

УДК 637.334

Д.В. Абрамов¹, Д.С. Мягконосов¹, Г.Н. Рогов¹, Е.В. Топникова¹,
Е.Г. Овчинникова¹, А.И. Григорьева¹, Г.Б. Гаврилов², В.Г. Гаврилов³, В.Б.Грачев⁴

¹ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Углич

²Ярославский государственный институт качества сырья и пищевых продуктов,
г. Ярославль

³ООО «Ярославская научно-исследовательская лаборатория молочного сырья»,
г. Ярославль

⁴ООО «АртВкус», г. Москва

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ ПРОФИЛЕЙ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И ЕЁ БЕЛКОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Представлены результаты исследования пептидных профилей различных видов молочной сыворотки (подсырной, творожной, казеиновой), белковых концентратов и полученных из них ферментативных гидролизатов методом гель-фильтрации высокого разрешения (FPLC-хроматографии). Установлено, что состав и распределение пептидных фракций существенно зависят от типа сыворотки и технологических параметров её обработки. Результаты исследования имеют важное значение для создания новых функциональных ингредиентов пищевого, фармацевтического и косметического назначения.

Ключевые слова: *молочная сыворотка, пептидные профили, белковые гидролизаты, гель-фильтрация высокого разрешения, биологически активные пептиды, функциональные продукты*

Молочная сыворотка по своему составу, пищевой и биологической ценности относится к важнейшему сырью с естественным набором жизненно важных компонентов. Из нее можно производить широкую гамму не только пищевых продуктов и косметических препаратов, но и средств лечебно-диетической направленности [1, 2, 3]. Современные исследования демонстрируют, что ежегодное мировое производство молочной сыворотки превышает 200 миллионов тонн [3, 4], при этом значительная часть этого ценного сырья используется неэффективно или сбрасывается в сточные воды, создавая экологические проблемы [5, 6].

В последние десятилетия внимание исследователей привлекают пептиды молочного происхождения, которые проявляют антиоксидантную, антимикробную, иммуномодулирующую, гипотензивную и другую биологическую активность [4–8]. Особый интерес представляют так называемые нативные пептидные комплексы (НПК) молочной сыворотки. НПК изначально содержатся в сыром молоке и частично образуются при производстве молочных продуктов, предусматривающем коагуляцию белков с отделением сыворотки. НПК также могут быть получены при направленном ферментативном гидролизе сывороточных белков [8, 9, 10].

Основной целью данной работы было проведение комплексного исследования качественного и количественного состава НПК в различных видах молочной сыворотки и её производных с использованием современных аналитических методов и оценка перспектив их практического применения. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

– провести сравнительный анализ пептидных профилей различных видов молочной сыворотки (подсырной, творожной и полученной при изоэлектрическом осаждении казеина), концентратов сывороточных белков, полученных методом ультрафильтрации (КСБ-УФ), и гидролизатов сывороточных белков, полученные при разных режимах гидролиза;

– оценить перспективы практического использования результатов проделанной научно-исследовательской работы в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Для определения пептидных профилей исследованных объектов использовали гель-фильтрацию высокого разрешения (FPLC-хроматография). Анализ проводили на хроматографической системе АКТА Pure 25 (Cytiva, Швеция) с использованием хроматографической колонки Superose 6 Increase 10/300, позволяющей дифференцировать водорастворимые фракции белковой природы с молекулярной массой от 2 до 500 кДа. В состав этих фракций входят НПК и аминокислоты, которые признаны в качестве биологически активных компонентов, имеющих высокую усвояемость и относительно бóльшую скорость всасывания, чем основной белок молока – казеин.

Анализ пептидных профилей *подсырной сыворотки* показал, что в ней содержится 7 основных фракций (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика белковых фракций подсырной сыворотки

Пик	Время элюирования (мин)	Молекулярная масса (кДа)	Площадь пика (%)	Идентификация	Биологическая активность
A	8,19±0,15	–	2,09±0,21	Свободный объем	-
B	17,00±0,18	69–200	3,08±0,25	Иммуноглобулины + бычий сывороточный альбумин (БСА)	Иммуномодулирующая
C	18,10±0,12	36	25,50±1,15	β-лактоглобулин	Аллергенность
D	18,69±0,11	14	16,86±0,92	α-лактальбумин	Кальций-связывающая
E	20,85±0,20	2–10	39,77±1,45	Протеозопептоны	Пребиотическая

Продолжение таблицы 1

Пик	Время элюирования (мин)	Молекулярная масса (кДа)	Площадь пика (%)	Идентификация	Биологическая активность
F	22,43±0,25	1–2	1,85±0,18	Среднемолекулярные пептиды	Антимикробная
G	25,19±0,30	<1	10,85±0,75	Низкомолекулярные пептиды	Биоактивная

Интересно отметить, что между подсырной сывороткой, полученной от разных видов сыров с низкой температурой второго нагревания (Голландский и Российский) не обнаружено статистически значимых различий в пептидных профилях ($p > 0,05$ по критерию Стьюдента), что свидетельствует о стандартности белкового состава подсырной сыворотки независимо от вида производимого сыра.

В отличие от подсырной *творожная сыворотка* характеризовалась следующими особенностями. Ее качественные отличия заключались в полном отсутствии фракций с молекулярной массой >36 кДа (иммуноглобулины и БСА) и дополнительном обнаружении пика в области 2 кДа (7,45 %). Количественные различия подсырной и творожной сывороток приведены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнение пептидных профилей подсырной и творожной сыворотки

Параметр	Подсырная сыворотка	Творожная сыворотка	p-value
Белки >36 кДа (%)	3,08±0,25	0±0	<0,001
β -лактоглобулин (%)	25,50±1,15	21,86±1,05	0,023
α -лактальбумин (%)	16,86±0,92	18,07±0,88	0,112
Пептиды 2-10 кДа (%)	39,77±1,45	52,63±1,65	<0,001
Пептиды ≤ 2 кДа (%)	12,70±0,85	7,45±0,65	<0,001
Общее содержание пептидов (%)	52,47±1,72	60,08±1,85	0,008

Статистический анализ (ANOVA) подтвердил значимость различий между видами сыворотки по большинству параметров ($p < 0,05$).

Наблюдаемые различия объясняются особенностями технологического процесса производства творога, а именно: более низкими значениями pH (4,5–4,6 против 6,2–6,4); повышенными температурами обработки сгустка; наличием молочнокислого брожения за счет внесенной заквасочной микрофлоры.

Для сравнения в табл. 3 приведены результаты оценки пептидных профилей *сыворотки, полученной при кислотном осаждении казеина соляной и уксусной кислотой*.

Таблица 3

Влияние вида кислоты на состав сыворотки

Параметр	Соляная кислота	Уксусная кислота	p-value
Имуноглобулины + БСА (%)	5,95±0,35	0±0	<0,001
β -лактоглобулин (%)	25,98±1,25	4,24±0,45	<0,001
α -лактальбумин (%)	15,93±0,95	18,83±1,05	0,015
Пептиды 2-10 кДа (%)	41,99±1,55	59,61±1,75	<0,001
Общее содержание пептидов (%)	51,02±1,82	76,60±2,05	<0,001

Исследование влияния вида кислоты на пептидный профиль сыворотки выявило, что уксусная кислота вызывает более глубокие изменения белкового состава. При этом наблюдается избирательное осаждение β -лактоглобулина. Как следствие, возрастает доля пептидов в белковой части казеиновой сыворотки при осаждении уксусной кислотой. Возможно, это связано с более низкой ионной силой уксусной кислоты при использовании её в качестве подкислителя и необходимости добавления этой кислоты в большем количестве для доведения до изоэлектрической точки казеина.

Сравнение пептидных профилей *растворимой белковой фракции КСБ-УФ-50* и *КСБ-УФ-80* выявили следующие различия. КСБ-УФ-50 содержит остаточные количества пептидов (2–10 кДа), соотношение белков и пептидов – 85:15, максимальную долю составляет β -лактоглобулин (высота пика 110 mAU). КСБ-УФ-80 практически не содержит пептидных фракций, соотношение белков и пептидов – 98:2, а высота основного пика β -лактоглобулина составляет 95 mAU.

Эти различия объясняются процессом диафильтрации, который проводится после ультрафильтрации в технологии белковых концентратов с содержанием белков не менее 75 %, в том числе используемым при производстве КСБ-УФ-80, который приводит к практически полному удалению низкомолекулярных фракций.

Белковые концентраты содержат все белки, содержащиеся в исходной сыворотке. Максимальное количество в белковых концентратах составляет β -лактоглобулин.

Белковый состав *КСБ-УФ-80 ТМ*, представляющего собой белковый концентрат, в технологии которого перед мембранным концентрированием сывороточные белки подвергаются термомеханической обработке, характеризуется отсутствием нативного β -лактоглобулина; частичным сохранением α -лактальбумина (18–20 %), появлением агрегированных форм белков и существенным изменением пептидного профиля. Это может повлиять на функциональные свойства белка, его способность к гидролизу и биологическую активность получаемых гидролизатов.

Характеристика *гидролизата сывороточных белков неглубокого расщепления* (степень гидролиза DH 12 %), полученного в экспериментальных условиях, в сравнении с коммерческим образцом (степень гидролиза DH 8 %) приведена в табл. 4.

Таблица 4

Сравнение гидролизатов неглубокого расщепления

Параметр	Гидролизат (12 % DH)	Optipep4Bars (8 % DH)	p-value
β -лактоглобулин	8,46±1,05	19,75±1,65	<0,001
α -лактальбумин + полипептиды	75,29±2,85	39,17±2,05	<0,001
Среднемолекулярные пептиды (4–8 кДа) (%)	14,51±0,85	28,90±1,25	<0,001
Низкомолекулярные пептиды (2–4 кДа) (%)	1,74±0,15	12,18±0,75	<0,001
Растворимость (%)	75,2±2,5	78,5±3,0	

Данные табл. 4 указывают на то, что оба гидролизата содержат значительное количество негидролизованых белков, опытный образец характеризуется более высокой степенью гидролиза.

При исследовании гидролизатов сывороточных белков более глубокого расщепления (45 % DH) установлено, что в их составе содержатся фракции с молекулярной массой от 8 до 12 кДа в количестве $14,41 \pm 0,75$ %, а с молекулярной массой от 4 до 8 кДа – в количестве $32,17 \pm 1,15$ %. Низкомолекулярные пептиды (2–3 кДа) составили $49,05 \pm 1,45$ %, а свободные аминокислоты – $4,37 \pm 0,25$ %. Все эти группы по литературным данным могут выполнять функции биологически активных компонентов, в том числе выполняющих антимикробные, иммуномодулирующие, антиоксидантные, гипотензивные и эмульгирующие.

Преимуществом гидролизатов глубокого расщепления является практически полное отсутствие интактных белков, высокое содержание биологически активных фракций (>80 %), отличная растворимость (>95 %) и низкая аллергенность, что предопределяет возможность расширенного применения таких гидролизатов в разных целевых направлениях.

По результатам проделанной работы сделаны следующие выводы.

Неизменяемая часть белковых фракций молочной сыворотки представлена протеозопептонами и пептидами с разной молекулярной массой и может рассматриваться как источник нативных пептидных комплексов. Эта часть устойчива к воздействию технологических факторов и остаётся в сыворотке после удаления казеина и основных сывороточных белков. Для получения сухой формы нативных пептидных комплексов, наиболее технологичной для применения в производстве пищевых продуктов, необходимо проводить дополнительную очистку от небелковых соединений (лактозы, солей, молочной кислоты).

Изменяемая часть белковых фракций молочной сыворотки представлена белками иммуноглобулинами, бычьим сывороточным альбумином, β -лактоглобулином и α -лактальбумином. Они достаточно легко выделяются из сыворотки в виде белковых концентратов (КСБ-УФ-50, КСБ-УФ-80 и КСБ-УФ-80 ТМ) и могут рассматриваться как белковый субстрат для получения пептидных комплексов способом ферментативного гидролиза с широким спектром функциональных свойств.

Дальнейшее детальное изучение функциональных свойств и биологической активности выделенных и полученных в результате ферментативного гидролиза пептидных фракций позволит уточнить их свойства и на основе этого обосновать новые возможности для создания инновационных продуктов функционального питания, фармацевтических препаратов и косметических средств, способствуя тем самым решению важной задачи глубокой комплексной переработки молочного сырья.

Список использованной литературы:

1. **Храмцов, А.Г.** Современные направления высокотехнологичной переработки молочной сыворотки / А.Г. Храмцов // Переработка молока. 2023. № 1. С. 30–32.
2. **Гаврилов, Г.Б.** Справочник по переработке молочной сыворотки. Технологии, процессы и аппараты, мембранное оборудование / Г.Б. Гаврилов, А.Ю. Просеков, Э.Ф. Кравченко, Б.Г. Гаврилов. – СПб: ИД Профессия, 2015. – 176 с.
3. **Волкова, Т.А.** Значимость продуктов из сыворотки в современном ассортименте пищевой продукции / Т.А. Волкова // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела: Материалы V межд. науч.-практ. конф. – Ставрополь: ФГАОУ ВПО СКФУ, 2015. – С. 62–65.
4. **Korhonen H.** Bioactive peptides: Production and functionality / H. Korhonen, A. Pihlanto // International Dairy Journal. 2006. № 16(9). P. 945–960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>

5. **Nongonierma, A.B.** The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review / A.B. Nongonierma, R.J. FitzGerald // *Journal of Functional Foods*. 2015. № 17. P. 640–656. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.021>
6. **Smithers G.W.** Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. / G.W. Smithers // *International Dairy Journal*. 2015. № 48. P. 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
7. **Nielsen, S.D.** Bioactive milk peptides: an updated comprehensive overview and database. / S.D. Nielsen et al. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2024. № 64(31). P. 11510–11529. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2240396>
8. **Mansinbhai, C.H.** Anti-Inflammatory, ACE Inhibitory, Antioxidative Activities and Release of Novel Antihypertensive and Antioxidative Peptides from Whey Protein Hydrolysate. / C.H. Mansinbhai et al. // *Journal of the American Nutrition Association*. 2022. № 42(4). P. 371–385. <https://doi.org/10.1080/07315724.2022.2052201>
9. **Chatterton, D.E.W.** Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. / D.E.W. Chatterton et al. // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013. № 45(8). P. 1730–1747. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.028>
10. **Tavares, T.G.** Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes / T.G. Tavares et al. // *Peptides*. 2012. № 38(1). P. 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.021>