

# Зависимость пенообразования в системах на основе сывороточных белков от режима протеолиза

**Евгения Юрьевна Агаркова**, канд. техн. наук, старший научный сотрудник  
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности  
E-mail: e\_agarkova@vniimi.org

Регулировать пенообразующие свойства сывороточных белков возможно при помощи их ферментативной обработки. В литературных источниках есть данные о тенденции повышения плотности пены растворов  $\beta$ -лактоглобулина, гидролизованных трипсином или субтилизином при увеличении продолжительности протеолиза, в отличие от пены пепсиновых гидролизатов. Наиболее стабильные пены на основе 3,4 %-ного раствора  $\beta$ -лактоглобулина получены при протеолизе пепсином в условиях pH-статирования при 7,5 ед. и 60 °C в течение 5 мин. В другом исследовании для гидролиза 10 %-ных растворов концентратов сывороточных белков использовали грибковую протеазу при 45 °C (pH 7,6) и папаин при 45 °C (pH 6,2). Ферментативная обработка грибной протеазой привела к увеличению пенообразующей способности при продолжительности гидролиза до 40 мин и 20 мин при использовании папаина, но стабильность пены снизилась во всех образцах. Описан протеолиз 4 %-ного раствора сывороточного изолята с последующим формированием белковых волокон при 55 °C и pH 7,7 ед. в течение 5 ч с использованием ферментного препарата «Corolase N». Фибриллированные белки на основе негидролизованного белка отличались наилучшей стабильностью пены, а гидролизованные имели самые высокие значения пенообразующей способности. Сделан вывод о том, что с точки зрения получения стойкой пены представляет интерес использование композиций белков нативных и подвергнутых гидролизу.

**Ключевые слова:** белки молочной сыворотки, гидролиз, ферменты, пены, пенообразующие свойства.

**Agarkova E.Yu. Study of the dependencies of foaming in whey proteins-based systems on the modes of proteolysis**  
**All-Russian Dairy Research Institute**

It is possible to regulate the foaming properties of whey proteins with the help of their enzymatic processing. In the literature there is evidence of a tendency to increase the density of  $\beta$ -lactoglobulin solutions hydrolyzed with trypsin or subtilisin with an increase in the duration of proteolysis, unlike pepsin hydrolysates. The most stable foams based on a 3,4 % solution of  $\beta$ -lactoglobulin were obtained by proteolysis with pepsin under pH-stating conditions at 7,5 units. and 60 °C for 5 minutes. In another study, fungal protease at 45 °C (pH 7,6) and papain at 45 °C (pH 6,2) were used for hydrolysis of 10 % solutions of whey protein concentrates. Enzymatic treatment with fungal protease resulted an increase in foaming capacity during hydrolysis up to 40 min and 20 min when using papain, but foam stability decreased in all samples. Proteolysis of a 4 % solution of whey isolate with subsequent formation of protein fibers at 55 °C and pH 7,7 is described. for 5 hours using the enzyme preparation «Corolase N». Fibrillated proteins based on non-hydrolyzed protein had the best foam stability, and hydrolyzed proteins had the highest values of foaming ability. From the point of view of obtaining resistant foams, it is of interest to use compositions of native and hydrolyzed proteins.

**Key words:** whey proteins, hydrolysis, enzymes, foams, foaming properties.

Сывороточные протеины часто применяются в различных отраслях пищевой индустрии [1–3]. Они обладают рядом ценных биологических эффектов [5, 6] и при этом имеют способность к эмульгированию, влагоудерживанию и пенообразованию. Интерес к данным свойствам обусловлен широким спектром возможностей их изменения в зависимости от технологических целей [7–9]. На сегодняшний день существует несколько направлений по регулированию структуры пищевых систем, подвергнутых аэрированию, содержащих сывороточные белки [10, 11]. Наиболее перспективным и востребованным является применение такого способа модификации белков, как биокаталитическая конверсия [12].

Основная проблема состоит в отсутствии корреляции между такими свойствами сывороточных белков, как способность образовывать пену и ее стабильность. Благодаря гибко регулируемым режимам протеолиза возможно максимально сбалансировать эти свойства и получать стабильные пенные системы на основе сывороточных белков [4–6].

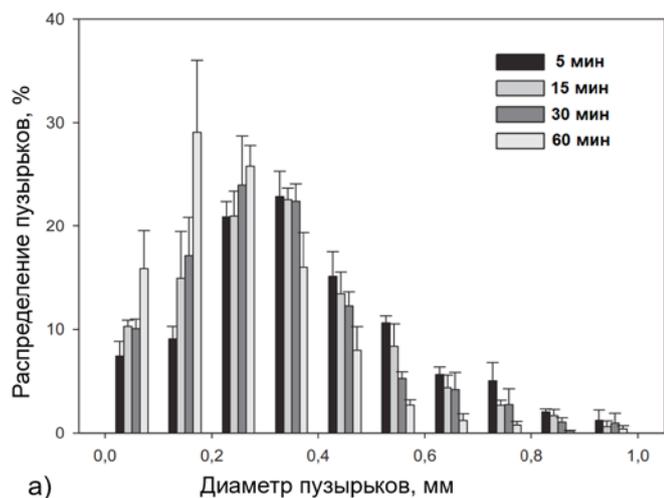
Целью исследования является изучение зависимости формирования пенообразующих свойств сывороточных белков от режимов их биокаталитической конверсии.

Специалисты Департамента безопасности и качества молока и рыбных продуктов (Германия) проводили исследования пенообразующих свойств изолированного  $\beta$ -лактоглобулина, подвергнутого протеолизу. Авторы работы улучшали межфазные свойства белка посредством ча-

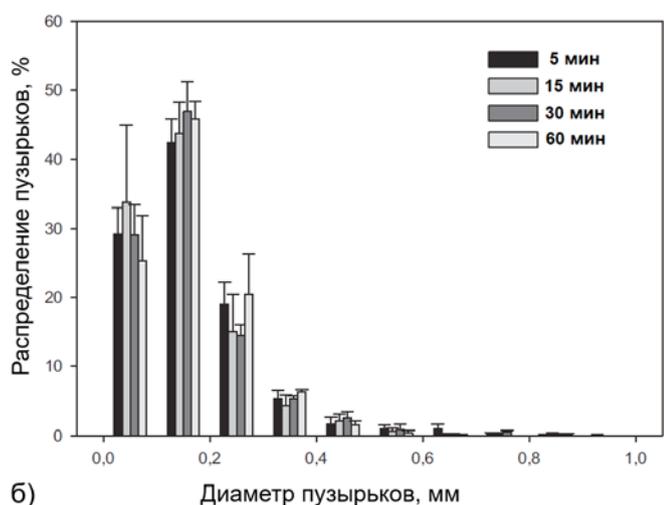
стичного гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина трипсином, пепсином и субтилизином. Данные ферментные препараты наиболее часто используются для протеолиза сывороточных белков [7, 8]. Кислотность растворов исходного изолята сывороточного белка (от 20 до 30 %) доводили 1 М раствором соляной кислоты до 3,8 ед. pH при 56 °C в течение 30 мин для осаждения всех сывороточных белков, кроме  $\beta$ -лактоглобулина. Далее осуществляли центрифугирование при 5000 RCF и 25 °C в течение 60 мин, после чего получали лиофилизированный концентрат с содержанием  $\beta$ -лактоглобулина 98 % в сухом веществе [9]. Процесс протеолиза осуществлялся в условиях pH-статирования при 7,5 ед. и 60 °C в течение 5, 15, 30 и 60 мин; ферменты инактивировали 10 мин при 90 °C.

Вспенивание 3,4 %-ного раствора  $\beta$ -лактоглобулина и гидролизатов и определение характеристик пены (взбитость, дренаж, плотность) проводили, как описано в работе [10]. Под показателем «дренаж» (в %) понимается отношение массы слитой через воронку жидкости пенной системы к общему весу пенной массы, умноженное на 100. Было установлено, что в целом плотность пен, полученных на основе гидролизатов, ниже, чем пен исходного раствора  $\beta$ -лактоглобулина. При этом в пенах, полученных из белковых растворов, гидролизованных трипсином или субтилизином, зафиксировано увеличение плотности с увеличением продолжительности протеолиза, а плотность пен пепсиновых гидролизатов снижается [9].

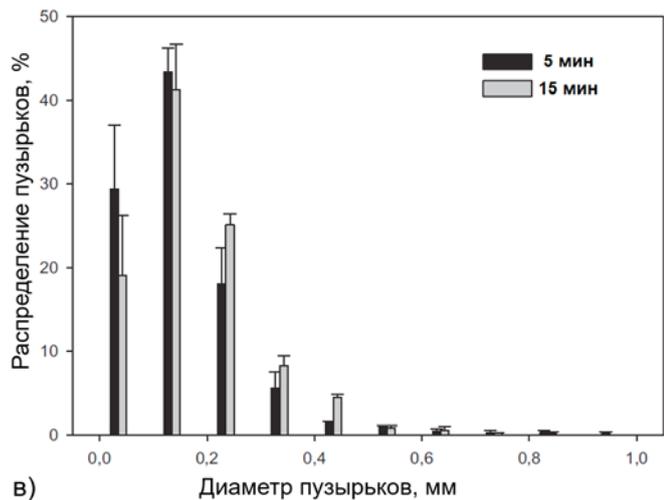
Также было показано, что средний диаметр пузырьков пены сильно различается в зависимости от используемой ферментной системы и продолжительности протеолиза. Средний диаметр пен пузырьков трипсиновых, пепсиновых и субтилизиновых гидролизатов, выдержанных в те-



а) Диаметр пузырьков, мм



б) Диаметр пузырьков, мм



в) Диаметр пузырьков, мм

Распределение размеров пузырьков пен гидролизатов с различной продолжительностью протеолиза после 1 мин взбивания: а – трипсиновые гидролизаты; б – пепсиновые гидролизаты; в – субтилизиновые гидролизаты

чение 1 мин, составил 0,38–0,24, 0,17–0,15 и 0,18–0,17 мм соответственно. С увеличением продолжительности гидролиза пузырьки пен трипсиновых и пепсиновых гидролизатов начинают незначительно укрупняться, в то время как пены на основе гидролизатов, полученных при использовании субтилизина (продолжительность протеолиза 15 мин), разрушаются сразу после приготовления (см. рисунок) [9].

Показатель дренажа пен варьировался незначительно (от 88,3 до 97,7 %), за исключением пены, полученной после 5 мин обработки пепсином, и составил  $41,8 \pm 4,96$  %. Следовательно, протеолиз раствора  $\beta$ -лактоглобулина пепсином в течение 5 мин при описанных выше условиях позволяет получить наиболее стабильную пенную систему [1, 9].

В то же время в обзоре Thao с соавторами сообщается, что при небольшой степени протеолиза (от 2,5 до 3,0 %) раствора изолята сывороточных белков (ИСБ) теми же ферментными препаратами увеличивалась как пенообразующая способность, так и стабильность пены. Данный факт указывает на то, что помимо  $\beta$ -лактоглобулина другие сывороточные белки влияют на процессы пенообразования и формирования структуры пенных масс [4–6, 11].

Другой пример регулирования пенообразующих свойств белков путем протеолиза описан индийскими учеными при разработке предназначенных для взбивания напитков, состоящих из гидролизованного концентрата сывороточных белков (КСБ), сухого обезжиренного молока, какао, жидкой глюкозы, сахара и растительного жира. Гидролиз 10 %-ных растворов КСБ проводили с использованием грибной протеазы и папаина с временными интервалами 20, 40 и 60 мин. При гидролизе грибной протеазой кислотность доводили 1 Н раствором NaOH до 7,6 ед. pH, процесс протекал при 45 °С; в случае папаина pH составил 6,2 ед., уровень кислотности регулировали 1 Н раствором HCl при 55 °С.

После инактивации ферментов гидролизаты центрифугировали 20 мин при 6000 RCF, супернатант собирали и лиофилизировали. Помимо пенообразующей способности были исследованы влагоудерживающие и эмульгирующие свойства, являющиеся маркерами стабильности любой пищевой системы. Зафиксировано возрастание по сравнению с контролем более чем в 3 раза влагоудерживающей способности с увеличением длительности протеолиза в случае применения обоих ферментов [12]. Это можно объяснить диссоциацией белков на более мелкие субъединицы с большим количеством сайтов связывания воды [13]. Эмульгирующая способность, напротив, снижалась с увеличением продолжительности процесса. Эмульгирующая способность белков связана с их способностью снижать поверхностное натяжение между гидрофобными и гидрофильными компонентами пищевых систем [14, 15].

Ферментативная обработка привела к увеличению пенообразования при продолжительности гидролиза грибной протеазой до 40 мин и 20 мин при использовании папаина. При этом стабильность пены снизилась во всех образцах, что говорит о необходимости применения дополнительных стабилизирующих компонентов [12, 16, 17].

Интересный способ получения стабильных пенных масс на основе гидролизованных сывороточных белков был предложен Moayedzadeh S. и Madadlou A. Перед проведением протеолиза 4 %-ный раствор изолята сывороточных белков перемешивали при 20 °С в течение 2 ч и хранили 12 ч при 4 °С для полной гидратации. Сам процесс проводили

5 ч при 55 °С и pH 7,7 с помощью препарата «Corolase N» при соотношении фермент-субстрат 1:100. Раствор постоянно перемешивали при 100 RCF на протяжении всего времени гидролиза, затем фермент инактивировали нагреванием до 85 °С в течение 10 мин. На основе гидролизатов были сформированы фибриллярные белки по методу, разработанному Loveday [18]. Для этого кислотность раствора ИСБ и гидролизата сывороточных белков (ГСБ) доводили до 2,0 ед. pH 8 М HCl с последующим нагреванием при 85 °С в течение 5 ч при постоянной скорости перемешивания (не менее 100 RCF). Для остановки процесса фибрилляции белков образцы быстро охлаждали до 30 °С холодной водопроводной водой со скоростью примерно 10 °С в минуту и подвергали сублимационной сушке [19]. Исследование пенообразующих свойств проводили по методике, изложенной в [20].

Было установлено, что фибриллированные белки на основе КСБ отличались самыми высокими, в 10 раз больше, значениями стабильности пены по сравнению с исходным раствором КСБ. При этом ГСБ, как фибриллированные белки, так и не имели самые высокие значения пенообразующей способности. Это связано с тем, что пептиды гидролизатов взбиваются интенсивнее из-за более высокой межфазной активности, а агрегаты сывороточного белка, находящиеся в КСБ, способствуют уменьшению дренажа пены и повышению ее стабильности [19].

## ВЫВОДЫ

- Изложенные выше данные позволяют говорить о перспективности использования приемов протеолиза для улучшения пенообразующей способности белков молочной сыворотки.
- Для получения гидролизатов, предназначенных для создания на их основе пенных систем, наиболее часто используются ферментные препараты субтилизин, пепсин и трипсин. Установлено, что даже низкая концентрация белка в растворе и непродолжительная ферментативная обработка приводят к улучшению пенообразующих характеристик по сравнению с необработанным раствором благодаря изменению реакционной способности белков.
- Наряду с этим показано, что агрегаты сывороточного белка в негидролизированных концентратах способствуют уменьшению дренажа пены и повышению ее стабильности, поэтому с точки зрения получения стойких пен представляет интерес использование композиций нативных белков и подвергнутых гидролизу.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Зобкова, З. С.** Изучение функциональных свойств обогащенного творожного продукта/З. С. Зобкова [и др.]// *Пищевая промышленность*. 2020. №3. С. 23–28.
2. **Федотова, О. Б.** Разработки ВНИИМ в области создания нового поколения функциональных продуктов/О. Б. Федотова// *Актуальные проблемы молочной отрасли. Международная молочная неделя [сб.]/[сост. ВНИИМС]*. — Углич, 2016. С. 15–18.
3. **Донская, Г. А.** Напитки кисломолочные с повышенным содержанием сывороточных белков и водорастворимых антиоксидантов/Г. А. Донская, В. М. Дрожжин, В. В. Брызгалина// *Вестник Мурманского государственного технического университета*. 2018. Т. 21. №3. С. 471–480.
4. **Просеков, А. Ю.** Пенообразующая способность восстановленного цельного молока/А. Ю. Просеков, Т. В. Подлегае-

ва, Р. С. Новиков// *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2001. №5–6. С. 39–40.

5. **Просеков, А. Ю.** Теоретическое обоснование и технологические принципы формирования молочных пенообразующих дисперсных систем: дис. — Кемерово: [Кемер. технол. ин-т пищевой пром-сти], 2004.

6. **Остроумова, Т. Л.** Влияние белковых веществ на пенообразующие свойства молока/Т. Л. Остроумова, А. Ю. Просеков// *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2007. №. 2. С. 43–46.

7. **Ma, S.** Changes in structure and antioxidant activity of  $\beta$ -lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment/S. Ma, C. Wang, M. Guo// *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018. Vol. 43. P. 227–236.

8. **Leeb, E.** Tryptic hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin: A generic approach to describe the hydrolysis kinetic and release of peptides/E. Leeb [et al.]// *International Dairy Journal*. 2020. Vol. 105. P. 104666.

9. **Pein, D.** Peptic treatment of beta-lactoglobulin improves foaming properties substantially/D. Pein, I. Clawin-Rädecker, P. C. Lorenzen// *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018. Vol. 42. №3. P. e13543.

10. **Borcherding, K.** Effect of protein content, casein — whey protein ratio and pH value on the foaming properties of skimmed milk/K. Borcherding, P. C. H. R. Lorenzen, W. Hoffmann// *International journal of dairy technology*. 2009. Vol. 62. №2. P. 161–169.

11. **Остроумова, Т. Л.** Технологические свойства белковых концентратов/Т. Л. Остроумова, А. Г. Галстян, И. Ю. Трифонов, С. А. Равнюшкин [и др.]// *Сыроделие и маслоделие*. 2007. №2. С. 53–55.

12. **Sinha, R.** Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation/R. Sinha// *Food Chemistry*. 2007. Vol. 101. №4. P. 1484–1491.

13. **Chih, M. L.** Heat-induced soluble protein aggregates from mixed pea globulins and  $\beta$ -lactoglobulin/M. L. Chih [et al.]// *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016. Vol. 64. №. 13. P. 2780–2791.

14. **Bhagya, S.** Effect of different methods of drying on the functional properties of enzyme treated groundnut flour/S. Bhagya, K. S. Srinivasan// *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 1989. Vol. 22. №6. P. 329–333.

15. **Schröder, A.** Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability/A. Schröder [et al.]// *Food Hydrocolloids*. 2017. Vol. 73. P. 129–140.

16. **Tamm, F.** Impact of enzymatic hydrolysis on the interfacial rheology of whey protein/pectin interfacial layers at the oil/water-interface/F. Tamm, S. Drusch// *Food Hydrocolloids*. 2017. Vol. 63. P. 8–18.

17. **Zhang, X.** Covalent conjugation of whey protein isolate hydrolysates and galactose through Maillard reaction to improve the functional properties and antioxidant activity/X. Zhang [et al.]// *International Dairy Journal*. 2020. Vol. 102. P. 104584.

18. **Loveday, S. M.** Whey protein nanofibrils: The environment-morphology-functionality relationship in lyophilization, rehydration, and seeding/S. M. Loveday [et al.]// *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012. Vol. 60. №20. P. 5229–5236.

19. **Mohammadian, M.** Characterization of fibrillated antioxidant whey protein hydrolysate and comparison with fibrillated protein solution/M. Mohammadian, A. Madadlou// *Food Hydrocolloids*. 2016. Vol. 52. P. 221–230.

20. **Oboroceanu, D.** Fibrillization of whey proteins improves foaming capacity and foam stability at low protein concentrations/D. Oboroceanu [et al.]// *Journal of Food Engineering*. 2014. Vol. 121. P. 102–111.