

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

УДК 637.143.2:577.152.34

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-3-227-236>

Поступила в редакцию 06.09.2024

Received 06.09.2024

В. Н. Леонтьев, О. И. Лазовская, А. Р. Попеня*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь*

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ БЕЛКОВ МОЛОКА В НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕПТИДЫ

Аннотация. Проведен сравнительный анализ эффективности гидролиза белков молока трипсином и нейтральной протеазой при различных способах их внесения. Установлено, что протеолиз трипсином (фермент-субстратное соотношение 1 : 40) при температуре 37 °С и pH 8,0 приводит к образованию $81,2 \pm 5,5$ % пептидов с молекулярной массой менее 3,0 кДа, а при гидролизе белков нейтральной протеазой (фермент-субстратное соотношение 1 : 20) в тех же условиях образуется $86,6 \pm 4,7$ % низкомолекулярных пептидных фракций. Показано, что последовательное применение трипсина и нейтральной протеазы позволяет получить в среднем 94,9 % коротких пептидов по сравнению с совместным внесением ($91,3 \pm 1,1$ % низкомолекулярных пептидов). Применение только одного фермента обеспечивает получение частичных гидролизатов, которые могут быть использованы в рецептурах функциональных продуктов питания с пониженной аллергенностью, в то время как последовательное и совместное внесение трипсина и нейтральной протеазы приводит к образованию глубоких гидролизатов, которые считаются идеальными ингредиентами в создании гипоаллергенных пищевых продуктов.

Ключевые слова: ферментативный катализ, трипсин, нейтральная протеаза, белки молока, низкомолекулярные пептиды

Для цитирования. Леонтьев, В. Н. Биокаталитическое превращение белков молока в низкомолекулярные пептиды / В. Н. Леонтьев, О. И. Лазовская, А. Р. Попеня // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2025. – Т. 61, № 3. – С. 227–236. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-3-227-236>

V. N. Leontiev, O. I. Lazovskaya, A. R. Popenya*Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus*

BIOCATALYTIC CONVERSION OF MILK PROTEINS INTO LOW MOLECULAR PEPTIDES

Abstract. A comparative analysis of the efficiency of milk protein hydrolysis by trypsin and neutral protease using different methods of their addition was conducted. It was found that proteolysis by trypsin (enzyme-substrate ratio 1 : 40) at a temperature 37 °C and pH 8.0 leads to the formation of 81.2 ± 5.5 % of peptides with molecular mass less than 3.0 kDa, while protein hydrolysis by neutral protease (enzyme-substrate ratio 1 : 20) under the same conditions produces 86.6 ± 4.7 % of low molecular weight peptide fractions. It was shown that sequential application of trypsin and neutral protease allows obtaining, on average, 94.9 % of short peptides in comparison with the joint addition (91.3 ± 1.1 % of low molecular weight peptides). The application of the single enzyme provides the production of partial hydrolysates that can be used in the formulation of functional foods with reduced allergenicity, while the sequential and joint addition of trypsin and neutral protease generates extensive hydrolysates, which are considered optimal ingredients in the creation of hypoallergenic food products.

Key words: enzymatic catalysis, trypsin, neutral protease, milk proteins, low molecular weight peptides

For citation. Leontiev V. N., Lazovskaya O. I., Popenya A. R. Biocatalytic conversion of milk proteins into low molecular peptides. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2025, vol. 61, no. 3, pp. 227–236 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-3-227-236>

Введение. Белковые гидролизаты представляют собой продукты, содержащие ценные биологически активные соединения – низкомолекулярные пептиды и свободные аминокислоты. В настоящее время белковые гидролизаты находят широкое применение в пищевой промышленности [1], медицине [2], животноводстве [3], птицеводстве [4] и рыбоводстве [5]. Важно отметить, что функциональные (растворимость, гелеобразование, эмульгирование, пенообразование и др.) и биологические (антиоксидантные, иммуномодулирующие, антимикробные, гипотензивные и др.) свойства белковых гидролизатов, предназначенных для использования в той или иной области, обусловлены исходным сырьем, способом гидролиза и последующей обработкой полученного продукта.

В производстве белковых гидролизатов для пищевой и фармацевтической промышленности наиболее часто применяют белки молока – казеин [6] или сывороточные белки [7] – из-за их высокой питательной ценности и оптимального аминокислотного состава. Казеин является главным белком молока; его содержание колеблется от 2,3 до 2,9 %. В молоке казеин находится в виде мицелл, представляющих собой сложные комплексы α_{s1} -, α_{s2} -, β - и κ -фракций казеина с коллоидным фосфатом кальция. Фракции казеина имеют молекулярную массу 19–25 кДа. К сывороточным белкам, содержание которых в молоке составляет около 0,6 %, относятся β -лактоглобулин (молекулярная масса 18,3 кДа), α -лактальбумин (молекулярная масса 14,2 кДа), бычий сывороточный альбумин (молекулярная масса 66,5 кДа), иммуноглобулины, лактоферрин и другие минорные белки [8]. Основным источником сывороточных белков выступает молочная сыворотка – побочный продукт при производстве сыра, творога и казеина [9].

Эффективным способом получения белковых гидролизатов с заданными свойствами является ферментативный гидролиз, который позволяет избирательно разрывать пептидные связи благодаря специфичности протеолитических ферментов. В частности, β -лактоглобулин, α -лактальбумин и бычий сывороточный альбумин характеризуются компактной глобулярной структурой, которая определяет их относительную устойчивость к протеолизу и требует тщательного подбора высокоактивных биокатализаторов [10]. Ферменты микробного (алкалаза, нейтральная протеаза, термолизин, протосубтилин), животного (пепсин, трипсин) и растительного (папаин) происхождения имеют различную субстратную специфичность по отношению к основным сывороточным белкам [11]. β -лактоглобулин устойчив к гидролизу пепсином в кислой среде, в то же время его эффективно расщепляют папаин, термолизин, нейтральная протеаза, трипсин, алкалаза и протосубтилин в нейтральных и щелочных средах. Пепсин, термолизин, трипсин, алкалаза и протосубтилин гидролизуют α -лактальбумин в оптимизированных условиях. В случае бычьего сывороточного альбумина показана исключительная устойчивость в нейтральных и щелочных средах к расщеплению трипсином, алкалазой, нейтральной протеазой, термолизином, протосубтилином и папаином. Лишь протеолиз пепсином позволяет удалить бычий сывороточный альбумин. В отличие от сывороточных белков казеин хорошо расщепляется протеазами, поскольку имеет малоупорядоченную структуру за счет незначительного количества α -спиральных участков [8].

Основными характеристиками гидролизатов белков молока являются молекулярно-массовое распределение пептидных фракций, остаточная антигенность и степень гидролиза. Известно, что аллергенность молочных белков обусловлена наличием в их составе антигенных детерминант, способных вызвать специфическую активацию Th2-хелперов и выработку IgE-антител [7]. Ферментативный гидролиз позволяет расщепить антигенные детерминанты казеина и сывороточных белков, что приводит к снижению их аллергенного потенциала. Молекулярная масса пептидов, ниже которой аллергенность гидролизата становится минимальной, составляет 2,5–3,0 кДа. От степени гидролиза зависит область применения белковых гидролизатов (табл. 1). При этом выделяют частичные гидролизаты, содержащие пептиды с различными молекулярными массами и минимальное количество свободных аминокислот, и глубокие гидролизаты, представленные короткоцепочечными пептидами и аминокислотами [12].

Таблица 1. Характеристика гидролизатов молочных белков в зависимости от их назначения

Table 1. Characterization of milk protein hydrolysates depending on the purpose of their use

Гидролизаты молочных белков	Степень гидролиза	Назначение	Молекулярная масса компонентов
Частичные гидролизаты	< 5 %	Технологические добавки – пенообразователи, эмульгаторы	> 8,0 кДа
	5–20 %	Функциональные продукты с пониженной аллергенностью, специализированные пищевые продукты для лечебного и спортивного питания	3,0–10,0 кДа; минимальное содержание свободных аминокислот
Глубокие гидролизаты	20–50 %	Гипоаллергенные пищевые продукты	< 3,0 кДа
		Продукты для зондового питания	< 1,0 кДа; 15–20 % свободных аминокислот
	> 80 %	Смеси для парентерального питания	< 0,5 кДа; преобладание свободных аминокислот

Среди различных способов определения степени гидролиза наиболее простым и экспрессивным является рН-статический метод. Он не требует проведения этапа дериватизации, необходимого при титровании о-фталевым альдегидом или 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой, или этапов осаждения и центрифугирования при использовании трихлоруксусной кислоты.

При гидролизе белков в щелочных условиях происходит расщепление пептидной связи с высвобождением концевой карбоксильной группы в ионизированной форме. Образующиеся протоны распределяются между ионизированной и неионизированной формами концевой α-аминогруппы:



Однако свободные протоны приводят к снижению рН реакционной среды. Для поддержания постоянства рН требуется добавление щелочи, количество которой зависит от доли гидролизующихся пептидных связей, что может быть использовано для оценки степени гидролиза [13].

Степень гидролиза (СГ, %) белков рассчитывают по формуле [14]:

$$СГ = V \cdot N \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{m} \cdot \frac{1}{h} \cdot 100, \quad (2)$$

где V – объем щелочи, добавленной в ходе гидролиза, мл; N – молярная концентрация щелочи, моль/л; m – масса белка, г; h – количество пептидных связей в 1 г белка, $h = 8,7$ ммоль/г белков молока; α – степень диссоциации α-аминогрупп белков и пептидов при рН гидролиза [13], которую определяют по формуле:

$$\alpha = \frac{10^{(pH-pK)}}{1 + 10^{(pH-pK)}}. \quad (3)$$

При этом константа диссоциации (рК) образующихся α-аминогрупп зависит от температуры гидролиза (T , К) следующим образом [14]:

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{(298 \cdot T)} \cdot 2400. \quad (4)$$

Необходимо отметить, что для более интенсивного расщепления белков молока можно использовать различные технологические подходы. Например, предварительная термообработка белкового субстрата обеспечивает разворачивание белковых молекул и повышает доступность пептидных связей к действию протеолитических ферментов [11]. Кроме того, совместное применение трипсина и алкалазы приводит к увеличению степени гидролиза белков и существенному снижению остаточной антигенности. Повышению степени гидролиза казеина и антиоксидантной активности пептидных фракций способствует последовательное внесение алкалазы и флаворизма [15].

Как отмечено выше, одними из основных биокатализаторов для гидролиза белков молока являются трипсин и нейтральная протеаза. При этом трипсин (КФ 3.4.21.4) избирательно гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков основных аминокислот – аргинина и лизина, а нейтральная протеаза (КФ 3.4.24.28) катализирует расщепление пептидных связей, которые образованы аминогруппами остатков гидрофобных аминокислот – лейцина и фенилаланина [16].

Таким образом, целью настоящего исследования является сравнительный анализ эффективности гидролиза белков молока трипсином и нейтральной протеазой при различных способах их внесения.

Экспериментальная часть. В работе использовали сухое обезжиренное молоко сорта «Стандарт» (содержание белка – 34 %, жира – 1 %, углеводов – 48 %; ОАО «Беллакт», Республика Беларусь), фермент трипсин (Sigma, США) и ферментный препарат на основе нейтральной протеазы (активность 3 380 ед/г; ООО «Фермент», Республика Беларусь).

Активность трипсина определяли по имеющейся методике [17].

Ферментативный гидролиз белков 2%-го раствора сухого обезжиренного молока проводили при температуре 37 °С и pH 8,0. По окончании протеолиза ферменты инактивировали при температуре 80 °С в течение 20 мин.

Степень гидролиза белков определяли pH-статическим методом. Значение pH реакционной среды контролировали с помощью pH-метра HI 83141 (Hanna, Германия). Постоянство pH поддерживали путем добавления 0,1 М раствора NaOH. Для расчета степени гидролиза использовали формулы (2)–(4).

Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций анализировали методом гель-хроматографии на колонке 1,8 × 35 см с Sephadex G-50 Medium (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), предварительно откалиброванной по стандартным веществам¹: трипсин (24 кДа), цитохром С (12,3 кДа; Serva Fein Biochimica, Германия), витамин В₁₂ (1,36 кДа; Sigma, США). Свободный объем колонки, который составил 33,1 ± 0,1 мл, определяли по объему элюирования голубого декстрана 2000 (2000 кДа; Sigma, США). Перед нанесением на колонку раствор гидролизата фильтровали через обеззоленный фильтр «Синяя лента» (размер пор 3–5 мкм, ООО «Мелиор XXI», Российская Федерация). В качестве элюента использовали 0,025 М трис-HCl буферный раствор (pH 8,0). Детектирование осуществляли при длине волны 280 нм на спектрофотометре Specord 200 Plus (Analytik Jena, Германия).

Статистический анализ выполняли в программе Microsoft Office Excel 2010. Результаты экспериментов представлены как среднее арифметическое значение двух независимых измерений со стандартным отклонением. Компьютерную обработку профилей молекулярно-массового распределения пептидных фракций осуществляли в программе OriginPro 8.5.1 с помощью функции Гаусса.

Результаты и их обсуждение. *Выбор температуры и pH среды.* Анализ литературы [18–20] показал, что трипсин проявляет каталитическую активность при температуре 37–55 °С и pH 7,5–9,0. Оптимальными параметрами для нейтральной протеазы являются 30–60 °С и pH 6,0–9,0 [21]. В связи с этим для исследования эффективности протеолиза под действием трипсина и нейтральной протеазы при различных способах их внесения (отдельно, последовательно и совместно) выбрали температуру 37 °С и pH 8,0.

Анализ эффективности гидролиза белков молока трипсином. Протеолиз трипсином (активность 16,99 ± 0,04 нкат/мг) проводили при фермент-субстратных соотношениях 1 : 20, 1 : 40 и 1 : 60 в течение 240 мин. Полученные значения степени гидролиза белков приведены в табл. 2. Из представленных данных видно, что фермент-субстратное соотношение 1 : 20 обеспечивало более интенсивное протекание ферментативной реакции. Однако в ходе термической инактивации трипсина наблюдали образование осадка денатурированного фермента. В связи с тем что избыточный расход фермента приводит к накоплению потенциально аллергенного материала в гидролизате и требует дополнительной стадии очистки, то применение фермент-субстратного соотношения 1 : 20 являлось нерациональным. Кроме того, следует отметить, что при всех фермент-субстратных соотношениях значительное образование продуктов гидролиза происходит в течение 60 мин, в то время как дальнейшее протекание ферментативной реакции обеспечивает медленное увеличение степени гидролиза с завершением протеолиза на 210 мин. При этом снижение активности фермента обусловлено ингибирующим влиянием образующихся пептидов и аминокислот. На основании вышеизложенного можно заключить, что оптимальными параметрами протеолиза трипсином являются фермент-субстратное соотношение 1 : 40 и продолжительность гидролиза 210 мин.

Профиль молекулярно-массового распределения пептидных фракций, полученных при оптимальных параметрах гидролиза белков трипсином, приведен на рисунке, а. Компьютерное разделение пиков гауссианами позволяет рассчитать процентное содержание образовавшихся пептидов и определить объемы их элюирования. Как видно из табл. 3, в гидролизате содержится 81,2 ± 5,5 % пептидов с молекулярной массой менее 3,0 кДа.

¹ Уравнение калибровочного графика имеет вид: $\lg M = -0,0304 \cdot V_e + 5,6568$ ($R^2 = 0,9994$), где М – молекулярная масса, Да; V_e – объем элюирования, мл.

Таблица 2. Динамика изменения степени гидролиза белков молока при внесении ферментов по отдельности

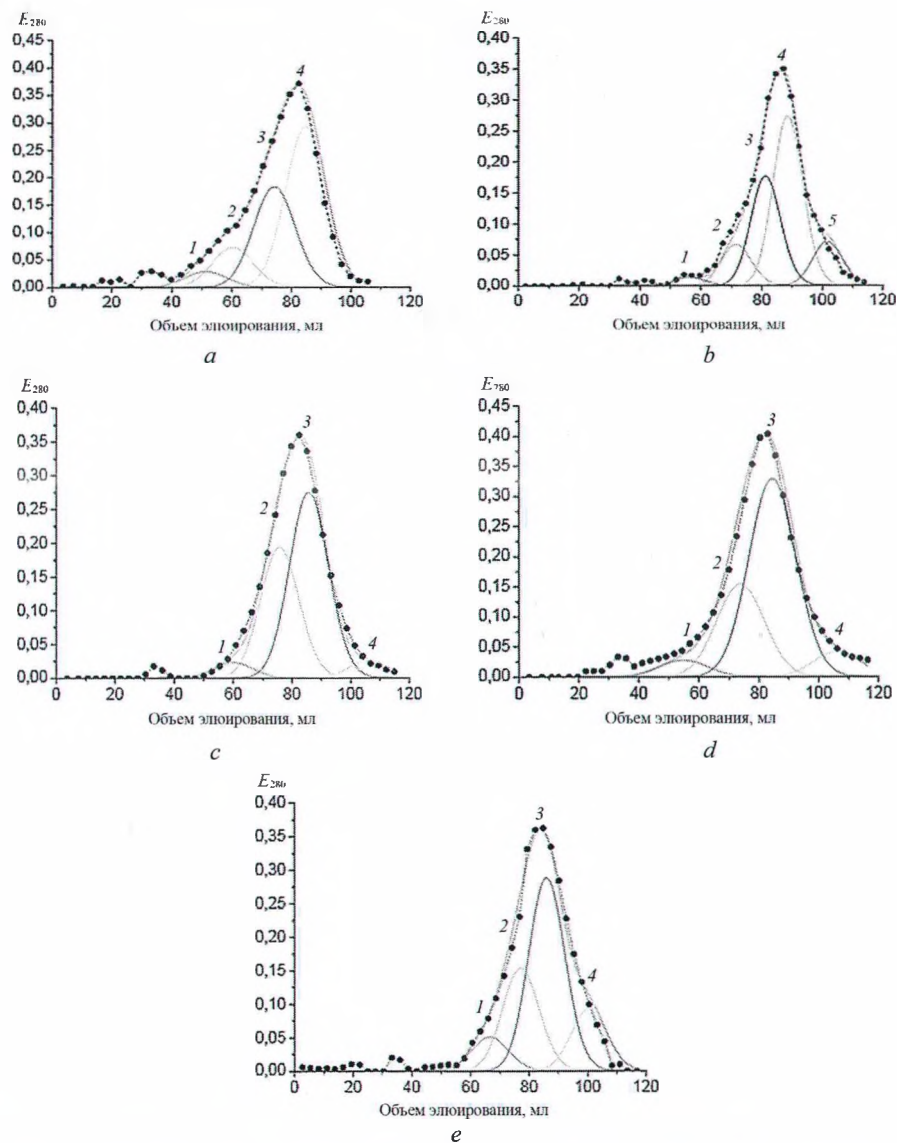
Table 2. Dynamics of changes in the hydrolysis degree of milk proteins with the addition of enzymes separately

Продолжительность протеолиза, мин	Степень гидролиза, %		
	Фермент-субстратное соотношение 1 : 20	Фермент-субстратное соотношение 1 : 40	Фермент-субстратное соотношение 1 : 60
Трипсин			
30	9,9 ± 0,5	8,1 ± 0,1	7,5 ± 0,3
60	11,9 ± 0,8	10,1 ± 0,3	9,6 ± 0,1
90	12,8 ± 0,5	11,2 ± 0,3	10,4 ± 0,3
120	13,4 ± 0,8	11,7 ± 0,5	11,0 ± 0,5
150	13,7 ± 0,8	12,2 ± 0,6	11,4 ± 0,5
180	14,1 ± 0,8	12,5 ± 0,6	11,7 ± 0,5
210	14,4 ± 0,6	12,8 ± 0,5	12,0 ± 0,4
240	14,4 ± 0,6	12,8 ± 0,5	12,0 ± 0,4
Нейтральная протеаза			
30	15,6 ± 1,3	13,7 ± 0,8	12,3 ± 0,3
60	17,6 ± 1,0	15,2 ± 0,8	13,7 ± 0,3
90	18,5 ± 0,8	16,1 ± 0,5	14,6 ± 0,1
120	19,2 ± 0,8	17,0 ± 0,3	15,6 ± 0,3
150	19,8 ± 1,0	17,6 ± 0,5	16,1 ± 0,1
180	20,1 ± 1,0	17,9 ± 0,5	16,7 ± 0,3
210	20,5 ± 1,0	18,3 ± 0,5	17,0 ± 0,3
240	20,8 ± 0,9	18,6 ± 0,4	17,3 ± 0,1
270	21,0 ± 0,9	18,8 ± 0,4	17,6 ± 0,1
300	21,2 ± 0,6	19,0 ± 0,1	17,9 ± 0,1
330	21,3 ± 0,4	19,0 ± 0,1	17,9 ± 0,1
360	21,4 ± 0,3	19,0 ± 0,1	17,9 ± 0,1
390	21,4 ± 0,3	19,0 ± 0,1	17,9 ± 0,1

Анализ эффективности гидролиза белков молока нейтральной протеазой. Гидролиз белков нейтральной протеазой осуществляли при фермент-субстратных соотношениях 1 : 20, 1 : 40 и 1 : 60 в течение 390 мин. Из табл. 2 видно, что ферментативная реакция более интенсивно протекает при фермент-субстратном соотношении 1 : 20. Необходимо отметить, что значительное образование продуктов гидролиза происходит в течение 120 мин при всех фермент-субстратных соотношениях, затем наблюдается постепенное увеличение степени гидролиза с окончанием протеолиза через 360 мин в случае фермент-субстратного соотношения 1 : 20 и через 300 мин в случае фермент-субстратных соотношений 1 : 40 и 1 : 60. Из полученных результатов следует, что оптимальными параметрами гидролиза белков нейтральной протеазой являются фермент-субстратное соотношение 1 : 20 и продолжительность протеолиза 360 мин.

Анализ профиля молекулярно-массового распределения (рисунок, *b*) показал, что гидролиз белков молока нейтральной протеазой при оптимальных параметрах приводит к получению гидролизата, содержащего $86,6 \pm 4,7$ % низкомолекулярных пептидов (см. табл. 3).

Анализ эффективности гидролиза белков молока при последовательном внесении трипсина и нейтральной протеазы. Протеолиз при последовательном внесении ферментов осуществляли двумя способами. При первом способе гидролиз белков проводили на протяжении 180 мин: сначала трипсином при фермент-субстратном соотношении 1 : 40 в течение 30 мин, а затем нейтральной протеазой при фермент-субстратном соотношении 1 : 20 в течение 150 мин. При этом установлено, что наибольшая степень гидролиза белков молока достигается в течение 150 мин (табл. 4). На основании анализа представленного на рисунке, *c* профиля молекулярно-массового распределения пептидных фракций следует, что в результате протеолиза образуется $94,9 \pm 3,0$ % низкомолекулярных пептидов (см. табл. 3). При втором способе гидролиз белков проводили на протяжении 210 мин: сначала трипсином при фермент-субстратном соотношении 1 : 40 в течение



Профили молекулярно-массового распределения пептидных фракций, полученных в результате гидролиза белков молока: *a* – трипсином; *b* – нейтральной протеазой; *c* – при последовательном внесении трипсина и через 30 мин нейтральной протеазы; *d* – при последовательном внесении трипсина и через 90 мин нейтральной протеазы; *e* – при совместном применении трипсина и нейтральной протеазы

Molecular weight distribution profiles of peptide fractions obtained by hydrolysis of milk proteins:

a – by trypsin; *b* – by neutral protease; *c* – with sequential addition of trypsin followed by 30 min of neutral protease; *d* – with sequential addition of trypsin followed by 90 min of neutral protease; *e* – with joint application of trypsin and neutral protease

90 мин, а затем нейтральной протеазой при фермент-субстратном соотношении 1 : 20 в течение 120 мин. Как видно из табл. 4, наибольшая степень гидролиза белков молока достигается в течение 180 мин. Анализ профиля молекулярно-массового распределения (рисунок, *d*) показал, что полученный гидролизат содержит $94,9 \pm 3,7$ % пептидов с молекулярной массой менее 3,0 кДа (см. табл. 3).

Анализ эффективности гидролиза белков молока при совместном применении трипсина и нейтральной протеазы. Гидролиз белков при совместном внесении трипсина (фермент-субстратное соотношение 1 : 40) и нейтральной протеазы (фермент-субстратное соотношение 1 : 20) осуществляли в течение 150 мин. Показано, что расщепление белкового субстрата с наибольшей степенью гидролиза происходит в течение 120 мин (см. табл. 4). Профиль молекулярно-массового распределения пептидных фракций в полученном гидролизате приведен на рисунке, *e*. Как следует из табл. 3, гидролиз белков молока при совместном применении ферментов приводит к образованию $91,3 \pm 1,1$ % низкомолекулярных пептидов.

Таблица 3. Характеристика пептидных фракций, полученных в результате гидролиза белков молока трипсином и нейтральной протеазой при различных способах их внесения

Table 3. Characterization of peptide fractions obtained by hydrolysis of milk proteins by trypsin and neutral protease using different addition methods

Номер пика	Объем элюирования, мл	Молекулярная масса пептидной фракции, кДа	Содержание пептидной фракции в гидролизате, %
Трипсин			
1	49,5 ± 0,1	14,2 ± 0,1	6,7 ± 0,5
2	58,5 ± 0,6	7,4 ± 0,4	12,1 ± 1,4
3	73,5 ± 0,4	2,7 ± 0,1	35,3 ± 2,4
4	82,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	45,9 ± 1,5
Нейтральная протеаза			
1	55,3 ± 1,1	9,5 ± 0,7	2,3 ± 0,3
2	68,1 ± 2,3	3,9 ± 0,6	11,1 ± 0,2
3	78,3 ± 2,1	1,9 ± 0,3	29,4 ± 0,4
4	84,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	46,7 ± 1,5
5	100,2 ± 0,6	0,4 ± 0,1	10,5 ± 1,4
Последовательное внесение трипсина и через 30 мин нейтральной протеазы			
1	58,1 ± 0,2	7,8 ± 0,1	5,1 ± 1,1
2	73,5 ± 1,3	2,7 ± 0,2	37,0 ± 0,9
3	83,8 ± 2,1	1,3 ± 0,1	52,8 ± 0,7
4	105,2 ± 1,6	0,3 ± 0,1	5,1 ± 0,5
Последовательное внесение трипсина и через 90 мин нейтральной протеазы			
1	53,0 ± 0,3	11,1 ± 0,2	5,1 ± 0,5
2	71,9 ± 0,9	3,0 ± 0,1	28,0 ± 1,2
3	82,6 ± 1,1	1,4 ± 0,3	59,4 ± 0,6
4	104,1 ± 0,6	0,3 ± 0,1	7,5 ± 0,8
Совместное применение трипсина и нейтральной протеазы			
1	65,5 ± 0,9	4,7 ± 0,3	8,7 ± 0,2
2	76,0 ± 0,9	2,2 ± 0,1	26,4 ± 0,1
3	85,5 ± 1,8	1,1 ± 0,1	49,0 ± 0,2
4	99,7 ± 1,5	0,4 ± 0,1	15,9 ± 0,5

Таблица 4. Динамика изменения степени гидролиза белков молока при последовательном и совместном внесении ферментов

Table 4. Dynamics of changes in the degree of hydrolysis of milk proteins during sequential and joint addition of enzymes

Продолжительность протеолиза, мин	Степень гидролиза, %		
	Последовательное внесение трипсина и через 30 мин нейтральной протеазы	Последовательное внесение трипсина и через 90 мин нейтральной протеазы	Совместное применение трипсина и нейтральной протеазы
30	7,9 ± 0,3	8,2 ± 0,3	20,1 ± 0,1
60	17,4 ± 0,3	10,2 ± 0,4	22,3 ± 0,1
90	19,6 ± 0,3	11,3 ± 0,4	23,2 ± 0,1
120	20,5 ± 0,1	19,5 ± 0,1	23,7 ± 0,1
150	21,2 ± 0,1	21,0 ± 0,1	23,7 ± 0,1
180	21,2 ± 0,1	22,1 ± 0,1	—
210	—	22,1 ± 0,1	—

Сравнительный анализ эффективности гидролиза белков молока трипсином и нейтральной протеазой при различных способах их внесения. Характеристика гидролиза белков молока трипсином и нейтральной протеазой при различных способах их внесения представлена в табл. 5. Установлено, что последовательное и совместное внесение трипсина и нейтральной протеазы

позволяет получить больше низкомолекулярных пептидов за менее продолжительное время, чем использование только одного из ферментов, что обусловлено различной специфичностью ферментов по отношению к типу пептидной связи. При этом чем выше содержание низкомолекулярных пептидов в гидролизате, тем ниже риск развития аллергических реакций [7]. Однако при совместном применении трипсина и нейтральной протеазы образуется меньше низкомолекулярных пептидов, чем при последовательном внесении, что может быть связано с расщеплением одного фермента другим. Кроме того, применение только одного фермента позволяет получить частичные гидролизаты, в то время как последовательное и совместное внесение трипсина и нейтральной протеазы обеспечивает глубокое расщепление белкового субстрата. При этом частичные гидролизаты могут быть использованы в рецептурах функциональных продуктов с пониженной аллергенностью, а глубокие гидролизаты – в составе гипоаллергенных пищевых продуктов.

Таблица 5. Характеристика протеолиза трипсином и нейтральной протеазой при различных способах их внесения

Table 5. Characterization of proteolysis by trypsin and neutral protease using different addition methods

Способ внесения ферментов	Продолжительность гидролиза, мин	Степень гидролиза, %	Содержание низкомолекулярных пептидов в гидролизате, %	Молекулярные массы коротких пептидов, кДа
Трипсин	210	12,8 ± 0,5	81,2 ± 5,5	2,7 ± 0,1 1,4 ± 0,1
Нейтральная протеаза	360	21,4 ± 0,3	86,6 ± 4,7	1,9 ± 0,3 1,2 ± 0,1 0,4 ± 0,1
Последовательное внесение трипсина и через 30 мин нейтральной протеазы	150	21,2 ± 0,1	94,9 ± 3,0	2,7 ± 0,2 1,3 ± 0,1 0,3 ± 0,1
Последовательное внесение трипсина и через 90 мин нейтральной протеазы	180	22,1 ± 0,1	94,9 ± 3,7	3,0 ± 0,1 1,4 ± 0,3 0,3 ± 0,1
Совместное применение трипсина и нейтральной протеазы	120	23,7 ± 0,1	91,3 ± 1,1	2,2 ± 0,1 1,1 ± 0,1 0,4 ± 0,1

Вывод. В результате исследований подобраны оптимальные параметры гидролиза (температура 37 °C и pH 8,0) белков молока трипсином (фермент-субстратное соотношение 1 : 40) и нейтральной протеазой (фермент-субстратное соотношение 1 : 20). Методом гель-хроматографии на колонке с Sephadex G-50 Medium в сочетании с компьютерной обработкой профилей молекулярно-массового распределения пептидных фракций установлено, что протеолиз трипсином в течение 210 мин приводит к образованию 81,2 ± 5,5 % коротких пептидов, а при расщеплении белков нейтральной протеазой на протяжении 360 мин образуется 86,6 ± 4,7 % низкомолекулярных пептидов. Показано, что последовательное применение трипсина и нейтральной протеазы двумя способами (в течение 150 и 180 мин) позволяет получить в среднем 94,9 % коротких пептидов по сравнению с совместным использованием ферментов (продолжительность 120 мин; 91,3 ± 1,1 % низкомолекулярных пептидов). На основании вышеизложенного можно заключить, что содержание низкомолекулярных пептидов в гидролизате при различных способах внесения трипсина и нейтральной протеазы убывает в ряду: последовательное внесение > совместное внесение > нейтральная протеаза > трипсин.

Список использованных источников

1. Белковый гидролизат как источник биоактивных пептидов в пищевой продукции диабетического питания / О. В. Зинина, А. Д. Николина, Д. В. Хвостов [и др.] // Пищевые системы. – 2023. – Т. 6, № 4. – С. 440–448. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-440-448>
2. Investigation of functional, antioxidant, anti-inflammatory, and antidiabetic properties of legume seed protein hydrolysates / T. S. Adewole, M. C. Bieni, G. E. Ogundepo [et al.] // Food Hydrocolloids for Health. – 2024. – Vol. 5. – Art. ID 100175. – 12 p. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100175>
3. Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance / Y. Hou, Z. Wu, Z. Dai [et al.] // Journal of Animal Science and Biotechnology. – 2017. – Vol. 8, № 1. – Art. ID 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>

4. Влияние нетрадиционных источников белка на продуктивность бройлеров и микрофлору кишечника / И. А. Егоров, Т. В. Егорова, Г. Ю. Лаптев [и др.] // Птицеводство. – 2014. – № 11. – С. 2–6.
5. Effects of replacing fish meal with fermented soybean meal on the growth performance, intestinal microbiota, morphology and disease resistance of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) / H. Yang, Y. Bian, L. Huang [et al.] // Aquaculture Reports. – 2022. – Vol. 22. – Art. ID 100954. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100954>
6. Милентьева, И. С. Подбор рабочих параметров для проведения направленного протеолиза казеина с целью получения биопептидов / И. С. Милентьева, Н. И. Давыденко, А. Н. Расшепкин // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 4. – С. 726–735. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-726-735>
7. Исследование процесса гидролиза белков молока с использованием ферментных препаратов отечественного производства / Е. С. Семенова, Е. С. Симоненко, С. В. Симоненко [и др.] // Пищевые системы. – 2023. – Т. 6, № 2. – С. 224–232. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-224-232>
8. Просеков, А. Ю. Анализ состава и свойств белков молока с целью использования в различных отраслях пищевой промышленности / А. Ю. Просеков, М. Г. Курбанова // Техника и технология пищевых производств. – 2009. – Т. 15, № 4. – С. 68а–71.
9. Химический состав и технологические свойства различных видов молочной сыворотки / И. В. Плотнокова, Е. С. Шенцова, К. К. Полянский, Д. С. Писаревский // Сыроделие и маслоделие. – 2020. – № 3. – С. 43–45. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-3-43-45>
10. Использование протеолитических ферментов для получения белковых гидролизатов пищевого назначения из вторичного сырья / Е. В. Костылева, А. С. Середа, И. А. Великоречкая [и др.] // Вопросы питания. – 2023. – Т. 92, № 1. – С. 116–132. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2023-92-1-116-132>
11. Головач, Т. Н. Гидролиз белков молока ферментными препаратами и протеолитическими системами молочнокислых бактерий / Т. Н. Головач, В. П. Курченко // Труды БГУ. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2012. – Т. 7, № 1–2. – С. 106–126.
12. Перспективы использования гидролизатов сывороточных белков в технологии кисломолочных продуктов / О. В. Королёва, Е. Ю. Агаркова, С. Г. Ботина [и др.] // Молочная промышленность. – 2013. – № 7. – С. 66–68.
13. Rutherford, S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review / S. M. Rutherford // Journal of AOAC International. – 2010. – Vol. 93, № 5. – P. 1515–1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>
14. Butre, C. I. Influence of water availability on the enzymatic hydrolysis of proteins / C. I. Butre, P. A. Wierenga, H. Gruppen // Process Biochemistry. – 2014. – Vol. 49, № 11. – P. 1903–1912. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.08.009>
15. Rao, P. S. Impact of sequential enzymatic hydrolysis on antioxidant activity and peptide profile of casein hydrolysate / P. S. Rao, R. Bajaj, B. Mann // Journal of Food Science and Technology. – 2020. – Vol. 57, № 12. – P. 4562–4575. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04495-2>
16. Whitaker, J. R. Handbook of food enzymology / J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen, D. W. S. Wong. – Boca Raton: CRC Press, 2002. – 1128 p. <https://doi.org/10.1201/9780203910450>
17. Covalent chromatography for chymotrypsin-like proteases using a diphenyl 1-amino-2-phenylethylphosphonate derivative / S. Ono, J. Murai, S. Furuta [et al.] // Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 78–85. <https://doi.org/10.14533/jbm.13.78>
18. Ферментативный гидролиз соевого белка / Д. В. Соколов, Б. А. Болянов, С. Д. Жамсаранова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2023. – Т. 53, № 1. – С. 86–96. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418>
19. Исследование процессов взаимодействия трипсина с ионообменными волокнами и хитозаном / С. М. Панкова, Ф. А. Сакибаев, М. Г. Холявка [и др.] // Биоорганическая химия. – 2021. – Т. 47, № 3. – С. 400–412. <https://doi.org/10.31857/S0132342321030143>
20. Trypsin from pyloric caeca of Asian seabass: purification, characterization, and its use in the hydrolysis of acid-soluble collagen / U. Patil, K. A. Baloch, S. H. Nile [et al.] // Foods. – 2023. – Vol. 12. – Art. ID 2937. <https://doi.org/10.3390/foods12152937>
21. Characterization of yeast protein hydrolysate for potential application as a feed additive / J. H. Min, Y. J. Lee, H. J. Kang [et al.] // Food Science of Animal Resources. – 2024. – Vol. 44, № 3. – P. 723–737. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2024.e33>

References

1. Zinina O. V., Nikolina A. D., Khvostov D. V., Rebezov M. B., Zavyalov S. N., Akhmedzyanov R. V. Protein hydrolysate as a source of bioactive peptides in diabetic food products. *Pishchevye sistemy = Food Systems*, 2023, vol. 6, no. 4, pp. 440–448 (in Russian). <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-440-448>
2. Adewole T. S., Bieni M. C., Ogundepo G. E., Odekanyin O. O., Kuku A. Investigation of functional, antioxidant, anti-inflammatory, and antidiabetic properties of legume seed protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids for Health*, 2024, vol. 5, art. ID 100175. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100175>
3. Hou Y., Wu Z., Dai Z., Wang G., Wu G. Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, vol. 8, art. ID 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
4. Egorov I. A., Egorova T. V., Laptev G. Yu., Novikova N. I., Nikonov I. N., Il'ina L. A. The influence of unconventional protein sources on meat productivity and intestinal microflora in broilers. *Pitisevodstvo = Aviculture*, 2014, no. 11, pp. 2–6 (in Russian).
5. Yang H., Bian Y., Huang L., Lan Q., Ma L., Li X., Leng X. Effects of replacing fish meal with fermented soybean meal on the growth performance, intestinal microbiota, morphology and disease resistance of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture Reports*, 2022, vol. 22, art. ID 100954. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100954>
6. Milentyeva I. S., Davydenko N. I., Rasshchepkin A. N. Casein proteolysis in bioactive peptide production: optimal operating parameters. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*, 2020, vol. 50, no. 4, pp. 726–735 (in Russian). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-726-735>
7. Semenova E. S., Simonenko E. S., Simonenko S. V., Zorin S. N., Petrov N. A., Mazo V. K. Study of parameters of milk proteins hydrolysis with the help of Russian-produced enzyme preparations. *Pishchevye sistemy = Food Systems*, 2023, vol. 6, no. 2, pp. 224–232 (in Russian). <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-224-232>

8. Prosekov A. U., Kurbanova M. G. Analysis of the composition and properties of milk proteins for use in various branches of the food industry. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*, 2009, vol. 15, no. 4, pp. 68a–71 (in Russian).
9. Plotnikova I. V., Shentsova E. S., Polyanskii K. K., Pisarevskii D. S. Chemical composition and technological properties of various types of whey. *Syrodelie i maslovelie = Cheese and buttermaking*, 2020, no. 3, pp. 43–45 (in Russian). <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-3-43-45>
10. Kostyleva E. V., Sereda A. S., Velikoretskaya I. A., Kurbatova E. I., Tsurikova N. V. Proteases for obtaining of food protein hydrolysates from proteinaceous by-products. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2023, vol. 92, no. 1, pp. 116–132 (in Russian). <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2023-92-1-116-132>
11. Golovach T. N., Kurchenko V. P. Hydrolysis of milk proteins by enzyme preparations and proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Trudy BGU. Seriya: Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem = Proceedings of the BSU. Series of Physiological, Biochemical and Molecular Biology Sciences*, 2012, vol. 7, no. 1–2, pp. 106–126 (in Russian).
12. Koroleva O. V., Agarkova E. Yu., Botina S. G., Nikolaev I. V., Ponomareva N. V., Mel'nikova E. I., Kharitonov V. D., Prosekov A. Yu., Krokhmal' M. V., Rozhkova I. V. Prospects for the use of whey protein hydrolysates in fermented milk product technology. *Molochnaya promyshlennost' = Dairy Industry*, 2013, no. 7, pp. 66–68 (in Russian).
13. Rutherford S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. *Journal of AOAC International*, 2010, vol. 93, no. 5, pp. 1515–1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>
14. Butre C. I., Wierenga P. A., Gruppen H. Influence of water availability on the enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 2014, vol. 49, no. 11, pp. 1903–1912. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.08.009>
15. Rao P. S., Bajaj R., Mann B. Impact of sequential enzymatic hydrolysis on antioxidant activity and peptide profile of casein hydrolysate. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, vol. 57, no. 12, pp. 4562–4575. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04495-2>
16. Whitaker J. R., Voragen A. G. J., Wong D. W. S. *Handbook of Food Enzymology*. Boca Raton, CRC Press, 2002. 1128 p. <https://doi.org/10.1201/9780203910450>
17. Ono S., Murai J., Furuta S., Doike K., Manzaki F., Yoshimura T., Kuroda H., Umezaki M., Oyama H. Covalent chromatography for chymotrypsin-like proteases using a diphenyl 1-amino-2-phenylethylphosphonate derivative. *Journal of Biological Macromolecules*, 2013, vol. 13, no. 3, pp. 78–85. <https://doi.org/10.14533/jbm.13.78>
18. Sokolov D. V., Bolkhonov B. A., Zhamsaranova S. D., Lebedeva S. N., Bazhenova B. A. Enzymatic hydrolysis of soy protein. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*, 2023, vol. 53, no. 1, pp. 86–96 (in Russian). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418>
19. Pankova S. M., Sakibaev F. A., Holyavka M. G., Vyshkvorkina Y. M., Lukin A. N., Artyukhov V. G. Studies of the processes of the trypsin interactions with ion exchange fibers and chitosan. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2021, vol. 47, pp. 765–776 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/s1068162021030146>
20. Patil U., Baloch K. A., Nile S. H., Kim J. T., Benjakul S. Trypsin from pyloric caeca of Asian seabass: purification, characterization, and its use in the hydrolysis of acid-soluble collagen. *Foods*, 2023, vol. 12, art. ID 2937. <https://doi.org/10.3390/foods12152937>
21. Min J. H., Lee Y. J., Kang H. J., Moon N. R., Park Y. K., Joo S. T., Jung Y. H. Characterization of yeast protein hydrolysate for potential application as a feed additive. *Food Science of Animal Resources*, 2024, vol. 44, no. 3, pp. 723–737. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2024.e33>

Информация об авторах

Леонтьев Виктор Николаевич – кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: leontiev@belstu.by; <https://orcid.org/0000-0001-5348-4350>

Лазовская Олеся Илгамовна – магистр химических наук, ассистент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lazovskaya@belstu.by; <https://orcid.org/0009-0006-0919-3736>

Попеня Анна Руслановна – студент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: popenya@mail.ru

Information about the authors

Leontiev Viktor N. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Department. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by; <https://orcid.org/0000-0001-5348-4350>

Lazovskaya Olesya I. – M. Sc. (Chemistry), Research Assistant. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lazovskaya@belstu.by; <https://orcid.org/0009-0006-0919-3736>

Popenya Anna R. – Student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: popenya@mail.ru