными гидролизатами пищевых белков. Аналогичные схемы применяются и для других эссенциальных микроэлементов. Использование стадии нанофильтрации в данном случае позволяет удалить из реакционной смеси несвязавшиеся с пептидно-аминокислотной матрицей ионы металла.

Таблица. Удельное содержание эссенциальных микроэлементов в комплексах с ферментативными гидролизатами пищевых белков.

Микроэлементы	Содержание ЭМ, мг/г комплекса			
	ФГБКМ	ФГБКЯ	ФГИСБ	ФГСБКМ
Zn	72,2	89,6	68,9	47,0
Cu	65,2	90,1	73,1	33,0
Mn	65,8	48,9	44,7	8,7
Cr	2,2	1,6	2,1	2,0

Примечание: ФГБКМ - ферментативный гидролизат белков коровьего молока; ФГБКЯ - ферментативный гидролизат белков куриного яйца; ФГИСБ - ферментативный гидролизат изолята соевых белков; ФГСБКМ - ферментативный гидролизат сывороточных белков коровьего молока.

В таблице приведены данные по содержанию некоторых эссенциальных микроэлементов в составе комплексов с ферментативными гидролизатами пищевых белков. Помимо высокого удельного содержания металла, данные комплексы являются чрезвычайно стойкими в диапазоне pH 2,0-8,0, что соответствует значениям pH желудочно-кишечного тракта на всем его протяжении.

Экспериментальные исследования, выполненные на лабораторных животных (крысах) с использованием в качестве источника цинка, меди, марганца и хрома их комплексов с ферментативными гидролизатами пищевых белков, показали перспективность этих источников органических форм эссенциальных микроэлементов как в составе БАД, так и специализированных продуктов питания [10-12]. Данные комплексы и премиксы на их основе не обладают токсическими и аллергенными свойствами, а также хорошо усваиваются в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Из всего вышесказанного можно заключить, что сочетание использования современных ферментных препаратов и мембранных технологий позволяет получать как ферментативные гидролизаты пищевых белков из различных источников с заранее заданными свойствами, так и органические формы эссенциальных микроэлементов на основе данных гидролизатов.

1. Использование современных ферментных препаратов, а также мембранных технологий (включая нанотехнологии) позволяет получать ферментативные гидролизаты пищевых белков с удовлетворительными органолептическими свойствами, которые могут использоваться как белковый компонент лечебных и специализированных продуктов питания, так и как основа для получения органических форм некоторых эссенциальных микроэлементов.

2. Полученные на основе ферментативных гидролизатов пищевых белков комплексы некоторых эссенциальных микроэлементов (цинка, меди, марганца и хрома) обладают высоким удельным содержанием данных металлов в составе комплекса, хорошей растворимостью и органолептическими свойствами, устойчивы в широком диапазоне значений pH.

3. Экспериментальные исследования, выполненные на лабораторных животных (крысах) с использованием в качестве источника цинка, меди, марганца и хрома их комплексов с ферментативными гидролизатами пищевых белков, показали перспективность этих источников органических форм эссенциальных микроэлементов как в составе БАД, так и специализированных продуктов питания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Покровский А.А.* (1979) Метаболические аспекты фармакологии и токсикологии пищи. Медицина, М.
2. *Уголев А.М.* (1991) Теория адекватного питания и трофология. Наука, С-Пб.
3. *Lahl W.J., Braun S.D.* (1994) Food Technol., №10, 77-85.
4. *Mahmoud M.I.* (1994) Food Technol., №10, 89-95.
5. *Мазо В.К., Зорин С.Н., Зилова И.С.* (2004) Микроэлементы в медицине, **5**(4), 85-87.
6. *Шатерников В.А.* (1970) Исследование ферментов поджелудочной железы и их ингибиторов в норме и при ряде заболеваний органов пищеварительного тракта. Дисс. докт. наук. Институт питания АМН СССР.
7. *Баяржаргал М., Розанцев Э.Г., Зорин С.Н., Бурдза Е.А., Гмошинский И.В., Мазо В.К.* (2005) Хранение и переработка сельхозсырья, № 4, 34-36.
8. *Мазо В.К., Зорин С.Н., Баяржаргал М., Гмошинский И.В., Бурдза Е.А.* (2005) Вопросы детской диетологии, **3**(5), 19-21.
9. *Скурихин И.М., Тутельян В.А.* (1998) Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов, Брандес-Медицина, М.
10. *Зорин С.Н.* (2007) Материалы научно-практических конгрессов III всероссийского форума "Здоровье нации - основа процветания России", Москва, с. 59-61.
11. *Мазо В.К., Зорин С.Н., Гмошинский И.В.* (2004) Вопросы детской диетологии, **2**(4), 12-14.
12. *Гмошинский И.В., Зорин С.Н., Баяржаргал М., Сафронова А.М., Мартынова Е.А., Шилина Н.М., Гмошинская М.В., Мазо В.К.* (2007) Микроэлементы в медицине, **8**(1), 21-23.

Поступила: 02. 07. 2007.

PREPARATION OF FOOD PROTEINS ENZYMATIC HYDROLYSATES OF DIETARY PROTEINS USING SOME COMMERCIAL ENZYME PREPARATIONS AND VARIOUS SCHEMES OF HYDROLYSIS

S.N. Zorin, M. Baiargargal

State Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Science, Moscow, 109240 Russia;
tel.: 698-53-71; e-mail: mazo@ion.ru

Schemes of enzymatic hydrolysis of dietary proteins from various sources (proteins of the cow milk, soy isolate proteins, proteins of chicken eggs) with using modern enzymatic preparations and membrane technologies have been developed. Resultant enzymatic hydrolysates possessed good solubility in water, had low osmolarity and satisfactory organoleptic properties. They may be used as a protein component of clinical and specialized foods, and as a peptide matrix for reception of some trace elements organic forms.

Key words: hydrolysates, food proteins, enzymes.