

Подбор рабочих параметров для проведения направленного протеолиза казеина с целью получения биопептидов

И. С. Милентьева*, Н. И. Давыденко, А. Н. Расщепкин



Дата поступления в редакцию: 16.11.2020
Дата принятия в печать: 25.12.2020

Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

*e-mail: irazumnikova@mail.ru



© И. С. Милентьева, Н. И. Давыденко, А. Н. Расщепкин, 2020

Аннотация.

Введение. На сегодняшний день наблюдается значительное ухудшение здоровья населения, связанное с образом жизни. Одним из признаков такого ухудшения является возникновение аллергических реакций на определённые компоненты пищи. Молоко и молочные продукты, благодаря содержанию биологически активных веществ, относятся к функциональным продуктам питания, систематическое употребление которых способствует улучшению здоровья населения. Наличие аллергенов в молоке (сывороточные и молочные белки, в особенности казеин, молочный сахар) может нанести вред людям, имеющим аллергическую реакцию на перечисленные компоненты. Поэтому актуальной задачей является снижение аллергенных свойств казеинов. Цель работы заключается в осуществлении подбора рабочих параметров протеолиза казеина рядом ферментов – эндопептидаз, а именно трипсином, химотрипсином, термолизином, для получения биопептидов из казеина путем варьирования параметров гидролиза.

Объекты и методы исследования. Гидролизаты казеина – биопептиды, исходным сырьем (субстратом) для которых являлся доступный и ценный белок молока – пищевой казеин. В качестве протеаз были использованы следующие ферменты: трипсин, химотрипсин и термолизин. В работе применялись общепринятые методы.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведения гидролиза при температуре 37 ± 2 °C и с использованием различных параметров (фермент, соотношение фермент-субстрата, продолжительность гидролиза) было установлено, что рабочие значения активной кислотности (pH) находились от $7,05 \pm 0,2$ до $7,44 \pm 0,2$. Также при увеличении времени протеолиза увеличивается количество свободных аминокислот. Для получения гидролизированных смесей, содержащих пептиды молекулярной массой менее 18 кДа, рационально использовать термолизин при соотношении 1:100 в течение $24,00 \pm 0,05$ ч, химотрипсин и трипсин при соотношении 1:25 в течение $24,00 \pm 0,05$ ч. Для получения гидролизата, содержащего большое количество аминокислот, необходимо использовать при протеолизе химотрипсин при соотношении фермент-субстрат 1:25 в течение 24 ч или термолизин при соотношении 1:100.

Выводы. Полученные гидролизаты казеина, содержащие биопептиды, которые являются гипоаллергенными, в сравнении с исходным казеином, в дальнейшем могут использоваться при изготовлении специализированной молочной продукции для диетического, спортивного и детского питания.

Ключевые слова. Гидролиз, протеолиз, казеин, белки, пептиды, аминокислоты, трипсин, химотрипсин, термолизин, аллергия

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2694.2020.4).

Для цитирования: Милентьева, И. С. Подбор рабочих параметров для проведения направленного протеолиза казеина с целью получения биопептидов / И. С. Милентьева, Н. И. Давыденко, А. Н. Расщепкин // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 4. – С. 726–735. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-726-735>.

Original article

Available online at <http://fppt.ru/eng>

Casein Proteolysis in Bioactive Peptide Production: Optimal Operating Parameters

Irina S. Milentyeva*, Natalia I. Davydenko, Aleksandr N. Rasshchepkin

Received: November 16, 2020
Accepted: December 25, 2020

Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

*e-mail: irazumnikova@mail.ru



© I.S. Milentyeva, N.I. Davydenko, A.N. Rasshchepkin, 2020

Abstract.

Introduction. Public health is gradually deteriorating as a result of unhealthy lifestyle and diet, which triggers allergic reaction to certain foods. Milk and dairy products are rich in biologically active substances, which makes them a good dietary supplement for athletes, diabetic patients, etc. However, this popular food contains allergens, for instance, such proteins as α S1-casein, α S2-casein, β -casein, and κ -casein. Therefore, one of the most urgent tasks of modern food science is to reduce the allergenic properties of casein. Heat treatment is an option, but thermal exposure leads to denaturation and produces new antigenic determinants, e.g. epitopes. Biotechnological processing is a more promising method. It is based on the catalytic properties of proteolytic enzymes. Enzymes make it possible to obtain a protein hydrolyzate with amino acids of various molecular weights. The present research provided the optimal working parameters of casein proteolysis by various enzymes (endopeptidases), namely trypsin, chymotrypsin, and thermolysin.

Study objects and methods. Casein hydrolysates are casein-based biopeptides, and casein is an accessible and valuable milk protein. Trypsin, chymotrypsin, and thermolysin were used as proteases. The experiment was based on standard methods.

Results and its discussion. At $47 \pm 2^\circ\text{C}$ and $\text{pH } 7.5 \pm 0.2$, the production of low-molecular-weight components of casein hydrolyzate proved feasible when thermolysin was used at a ratio of 1:100 for 24.00 ± 0.05 h, and chymotrypsin and trypsin – at a ratio of 1:25 for 24.00 ± 0.05 h.

Conclusion. The resulting casein hydrolysates contain biologically active peptides and can be used in formulations of low-allergy functional dairy products in allergy-friendly, sports, and baby diets.

Keywords. Hydrolysis, proteolysis, casein, proteins, peptides, amino acids, trypsin, chymotrypsin, thermolysin, allergy

Funding. This research was part of the grant of the President of the Russian Federation for state support of leading scientific schools (NSH-2694.2020.4).

For citation: Milentyeva IS, Davydenko NI, Rasshechkin AN. Casein Proteolysis in Bioactive Peptide Production: Optimal Operating Parameters. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(4):726–735. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-726-735>.

Введение

Питание является основной жизненной потребностью человека, способной влиять на здоровье организма. В связи со снижением качества питания (недостаточным содержанием витаминов и минералов, избыточным содержанием жиров и углеводов в пище и т. п.) ухудшается состояние здоровья: высок риск развития не только алиментарных заболеваний, но и болезней образа жизни (сахарного диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, ожирения и т. п.) [1, 2]. Профилактической мерой данных негативных последствий является систематическое употребление пищевых продуктов, богатых основными нутриентами. Например, систематическое употребление продуктов молочной промышленности, обладающих высокой биологической ценностью из-за содержания незаменимых жирных кислот, аминокислот, витаминов, макроэлементов (кальция) и т. д. [3, 4]. Но не все потребители могут получать пользу от молока и молочных продуктов. Причиной является возникновение аллергии или пищевой непереносимости, заданной генетическими особенностями организма, на компоненты молока [5]. Например, на молочный сахар и/или белки молока.

Коровье молоко содержит 25 видов различных белков, среди которых основным аллергеном является казеин, т. к. на данный кальций-связывающий фосфопротеин приходится 80 % от общего содержания белков [6]. Фракция казеина представлена четырьмя видами белков (рис. 1): α S1-казеин, α S2-казеин, β -казеин и κ -казеин. Причем α S1-казеин является наиболее важным аллергеном [7].

На сегодняшний день нет терапии или лекарственных средств (без побочных эффектов) по устранению аллергии на компоненты молока. Единственный доступный способ – это исключение молочных продуктов из рациона питания. Однако данное решение негативно скажется на здоровье человека, т. к. приведет к дефициту важных питательных веществ, содержащихся в молочных продуктах [7].

С развитием биотехнологии появились новые методы, позволяющие преобразовывать молоко в новые полезные продукты питания путем уменьшения аллергенности их компонентов. Наряду с нагреванием (термической обработкой) можно использовать ферментативный гидролиз и гликилирование [8]. Так как фракции казеина устойчивы к нагреванию, т. е. термостабильны

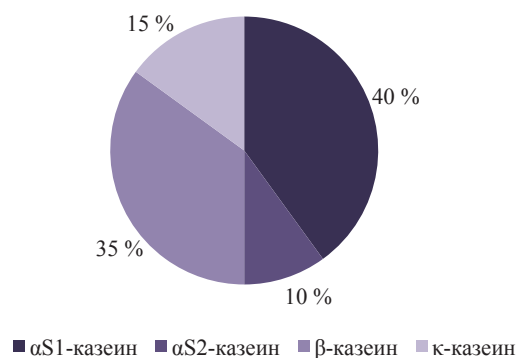


Рисунок 1. Фракции казеина и их содержание от общей массы белка

Figure 1. Casein fractions and their content vs. total protein

при нагревании до 50 °С, но восприимчивы к ферментативной активности, то эффективным методом снижения аллергенности данных соединений является ферментный гидролиз [6].

Под ферментным гидролизом (протеолизом) подразумевается процесс разложения белков на составляющие пептиды и аминокислоты путем воздействия соответствующих ферментов (протеаз или протеолитических ферментов) [9]. При проведении ферментного гидролиза казеина можно получать гипоаллергенные гидролизованные молочные смеси (гидролизаты казеина), содержащие биоактивные пептидные комплексы [10].

Протеолиз имеет ряд закономерностей, связанных с различными факторами (с коллоидными, фазовыми, биохимическими процессами), которые не всегда приводят к получению необходимого продукта. К тому же гидролиз может иметь обратимый характер, когда дезагрегация белка не зашла слишком далеко. Иными словами, для получения биоактивных пептидов необходимо добиться оптимальной степени гидролиза. Для этого следует подобрать эффективные параметры (рН, температура, время) и фермент (соотношение фермент-субстрата). Для проведения ферментного гидролиза в основном используют следующие ферменты:

Экзопептидазы, которые катализируют разрыв концевой пептидной связи. Например, карбокси-пептидазы А и В, аланинаминопептидаза, лейцина-минопептидаза;

Эндопептидазы, которые катализируют разрыв пептидных связей внутри цепи. Например, пепсин, трипсин, химотрипсин, термолизин и эластаза [11].

Для проведения протеолиза можно использовать следующие ферменты:

1) Трипсин – фермент, полученный из поджелудочной железы свиньи. Он легко расщепляет пептидные связи, в образовании которых учувствуют карбоксильные группы лизина или аргинина. Данный фермент осуществляет неглубокий гидролиз белков – расщепляет около одной трети всех пептидных связей [12];

2) Химотрипсин – фермент, полученный из поджелудочной железы свиньи, расщепляющий те связи, которые не расщепляет трипсин. В связи с этим последовательное применение данных ферментов позволяет провести глубокий гидролиз [13];

3) Термолизин – фермент, полученный при метаболизме *Bacillus thermoproteolyticus*, способный расщеплять пептидные связи, образованные остатками лейцина, изолейцина, валина, аланина и фенилаланина [12].

Полученные гидролизаты в дальнейшем можно использовать в качестве компонентов специализированных пищевых продуктов молочной промышленности – функциональных продуктов питания для поддержания здорового состояния

организма, т. е. для спортивного, диетического и детского питания [14].

Цель работы заключается в подборе рабочих параметров для получения гидролизатов казеина – биопептидов, обладающих меньшей аллергенностью, чем исходный белок, путем варьирования параметров гидролиза (соотношения фермент-субстрат, температура, продолжительность и рН гидролиза) при использовании эндопептидаз (трипсина, химотрипсина и термолизина).

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись гидролизаты казеина – биопептиды. Исходным сырьем (субстратом) для них являлся доступный и ценный белок молока – пищевой казеин (Pronadisa Conda, Испания), соответствующий ГОСТ 31689-2012.

В качестве протеаз были использованы следующие ферменты, выбранные у зарубежных поставщиков в связи с отсутствием на российском рынке данных ферментов в чистом виде: трипсин (Gibco (Thermo Scientific), США), химотрипсин (AppliChem, США) и термолизин (Gibco (Thermo Scientific), США).

Проведение протеолиза осуществляли с помощью статического метода. Методика представлена в работе О. В. Козловой и ее коллег [15]. Раствор казеина (10 мг белка на 1 мл дистиллированной воды) гидролизовали путем добавления в смесь фермента в трех разных соотношениях: 1:25, 1:50, 1:100 [16]. В ходе анализа научной литературы по данной тематике были подобраны оптимальные параметры гидролиза казеина представленными выше ферментами. В результате чего гидролиз протекал при температуре в 37 ± 2 °С [17]. Значение рН смеси регулировали добавлением 0,1 М HCl или NaOH в соответствии с оптимальной рН для каждого фермента. Для трипсина, химотрипсина и термолизина оптимальное значение рН составляет от $7,0 \pm 0,2$ до $8,0 \pm 0,2$ [18].

Оценка степени гидролиза определялась по содержанию общего азота. Методика определения представлена в ГОСТ 23327-98. Установление молекулярной массы компонентов гидролизата осуществлялось с помощью электрофореза по Лэм-ли в полиакриламидном геле (ПААГ) [18, 19].

Для гидролизатов, полученных при выбранных рабочих условиях (соотношение фермент-субстрат для каждой протеазы и оптимальная продолжительность гидролиза), осуществлялась оценка аминокислотного состава. Данная проверка выполнялась при помощи ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе «ARACUS» [20].

Результаты и их обсуждение

Изучение влияния соотношения фермент-субстрат и времени на протекание протеолиза. Оптимальный протеолиз казеина оценивали при

Таблица 1. Основные характеристики гидролизатов казеина, полученных в результате обработки белка протеолитическими ферментами

Table 1. Casein hydrolysates obtained by processing protein with proteolytic enzymes

Показатель	Контроль	Фермент-субстратное соотношение при продолжительности гидролиза, ч									
		1:25			1:50			1:100			
		6,00 ± 0,05	12,00 ± 0,05	24,00 ± 0,05	6,00 ± 0,05	12,00 ± 0,05	24,00 ± 0,05	6,00 ± 0,05	12,00 ± 0,05	24,00 ± 0,05	
Трипсин											
Степень протеолиза, %	0	7,50 ± 0,2	7,33 ± 0,2	7,22 ± 0,2	7,15 ± 0,2	7,36 ± 0,2	7,32 ± 0,2	7,27 ± 0,2	7,40 ± 0,2	7,38 ± 0,2	7,26 ± 0,2
pH											
Химотрипсин											
Степень протеолиза, %	0	7,50 ± 0,2	7,11 ± 0,2	7,20 ± 0,2	7,05 ± 0,2	7,47 ± 0,2	7,31 ± 0,2	7,22 ± 0,2	7,28 ± 0,2	7,32 ± 0,2	7,28 ± 0,2
pH											
Термолизин											
Степень протеолиза, %	0	7,50 ± 0,2	7,44 ± 0,2	7,29 ± 0,2	7,26 ± 0,2	7,41 ± 0,2	7,37 ± 0,2	7,30 ± 0,2	7,42 ± 0,2	7,35 ± 0,2	7,31 ± 0,2
pH											

различных соотношениях фермент-субстрата в течение 6, 12 и 24 ч. Результаты серии экспериментов, связанных с подбором оптимального соотношения фермент-субстрата при протеолизе, представлены в таблице 1.

Было определено, что величина pH при протеолизе различными ферментами в течение 6, 12 и 24 ч находится в пределах от $7,05 \pm 0,2$ до $7,44 \pm 0,2$, что находится в пределах оптимальной работы ферментов. Следовательно, такие значения являются рабочими.

Анализируя данные из таблицы 1, видно, что при фермент-субстратном соотношении 1:25 выбранных ферментов наблюдается следующая активность гидролиза. При использовании трипсина через $6,00 \pm 0,05$ ч степень гидролиза была более 2,80 %, через $12,00 \pm 0,05$ ч – более 5,00 %, через $24,00 \pm 0,05$ ч – более 11,00 %. Степень активности гидролиза при применении химотрипсина через $6,00 \pm 0,05$ ч составила более 1,70 %, через $12,00 \pm 0,05$ ч – более 5,00 %, а через $24,00 \pm 0,05$ ч – более 8,30 %. При использовании термолизина степень гидролиза при фермент-субстратном соотношении 1:25 через $6,00 \pm 0,05$ ч была более 1,50 %, через $12,00 \pm 0,05$ ч – 2,60 %, а через $24,00 \pm 0,05$ ч – 6,50 %.

При соотношении фермент-субстрат 1:50 степень активности гидролиза для каждого фермента выглядит следующим образом. Через $6,00 \pm 0,05$ ч применения трипсина степень гидролиза была более 5,50 %, через $12,00 \pm 0,05$ ч – 9,70 %, через $24,00 \pm 0,05$ ч – 12,00 %. Степень активности гидролиза при применении химотрипсина через $6,00 \pm 0,05$ ч составила более 6,00 %, через $12,00 \pm 0,05$ ч – 10,20 %, а через $24,00 \pm 0,05$ ч – 11,00 %. При использовании термолизина выявлено, что степень активности гидролиза стала более 4,90 % через $6,00 \pm 0,05$ ч, 7,00 % через $12,00 \pm 0,05$ ч, 6,40 % через $24,00 \pm 0,05$ ч.

Из таблицы 1 видно, что при использовании выбранных ферментов в соотношении 1:100 наблюдается следующая активность гидролиза. При применении трипсина через $6,00 \pm 0,05$ ч степень активности гидролиза была более 7,60 %, через $12,00 \pm 0,05$ ч – 12,40 %, через $24,00 \pm 0,05$ ч – 16,00 %. Степень активности гидролиза при использовании химотрипсина составила более 8,80 % через $6,00 \pm 0,05$ ч, через $12,00 \pm 0,05$ ч – 10,50 %, а через $24,00 \pm 0,05$ ч – 14,60 %. При соотношении фермент-субстрата 1:100 степень гидролиза при применении термолизина через $6,00 \pm 0,05$ ч была более 6,40 %, через $12,00 \pm 0,05$ ч – 10,50 %, а через $24,00 \pm 0,05$ ч – 14,50 %.

В результате эксперимента по подбору оптимального соотношения фермент-субстрата выявлено, что чем дольше протекает гидролиз, тем выше степень гидролиза. Но, если сравнивать действие ферментов, то при соотношении 1:25 наибольшей активностью при гидролизе, протекающем в течение 6 ч, обладал трипсин, при гидролизе в 12 ч – химотрипсин, при 24 ч – трипсин. При соотношении 1:50 наибольшей активностью при гидролизе, протекающем в течение 6 ч, обладал химотрипсин, при гидролизе в 12 ч – химотрипсин, при 24 ч – термолизин. При соотношении 1:100 наибольшей активностью при гидролизе, протекающем в течение 6 ч, обладал химотрипсин, при гидролизе в 12 ч – трипсин, при 24 ч – трипсин.

Изучение молекулярно-массового распределения образовавшихся пептидов в зависимости от соотношения фермент-субстрат и времени протекания протеолиза. Результаты исследования состава фракций гидролизатов казеина, образовавшихся под действием выбранных ферментов, а именно молекулярно-массовое распределение получившихся пептидов, представлены в таблицах 2–4. Важно, что

нативный казеин с молекулярной массой в 28 кДа являлся контролем.

Из таблицы 2 видно, что в процессе протеолиза оптимальное время, за которое образуется большее количество наименьших фракций (молекулярной массой менее 18 кДа), – $12,00 \pm 0,05$ ч для соотношения фермент-субстрат 1:25 и 1:50. При

данном времени в соотношении 1:25 в состав гидролизата входят пептиды с молекулярной массой от менее 18,0 до 25,0 кДа, при соотношении 1:50 – от 20,0 до 25,0 кДа, а при 1:100 – от 25,0 до 30,0 кДа. Наибольшее количество низкомолекулярных фракций при $12,00 \pm 0,05$ ч образуется при соотношении 1:25.

Таблица 2. Молекулярно-массовое распределение фракций гидролизатов казеина, полученных при воздействии трипсина, %

Table 2. Molecular weight distribution of fractions of casein hydrolysates obtained by trypsin exposure, %

Соотношение фермент-субстрат	Продолжительность гидролиза, ч	Показатель				
		Диапазон молекулярных масс, кДа				
		30,0–28,0	28,0–25,0	25,0–20,0	20,0–18,0	Менее 18,0
1:25	$6,00 \pm 0,05$	3,0	4,3	20,9	25,2	46,0
	$12,00 \pm 0,05$	1,2	3,1	19,7	21,2	52,4
	$24,00 \pm 0,05$	2,5	1,9	19,8	22,0	52,4
1:50	$6,00 \pm 0,05$	2,2	41,4	8,5	15,0	16,4
	$12,00 \pm 0,05$	3,0	2,4	43,0	8,5	15,4
	$24,00 \pm 0,05$	2,1	35,0	29,7	12,3	18,4
1:100	$6,00 \pm 0,05$	45,8	8,0	16,1	14,0	2,8
	$12,00 \pm 0,05$	2,9	35,0	8,5	18,6	3,7
	$24,00 \pm 0,05$	22,5	23,8	20,6	19,8	10,0

Таблица 3. Молекулярно-массовое распределение фракций гидролизатов казеина, полученных при воздействии химотрипсина, %

Table 3. Molecular weight distribution of fractions of casein hydrolysates obtained by chymotrypsin exposure, %

Соотношение фермент-субстрат	Продолжительность гидролиза, ч	Показатель				
		Диапазон молекулярных масс, кДа				
		30,0–28,0	28,0–25,0	25,0–20,0	20,0–18,0	Менее 18,0
1:25	$6,00 \pm 0,05$	2,9	2,6	21,4	22,1	51,0
	$12,00 \pm 0,05$	3,2	2,7	19,8	19,0	52,4
	$24,00 \pm 0,05$	2,1	1,9	19,8	18,0	52,5
1:50	$6,00 \pm 0,05$	3,1	41,4	8,6	14,8	16,7
	$12,00 \pm 0,05$	2,6	2,9	44,6	8,6	15,0
	$24,00 \pm 0,05$	2,2	35,6	29,6	12,2	18,0
1:100	$6,00 \pm 0,05$	46,5	7,8	16,4	14,2	2,8
	$12,00 \pm 0,05$	3,4	36,0	8,6	19,0	3,7
	$24,00 \pm 0,05$	22,0	24,5	21,0	19,6	10,3

Таблица 4. Молекулярно-массовое распределение фракций гидролизатов казеина, полученных при воздействии термолизина, %

Table 4. Molecular weight distribution of fractions of casein hydrolysates obtained by thermolysin exposure, %

Соотношение фермент-субстрат	Продолжительность гидролиза, ч	Показатель				
		Диапазон молекулярных масс, кДа				
		30,0–28,0	28,0–25,0	25,0–20,0	20,0–18,0	Менее 18,0
1:25	$6,00 \pm 0,05$	10,9	3,3	46,6	5,6	32,0
	$12,00 \pm 0,05$	12,5	2,5	32,9	9,0	43,1
	$24,00 \pm 0,05$	4,8	23,4	24,6	18,2	29,0
1:50	$6,00 \pm 0,05$	8,0	14,8	38,7	8,8	29,0
	$12,00 \pm 0,05$	8,4	5,9	47,0	4,7	34,0
	$24,00 \pm 0,05$	17,0	3,2	16,3	20,0	43,6
1:100	$6,00 \pm 0,05$	3,5	12,9	11,5	17,0	52,3
	$12,00 \pm 0,05$	11,5	2,6	15,0	7,0	36,9
	$24,00 \pm 0,05$	0,0	13,0	16,8	15,6	54,5

Результаты исследования показывают, что оптимальное время, за которое образуется большее количество наименьших фракций, – $24,00 \pm 0,05$ ч (табл. 2). Для этого времени при соотношении 1:25, при применении химотрипсина, в состав гидролизата входят пептиды с молекулярной массой от менее 18,0 до 25,0 кДа, при соотношении 1:50 – от 20,0 до 28,0 кДа, а при 1:100 – от 25,0 до 30,0 кДа. Наибольшее количество низкомолекулярных фракций при $24,00 \pm 0,05$ ч образуется при соотношении фермент-субстрат 1:25.

Анализ таблицы 4 показал, что оптимальное время, за которое образуется большее количество наименьших фракций, – $12,00 \pm 0,05$ ч. Для такого времени при соотношении 1:25 и 1:50 в состав гидролизата входят пептиды с молекулярной массой менее 18,0, и от 20,0 и 25,0 кДа, а при 1:100 – менее 18 кДа. Наибольшее количество низкомолекулярных фракций при $12,00 \pm 0,05$ ч образуется при соотношении 1:100.

По результатам распределения видно, что при увеличении продолжительности протеолиза уменьшается содержание пептидов с молекулярной массой 30 кДа и увеличивается количество низкомолекулярных пептидов и аминокислот с молекулярной массой менее 18 кДа. Полученные данные не противоречат ранее изложенной информации, опубликованной отечественными и зарубежными учеными [12, 21–24].

По результатам экспериментов были подобрано оптимальное соотношение фермент-субстрат для каждой протеазы и оптимальная продолжительность гидролиза (табл. 5 и 6).

Таблица 5. Оптимальные параметры гидролиза, подобранные экспериментально на основании степени гидролиза

Table 5. Optimal hydrolysis parameters based on the degree of hydrolysis

Продолжительность гидролиза, ч	Соотношение фермент-субстрат		
	1:25	1:50	1:100
$6,00 \pm 0,05$	трипсин	химотрипсин	химотрипсин
$12,00 \pm 0,05$	химотрипсин	химотрипсин	трипсин
$24,00 \pm 0,05$	трипсин	термолизин	трипсин

Таблица 6. Оптимальные параметры гидролиза, подобранные экспериментально на основании молекулярно-массового распределения

Table 6. Optimal hydrolysis parameters based on molecular weight distribution

Фермент	Соотношение фермент-субстрат	Продолжительность гидролиза, ч
Трипсин	1:25	$12,00 \pm 0,05$
Химотрипсин	1:25	$24,00 \pm 0,05$
Термолизин	1:100	$12,00 \pm 0,05$

Исследование аминокислотного состава полученных гидролизатов. Для гидролизатов, полученных под действием исследуемых ферментов при соблюдении подобранных рабочих параметров, был определен аминокислотный состав. Результаты исследования представлены в таблице 7.

Анализируя данные, представленные в таблице 7, видно, что при увеличении времени протеолиза увеличивается количество свободных аминокислот. Данная зависимость видна на примере использования трипсина (соотношение фермент-субстрат 1:25, при 6, 12 и 24 ч) и химотрипсина (но при 12 и 24 ч), т. к. наибольшее количество свободных аминокислот

Таблица 7. Динамика накопления свободных аминокислот в результате гидролиза казеина трипсином

Table 7. Accumulation of free amino acids as a result of casein hydrolysis by trypsin

Фермент	Трипсин			Химотрипсин			Термолизин		
Аминокислоты, ммоль/л	Фермент-субстратное соотношение								
	1:25		1:100	1:25	1:50	1:100	1:50	1:100	
	Продолжительность ферментативного гидролиза, ч								
	6,00 ± 0,05	12,00 ± 0,05	24,00 ± 0,05	12,00 ± 0,05	24,00 ± 0,05	6,00 ± 0,05	24,00 ± 0,05	12,00 ± 0,05	
Trp	0,07	0,15	0,22	0,29	0,62	0,14	0,18	0,33	0,52
Phe	1,22	1,43	3,02	4,45	4,87	3,70	3,90	5,84	5,11
Leu	3,65	4,52	6,33	7,47	8,67	4,75	5,18	10,67	9,23
Ile	0,32	0,42	0,69	1,12	2,33	0,52	0,95	4,89	3,60
Thr	0,17	0,27	0,30	1,30	3,24	0,60	1,11	1,78	0,72
Met	0,78	0,92	1,24	1,55	3,44	2,24	2,47	3,40	2,32
Lys	0,95	1,60	2,11	4,26	4,80	2,37	4,16	4,73	2,88
Val	0,20	0,34	0,53	1,22	3,32	0,40	0,62	4,90	3,82
His	2,38	2,59	3,55	1,26	3,27	3,62	5,08	2,85	3,20
Arg	0,35	0,76	0,85	2,12	4,43	1,41	2,33	3,45	3,01
Ala	0,50	0,70	0,71	1,55	3,77	1,19	1,65	3,88	1,58
Ser	0,05	0,09	0,12	0,62	3,86	0,21	0,52	1,10	0,45
Glu	0,15	0,12	0,79	1,94	1,25	1,30	1,83	7,85	0,33
Asp	0,03	0,11	0,10	0,13	1,27	0,05	0,07	1,60	0,74
Cys	0,66	0,79	1,01	1,30	1,41	1,20	1,43	1,25	1,26
Tyr	3,21	3,18	3,53	7,25	7,37	4,63	5,45	7,07	7,36
Gly	2,40	2,65	3,48	1,29	3,34	0,33	0,23	0,95	1,55
Всего	17,09	20,64	28,58	39,12	60,26	28,47	37,32	66,54	47,68
							20,46	23,53	
							35,61		

после протеолиза наблюдается при $24,00 \pm 0,05$ ч. Если выбирать между трипсином и химотрипсином, при одинаковых условиях протекания протеолиза, то наиболее богатым по общему содержанию аминокислот и по содержанию фенилаланина, треонина, метионина, лизина, гистидина, аргинина, аланина, глутаминовой кислоты, цистеина и тирозина является гидролизат, полученный при использовании химотрипсина. Но гидролизат, полученный при использовании трипсина, богат глицином и аспарагиновой кислотой. При сравнении содержания свободных аминокислот, полученных протеолизом при соотношении фермент-субстрат 1:100 в течение 12 ч, видно, что при использовании термолизина общее содержание аминокислот выше, как и содержание фенилаланина, лейцина, изолейцина, метионина, валина, гистидина, аргинина, аспарагиновой кислоты, тирозина и глицина. Но в гидролизате, полученном при использовании трипсина, содержится больше треонина, лизина, серина, глутаминовой кислоты и цистеина.

Так, для детского питания важны следующие незаменимые аминокислоты: триптофан, лизин, фенилаланин, треонин, валин, метионин, лейцин, изолейцин, гистидин и аргинин. Зная при каких параметрах гидролиза можно получить максимальное содержание вышеперечисленных аминокислот, можно создавать функциональные продукты питания, использующиеся в диетологической коррекции детского питания. Например, для коррекции функциональных расстройств пищеварения (регургитаций, колик, запора) [25–27].

Помимо уменьшения аллергенности и питательной роли продукта, гидролизаты казеина обладают противовоспалительными свойствами, т. е. способны улавливать радикалы и хелатировать металлы, выводя их из организма. Следовательно, гидролизаты казеинов являются функциональными продуктами, способными предотвращать развитие хронических заболеваний (сердечно-сосудистые заболевания, рак и прочие, вызванные окислительным стрессом) [12].

В результате проведенной работы были получены гидролизаты казеина. Для каждого была

определена степень гидролиза и молекулярно-массовое распределение фракций, по которым были установлены оптимальные рабочие параметры протеолиза. В дальнейшем для гидролизатов, полученных с помощью выбранных параметров, был определен аминокислотный состав.

Выводы

В данной работе были проведены исследования по подбору рабочих условий для получения гидролизатов казеина для уменьшения аллергенности молока и молочных продуктов. Исследования показали, что для получения гидролизата, содержащего разнообразное количество аминокислот, необходимо использовать термолизин при соотношении фермент-субстрат 1:50 в течение $24,00 \pm 0,05$ ч. Для получения наиболее гидролизованных смесей, в которых преобладают пептиды молекулярной массой менее 18 кДа, рационально использовать термолизин при соотношении 1:100 в течение $24,00 \pm 0,05$ ч, химотрипсин и трипсин при соотношении 1:25 в течение $24,00 \pm 0,05$ ч. Для получения гидролизата, содержащего большое количество аминокислот, необходимо использовать при протеолизе химотрипсин при соотношении фермент-субстрат 1:25 в течение $24,00 \pm 0,05$ ч или термолизин при соотношении 1:100. Варьируя параметрами протеолиза, можно получать гидролизованные молочные продукты с заданным аминокислотным составом, что важно при производстве функциональных продуктов питания.

Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в подготовке и написании статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликта интересов нет.

Contribution

All the authors bear equal responsibility for the content of the article.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Prosekov, A. Yu. Providing food security in the existing tendencies of population growth and political and economic instability in the world / A. Yu. Prosekov, S. A. Ivanova // Foods and Raw Materials. – 2016. – Vol. 4, № 2. – P. 201–211. <https://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-2-201-211>.
2. Perspective: advancing understanding of population nutrient-health relations via metabolomics and precision phenotypes / S. Andraos, M. Wake, R. Saffery [et al.] // Advances in Nutrition. – 2019. – Vol. 10, № 6. – P. 944–952. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz045>.
3. Antioxidant properties of milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge / I. T. Khan, M. Nadeem, M. Imran [et al.] // Lipids in Health and Disease. – 2019. – Vol. 18, № 1. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>.
4. Dairy fats and cardiovascular disease: Do we really need to be concerned? / R. Lordan, A. Tsoupras, B. Mitra [et al.] // Foods. – 2018. – Vol. 7, № 3. <https://doi.org/10.3390/foods7030029>.

5. Genes and eating preferences, their roles in personalized nutrition / A. Vesnina, A. Prosekov, O. Kozlova [et al.] // *Genes*. – 2020. – Vol. 11, № 4. <https://doi.org/10.3390/genes11040357>.
6. Molecular approaches for diagnosis, therapy and prevention of cow's milk allergy / B. Linhart, R. Freidl, O. Elisyutina [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11, № 7. <https://doi.org/10.3390/nu11071492>.
7. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention / H. Hochwallner, U. Schulmeister, I. Swoboda [et al.] // *Methods*. – 2014. – Vol. 66, № 1. – P. 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.08.005>.
8. Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA / Z. Sun, M. Wang, S. Han [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32024-x>.
9. Nongonierma, A. B. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins / A. B. Nongonierma, R. J. FitzGerald // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2018 – Vol. 410, № 15. – P. 3407–3423. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0793-9>.
10. Nano-biosensing platforms for detection of cow's milk allergens: An overview / M. Nehra, M. Lettieri, N. Dilbaghi [et al.] // *Sensors*. – 2019. – Vol. 20, № 1. <https://doi.org/10.3390/s20010032>.
11. Rawlings, N. D. Origins of peptidases / N. D. Rawlings, A. Bateman // *Biochimie*. – 2019. – Vol. 166. – P. 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.026>.
12. Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes / F. Bamdad, S. H. Shin, J.-W. Suh [et al.] // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 4. <https://doi.org/10.3390/molecules22040609>.
13. Ферментативная обработка как инструмент придания функциональных свойств белкам молочной сыворотки / Е. Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева [и др.] // *Аграрно-пищевые инновации*. – 2019. – Т. 8, № 4. – С. 81–88. <https://doi.org/10.31208/2618-7353-2019-8-81-88>.
14. Снижение аллергенных свойств белков молока. Технологические подходы / В. П. Курченко, Т. Н. Головач, В. И. Круглик [и др.] // *Молочная промышленность*. – 2012. – № 4. – С. 73–75.
15. Пат. 2415943С1 Российская Федерация, МПК C12P21/06, C07K7/08. Биологически активный пептид, полученный из молочного белка / Козлова О. В., Разумникова И. С., Бабищ О. О. [и др.]; заявитель и патентообладатель Козлова О. В., Разумникова И. С., Бабищ О. О. [и др.]. – № 2010105589/10; заявл. 16.02.2010; опубл. 10.04.2011; Бюл. № 10. – 5 с.
16. Курбанова, М. Г. Исследование влияния фермент-субстратного соотношения на процесс гидролиза сывороточных белков / М. Г. Курбанова, К. А. Шемякова // *Вестник современных исследований*. – 2017. – Т. 11, № 8–1. – С. 38–40.
17. Закономерности гидролиза сывороточных белков экзо- и эндопротеазами / Т. Н. Головач, Н. В. Гавриленко, Н. К. Жабанос [и др.] // *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. – 2008. – Т. 3, № 1. – С. 85–98.
18. ОФС.1.2.1.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmascopoeia.ru/ofs-1-2-1-0023-15-elektroforez-v-poliakrilamidnom-gele/>. – Дата обращения 03.11.2020.
19. Comparison of the allergenicity and immunogenicity of camel and cow's milk – A study in brown Norway rats / N. Z. Maryniak, E. B. Hansen, A.-S. R. Ballegaard [et al.] // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10, № 12. <https://doi.org/10.3390/nu10121903>.
20. Курбанова, М. Г. Направленный гидролиз белков молока / М. Г. Курбанова, О. О. Бабищ, А. Ю. Просяков // *Молочная промышленность*. – 2010. – № 10. – С. 73–75.
21. Modulation of milk allergenicity by baking milk in foods: A proteomic investigation / S. L. Bavaro, E. De Angelis, S. Barni [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11, № 7. <https://doi.org/10.3390/nu11071536>.
22. Azdad, O. Reduction of the allergenicity of cow's milk α -lactalbumin under heat-treatment and enzymatic hydrolysis in Moroccan population / O. Azdad, N. Mejrhit, L. Aarab // *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. – 2018. – Vol. 50, № 4. – P. 177–183. <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.60>.
23. Агаркова, Е. Ю. Ферментативная конверсия как способ получения биологически активных пептидов / Е. Ю. Агаркова, А. Г. Курчинин // *Вестник мурманского государственного технического университета*. – 2018. – Т. 21, № 3. – С. 412–419. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419>.
24. Кручинин, А. Г. Использование протеолиза белков молока при разработке молочных продуктов со сниженной аллергенностью / А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева, Е. Ю. Агаркова // *Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова*. – 2015. – № 1. – С. 289–291.
25. Яйленко, А. А. Роль макро- и микронутриентов в профилактике и коррекции когнитивных расстройств у детей / А. А. Яйленко // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. – 2020. – Т. 19, № 1. – С. 216–226.
26. Protein digestion of baby foods: Study approaches and implications for infant health / J. Gan, G. M. Bornhorst, B. M. Henrick [et al.] // *Molecular Nutrition and Food Research*. – 2018. – Vol. 62, № 1. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700231>.
27. Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia *Astragalus danicus* in different regions / O. Babich, A. Prosekov, A. Zaushtinsena [et al.] // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5, № 8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02245>.

References

1. Prosekov AYu, Ivanova SA. Providing food security in the existing tendencies of population growth and political and economic instability in the world. *Foods and Raw Materials*. 2016;4(2):201–211. <https://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-2-201-211>.
2. Andraos S, Wake M, Saffery R, Burgner D, Kussmann M, O'Sullivan J. Perspective: advancing understanding of population nutrient-health relations via metabolomics and precision phenotypes. *Advances in Nutrition*. 2019;10(6):944–952. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz045>.
3. Khan IT, Nadeem M, Imran M, Ullah R, Ajmal M, Jaspal MH. Antioxidant properties of milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*. 2019;18(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>.
4. Lordan R, Tsoupras A, Mitra B, Zabetakis I. Dairy fats and cardiovascular disease: Do we really need to be concerned? *Foods*. 2018;7(3). <https://doi.org/10.3390/foods7030029>.
5. Vesnina A, Prosekov A, Kozlova O, Atuchin V. Genes and eating preferences, their roles in personalized nutrition. *Genes*. 2020;11(4). <https://doi.org/10.3390/genes11040357>.
6. Linhart B, Freidl R, Elisyutina O, Khaitov M, Karaulov A, Valenta R. Molecular approaches for diagnosis, therapy and prevention of cow's milk allergy. *Nutrients*. 2019;11(7). <https://doi.org/10.3390/nu11071492>.
7. Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, Spitzauer S, Valenta R. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*. 201;66(1):22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.08.005>.
8. Sun Z, Wang M, Han S, Ma S, Zou Z, Ding F, et al. Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA. *Scientific Reports*. 2018;8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32024-x>.
9. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018;410(15):3407–3423. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0793-9>.
10. Nehra M, Lettieri M, Dilbaghi N, Kumar S, Marrazza G. Nano-biosensing platforms for detection of cow's milk allergens: An overview. *Sensors*. 2019;20(1). <https://doi.org/10.3390/s20010032>.
11. Rawlings ND, Bateman A. Origins of peptidases. *Biochimie*. 2019;166:4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.026>.
12. Bamdad F, Shin SH, Suh J-W, Nimalaratne C, Sunwoo H. Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. *Molecules*. 2017;22(4). <https://doi.org/10.3390/molecules22040609>.
13. Agarkova EYu, Kruchinin AG, Ryazantzeva KA, Pryanichnikova NS. Enzymatic processing as a tool of giving functional properties to proteins of milk serum. *Agrarian-and-Food Innovations*. 2019;8(4):81–88. (In Russ.). <https://doi.org/10.31208/2618-7353-2019-8-81-88>.
14. Kurchenko VP, Golovach TN, Kruglik VI, Haritonov VD, Agarkova EYu. Lowering of allergenic properties of milk proteins. *Technological approaches*. *Dairy Industry*. 2012;(4):73–75. (In Russ.).
15. Kozlova OV, Razumnikova IS, Babich OO, Prosekov AYu, Kurbanova MG. Biologically active peptide prepared of lactic protein. *Russia patent RU 2415943C1*. 2011.
16. Kurbanova MG, Shevyakova KA. Investigation of the influence of the enzyme-substrate relation on the process of hydrolysis of serum proteins. *Vestnik sovremennykh issledovaniy [Bulletin of Contemporary Research]*. 2017;11(8–1):38–40. (In Russ.).
17. Golovach TN, Gavrilenko NV, Zhabanos NK, Kurchenko VP. Regularities of hydrolysis of whey proteins with exo- and endoproteases. *Proceedings of the Belarusian State University. Series of Physiological, Biochemical and Molecular Biology Sciences*. 2008;3(1):85–98. (In Russ.).
18. OFS.1.2.1.0023.15. Ehlektroforez v poliakrilamidnom gele [Polyacrylamide gel electrophoresis] [Internet]. [cited 2020 Nov 03]. Available from: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0023-15-elektroforez-v-poliakrilamidnom-gele/>.
19. Maryniak NZ, Hansen EB, Ballegaard A-SR, Sancho AI, Bøgh KL. Comparison of the allergenicity and immunogenicity of camel and cow's milk – A study in brown Norway rats. *Nutrients*. 2018;10(12). <https://doi.org/10.3390/nu10121903>.
20. Kurbanova MG, Babich OO, Prosekov AYu. Directed hydrolysis of milk proteins. *Dairy Industry*. 2010;(10):73–75. (In Russ.).
21. Bavaro SL, De Angelis E, Barni S, Pilolli R, Mori F, Novembre EM, et al. Modulation of milk allergenicity by baking milk in foods: A proteomic investigation. *Nutrients*. 2019;11(7). <https://doi.org/10.3390/nu11071536>.
22. Azdad O, Mejriht N, Aarab L. Reduction of the allergenicity of cow's milk α -lactalbumin under heat-treatment and enzymatic hydrolysis in Moroccan population. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;50(4):177–183. <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.60>.

23. Agarkova EYu, Kruchinin AG. Enzymatic conversion as a method of producing biologically active peptides. Vestnik of MSTU. 2018;21(3):412–419. (In Russ.). <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419>.
24. Kruchinin AG, Ryazantseva KA, Agarkova EYu. Use of milk protein proteolysis in development of dairy products with reduced allergenicity. International scientific-practical conference dedicated to the memory of Vasily Matveevich Gorbatov. 2015;(1):289–291. (In Russ.).
25. Yaylenko AA. Role of macro- and micronutrients in the prevention and correction of cognitive disorders in children. Vestnik of the Smolensk State Medical Academy. 2020;19(1):216–226. (In Russ.).
26. Gan J, Bornhorst GM, Henrick BM, German JB. Protein digestion of baby foods: Study approaches and implications for infant health. Molecular Nutrition and Food Research. 2018;62(1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700231>.
27. Babich O, Prosekov A, Zaushintsena A, Sukhikh A, Dyshlyuk L, Ivanova S. Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia *Astragalus danicus* in different regions. Heliyon. 2019;5(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02245>.

Сведения об авторах

Милентьева Ирина Сергеевна

канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры бионанотехнологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (3842) 39-68-74, e-mail: irazumnikova@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-3536-562X>

Давыденко Наталия Ивановна

д-р техн. наук, доцент, профессор кафедры технологии и организации общественного питания, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (3842) 39-68-56, e-mail: nat1861@yandex.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-2479-8750>

Расщепкин Александр Николаевич

д-р техн. наук, доцент, профессор кафедры теплохладотехники, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6

Information about the authors

Irina S. Milentyeva

Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Bionanotechnology, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-74, e-mail: irazumnikova@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-3536-562X>

Natalia I. Davydenko

Dr.Sci.(Eng.), Associate Professor, Professor of the Department of Catering Technology and Organization, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-56, e-mail: nat1861@yandex.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-2479-8750>

Aleksandr N. Rasshchepkin

Dr.Sci.(Eng.), Associate Professor, Professor of the Department of Heat and Refrigerating Engineering, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia