

Биологически активные гидролизаты белков молока и их комплексы включения с циклодекстринами

Т. Н. Головач^{1,*}, З. В. Ловкис², В. П. Курченко¹,
А. В. Янцевич³, Е. И. Тарун⁴, Н. В. Дудчик⁵,
И. В. Ржепаковский⁶, А. Д. Лодыгин⁶

¹ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

² Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию, Минск, Беларусь

³ Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

⁴ Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова, Минск, Беларусь

⁵ Научно-практический центр гигиены, Минск, Беларусь

⁶ Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Поступила в редакцию: 19.03.2024

Принята после рецензирования: 25.04.2024

Принята к публикации: 07.05.2024

*Т. Н. Головач: halavachtn@gmail.com,
<https://orcid.org/0000-0002-2096-8030>

З. В. Ловкис: <https://orcid.org/0000-0002-2641-3888>

В. П. Курченко: <https://orcid.org/0000-0002-4859-2389>

А. В. Янцевич: <https://orcid.org/0000-0001-6786-3589>

Е. И. Тарун: <https://orcid.org/0000-0001-5711-6037>

Н. В. Дудчик: <https://orcid.org/0000-0002-5877-9307>

И. В. Ржепаковский: <https://orcid.org/0000-0002-2632-8923>

А. Д. Лодыгин: <https://orcid.org/0000-0001-8460-2954>

© Т. Н. Головач, З. В. Ловкис, В. П. Курченко, А. В. Янцевич, Е. И. Тарун, Н. В. Дудчик, И. В. Ржепаковский, А. Д. Лодыгин, 2024



Аннотация.

Ферментативный гидролиз белков молока – эффективный технологический прием для повышения их пищевой и биологической ценности, а также снижения аллергенного потенциала. Последующее комплексообразование пептидов с циклодекстринами (ЦД) направлено на снижение горечи гидролизованных белков. Цель работы – получение гидролизатов сывороточных белков молока и комплексов включения пептидов с ЦД, определение пептидного состава расщепленных белков молока, оценка биоактивных и органолептических свойств гидролизатов и комплексов включения.

Объектами исследования являлись ферментативные гидролизаты сывороточных белков молока с глубокой степенью гидролиза и их комплексы включения с β - и γ -ЦД. Для расщепления белков применяли протеазу алкалазу (Alcalase®2.4L FG), гидролизаты подвергали микро- и ультрафильтрации (отсечка 10 кДа). Пептидный состав гидролизованных белков определяли высокоэффективной жидкостной хроматографией и хромато-масс-спектрометрией, антимуtagenную активность – в тесте Эймса, антибактериальное действие – импедиметрическим методом. Антиоксидантный эффект оценивали с использованием флуориметрического и спектрофотометрического подходов, антигенные свойства – по данным конкурентного иммуноферментного анализа. Уровень горечи опытных образцов устанавливали органолептически.

Подобраны режимы расщепления сывороточных белков молока алкалазой для достижения эффективной микро- и ультрафильтрации гидролизата. Получены гипоаллергенные пептидные фракции и их комплексы включения с β - и γ -ЦД. В результате протеолиза молочной сыворотки и последующей фильтрации с/без тиндализации установлено снижение остаточной антигенности в 265/589 раз соответственно. По данным флуориметрического метода показано увеличение антиоксидантной активности гидролизата в составе комплексов с β/γ -ЦД в 1,79/1,90 раза соответственно. Связывание β -ЦД с пептидами обусловило возрастание их антимикробного действия в отношении *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Эффективное снижение горечи установлено после взаимодействия гидролизата с β -ЦД.

Ферментативные гидролизаты белков молока и их комплексы включения с ЦД являются перспективными заменителями нативного белкового компонента для продуктов питания функционального назначения, что обусловлено их низким аллергенным потенциалом, приемлемым вкусом и подтвержденными биоактивными свойствами.

Ключевые слова. Сывороточные белки, ферментативный гидролиз, ультрафильтрация, степень гидролиза, пептиды, циклодекстрин, биологическая активность

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Министерства образования Республики Беларусь «Наноконструкции циклодекстринов с биологически активными гидролизатами белков молока для специализированных продуктов питания» (договор № 002/2023–БГУ от 20.03.2023) и «Биологически активные фракции гидролизатов белков молока для продуктов функционального назначения» (договор № 002/2024–БГУ от 13.03.2024).

Для цитирования: Биологически активные гидролизаты белков молока и их комплексы включения с циклодекстринами / Т. Н. Головач [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 3. С. 461–482. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2521>

Biologically Active Dairy Protein Hydrolysates and Their Cyclodextrin Inclusion Complexes: Biotechnological Aspects of Production

Tatsiana M. Halavach^{1,*}, Zenon V. Lovkis², Vladimir P. Kurchenko¹,
Aleksei V. Yantsevich³, Ekaterina I. Tarun⁴, Natalia V. Dudchik⁵,
Igor V. Rzhepakovsky⁶, Aleksei D. Lodygin⁶



¹ Belarusian State University^{ROR}, Minsk, Belarus

² Scientific and Practical Centre for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³ Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus^{ROR}, Minsk, Belarus

⁴ International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus

⁵ Scientific and Practical Centre of Hygiene, Minsk, Belarus

⁶ North-Caucasus Federal University^{ROR}, Stavropol, Russia

Received: 19.03.2024

Revised: 25.04.2024

Accepted: 07.05.2024

*Tatsiana M. Halavach: halavachtn@gmail.com,
<https://orcid.org/0000-0002-2096-8030>

Zenon V. Lovkis: <https://orcid.org/0000-0002-2641-3888>

Vladimir P. Kurchenko: <https://orcid.org/0000-0002-4859-2389>

Aleksei V. Yantsevich: <https://orcid.org/0000-0001-6786-3589>

Ekaterina I. Tarun: <https://orcid.org/0000-0001-5711-6037>

Natalia V. Dudchik: <https://orcid.org/0000-0002-5877-9307>

Igor V. Rzhepakovsky: <https://orcid.org/0000-0002-2632-8923>

Aleksei D. Lodygin: <https://orcid.org/0000-0001-8460-2954>

© T.M. Halavach, Z.V. Lovkis, V.P. Kurchenko, A.V. Yantsevich, E.I. Tarun, N.V. Dudchik, I.V. Rzhepakovsky, A.D. Lodygin, 2024



Abstract.

Enzymatic hydrolysis of dairy proteins increases their nutritional and biological value while reducing their allergenic potential. The subsequent complexation of peptides with cyclodextrins (CDs) reduces the bitterness of the hydrolyzed proteins. The research objective was to obtain hydrolysates of whey proteins and their cyclodextrin inclusion complexes with peptides, as well as to describe the peptide composition of the cleaved dairy proteins, biological activity, and sensory profile of the hydrolysates and inclusion complexes.

The research featured enzymatic whey protein hydrolysates with an extensive hydrolysis degree and their inclusion complexes with β - and γ -CDs. Dairy proteins were hydrolyzed with alcalase, and the hydrolysates obtained were subjected to micro- and ultrafiltration (cut-off limit – 10 kDa). The peptide composition of the hydrolyzed proteins was determined by the methods of high-performance liquid chromatography and chromatography-mass spectrometry. The antimutagenic activity was evaluated using the Ames test whereas the antibacterial effect was studied with the impedimetric method. The antioxidant activity was detected with fluorimetry and spectrophotometry. The method of competitive enzyme immunoassay was applied to reveal the antigenic properties. The bitterness of the experimental samples was determined by a sensory evaluation.

The research delivered the optimal modes for whey protein cleavage with alcalase that made it possible to achieve efficient micro- and ultrafiltration. The resulting hypoallergenic peptide fractions and their inclusion complexes with β - and γ -CDs possessed antioxidant, antibacterial, and antimutagenic properties. The whey proteolysis and subsequent filtration with/without tinalization demonstrated a 265/589-fold decrease in the residual antigenicity. The fluorimetric method showed a 1.79/1.90-fold increase in the antioxidant activity of the hydrolysate in complexes with β - and γ -CDs. Binding of β -CDs to peptides enhanced their antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. The hydrolysate samples with β -CDs showed less bitterness.

Whey proteolysis with alcalase under optimized conditions and subsequent fractionation resulted in a product with high consumer qualities. Enzymatic hydrolysates of dairy proteins and their CD inclusion complexes were able to substitute native protein components. Their bioactive properties, good taste, and low allergenic potential mean good prospects for the functional food industry.

Keywords. Whey proteins, enzymatic hydrolysis, ultrafiltration, hydrolysis degree, peptide, cyclodextrin, biological activity

Funding. The research was supported by the Ministry of Education of Belarus as part of grant no. 002/2023-BSU: Nanocomplexes of cyclodextrins with biologically active hydrolysates of dairy proteins for specialty foods (20.03.2023) and no. 002/2024-BSU: Biologically active fractions of dairy protein hydrolysates for functional products (13.03.2024).

For citation: Halavach TM, Lovkis ZV, Kurchenko VP, Yantsevich AV, Tarun EI, Dudchik NV, et al. Biologically Active Dairy Protein Hydrolysates and Their Cyclodextrin Inclusion Complexes: Biotechnological Aspects of Production. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(3):461–482. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2521>

Введение

Молочная промышленность является одним из наиболее важных направлений применения протеолитических ферментов (эндопептидаз), расщепляющих внутренние пептидные связи белковых макромолекул [1]. Щелочная эндопептидаза алкалаза, продуцируемая *Bacillus licheniformis*, является одной из самых эффективных протеаз в условиях применения различных источников белка, в частности отходов пищевой промышленности. В связи с широким спектром потенциальных сайтов гидролиза применение алкалазы обуславливает получение гидролизата с преобладанием низкомолекулярных пептидов [2]. Среди продуктов гидролиза алкалазой обнаружены пептиды с противовоспалительной, антиоксидантной, гипотензивной, антимикробной, антидиабетической активностью [3, 4]. Аллергические реакции обусловлены связыванием антител с антигенными эпитопами на поверхности белковых макромолекул. В результате гидролиза расщепляются потенциальные сайты связывания антител, что предотвращает реакции гиперчувствительности [5, 6].

В ферментативных гидролизатах содержится широкий спектр пептидов, различающихся по длине аминокислотной цепи (или молекулярной массе), гидрофобности и заряду. В частности, классификация гипоаллергенных молочных смесей для детского питания основана на молекулярно-массовом распределении пептидов. Частично гидролизованные смеси (предназначены для профилактики аллергии), главным образом, включают пептиды с молекулярной массой 3–10 кДа, тогда как смеси на основе глубоких гидролизатов (лечебное питание) представлены фракцией с молекулярной массой 3–5 кДа и менее [7, 8]. Методы фракционирования гидролизатов направлены на получение пептидов с целевым диапазоном физико-химических и функциональных свойств. Мембраны для лабораторного и промышленного применения выпускают с различными значениями отсеки по молекулярной массе (M_w , 0,5–100 кДа). Микрофильтрация ($M_w > 100$ кДа) предшествует ультрафильтрации и направлена на отделение микроорганизмов и взвешенных частиц [9, 10]. Актуальным является изучение влияния мембранной фильтрации ферментативных гидролизатов белков молока на спектр биоактивных свойств полученных пептидных фракций [11].

Наряду с высокой пищевой и биологической ценностью гидролизаты обладают выраженным горьким вкусом, что удается преодолеть путем образования комплексов включения циклодекстринов (ЦДв) с «горькими» пептидами [12]. Наиболее распространены природные циклодекстрины $\alpha/\beta/\gamma$ -ЦД, включающие 6/7/8 единиц глюкозы соответственно, что определяет размер гидрофобной полости и, следовательно, спектр потенциальных гостевых молекул. Циклодекстрины нетоксичны, относятся к соединениям с низким гликемическим индексом. β -ЦД зарегистрирован в качестве пищевой добавки E459, отличается доступной ценой

и активным промышленным применением [13, 14]. При изучении научных публикаций обнаружены способы снижения горечи аминокислот и ферментативных гидролизатов белков растительного (*Pisum sativum* L.) и животного (*Salmo salar*) происхождения в результате внесения β -ЦД [15, 16]. Целесообразным является детальное изучение сенсорных и биологически активных характеристик пептидов молока в составе комплексов включения с природными циклодекстринами.

В настоящее время известны способы получения частичных гидролизатов сывороточных белков коровьего молока с использованием различных протеолитических ферментов и последующей ультрафильтрации (отсека 2–20 кДа) [17–19]. Определены закономерности гидролиза казеина и сывороточных белков протеазами животного, растительного, грибного и бактериального происхождения, а также при совместном их внесении [20, 21]. Изучены физико-химические свойства, уровень остаточной антигенности, биологически активное действие (антирадикальный, антибактериальный и антимуtagenный эффект) гидролизованных белков молока [17–19, 22, 23]. Получены комплексы включения β - и γ -ЦД с пептидами молочной сыворотки и молозива, что подтверждено с применением различных методических подходов. Выявлено снижение горечи, возрастание антирадикальных свойств, сохранение антимуtagenной и антимикробной активности наноконструкций циклодекстринов с гидролизатами по сравнению с исходными пептидами [24, 25].

Наряду с этим требуются дополнительные исследования, связанные с влиянием фракционирования продуктов протеолиза и комплексообразования с ЦД на их биоактивный потенциал. Оптимизация процесса гидролиза алкалазой и последующего фракционирования (микро- и ультрафильтрации) направлена на эффективное снижение антигенных свойств продуктов протеолиза и повышение их биологической ценности.

Актуальность исследования определяется разработкой гипоаллергенных продуктов питания на основе гидролизованных белков коровьего молока с высокой пищевой и биологической ценностью, необходимостью применения мембранной ультрафильтрации и комплексообразования с ЦД в технологическом процессе получения биоактивных гидролизатов с приемлемыми органолептическими свойствами, использованием комплексного анализа пептидных фракций молока с применением современных методических подходов. Ферментативно расщепленные белки молока и комплексы включения ЦД с пептидами, обладающие высокой пищевой и биологической ценностью, являются потенциальным ингредиентом для функциональных продуктов.

Цель работы – получение гидролизатов сывороточных белков молока и комплексов включения пептидов с ЦД, определение пептидного состава расщепленных белков молока, оценка биоактивных и органолептических свойств гидролизатов и комплексов включения.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись ферментативные гидролизаты сывороточных белков молока с глубокой степенью гидролиза и их комплексы включения с β - и γ -циклодекстрином.

Получение частичного ферментативного гидролизата сывороточных белков молока с глубокой степенью гидролиза. В исследовании применяли концентрат сывороточных белков (КСБ–УФ–80, ТУ ВУ 100377914.550–2008, массовая доля белка 80 %; ОАО «Щучинский маслосырзавод», Беларусь), фермент алкалазу (Alcalase®2.4L FG, активность 2,4 ЕА/г; Novozymes A/S, Дания), КОН и NaOH (хч).

При фракционировании гидролизатов применяли фильтрующую установку Vivaflow 50 с фильтрами для микрофильтрации (VF05P7 Sartorius VIVAFLOW 50, PES 0,2 μm , разъем luer с отсечкой по размеру пор 0,2 мкм) и ультрафильтрации (VF05P0 Sartorius VIVAFLOW 50, PES 10000 MWCO, разъем luer с отсечкой по M_w 10 кДа) производства Sartorius (Германия).

В ходе технологического процесса органолептические показатели определяли по ГОСТ 15113.3–77, контроль активной кислотности осуществляли по ГОСТ 26781–85, массовую долю сухого вещества устанавливали по ГОСТ 3626–73 (весовой метод), массовую долю общего белка определяли согласно методике Варбурга и Кристиана и с применением биуретового метода [26, 27].

С целью приготовления раствора сывороточных белков молока в колбу вносили 500 мл дистиллированной воды, затем добавляли 30 г КСБ–УФ–80 для получения раствора с массовой долей белка 4,5 %, тщательно перемешивали и нагревали до 50 °С при 120 мин.⁻¹ в течение 30 мин. Согласно различным вариантам технологического процесса, раствор сывороточных белков охлаждали до температуры 4 °С, дополнительно центрифугировали при 4700 мин.⁻¹ в течение 2 ч при температуре 4 °С. Затем раствор КСБ–УФ–80 нагревали до температуры 60 °С. Последующие стадии технологического процесса проводили в условиях постоянного перемешивания при 120 мин.⁻¹. Раствором натрия : калия гидроокиси (50 : 50, 33,3 %) титровали раствор сывороточных белков до установления значения рН 8,0 или 8,5. В колбу вносили 1,2 г ферментного препарата алкалазы для получения соотношения белок : ферментный препарат, равного 100 : 5 (содержание алкалазы 0,12 ЕА/г белка). Ферментативный гидролиз проводили при постоянной температуре 60 °С в течение 4 или 6 ч. Полученный гидролизат охлаждали до температуры 4 °С, контролировали активную кислотность опытного образца. Согласно различным вариантам технологического процесса, гидролизат дополнительно центрифугировали при 4700 мин.⁻¹ в течение 2 ч при температуре 4 °С. Промежуточное хранение гидролизата осуществляли в холодильных камерах при температуре 4 °С.

Гидролизат подвергали микрофильтрации с применением касетных фильтров с отсечкой по размеру

пор 0,2 мкм. Микрофильтрацию проводили в течение 3–12 ч при скорости потока 86 мл/мин. Промежуточное хранение микрофильтрата гидролизата осуществляли в холодильнике при температуре 4 °С.

Микрофильтрат гидролизата направляли на ультрафильтрацию с применением касетных фильтров с отсечкой по M_w 10 кДа. Ультрафильтрацию проводили в течение 4–12 ч при скорости потока 10 мл/мин. Определяли активную кислотность опытного образца жидкого гидролизата, содержание в нем сухого вещества и белка. Согласно различным вариантам технологического процесса, проводили тиндализацию: ультрафильтрат гидролизата в количестве 300 мл нагревали до 60 °С в течение 1 ч, далее выдерживали при 37 °С в течение 24 ч, обработку проводили трехкратно. На следующем этапе ультрафильтрат гидролизата быстро охлаждали до –40 °С. Гидролизат лиофильно высушивали с использованием лиофильной сушилки ЛС–500 (Проинтех, Пушкино, Россия) в течение 35 ч при температуре конденсора –35° С и давлении до 10 Па. Детальное описание различных вариантов технологического процесса представлено в таблице 1.

Массовую долю общего азота (ТN) и белка в лиофильно высушенных образцах гидролизатов определяли по ГОСТ 30648.2–99, массовую долю α -аминного азота (AN) – по ГОСТ Р 55479–2013, массовую долю влаги – по ГОСТ 29246–91. Степень гидролиза определяли как соотношение AN/TN, выраженное в %.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) гидролизатов и фильтратов. Для ВЭЖХ-исследований применяли ацетонитрил (осч, для ВЭЖХ; Sigma Aldrich, США) и трифторуксусную кислоту (осч, для масс-спектрометрии; Fisher Scientific International, США). В качестве стандартов белков молока использовали β -лактоглобулин (β -лг, варианты А и В, массовая доля белка 90 %), α -лактальбумин (α -ла, массовая доля белка 85 %), бычий сывороточный альбумин (БСА, массовая доля белка 90 %), казеин (массовая доля белка 88 %), лактоферрин (ЛФ, массовая доля белка 85 %) и иммуноглобулин G (Ig G, массовая доля белка 90 %) из коровьего молока производства Sigma (США).

Хроматографическое разделение осуществляли на приборе Agilent 1100 (колонка Zorbax–300SB C8; Agilent Technologies, США) в соответствии с представленной программой (табл. 2) при комнатной температуре в потоке 1,0 мл/мин. в течение 33 мин., детекцию проводили при 214 нм. ВЭЖХ-профили анализировали с применением ПО ChemStation for LC 3D systems Rev.В.04.01 (Agilent Technologies, США).

Хромато-масс-спектрометрический (МС) анализ гидролизатов и пептидных фракций. Для МС-анализа использовали трифторуксусную кислоту (осч, для масс-спектрометрии; Fisher Scientific International, США), калибровочные стандарты Protein Calibration Standard I/Standard II (Bruker Daltonik, Германия), матрицу для ионизации α -циано-4-гидроксикоричную кислоту

Таблица 1. Описание вариантов технологического процесса получения гидролизатов

Table 1. Technological options for hydrolysate production

Стадия технологического процесса	Вариант технологического процесса				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Центрифугирование раствора концентрата сывороточного белка	–	+	–	+	+
pH раствора концентрата сывороточного белка до гидролиза	8,0	8,0	8,0	8,5	8,5
Продолжительность гидролиза, ч	4	4	6	4	4
Центрифугирование после гидролиза	+	–	–	–	–
Корректировка pH после гидролиза	–	+	–	–	–
Микрофильтрация	+	+	+	+	+
Ультрафильтрация	+	+	+	+	+
Тиндализация	–	–	–	+	–
Лиофильная сушка	+	+	+	+	+

Таблица 2. Условия разделения сывороточных белков и их гидролизатов методом высокоэффективной жидкостной хроматографией

Table 2. Separation of whey proteins and their hydrolysates by high performance liquid chromatography

№ стадии	Время, мин.	Раствор А, % (v/v)	Раствор В, % (v/v)
1	5,0	95,0	5,0
2	10,0	90,0	10,0
3	30,0	60,0	40,0
4	32,0	60,0	40,0
5	40,0	50,0	50,0
6	45,0	50,0	50,0
7	50,0	90,0	10,0

Примечание: раствор А – 0,1 % раствор ТФУ, раствор В – АЦН.

Note. Solution A is 0.1% trifluoroacetic solution; solution B is acetonitrile.

(Bruker Daltonik, Германия), воду (осч. для масс-спектрометрии; Honeywell Burdick & Jackson, США).

Готовили 0,1 % раствор гидролизата (вариант технологического процесса № 5) в 0,5 % растворе ТФУ. Далее образец подвергали обессоливанию методом твердофазной экстракции на картридже с C18-силикагелем (Macherey-Nagel, Германия). Картридж устанавливали в вакуумный коллектор для ТФЭ на 12 картриджей Chromabond (Macherey-Nagel, Германия). Обессоливание проводили согласно рекомендациям производителя. Готовили серию разведений опытного образца с содержанием белка 0,2, 0,1 и 0,05 мг/мл.

На пластину для MALDI наносили матрицу и элюат образцов при объемном соотношении, равном 1 : 1, и высушивали на воздухе, после чего помещали мишень в масс-спектрометр.

В работе использовали масс-спектрометр высокого разрешения с источником ионизации MALDI (матрично-активированная лазерная десорбция ионизация) в сочетании с времяпролетным масс-анализатором (TOF) – microflex LRFMALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия). Разрешение составляло >15 000 FWHM при m/z 500–5000 Да в рефлекторном режиме, погрешность достигала 500 ppm в линейном режиме при m/z 5–100 кДа, 30 ppm в рефлекторном режиме при m/z 500–5000 Да.

В процессе записи и первичной обработки масс-спектров применяли программное обеспечение Compass for flexSeries 1.4 и flexControl Version 3.4 (Build 57), а для обработки масс-спектров – Compass for flexSeries 1.4 и flexAnalysis Version 3.4 (Bruker Daltonik, Германия).

Для калибровки прибора и записи масс-спектров в различных диапазонах m/z использовали следующие режимы работы масс-спектрометра. Для пептидов (m/z – 500–5000 Да) – положительная ионизация с рефлекторном, метод RP_PerMix. В случае низкомолекулярных белков (m/z – 4000–20000 Да) – линейный режим с положительной ионизацией, метод LP_ProtMix.

Для записи масс-спектров и первичной обработки данных (суммирование и сглаживание суммарного спектра) использовали программу FlexControl, для последующей обработки данных (вычитание базовой линии, сглаживание) и для определения m/z пиков применяли программу FlexAnalysis. Спектры записывали в автоматизированном режиме, суммируя 50 лазерных импульсов с различных позиций в пятне, соответствующем калибранту или образцу. Подбирали условия для достижения интенсивности сигнала порядка 1×10^5 .

Получение комплексов β- и γ-ЦД с гидролизатами сывороточных белков молока (оценка антигенности и биоактивностей). В экспериментальной работе применяли фильтраты гидролизатов сыворотки

(согласно вариантам технологического процесса № 4 и 5), β -ЦД (массовая доля ЦД 85 %, Roquette, Франция), γ -ЦД (массовая доля ЦД 90 %, Chem-Impex International Inc., Китай), 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,4) производства Sigma (США), дистиллированную воду.

Готовили растворы в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, содержащие β/γ -ЦД и гидролизаты (пептидные фракции с массовой долей белка 0,5 %) при массовом соотношении ЦД : белок, равном 1 : 1. Полученные растворы инкубировали при комнатной температуре в условиях постоянного перемешивания (120 мин.⁻¹) в течение 30 мин. Экспериментальные пробы хранили при –20 °С для последующего анализа.

Получение гидролизатов сывороточных белков молока и комплексов β -ЦД с пептидами для проведения сенсорной оценки. В исследовании применяли концентрат сывороточных белков молока (КСБ–УФ–80, ТУ ВУ 100377914.550–2008, массовая доля белка 80 %; ОАО «Щучинский маслосырзавод», Беларусь), фермент алкалазу (Alcalase® 2.4L FG, КФ 3.4.21.62, протеазу из *Bacillus licheniformis*, активность 2,4 ЕА/г) производства Novozymes A/S (Дания), гидролизат сывороточных белков молока (вариант технологического процесса № 5), β -ЦД (массовая доля ЦД 85 %) производства Henan Haoyuhang Economic & Trade Co. Ltd. (Китай), NaOH (хч), дистиллированную воду.

Готовили 5,0 % белковый раствор гидролизата сывороточных белков молока (вариант технологического процесса № 5) в дистиллированной воде, подогретой до 45 °С. В раствор гидролизата вносили навески β -ЦД (Henan Haoyuhang Economic & Trade Co. Ltd., Китай) для достижения массового соотношения ЦД : белок, равного 1/50/51/52/55 : 50, инкубировали в течение 30 мин. при 45 °С и постоянном перемешивании (120 мин.⁻¹). Пробы гидролизата и комплекса не подлежали хранению, их немедленно направляли на оценку органолептических свойств.

Анализ антигенных свойств пептидов молока и их комплексов с циклодекстринами (конкурентный иммуноферментный анализ, ИФА). Для оценки антигенных свойств опытных образцов, полученных согласно вариантам технологического процесса № 4 и 5, использовали набор для количественного определения β -лактоглобулина (β -лг) методом конкурентного иммуноферментного анализа (RIDASCREEN® β -Lactoglobulin, R4901) производства R-Biopharm AG (Германия). Набор предназначен для анализа содержания β -лг в гидролизованных молочных продуктах, в том числе в гипоаллергенном детском питании. Калибровка набора проведена на контрольных образцах гидролизованного β -лг; стандарты состояли из нативного белка-аллергена. Тест-система позволяет выявлять нативный и обработанный белок, а также его фрагменты. Предел обнаружения – 2,1 мг/кг (2,1 мкг/г) β -лг, предел количественного определения – 5 мг/кг (5 мкг/г) β -лг.

По данным инструкции производителя, в основе работы теста – реакция антиген–антитела. Лунки микро-

планшета покрыты β -лг. В состав набора входят стандарты, необходимые растворы и антитела к β -лг. Свободный и иммобилизованный β -лг конкурируют за сайты связывания с антителами. После промывки добавляют вторичные антитела, меченные пероксидазой (конъюгат). Они связываются с комплексом антитело– β -лг. Несвязанный конъюгат впоследствии удаляют на этапе промывки. Ферментный субстрат и хромоген вносят в лунки и инкубируют. Связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в синий продукт. Добавление стоп-раствора вызывает изменение цвета с синего на желтый. Измерение оптической плотности раствора проводят фотометрически. Оптическая плотность раствора обратно пропорциональна концентрации β -лг в образце.

Согласно рекомендациям производителя тест-системы, готовили разведения образцов β/γ -ЦД, нативных и гидролизованных белков сыворотки молока, комплексов включения пептидов с ЦД. Оптическую плотность целевых растворов определяли при длине волны 450 нм с применением микропланшетного спектрофотометра Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, США). На заключительной стадии эксперимента применяли специализированное ПО RIDA®SOFT Win.net (R-Biopharm AG, Германия), в частности, функцию кубического сплайна. Остаточную антигенность рассчитывали как соотношение количества β -лг в образце гидролизата к его содержанию в нативной молочной сыворотке, выраженное в %.

Оценка антиоксидантной активности белков и пептидов молока, их комплексов включения с циклодекстринами. Флуориметрический метод. Согласно предложенной методике снижение флуоресценции (A , %) флуоресцеина (ФЛ) обусловлено его окислительной деградацией при генерировании свободных радикалов в системе Фентона. Защитная роль антиоксидантов (пептидов молока) состоит в ингибировании окисления флуорофора, что приводит к восстановлению его флуоресценции. Способ предполагает измерение способности тестируемых образцов поглощать кислородные радикалы (oxygen radical absorbance capacity, ORAC assay) [28]. Развернутая методика эксперимента представлена в статье [25].

Степень интенсивности флуоресценции (A , %) рассчитывали по формуле (1):

$$A = \frac{Fl}{Fl_0} \times 100 \quad (1)$$

где Fl_0 – интенсивность флуоресценции контрольного образца ФЛ, Fl – интенсивность флуоресценции раствора после добавления антиоксиданта. Строили графики зависимости интенсивности флуоресценции (A , %) от содержания белка в анализируемых образцах. Согласно полученному уравнению рассчитывали концентрацию пробы IC_{50} , соответствующую 50 % ингибированию флуоресценции.

ABTS-метод. Измерение АОО предполагало применение катион-радикала на основе диаммониевой соли

2,2'-азино-бис[3-этилбензтиазолин-6-сульфоново-й кислоты] (ABTS) согласно модифицированной методике, описанной в статье В. Hernández-Ledesma и др. и в предшествующих собственных исследованиях [25, 29].

Степень восстановления катион-радикала, или ингибирование поглощения (I , %), рассчитывали по формуле (2):

$$I = \frac{D_0 - D}{D_0} \times 100 \quad (2)$$

где D_0 – оптическая плотность исходного раствора ABTS⁺, D – оптическая плотность раствора ABTS⁺ после внесения тестируемых образцов. Строили графики зависимости ингибирования поглощения (I , %) от концентрации тролокса и содержания белка в анализируемых образцах (мкг/мл). Согласно полученным уравнениям, рассчитывали концентрацию пробы IC_{50} , соответствующую 50 % ингибированию поглощения.

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ($TEAC$ – показатель антиоксидантной активности, выраженный в мкмоль тролокса/мкг белка) исследуемых образцов определяли по формуле (3):

$$TEAC = \frac{IC_{50}(ст)}{IC_{50}(пр)} \quad (3)$$

где $IC_{50}(ст)$ – концентрация 50 % ингибирования поглощения при внесении стандарта (тролокса), $IC_{50}(пр)$ – концентрация 50 % ингибирования поглощения при внесении образцов нативных белков, их гидролизатов и комплексов включения циклодекстринов с пептидами.

Оценка антимуtagenного эффекта гидролизатов и комплексов циклодекстринов с пептидами молока. Атимутагенную активность гидролизатов и их комплексов с ЦД оценивали в модифицированном тесте Эймса согласно методике, представленной в статье [23]. В краткосрочном тесте для изучения антимуtagenных свойств в качестве тест-моделей использовали индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100 из коллекции РУП «НИИ гигиены» (г. Минск, Беларусь). В качестве прямых мутагенов применяли этидиум бромид для штамма *S. typhimurium* TA 98 и азид натрия в случае *S. typhimurium* TA 100 производства Sigma (США). Уровень снижения мутирования (I_{mut} , %) рассчитывали по формуле (4):

$$I_{mut} = 100 - \frac{N_1}{N_2} \times 100 \quad (4)$$

где N_1 – число ревертантов в опыте (добавление образцов гидролизатов), N_2 – число ревертантов в контроле.

Определение антимикробного действия гидролизатов и комплексов циклодекстринов с пептидами. Антимикробную активность гидролизатов белков молока и их комплексов включения с ЦД устанавливали импедиметрическим методом, как описано в предшествующем исследовании [24]. В эксперименте оценивали задержку роста тест-культур после внесения в среду культивирования опытных образцов гидролизатов /

комплексов на стадии лаг-фазы, когда клетки адаптируются к окружающей среде, что позволяет наиболее адекватно оценить ингибирующий эффект изучаемого соединения. В качестве испытуемых образцов использовали гидролизат, полученный согласно варианту технологического процесса № 5, а также гидролизаты сывороточных белков молока / молозива и их комплексов с ЦД, которые были приготовлены в соответствии с методикой, представленной в статье [25]. В качестве тест-объектов использовали музейные штаммы *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 из Национального Биоресурсного Центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва, Россия).

В качестве количественного критерия оценки антимикробного действия (АМД) применяли показатель степени ингибирования I_{mic} , %, рассчитываемый по формуле (5):

$$I_{mic} = \frac{IDT_2 - IDT_1}{IDT_2} \times 100 \quad (5)$$

где IDT_1 – время детекции роста тест-объекта в контроле, ч; IDT_2 – время детекции в опыте, ч. При значении $I_{mic} > 0$ исследуемое соединение обладает антимикробным действием: при $I_{mic} < 15$ % оказывает на тест-культуру слабое антимикробное действие, $15 < I_{mic} < 50$ % – умеренно выраженное антимикробное действие, $I_{mic} > 50$ % – выраженное антимикробное действие.

Органолептический анализ комплексов включения β-ЦД с пептидами сыворотки молока. В условиях Республиканского контрольно-испытательного комплекса по качеству и безопасности продуктов питания РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию» проведена сенсорная оценка гидролизата сывороточных белков молока (вариант технологического процесса № 5) и его комплексов с β-ЦД. Сенсорную оценку опытных образцов осуществляли в несколько этапов: ранжирование (согласно ГОСТ ISO 8586–2015 и ГОСТ ISO 8587–2015), испытания «А» – «Не А» (ГОСТ ISO 8588–2011) и испытание «дуо-трио» (ГОСТ ISO 10399–2015).

На этапе ранжирования (тест 1) готовили эталонные растворы кофеина (чистота 98,5 %; Acros Organics, Китай) в дистиллированной воде с концентрацией, указанной в таблице 3. Далее готовили растворы гидролизата сывороточных белков молока и соответствующих комплексов с массовой долей белка 5 % и содержанием β-ЦД 0,1 и 5 % в дистиллированной воде. Массовое соотношение гидролизата сывороточных белков молока : β-ЦД составляло 50 : 1 и 50 : 50. В эксперименте использовали свежеприготовленные образцы при температуре 45 °С.

Дегустационная комиссия осуществляла органолептическую оценку образцов. Экспертам предлагали растворы образцов в пластиковых стаканах в количестве 50 мл. Перед дегустацией рот тщательно прополаски-

Таблица 3. Приготовление эталонных растворов кофеина

Table 3. Caffeine standard solutions

Концентрация кофеина в эталонном растворе		Уровень горечи, балл	Описание уровня горечи
мМ	%		
10,0	0,20	5	Очень сильная горечь
7,3	0,15	4	Выраженная горечь
5,0	0,10	3	Умеренная горечь
3,0	0,06	2	Слабая горечь
1,3	0,03	1	Очень слабая горечь
0	0	0	Отсутствие горечи

вали дистиллированной водой. Раствор образца держали во рту в течение 10 с, затем удаляли и определяли уровень горечи. Горький вкус каждого образца сравнивали со стандартными растворами кофеина, которые оценивали по 5-балльной шкале, где оценку 5 баллов считали эквивалентной по горькому вкусу эталонному 10 мМ раствору кофеина (очень сильная горечь). Баллы 4, 3, 2 и 1 указывали на убывающую степень горечи по сравнению с эталонными растворами. Оценка 3 означала горечь, равнозначную 5 мМ раствору кофеина (умеренная горечь), а оценка 0 – отсутствие горького вкуса. После повторной оценки рассчитывали среднее значение уровня горечи для опытных образцов.

На следующем этапе осуществляли сенсорную оценку образцов с применением метода «А» – «Не А» (тест 2). Определяли пороговый уровень горечи в образцах с увеличением дозировки β -ЦД на 1–5 % в комплексе включения. Идентифицировали образцы вкусов, эквивалентные эталону «А» (горький) и отличные от эталона – образцы «Не А» (негорький). Набор для определения порога горького вкуса состоял из 5 закодированных проб. Набор для определения порога горького вкуса состоял из 5 закодированных проб. Набор содержал одну пробу (эталон «А») с горьким вкусом, а именно образец комплекса гидролизата сывороточных белков молока : β -ЦД при массовом соотношении 50 : 50, две пробы с горьким вкусом, идентичные эталону «А», и две пробы, отличные от эталона «А» («Не А1», «Не А2»). «Не А1» образец комплекса был приготовлен при массовом соотношении гидролизата сывороточных белков молока : β -ЦД, равном 50 : 51, «Не А2» – 50 : 55. При проведении испытаний представлены 10 комплектов по методу «А» – «Не А» для 5 испытателей. Каждому испытателю предоставляли по 2 комплекта образцов, маркированных трехзначным случайным кодом. В рамках определения критерия Хи-квадрата (X^2) без поправки Йейтса суммарное число ответов, согласно анкетам, составляло не менее 40.

На заключительном этапе (тест 3) образцы тестировали с применением метода «дуо-трио» и в каждой триаде определяли образцы, идентичные эталонам каждой триады. Выявляли минимальную достаточную концентрацию β -ЦД в составе комплексов для устранения горького вкуса. Подготовлены образцы комплексов

гидролизата сывороточных белков молока : β -ЦД при массовом соотношении 50 : 51 и 50 : 52. Пробы кодировали неповторяющимися случайными трехзначными числами. Испытателям в количестве 5 человек в произвольном порядке предоставлены 10 комплектов (по 2 триады). Испытатели оценивали образцы триадами и выделяли вариант, идентичный эталону. Для заключения об отсутствии заметного различия между сравниваемыми объектами согласно методу «дуо-трио» при использовании одностороннего критерия при α -риске, равном 0,05, необходимо было получить не менее 9 правильных результатов из 10 тестов.

Статистическая обработка данных. Для сравнения средних значений при различных уровнях факторов использовали одно-, двух- или трехфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим применением теста Даннетта, t -теста Стьюдента или теста Тьюки (Tukey's Honest Significant Difference, HSD) [30–33]. В случае сравнения нескольких выборок данных с контролем применяли тест Даннетта, при доверительной вероятности 0,95. Двухвыборочный t -тест Стьюдента использовали для сопоставления средних значений двух независимых выборок. С помощью теста Тьюки (для множественных сравнений) вычисляли различия между средними значениями уровней фактора при заданном уровне групповой доверительной вероятности (0,95). Для анализа экспериментальных данных применяли R функции *aov*, *DunnnettTest*, *t.test* и *TukeyHSD* из пакетов *stats* и *DescTools* [34, 35]. Статистические различия между группами считали значимыми при уровне $p < 0,05$ с поправкой на множественные попарные сравнения.

Результаты и их обсуждение

Подбор параметров ферментативного гидролиза сывороточных белков молока и фракционирования гидролизатов. Получены опытные образцы ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока с глубокой степенью гидролиза. Технологическая схема включала приготовление раствора сывороточных белков молока (на основе концентрата сывороточных белков, КСБ) и его центрифугирование для удаления нерастворимой фракции, внесение фермента, ферментативный гидролиз, микрофльтрацию с отсечкой по M_w

0,2 мкм, ультрафильтрацию с отсечкой по M_w 10 кДа, тиндализацию, заморозку, лиофильную сушку. В таблице 4 представлено полное описание стадий для пяти различных вариантов получения гидролизатов.

Определены основные физико-химические показатели опытных образцов. Сравнительная характеристика параметров жидких образцов гидролизатов в ходе технологического процесса представлена в таблице 5. Согласно варианту 1 предполагалась потеря белковой фракции на стадии центрифугирования гидролизата и его микро/ультрафильтрации, а в случае варианта 2 – на этапе центрифугирования раствора концентрата сывороточных белков. Вместе с тем в отличие от варианта 1 микро/ультрафильтрация гидролизата не была затруднена (таблица 4).

В соответствии с вариантом 3 предполагалась потеря белковой фракции на стадии фильтрации гидролизата. Увеличение продолжительности гидролиза с 4 до 6 ч не привело к существенному возрастанию выхода пептидной фракции. В целом показана необходимость включения стадии центрифугирования раствора КСБ, что впоследствии обеспечивало эффективную микро/ультрафильтрацию гидролизата. Наряду с этим отличием варианта 4 от вариантов 1–3 является повышение исходного значения активной кислотности КСБ до 8,5 ед. рН (табл. 1).

По итогам выработок № 4–8 (варианты 4 и 5) следует отметить, что исходный объем гидролизата согласно методике составляет 530 мл, тогда как после микрофильтрации и ультрафильтрации – 400–450 и 300–350 мл соответственно, где 100 мл является слепым объемом для запуска систем микро- и ультрафильтрации (по 50 мл на каждый этап фильтрации). Помимо этого, 50 мл ультрафильтрата использовали для анализа физико-химических показателей образцов гидролизата.

Так, на стадии центрифугирования раствора концентрата сывороточных белков и микрофильтрации гидролизата потери составили 30–80 мл белкового раствора, или 5,7–15,1 %. Впоследствии 300–350 мл ультрафильтрата направляли на лиофильную сушку. Установлено активное вспенивание гидролизата в процессе сушки, что потенциально может привести к потере конечного продукта.

По итогам испытаний, предполагающим центрифугирование исходного раствора концентрата сывороточных белков, м.д. белка в сухом веществе жидких образцов гидролизатов составила 74,1 и 75,5–86,0 % согласно вариантам 2 и 4/5 соответственно. Центрифугирование обусловило удаление нерастворенных частиц, забивающих фильтры, что обеспечило сокращение времени микро/ультрафильтрации с >12 ч до 3–5 ч (таблица 4). Показатели опытных

Таблица 4. Органолептические и физико-химические показатели образцов жидких гидролизатов, полученных согласно вариантам 1–5

Table 4. Sensory and physicochemical parameters of liquid hydrolysates obtained using options 1–5

Наименование этапа техпроцесса	Значение показателя для выработки № / согласно варианту №							
	1 / 1	2 / 2	3 / 3	4 / 4	5 / 4	6 / 5	7 / 5	8 / 5
Центрифугирование раствора КСБ	не исп.	исп.	не исп.	исп.	исп.	исп.	исп.	исп.
Условия гидролиза (рН/ время, ч)	8,0 ± 0,1/ 4	8,0 ± 0,1/ 4	8,0 ± 0,1/ 6	8,5 ± 0,1/ 4	8,5 ± 0,1/ 4	8,5 ± 0,1/ 4	8,5 ± 0,1/ 4	8,5 ± 0,1/ 4
Эффективность микрофильтрации / время (ч)	низкая/ >12	высокая/ 3	низкая/ >12	высокая/ 4–5	высокая/ 4–5	высокая/ 4–5	высокая/ 4–5	высокая/ 4–5
Эффективность ультрафильтрации / время (ч)	низкая/ >12	высокая/ 4	низкая/ >12	высокая/ 4	высокая/ 4	высокая/ 4	высокая/ 4	высокая/ 4
Внешний вид и цвет	Жидкость светло-желтого цвета							
Тиндализация	не исп.	не исп.	не исп.	исп.	исп.	не исп.	не исп.	не исп.
Объем ультрафильтрата, мл	~250	~350	~300	~300	~300	~300	~330	~350
Массовая доля сухого вещества, %	4,2	4,3	4,0	5,3	4,1	4,2	4,2	3,9
рН до фильтрации	–	7,0	–	6,3	6,3	6,3	6,2	6,2
рН после фильтрации	7,4	8,1	7,2	7,2	6,8	7,1	7,2	7,2
Массовая доля общего белка, %	3,1	3,2	3,2	4,0	3,6	3,4	3,4	3,2
Массовая доля белка в сухом веществе, %	72,6	74,1	79,2	75,5	86,0	81,0	79,4	83,7
Количество сухого вещества после сушки, г	10,8	15,0	11,6	14,9	12,9	12,3	14,4	14,6

Таблица 5. Характеристика лиофильно высушенных образцов гидролизатов сывороточных белков молока

Table 5. Freeze-dried samples of whey protein hydrolysates

Наименование показателя	Значение показателя для выработки № / согласно варианту №							
	1 / 1	2 / 2	3 / 3	4 / 4	5 / 4	6 / 5	7 / 5	8 / 5
Массовая доля влаги, %	3,9	5,1	5,8	5,4	5,2	5,1	3,8	4,0
	4,9 ± 1,1 ^A				4,7 ± 0,7 ^A			
Массовая доля общего азота (TN, %)	12,4	11,8	11,9	11,9	12,1	12,0	12,7	12,4
	12,0 ± 0,4 ^A				12,2 ± 0,3 ^A			
Степень гидролиза (AN/TN, %)	25,7	23,3	24,5	29,4	34,6	30,6	34,3	27,0
	24,5 ± 1,4 ^A				31,2 ± 2,8 ^B			
Массовая доля белка, %	79,4	75,3	75,8	76,1	77,5	76,6	80,8	78,9
	76,8 ± 2,5 ^A				78,0 ± 1,7 ^A			
Массовая доля белка в сухом веществе, %	82,6	79,3	80,5	80,4	81,7	80,7	84,0	82,2
	80,8 ± 1,9 ^A				81,8 ± 1,3 ^A			

Примечание: результаты расчетов отражены как среднее значение ± половина ширины 95 % доверительного интервала (n = 3). Значения без общего буквенного индекса в пределах одной строки (^{A,B}) указывают на достоверные различия при $p < 0,05$

Note. All calculations in the table are mean values ± half the width of 95% confidence interval (n = 3). Values that do not share the same letter index (^{A,B}) in the line indicate significant differences at $p < 0.05$

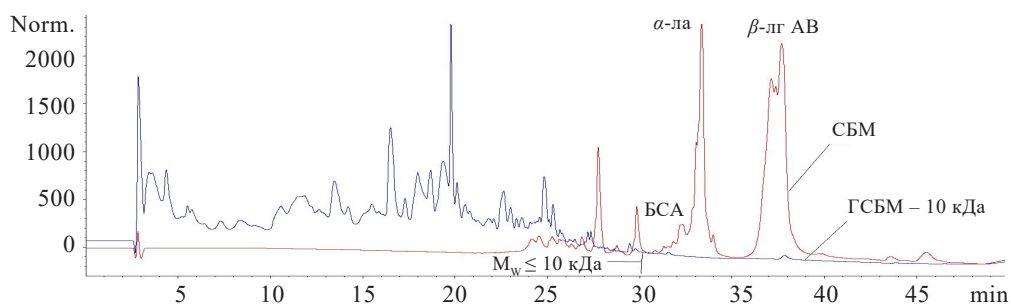


Рисунок 1. ВЭЖХ-профили нативных белков сыворотки молока, гидролизованных белков сыворотки молока, подвергнутых последующей ультрафильтрации с отсечкой по M_w 10 кДа (ГСБМ – 10 кДа)

Figure 1. High performance liquid chromatography profiles of native hydrolyzed whey proteins subjected to subsequent ultrafiltration, M_w cut-off limit = 10 kDa

образцов лиофильно высушенных гидролизатов отражены в таблице 6.

Технологический процесс в соответствии с вариантом 4/5 обеспечивает возрастание выхода пептидной фракции по сравнению с вариантом 2 (массовая доля белка в сухом веществе достигает 80,4–84,0 и 79,3 % соответственно), как показано в таблице 5. Данный эффект обусловлен повышением степени гидролиза сывороточных белков алкалазой с 23,3 до 27,0–34,6 % вследствие увеличения исходного значения активной кислотности раствора КСБ с 8,0 до 8,5 ед. рН.

В целом по итогам проведения опытных выработок подобраны условия подготовки белкового субстрата и ферментативного гидролиза сывороточных белков молока алкалазой, что позволило повысить выход пептидной фракции и эффективность микро- и ультрафильтрации гидролизата.

Технологический процесс получения гидролизата сывороточных белков молока с глубокой степенью гидролиза согласно оптимизированному (усовершенствованному) варианту состоит из следующих стадий:

- приготовление раствора сывороточных белков молока и его центрифугирование для удаления нерастворимой фракции;
- внесение фермента;
- ферментативный гидролиз;
- микрофильтрация с отсечкой по размеру пор 0,2 мкм;
- ультрафильтрация с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа;
- тиндализация / отсутствие тиндализации;
- заморозка;
- лиофильная сушка.

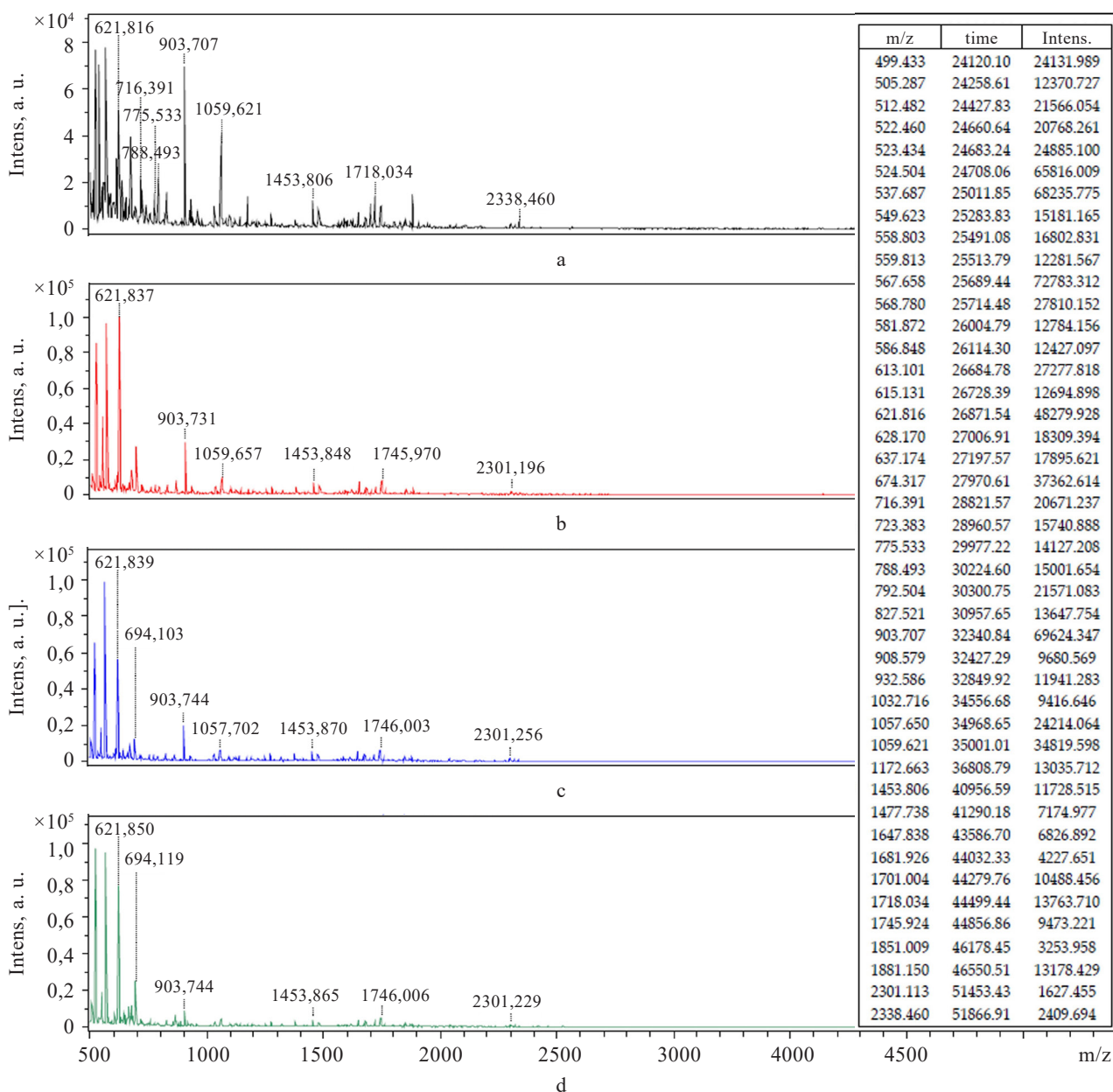
Оптимизированный вариант обеспечивает получение сухих ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока с глубокой степенью гидролиза, в частности, с содержанием пептидной фракции в сухом веществе 81,8 ± 1,3 % и степенью гидролиза 31,2 ± 2,8 %. Так, микрофильтрация и ультрафильтрация являются необходимыми условиями получения фракций с заданными характеристиками (пептидным профилем), что отражено в ряде современных источников, посвященных получению биоактивных гидролизатов [9, 10].

ВЭЖХ-анализ гидролизованных белков сыворотки молока. Проведен анализ опытных образцов нативной сыворотки молока и ее ферментативного гидролизата (пептидной фракции с $M_w \leq 10$ кДа) с применением ВЭЖХ-анализа для установления их белково-пептидного состава. На рисунке 1 представлены ВЭЖХ-профили белков сыворотки молока и продуктов ее протеолиза алкалазой, подвергнутых последующей ультрафильтрации с отсечкой по M_w 10 кДа.

По данным предыдущих исследований, при фракционировании с осечкой по M_w 5/10 кДа продукты протео-

лиза элюируются с колонки вплоть до 25/30 мин разделения соответственно. Полученный образец гидролизата сывороточных белков молока представлен смесью пептидов с $M_w \leq 10$ кДа, причем преобладают продукты протеолиза с $M_w \leq 5$ кДа. В результате фракционирования достигается удаление из гидролизата остаточного количества нативных белков молока и полипептидов.

Пептидный профиль гидролизованной молочной сыворотки согласно данным хромато-масс-спектрометрии. Проведен анализ ферментативного гидролизата сывороточных белков, подвергнутого ультрафильтрации



Примечание: в таблице представлен список обнаруженных масс ионов для масс-спектрометрического профиля с концентрацией белка 1,9 мг/мл

Рисунок 2. Масс-спектры гидролизата и его разведений, содержащих 1,9 (а), 0,2 (б), 0,1 (с) и 0,05 (д) мг/мл белка, в пептидном диапазоне (m/z – 500–5000 Да)

Figure 2. Hydrolyzate and its dilutions with 1.9 (a), 0.2 (b), 0.1 (c), and 0.05 (d) mg/ml protein, mass spectra in peptide range (m/z) at 500–5,000 Da

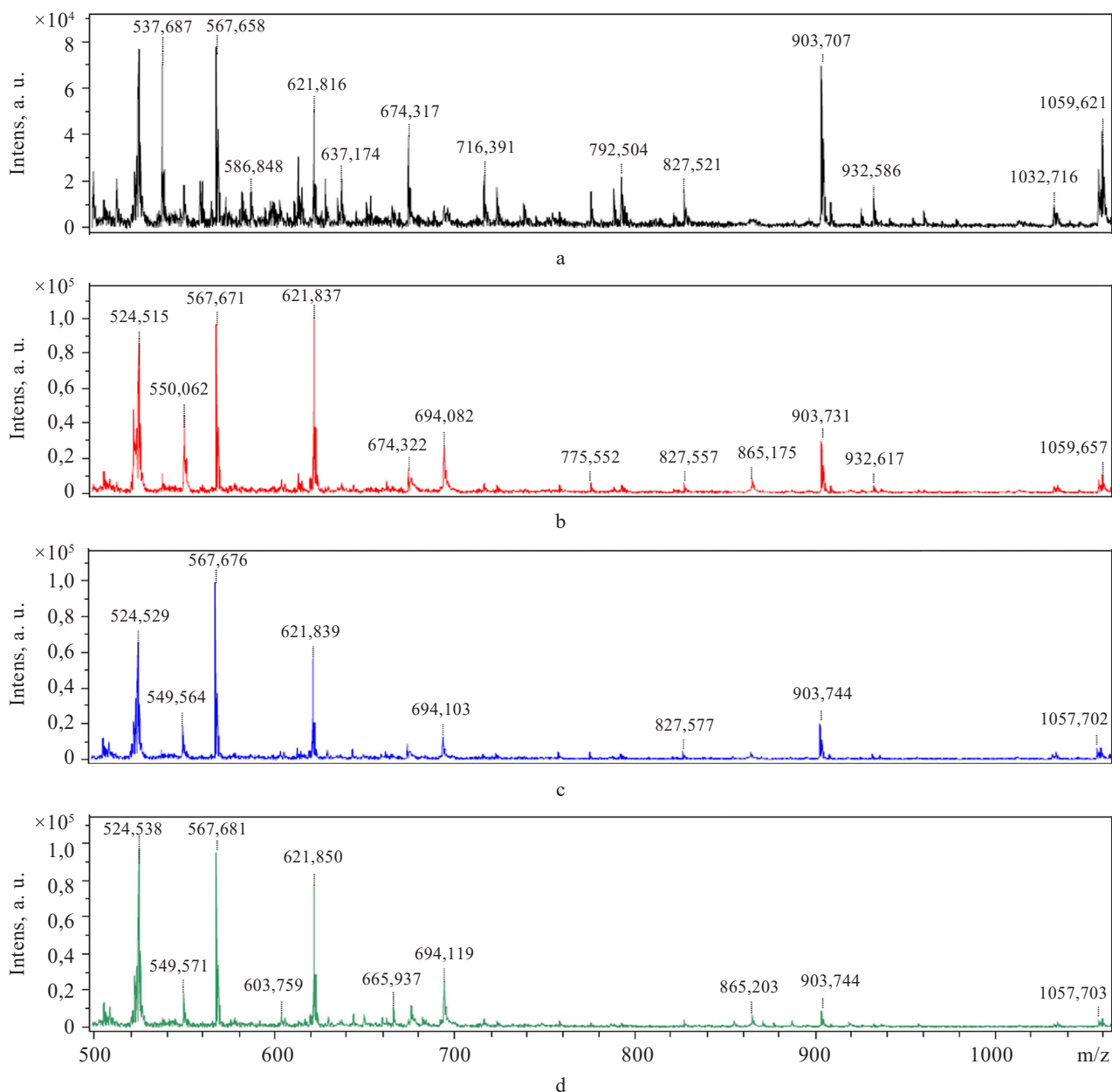


Рисунок 3. Масс-спектры гидролизата и его разведений, содержащих 1,9 (а), 0,2 (б), 0,1 (с) и 0,05 (д) мг/мл белка, в пептидном диапазоне (m/z – 500–1100 Да)

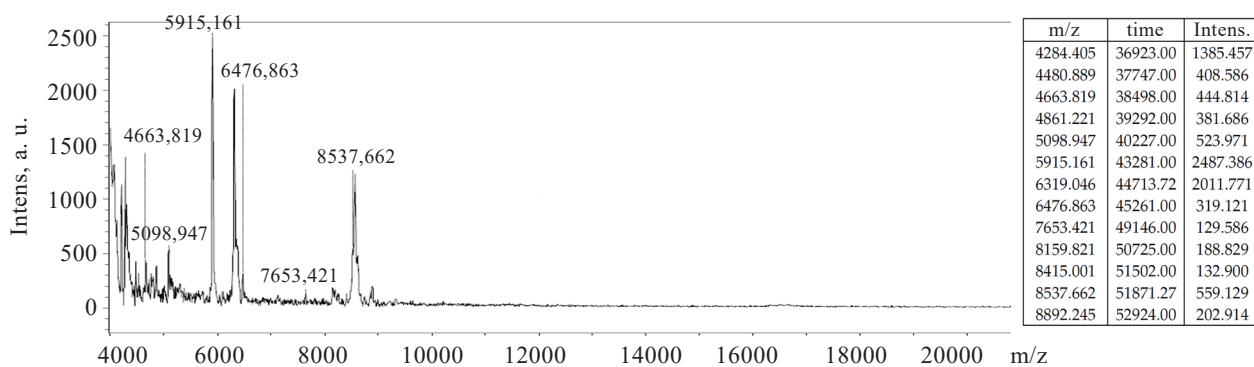
Figure 3. Hydrolyzate and its dilutions with 1.9 (a), 0.2 (b), 0.1 (c), and 0.05 (d) mg/ml protein, mass spectra in peptide range (m/z) at 500–1,100 Da

(отсечка по M_w 10 кДа) с применением масс-спектрометрии для установления его молекулярно-массового распределения. На рисунках 2–4 представлены МС-профили опытного образца в различном диапазоне m/z .

В пептидном диапазоне со значениями m/z от 500 до 5000 Да максимальная молекулярная масса выявленных пептидов составила 2301–2338 Да (рис. 2). Следует отметить, что относительная высокая интенсивность сигнала, достигающая $(3,5–7,3) \times 10^4$ отн. ед., характерна для пиков, которые соответствуют пептидам с M_w , равной 525, 538, 568, 622, 904 и 1060 Да (длине пептидной цепи из 5–10 аминокислотных остатков).

Указанные пептиды также обнаружены по итогам детального анализа МС-профилей при значениях m/z от 500 до 1100 Да (рис. 3).

Наряду с этим в диапазоне m/z , относящемся к низкомолекулярным белкам (4000–20000), выявлены пептиды с максимальной M_w 8892 Да (рис. 4). В спектре выделяются пики с относительно высокой интенсивностью сигнала, достигающей $(0,14–0,25) \times 10^4$ отн. ед., которые сопряжены со значениями m/z , равными 4284, 5915 и 6319 Да. Следует особо отметить, что интенсивность сигнала обнаруженных высокомолекулярных пиков существенно ниже, чем выявленных в пептидном



Примечание: в таблице представлен список масс ионов, обнаруженных в гидролизате

Рисунок 4. Масс-спектр гидролизата, содержащий 1,9 мг/мл белка, в диапазоне низкомолекулярных белков (m/z – 4000–20000 Да)

Figure 4. Hydrolyzate with 1.9 mg/ml protein, mass spectrum in the range of low molecular weight proteins (m/z) at 4000–20,000 Da

диапазоне. Следовательно, в опытном образце преобладают продукты протеолиза с MW менее 1100 Да, или пептиды длиной до 10 аминокислотных остатков.

Изучение антигенных, биоактивных и сенсорных свойств гидролизатов белков молочной сыворотки и их комплексов с циклодекстринами. Получены опытные образцы ферментативных гидролизатов и соответствующих комплексов включения β/γ -ЦД с пептидами молочной сыворотки (выработка № 8, таблица 5). Установили влияние комплексообразования с β/γ -ЦД на антигенные свойства пептидов, их антиоксидантное действие и уровень горечи.

Антиоксидантная активность (АОА) нативных пептидов молочной сыворотки в составе комплексов с ЦД. Изучена антиоксидантная активность нативных сывороточных белков (КСБ) и их ферментативных гидролизатов (фракций с отсечкой по M_w 10 кДа) с применением флуориметрического и спектрофотометрического подходов (ORAC- и ABTS-методы соответственно).

По данным флуориметрического метода после протеолиза алкалазой и фракционирования выявлено существенное возрастание радикал-восстанавливающих свойств гидролизатов молочной сыворотки, в частности их способности восстанавливать интенсивность флуоресценции флуоресцеина (табл. 5). В результате гидролиза алкалазой при концентрации 5 % и фильтрации (отсечка по M_w 10 кДа) установлено увеличение АОА расщепленной молочной сыворотки в 3,0 раза (образец гидролизата № 8).

Получены комплексы включения пептидов молочной сыворотки с β - и γ -ЦД. По данным флуориметрического метода установлено сопоставимое увеличение АОА гидролизата сыворотки в составе комплексов с β/γ -ЦД (в 1,79/1,90 раза соответственно). Возрастание антиоксидантных свойств полученных образцов может быть связано с увеличением растворимости пептидной фракции в структуре комплексов с β - и γ -ЦД. Следует отметить большой антиоксидантный потенциал

контрольного образца γ -ЦД, чем β -ЦД (табл. 6), очевидно обусловленный относительно высокой растворимостью γ -ЦД.

Согласно итогам спектрофотометрического анализа протеолиз алкалазой и последующая фильтрация обусловили достоверное увеличение АОА гидролизатов белков молока, а именно их способности к восстановлению катион-радикала ABTS⁺ (табл. 7). Протеолиз алкалазой при содержании фермента 5 % и фракционирование определили возрастание АОА молочной сыворотки в 5,34 и 5,31 раза для образцов № 5 и 8 соответственно. Различия между экспериментальными образцами недостоверны, что указывает на отсутствие влияния тиндализации на антирадикальное действие термообработанной пептидной фракции (образец № 5).

Методы анализа АОА разделяют на три класса в зависимости от механизма поглощения радикалов, основанного на (1) переносе атома водорода (hydrogen atom transfer, HAT), (2) переносе одного электрона с последующей передачей протона (single electron transfer followed by proton transfer, SET-PT) и (3) последовательной потере протона при переносе электрона (sequential proton loss by electron transfer, SPLET) [36].

Предпочтительным методом HAT является ORAC-метод, который применяют для определения как гидрофильных, так и липофильных антиоксидантов (АО) [28]. Подходы, связанные с переносом одного электрона, в частности, оценка АОА в Тролокс-эквиваленте (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC), основаны на неконкурентном одноэлектронном переносе от антиоксиданта к окислителю (радикалам, металлам и карбонильным группам). В системе TEAC в результате окисления ABTS образуется катион-радикал. Окрашенный ABTS⁺ быстро реагирует с антиоксидантом, и его восстановление приводит к уменьшению окраски. Степень обесцвечивания рассчитывают по отношению к стандарту (тролоксу) [29].

Таблица 6. Показатели антиоксидантной активности нативных и расщепленных белков сыворотки молока (образец № 8), комплексов β/γ -ЦД с пептидами по данным ORAC-методаTable 6. Antioxidant activity of native and cleaved whey proteins (sample 8), β/γ -cyclodextrin complexes with peptides by ORAC

Наименование образца	IC ₅₀ (FI), мкг белка/мл	IC ₅₀ (нативный белок)/IC ₅₀ (гидролизат)	IC ₅₀ (гидролизат)/IC ₅₀ (комплекс)
СБМ	105,9 ± 3,8 ^a	1,0 ^a	–
ГСБМ–5%–10кДа	35,4 ± 0,7 ^b	2,99 ± 0,15 ^b	1,0 ^a
ГСБМ–5%–10кДа+ β -ЦД	19,8 ± 1,0 ^c	5,37 ± 0,44 ^c	1,79 ± 0,09 ^b
ГСБМ–5%–10кДа+ γ -ЦД	18,6 ± 0,5 ^c	5,69 ± 0,29 ^c	1,90 ± 0,08 ^b
β -ЦД (контроль)	104,9 ± 2,3 ^a	–	–
γ -ЦД (контроль)	79,8 ± 1,0 ^d	–	–

Примечание: СБМ – белки сыворотки молока; ГСБМ – гидролизат сывороточных белков; 5 % – гидролиз при соотношении фермент (алкалаза) : субстрат, равном 5 %; 10 кДа – фильтрация с отсечкой по M_w 10 кДа. Данные представлены как среднее значение ± половина ширины 95 % доверительного интервала (n = 3). Значения без общей буквы (^{a-d}) в пределах одного столбца указывают на достоверные различия при $p < 0,05$

Note. СБМ – milk whey proteins; ГСБМ – whey protein hydrolysate; 5% – hydrolysis with a 5% enzyme (alcalase) to substrate ratio; 10 кДа – filtration with an M_w cut-off at 10 kDa. The data are presented as mean values ± half the width of 95% confidence interval (n = 3). Values that do not share the same letter index (^{a-d}) in the column indicate significant differences at $p < 0.05$

Таблица 7. Показатели антиоксидантной активности нативных и расщепленных белков сыворотки молока, их гидролизатов и комплексов β/γ -ЦД с пептидами по данным ABTS-методаTable 7. Antioxidant activity of native and cleaved whey proteins (sample 8), β/γ -cyclodextrin complexes with peptides by ORAC

Наименование образца	IC ₅₀ (ABTS), мкг белка/мл	TEAC, мкмоль тролокса/мкг белка	IC ₅₀ (нативный белок)/IC ₅₀ (гидролизат)
СБМ	96,9 ± 2,1 ^a	0,206 ± 0,004 ^a	1,00 ^a
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 5)	18,1 ± 0,3 ^b	1,101 ± 0,011 ^b	5,34 ± 0,16 ^b
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8)	18,3 ± 0,1 ^b	1,094 ± 0,004 ^b	5,31 ± 0,15 ^b
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8) + β -ЦД	18,5 ± 0,2 ^b	1,081 ± 0,006 ^b	5,24 ± 0,18 ^b
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8) + γ -ЦД	18,3 ± 0,1 ^b	1,090 ± 0,009 ^b	5,29 ± 0,16 ^b
β -ЦД (контроль)	0	–	–
γ -ЦД (контроль)	0	–	–

Примечание: СБМ – белки сыворотки молока; ГСБМ – гидролизат сывороточных белков; 5 % – гидролиз при соотношении фермент (алкалаза) : субстрат, равном 5 %; 10кДа – фильтрация с отсечкой по M_w 10 кДа. Данные представлены как среднее значение ± половина ширины 95 % доверительного интервала (n = 3). Значения без общей буквы (^{a, b}) в пределах одного столбца указывают на достоверные различия при $p < 0,05$

Note. СБМ – milk whey proteins; ГСБМ – whey protein hydrolysate; 5% – hydrolysis with a 5% enzyme (alcalase) to substrate ratio; 10 кДа – filtration with an M_w cut-off at 10 kDa. The data are presented as mean values ± half the width of 95% confidence interval (n = 3). Values that do not share the same letter index (^{a, b}) in the column indicate significant differences at $p < 0.05$

В отличие от ORAC-метода, последующее комплексообразование гидролизата молочной сыворотки (образец № 8) с β/γ -ЦД не оказало влияния на способность восстанавливать ABTS⁺ в тест-системе. Полученные различия при использовании флуориметрического и спектрофотометрического подходов могут быть связаны с особенностями механизмов реализации антиоксидантного действия в сравниваемых тест-системах.

Получение биоактивных гидролизатов сывороточных белков молока с применением алкалазы, обладающих высокой АОА, согласуется с данными литературы [37, 38]. Увеличение радикал-восстанавливающих свойств различных биоактивных соединений в составе

комплексов включения с ЦД подтверждается современными исследованиями [39–41]. Вместе с тем эксперименты по положительному эффекту взаимодействия с ЦД на антирадикальный эффект включаемых пептидов молока отражены в предшествующей работе [25].

Антигенные свойства нативных и гидролизованных сывороточных белков молока, комплексов включения ЦД в с пептидами. Изучены антигенные свойства (или способность связываться с антителами) нативной сыворотки молока, ее ферментативных гидролизатов (образцы № 5 и № 8), полученных в результате расщепления алкалазой (при соотношении фермент : субстрат, равном 5 %) и фильтрации с отсечкой по M_w,

равной 10 кДа. С применением конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) определено остаточное количество основного аллергена молока (β -лг) в гидролизатах белков молока и соответствующих фракциях.

В результате протеолиза сыворотки молока алкалазой и последующей ультрафильтрации (отсечка по M_w 10 кДа) установлено снижение количества нативного β -лг в 265 раз (табл. 8). Так, гидролиз алкалазой направлен на расщепление в белковых макромолекулах областей антигенных детерминант. Вместе с тем фильтрация обуславливает снижение остаточной антигенности (ОА) образцов в связи с удалением следового количества нативного β -лг, а также продуктов его частичного протеолиза, содержащих антигенные детерминанты.

Применение тиндализации обеспечило дополнительное уменьшение связывания гидролизата (образец № 5) с антителами против β -лг (в 2,2 раза). Минимальным уровнем остаточной антигенности среди образцов молочной сыворотки характеризуется фильтрат, содержащий пептидную фракцию и подвергнутый тиндализации, что составляет 0,17 % (снижение ОА в 589 раз). Не установлено достоверное влияние комплексообразования с циклодекстринами на уровень ОА включенных пептидных фракций.

Различный уровень антигенности расщепленных образцов молочной сыворотки (образцы № 5 и № 8) обусловлен применением тиндализации, которая определяет дополнительное снижение показателя ОА образца № 5 в результате термоденатурации конформационных антигенных детерминант. Для комплексов ЦД в с пептидной фракцией не установлено достоверное различие с исходным гидролизатом сывороточных белков. Так, применение алкалазы при соотношении субстрат : фермент, равном 5 %, ультрафильтрации

(10 кДа) и тиндализации обеспечивают максимальное снижение ОА гидролизатов сыворотки молока.

Известный способ получения гидролизата сывороточных белков включает протеолиз с помощью алкалазы и ультрафильтрацию с отсечкой по M_w , равной 20 кДа [17]. Авторы сообщают о существенном снижении антигенности полученной пептидной фракции. Вместе с тем используемой разделяющей способности фильтров (отсечка 20 кДа) недостаточно для удаления остаточного количества нерасщепленных сывороточных белков, так как M_w преобладающих белков сыворотки β -лг/ α -ла составляет 18,4/14,2 кДа. Другой подход предусматривает применение протеаз алкалазы или Protamex и ультрафильтрации (отсечка 10 кДа) [18]. По итогам испытаний выход пептидной фракции достигает 80 %, наряду с существенным снижением ее антигенных свойств. Известен способ получения гидролизата сывороточных белков с высокой степенью гидролиза, предполагающий гидролиз флейворзимом, а также последующую ультрафильтрацию с отсечкой по M_w 2 и 5 кДа, что обеспечивает изготовление гидролизата с остаточной антигенностью (массовой долей антигенов молочной сыворотки) не более $1,0 \times 10^{-5}$ [19].

Согласно предыдущим исследованиям и патентным данным ультрафильтрация с отсечкой по M_w , равной 10 кДа и менее, является эффективным способом удаления остаточного количества нерасщепленных белков-аллергенов молока и продуктов их частичного протеолиза, способных взаимодействовать с антителами [18, 19, 23]. В целом использование алкалазы обуславливает получение гипоаллергенных гидролизатов белков молока, что отражено в современных источниках литературы [17–19, 42–44].

В настоящей работе и в предшествующем исследовании впервые представлены данные об антигенных

Таблица 8. Оценка антигенности нативных и гидролизованных белков сыворотки молока и их комплексов с β - и γ -циклодекстрином

Table 8. Antigenicity of native and hydrolyzed whey proteins and their complexes with β - and γ -cyclodextrin

Наименование образца	Остаточная антигенность (ОА), %	Остаточная антигенность (нативный белок)/ Остаточная антигенность (гидролизат)
СБМ	100 ^a	1,00 ^a
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 5)	0,170 ± 0,01 ^b	589 ± 31 ^b
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8)	0,380 ± 0,04 ^c	265 ± 29 ^c
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8) + β -ЦД	0,425 ± 0,04 ^c	237 ± 20 ^c
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8) + γ -ЦД	0,395 ± 0,02 ^c	254 ± 14 ^c
β -ЦД (контроль)	0	–
γ -ЦД (контроль)	0	–

Примечание: СБМ – белки сыворотки молока; ГСБМ – гидролизат сывороточных белков; 5 % – гидролиз при соотношении фермент (алкалаза) : субстрат, равном 5 %; 10 кДа – фильтрация с отсечкой по M_w 10 кДа. Данные расчетов отражены как среднее значение ± половина ширины 95 % доверительного интервала (n = 3). Значения без общей буквы (^{a-c}) в пределах одного столбца указывают на достоверные различия при $p < 0,05$

Note. СБМ – milk whey proteins; ГСБМ – whey protein hydrolysate; 5% – hydrolysis with a 5% enzyme (alcalase) to substrate ratio; 10 кДа – filtration with an M_w cut-off at 10 kDa. The data are presented as mean values ± half the width of 95% confidence interval (n = 3). Values that do not share the same letter index (^{a-c}) in the column indicate significant differences at $p < 0.05$

свойствах пептидов молока при взаимодействии с ЦД [25]. Следует отметить, что для комплексов включения, содержащих пептиды с $M_w \leq 10$ кДа, показан уровень ОА, сопоставимый с исходным гидролизатом (0,38 %). Вместе с тем взаимодействие ЦДв с фракцией пептидов, которая получена при отсечке по M_w 5 кДа, определило снижение ее ОА [25]. Очевидно, это связано с относительно низкой ОА низкомолекулярной пептидной фракции (0,047 %), на уровне которой комплексообразование оказывает значимый эффект.

Влияние комплексообразования с циклодекстринами на антимутагенные свойства пептидов сыворотки молока. Проведены исследования антимутагенного действия опытного образца гидролизата сывороточных белков молока (образец № 8), а также комплексов пептидов с β - и γ -циклодекстрином. Антимутагенный потенциал опытных образцов оценивали в тесте Эймса, основанном на учете частоты обратных мутаций к прототрофности по гистидину для штаммов *S. typhimurium*.

На предварительном этапе установлено, что образцы гидролизатов и комплексов включения в диапазоне концентраций 0,03–0,5 мг белка на чашку не проявляли бактериостатический или бактерицидный эффект в отношении тест-моделей *S. typhimurium* TA 98 и TA 100, что могло бы привести к получению ложноположительных результатов. Количество ревертантов в контроле (контроль негативный) было в пределах колебаний спонтанного уровня для данных штаммов. Ответ штаммов на стандартные мутагены выявлен в пределах стандартных уровней. Статистически значимое снижение индуцированного мутирования отмечено для образца гидролизата и его комплексов включения с циклодекстринами. Выявленные различия в числе ревертантов в контроле и опыте были статистически достоверны в диапазоне изученных концентраций.

Снижение уровня индуцированного мутирования при внесении опытных образцов в максимальной концентрации (0,5 мг белка на чашку) достигало 19,1–

21,4 % в тест-системе с *S. typhimurium* TA 98 и 13,9–26,2 % – в эксперименте с *S. typhimurium* TA 100 (табл. 9). Установлено, что разница в уровне антимутагенной активности пептидов сыворотки молока и их комплексов не достоверна при тестировании на штамме *S. typhimurium* TA 98 (мутации типа сдвига рамки считывания).

В эксперименте с *S. typhimurium* TA 100 (мутации типа замены пар оснований) показано достоверное повышение уровня индуцированного мутирования комплексов включения с пептидами относительно исходного образца гидролизата (табл. 9). Достигнуто увеличение антимутагенного эффекта в 1,3/1,9 раза комплексов включения с β/γ -ЦД соответственно при концентрации пептидов 0,5 мг белка на чашку. Возможно, выявленный эффект обусловлен большей растворимостью γ -ЦД и повышением растворимости включенных пептидных фракций.

В целом в результате комплексообразования β/γ -ЦД с гидролизатом степень индуцированного мутирования пептидов молочной сыворотки сохраняется на исходном уровне (в тест-системе с *S. typhimurium* TA 98) либо отмечается увеличение антимутагенного действия (при тестировании на штамме TA 100).

Известны данные литературы о подтвержденном антимутагенном действии белков животного происхождения, подвергнутых бактериальной ферментации и расщеплению протеолитическими ферментами [20, 45, 46]. Проведенные исследования при тестировании пептидной фракции сывороточных белков молока (фильтрация с отсечкой по M_w 5 кДа) на штамме *S. typhimurium* TA 98 не отметили достоверного влияния комплексообразования с β/γ -ЦД на антимутагенный эффект гидролизата, что отражено и в настоящей работе [24, 25].

Эффект комплексообразования с циклодекстринами на антимикробные свойства гидролизата белков молочной сыворотки. Изучены антимикробные свойства образца гидролизата молочной сыворотки (фильтрат

Таблица 9. Антимутагенное действие гидролизованной молочной сыворотки (образец № 8), комплексов β/γ -ЦД с пептидами в тесте Эймса

Table 9. Antimutagenic effect of hydrolyzed whey (sample 8) and β/γ -cyclodextrin complexes with peptides by Ames test

Наименование образца	Уровень снижения мутирования, %, (0,03–0,5 мг белка на чашку)	
	<i>S. typhimurium</i> TA 98	<i>S. typhimurium</i> TA 100
ГСБМ–5 %–10 кДа	11,2–19,1 ^{A, I}	10,0–13,9 ^{A, II}
ГСБМ–5 %–10 кДа+ β -ЦД	16,4–20,0 ^{A, I}	13,8–17,7 ^{B, II}
ГСБМ–5 %–10 кДа+ γ -ЦД	11,0–21,4 ^{A, I}	17,8–26,2 ^{C, II}
β/γ -ЦД (контроль)	0	0

Примечание: ГСБМ – гидролизат сывороточных белков молока; 5 % – гидролиз при соотношении фермент (алкалаза) : субстрат, равном 5 %; 10 кДа – ультрафильтрация с пропускающей способностью 10 кДа. Результаты расчетов представлены как среднее значение ($n = 3$). Значения без общего буквенного индекса (^{A–C}) в пределах одного столбца и строки (^{I, II}) указывают на достоверные различия при $p < 0,05$

Note. ГСБМ – whey protein hydrolysate; 5% – hydrolysis with a 5% enzyme (alcalase) : substrate ratio; 10 кДа – filtration with an M_w cut-off at 10 kDa. The data are presented as mean values \pm half the width of 95% confidence interval ($n = 3$). Values that share neither the same letter index (^{A–C}) in the column nor the same number (^{I–II}) in the line indicate significant differences at $p < 0.05$

с отсечкой по M_w 10 кДа) и его комплексов включения с β/γ -ЦД в отношении грамотрицательного тест-штамма *Escherichia coli* ATCC 8739 и грамположительного тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Оценивали задержку роста тест-культур после добавления в ростовую среду пептидов молочной сыворотки, соответствующих комплексов включения и контрольных образцов β/γ -ЦД. Установлено увеличение показателя времени детекции IDT при культивировании популяции тест-штаммов *E. coli* ATCC 8739 и *S. aureus* ATCC 6538 в среде с гидролизатом сывороточных белков молока и его комплексами включения по сравнению с показателем IDT в контроле. В таблице 10 отражены результаты оценки антимикробной активности гидролизата и его комплексов с β/γ -ЦД в отношении тест-штаммов.

Задержка роста *E. coli* ATCC 8739 составила 1,3–2,0 ч при добавлении в питательную среду гидролизата белков молочной сыворотки и его комплексов включения, что указывает на умеренно выраженное действие (показатель *I* составил 18,6–27,4 %). Достоверное увеличение антимикробного эффекта (в 1,4 раза) показано после комплексообразования пептидов с β -ЦД.

В отношении золотистого стафилококка (*S. aureus* ATCC 6538) действие исследуемого образца гидролизата молочной сыворотки, а также комплекса γ -ЦД с пептидами было слабо выражено (10,6 и 11,8 % задержки роста популяции), что проявилось в увеличении показателя IDT на 0,8 и 0,9 ч соответственно по сравнению с контролем. Задержка роста на 1,2 ч и соответственно умеренный уровень антибактериального действия (15,2 %) характерны для комплекса включения β -ЦД с пептидами молочной сыворотки.

В целом гидролизат сывороточных белков молока и его комплексы включения более активны в отношении грамотрицательного тест-штамма *E. coli* ATCC 8739, чем грамположительного штамма *S. aureus* ATCC 6538. Комплексообразование β -ЦД с пептидами сыворотки молока обусловило возрастание их АМД в отношении *E. coli* ATCC 8739 и *S. aureus* ATCC 6538. Следует отметить, что антибактериальный эффект гидролизатов с γ -ЦД сохранялся на уровне, характерном для пептидных фракций.

С учетом проведенных ранее исследований (таблица 11) по изучению АМД-комплексов включения пептидов молока с β -ЦД и новым данным, связанным с изучением биоактивности комплексов с γ -ЦД, тестируемые образцы обладают более выраженным эффектом в отношении *E. coli* ATCC 8739, чем *S. aureus* ATCC 6538 [24]. Антибактериальные свойства пептидной фракции молозива более выражены, чем пептидов сывороточных белков. Максимальная задержка роста *E. coli* ATCC 8739 и *S. aureus* ATCC 6538 установлена при внесении в среду культивирования комплекса β -ЦД с пептидами молозива. Взаимодействие β -ЦД с пептидами сыворотки молока и молозива (филтраты с отсечкой по M_w 5 кДа) определило возрастание их АМД в отношении тестируемых штаммов, что согласуется с итогами исследования гидролизата, подвергнутого фильтрации с отсечкой по M_w 10 кДа (образец № 8).

Изучение антимикробных свойств ферментативных белковых гидролизатов является актуальным направлением биотехнологии продуктов питания, что подтверждается рядом современных работ. В частности, получен трипсиновый гидролизат казеина с выражен-

Таблица 10. Уровень антимикробного действия (АМД) гидролизованной молочной сыворотки (образец № 8), комплексов β/γ -ЦД с пептидами в отношении тест-штаммов *E. coli* ATCC 8739 и *S. aureus* ATCC 6538

Table 10. Antimicrobial action of hydrolyzed whey (sample 8) and β/γ -cyclodextrin complexes with peptides against *E. coli* ATCC 8739 and *S. aureus* ATCC 6538

Наименование образца	Количество образца, мг белка на чашку	Показатель степени ингибирования (ИАМД) в отношении тест-штаммов, %	
		<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8)	0,5	19,4 ± 1,3 ^{A,1} (умеренно выраженное АМД)	10,6 ± 1,0 ^{A,II} (слабое АМД)
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8) + β -ЦД	0,5	27,4 ± 2,5 ^{B,1} (умеренно выраженное АМД)	15,2 ± 1,6 ^{B,II} (умеренно выраженное АМД)
ГСБМ–5 %–10 кДа (образец № 8) + γ -ЦД	0,5	18,6 ± 1,4 ^{A,1} (умеренно выраженное АМД)	11,8 ± 1,3 ^{A,II} (слабое АМД)
β/γ -ЦД (контроль)	0,5	0	0

Примечание: ГСБМ – гидролизат сывороточных белков молока; АМД – антимикробное действие; 5 % – гидролиз при соотношении фермент (алкалаза) : субстрат, равном 5 %; 10 кДа – фильтрация с пропускающей способностью 10 кДа. Результаты расчетов отражены как среднее значение ± половина ширины 95 % доверительного интервала (n = 3). Значения без общего буквенного индекса в пределах одного столбца (^{A, B}) и строки (^{I, II}) указывают на достоверные различия при $p < 0,05$

Note. ГСБМ – milk whey protein hydrolysate; АМД – antimicrobial action; 5% – hydrolysis with an enzyme (alcalase) : substrate ratio of 5%; 10 kDa – filtration with a transmission capacity of 10 kDa. Calculation results are expressed as the mean ± half the width of the 95% confidence interval (n = 3). Values that share neither the same letter index (^{A-C}) in the column nor the same number (^{I-II}) in the line indicate significant differences at $p < 0.05$.

Таблица 11. Уровень антимикробного действия глубоких гидролизатов сывороточных белков молока и молозива (фильтраты с отсечкой по M_w 5 кДа) и их комплексов включения с β/γ -ЦД в отношении тест-штаммов *E. coli* ATCC 8739 и *S. aureus* ATCC 6538Table 11. Antimicrobial action of deep hydrolysates of whey proteins of milk and colostrum (cut-off level MW – 5 kDa) and their inclusion complexes with β/γ -cyclodextrin against *E. coli* ATCC 8739 and *S. aureus* ATCC 6538

Наименование образца	Количество образца, мг сухого вещества на чашку	Показатель степени ингибирования (ИАМД) в отношении тест-штаммов, %	
		<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538
ГСБМ–5 кДа	1,0	16,2 ± 1,0 ^{A,1} (умеренно выраженное АМД)	7,1 ± 0,5 ^{A,II} (слабое АМД)
ГБМ–5 кДа	1,0	40,4 ± 2,7 ^{B,1} (умеренно выраженное АМД)	13,3 ± 0,9 ^{B,II} (слабое АМД)
ГСБМ–5 кДа+ β/γ -ЦД	1,0	22,2 ± 1,4 ^{C,1} /16,1 ± 1,1 ^{A,1} (умеренно выраженное АМД)	8,4 ± 0,6 ^{C,II} /8,8 ± 0,6 ^{C,II} (слабое АМД)
ГБМ–5 кДа+ β/γ -ЦД	1,0	67,0 ± 3,8 ^{D,1} /38,5 ± 2,4 ^{B,1} (выраженное/умеренно выраженное АМД)	17,5 ± 1,2 ^{D,II} /13,1 ± 1,0 ^{B,II} (умеренно выраженное / слабое АМД)

ГСБМ – гидролизат сывороточных белков молока; АМД – антимикробное действие ГБМ – гидролизат белков молозива; 5 % – гидролиз при соотношении фермент (алкалаза) : субстрат, равном 5 %; 5 кДа – фильтрация с пропускающей способностью 5 кДа; сух. вещ. – сухое вещество. Результаты расчетов отражены как среднее значение ± половина ширины 95 % доверительного интервала (n = 3). Значения без общего буквенного индекса в пределах одного столбца (^{A-D}) и строки (^{I-II}) указывают на достоверные различия при p < 0,05. Note. ГСБМ – milk whey protein hydrolysate; АМД – antimicrobial action ГБМ – colostrum protein hydrolysate; 5% – hydrolysis with a 5% enzyme (alkalase) to substrate ratio; 5 kDa – filtration with a transmission capacity of 5 kDa; сух. вещ. – solids. Data are expressed as mean values ± half the width of 95% confidence interval (n = 3). Values that share neither the same letter index (^{A-C}) in the column nor the same number (^{I-II}) in the line indicate significant differences at p < 0.05

ными антиоксидантными свойствами и антимикробным действием в отношении *E. coli*, *S. typhimurium* и *Bacillus cereus*, тогда как в эксперименте с *S. aureus* биоактивность не выявлена [47]. Показано, что грибные протеазы, выделенные из *Aspergillus oryzae* и *A. flavipes*, при внесении в козье и коровье молоко обеспечивают высвобождение антиоксидантных и антимикробных пептидов [48]. В целом пептиды с антимикробным эффектом выявлены в результате ферментации белков молока бактериями-пробиотиками, а также при расщеплении протеазами в желудочно-кишечном тракте и в технологическом процессе производства гидролизатов [49–51]. Сообщается о положительном влиянии комплексообразования с β -ЦД на устойчивость к протеолизу антимикробного пептида низина, а также на биоактивность и безопасность ультракоротких антимикробных пептидов [52, 53, 54].

Сенсорная оценка гидролизата сывороточных белков молока и комплексов включения β -циклодекстрина с пептидами. На базе Республиканского контрольно-испытательного комплекса по качеству и безопасности продуктов питания РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию» проведена сенсорная оценка гидролизата сывороточных белков молока и его комплексов включения с β -ЦД, включающая несколько этапов: (1) ранжирование, (2) испытания «А» – «Не А» и (3) испытание «дуо-трио».

На первом этапе (тест 1) участники комиссии проводили определение органолептических характеристик методом шкал и категорий (ранжирование) в соответст-

вии с разработанными анкетами. Средняя оценка интенсивности горького вкуса чистого гидролизата по шкале горечи составила 4,5 балла, комплексов включения, полученных при массовом соотношении гидролизата сывороточных белков молока : β -ЦД, равном 50 : 1 – 4 балла, а в случае 50 : 50 – 1 балл.

Так, при минимальном внесении циклодекстрина показано снижение интенсивности горечи с 4,5 до 4,0 баллов. Наряду с этим при соотношении компонентов 50 : 50 не достигнута полная маскировка горького вкуса. Для исключения горечи следовало увеличить дозировку комплексообразователя и провести повторную сенсорную оценку. В тесте 1 отобранные испытатели идентифицировали, помимо горечи, оттенки вкусовых ощущений, в частности: сладость, молочность, сливочность, химический привкус, сывороточный вкус.

При проведении теста 2 подготовлены образцы при увеличении дозы β -ЦД на 1 и 5 %. Для проверки гипотезы о действительно существующем различии между пробами комплексов при массовом соотношении 50 : 50 (горький вкус) и новыми пробами 50 : 51 (негорький вкус), 50 : 55 (негорький вкус) применяли сенсорную оценку методом «А» – «Не А».

Согласно результатам испытаний пробы комплексов при увеличении дозировки β -ЦД на 1 и 5 % не обладают горьким вкусом (массовое соотношение гидролизата сывороточных белков молока : β -ЦД – 50:51 и 50:55). Показаны достоверные различия относительно эталона А (50 : 50), для которого характерен горький вкус.

На заключительном этапе (тест 3) устанавливали минимальную достаточную концентрацию β -ЦД для устранения горького вкуса гидролизата. Образцы тестировали с применением метода дуо-трио и в каждой триаде определяли образцы, идентичные эталонному.

При выполнении теста 3 подготовлены образцы комплексов с максимально близкими концентрациями ЦД к нижнему диапазону, исследуемому на предыдущем этапе, а именно, при массовом соотношении ГСБМ : β -ЦД, равном 50 : 51 и 50 : 52. По результатам испытаний подтверждено отсутствие различий во вкусе между пробами комплексов с содержанием компонентов 50 : 51 и 50 : 52.

В целом определена минимальная дозировка β -ЦД для удаления горького вкуса. Она достигается при массовом соотношении гидролизата сывороточных белков молока : β -ЦД, равном 50 : 51. Уровень горечи данной композиции составил 0,5 балла в соответствии с применяемой шкалой горького вкуса.

Образцы белковых гидролизатов обладают различным уровнем горечи в зависимости от источника белкового субстрата, степени гидролиза и особенностей технологического процесса. Минимальная достаточная дозировка β -ЦД для устранения горького вкуса тестируемого гидролизата определяется опытным путем.

В предыдущем исследовании также отмечено существенное снижение уровня горечи гидролизата сывороточных белков и молозива после взаимодействия с β -ЦД [24]. Улучшение органолептических показателей гидролизатов белков гороха и лосося также выявлено после внесения β -ЦД [15, 16]. В современных обзорных источниках представленный подход определен как перспективный способ улучшения органолептических свойств белковых гидролизатов для применения в фармацевтической и пищевой промышленности [55, 56].

Выводы

Впервые в настоящей работе проведено комплексное сравнительное исследование антиоксидантного эффекта, антигенных свойств, антимуtagenного и антимикробного действия, органолептических показателей (уровня горечи) глубокого ферментативного гидролизата белков молочной сыворотки и его комплексов включения с β/γ -ЦД.

Представлены опытные образцы глубоких гидролизатов сывороточных белков молока, полученные с применением алкалазы и последующей микро- и ультрафильтрации (отсечка 10 кДа). По данным МС-анализа в гидролизате, изготовленном согласно оптимизированному способу, преобладают продукты протеолиза с M_w менее 1100 Да (пептиды длиной до 10 аминокислотных остатков).

Изучены биоактивные свойства гидролизатов и комплексов включения с β/γ -ЦД с пептидами. В результате протеолиза алкалазой и ультрафильтрации установлено увеличение АОА расщепленной молочной сыворотки в 3,0/5,3 раза по данным флуориметриче-

ского и спектрофотометрического подходов соответственно. Согласно ORAC-методу показано сопоставимое увеличение АОА пептидов сыворотки в составе комплексов с β/γ -ЦД (в 1,79/1,90 раза соответственно). Комплексообразование гидролизата с β/γ -ЦД не оказало влияния на способность восстанавливать АВТС⁺ в тест-системе, что связано с различиями в механизмах реализации антиоксидантного действия в сравниваемых тест-системах. При определении антимикробного эффекта гидролизат оказался более активен в отношении *Escherichia coli* ATCC 8739 (19,4 %), чем *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (10,6 %), а взаимодействие β -ЦД с пептидами обусловило возрастание их ингибирующего действия в отношении тест-штаммов (27,4/15,2 % соответственно). Антимикробный эффект гидролизатов с γ -ЦД сохранялся на уровне, характерном для пептидных фракций. Антимутагенная активность гидролизата при тестировании на штаммах *S. typhimurium* TA 98/TA 100 составила 11,2–19,1/10,0–13,9 % соответственно. Степень индуцированного мутирования пептидов после комплексообразования ЦД сохранилась на исходном уровне для штамма TA 98, а в случае штамма TA 100 отмечено увеличение антимуtagenного действия, что составило 13,8–17,7/17,8–26,2 % в системе с β/γ -ЦД соответственно. В результате протеолиза сыворотки молока алкалазой и последующей фильтрации установлено снижение остаточной антигенности в 265 раз. Комплексообразование с β/γ -ЦД не оказало влияния на антигенность пептидной фракции, тогда как тиндализация обусловила дополнительное ее снижение (в 2,2 раза) в результате термоденатурации антигенных детерминант. В целом уровень антиоксидантного, антимикробного и антимуtagenного эффекта комплексов с β/γ -ЦД оказался сопоставим либо повышен по сравнению с глубокими гидролизатами. В результате взаимодействия β -ЦД с пептидами сыворотки установлено существенное снижение горечи относительно контрольной пептидной фракции.

Предполагается применение ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки и их комплексов включения с циклодекстринами, полученных согласно предложенному технологическому процессу, в составе гипоаллергенных специализированных продуктов питания, в которых нативный белок полностью или частично заменен на смесь пептидов молока.

Критерии авторства

Т. Н. Головач руководила проектом, принимала участие в планировании и проведении экспериментов (постановка ферментативного гидролиза белков молока, получение комплексов включения циклодекстринов с пептидами), отвечала за дизайн работы, сбор, анализ и интерпретацию данных, подготовку текста статьи. З. В. Ловкис принимал участие в подборе параметров технологического процесса получения гидролизатов сывороточных белков молока, организации проведения сенсорной оценки гидролизата и его комплексов

включения с β -циклодекстрином, подготовке и редактировании рукописи. В. П. Курченко и А. Д. Лодыгин участвовали в создании концепции исследования и редактировании рукописи. И. В. Ржепаковский, А. В. Янцевиц, Е. И. Тарун и Н. В. Дудчик принимали участие в планировании и проведении экспериментов по получению ферментативных гидролизатов сыворо-точных белков молока, определению их пептидного состава (ВЭЖХ/МС-анализ), оценке антиоксидантной активности (ORAC-метод) и выявлению антиму-тагенного и антимикробного действия соответственно.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-тересов.

Contribution

T.M. Halavach supervised the project, was in charge of design and performance of experiments (enzymatic

hydrolysis of dairy proteins, preparation of cyclodex-trin inclusion complexes with peptides), data collection, analysis and interpretation, and drafted the manuscript. Z.V. Lovkis selected parameters of the technological pro-cess of whey protein hydrolysate production, organized sensory evaluation of the hydrolysate and its inclusion complexes with β -cyclodextrin, drafted and proofread the manuscript. V.P. Kurchenko and A.D. Lodygin de-veloped the research concept and edited the manuscript. I.V. Rzhepakovsky, A.V. Yantsevich, E.I. Tarun, and N.V. Dudchik obtained enzymatic hydrolysates of whey proteins, determined their peptide composition (HPLC/MS), evaluated antioxidant activity (ORAC), and iden-tified their antimutagenic and antimicrobial effects, res-pectively.

Conflict of interest

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

References/Список литературы

1. Aruna V, Chandrakala V, Angajala G, Nagarajan ER. Proteases: An overview on its recent industrial developments and current scenario in the revolution of biocatalysis. *Materials Today: Proceedings*. 2023;92(2):565–573. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.03.806>
2. Tacias-Pascacio VG, Morellon-Sterling R, Siar EH, Tavano O, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R. Use of alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;165:2143–2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>
3. Czelej M, Garbacz K, Czernecki T, Wawrzykowski J, Waśko A. Protein hydrolysates derived from animals and plants – a review of production methods and antioxidant activity. *Foods*. 2022;11(13):1953. <https://doi.org/10.3390/foods11131953>
4. Ramakrishnan VV, Hossain A, Dave D, Shahidi F. Salmon processing discards: a potential source of bioactive peptides – a review. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2024;6(1):22. <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00197-2>
5. Freidl R, Garib V, Linhart B, Haberl EM, Mader I, Szépfalusi Z, et al. Extensively hydrolyzed hypoallergenic infant formula with retained T cell reactivity. *Nutrients*. 2022;15(1):111. <https://doi.org/10.3390/nu15010111>
6. Gromov DA, Borisova AV, Bakharev VV. Food allergens and methods for producing hypoallergenic foods. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2021;51(2):232–247. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-232-247>; <https://www.elibrary.ru/MHOLPD>
7. Vandénplas Y, Książek J, Luna MS, Migacheva N, Picaud J-C, Ramenghi LA, et al. Partial hydrolyzed protein as a protein source for infant feeding: do or don't? *Nutrients*. 2022;14(9):1720. <https://doi.org/10.3390/nu14091720>
8. Maryniak NZ, Sancho AI, Hansen EB, Bøgh KL. Alternatives to cow's milk-based infant formulas in the prevention and management of cow's milk allergy. *Foods*. 2022;11(7):926. <https://doi.org/10.3390/foods11070926>
9. Soto-Sierra L, Nikolov ZL. Feasibility of membrane ultrafiltration as a single-step clarification and fractionation of microalgal protein hydrolysates. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:957268. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.957268>
10. Alavi F, Ciftci ON. Purification and fractionation of bioactive peptides through membrane filtration: A critical and application review. *Trends in Food Science and Technology*. 2023;131:118–128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.024>
11. Ryazantseva KA, Agarkova EYu, Fedotova OB. Continuous hydrolysis of milk proteins in membrane reactors of various configurations. *Foods and Raw Materials*. 2021;9(2):271–281. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-271-281>; <https://www.elibrary.ru/XVLLQE>
12. Poulson BG, Alsulami QA, Sharfalddin A, Agammy EFE, Mouffouk F, Emwas AH, et al. cyclodextrins: structural, chemical, and physical properties, and applications. *Polysaccharides*. 2021;3(1):1–31. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001>
13. Zhou J, Jia J, He J, Li J, Cai J. Cyclodextrin inclusion complexes and their application in food safety analysis: recent developments and future prospects. *Foods*. 2022;11(23):3871. <https://doi.org/10.3390/foods11233871>
14. Yousaf R, Razzaq FA, Asghar S, Irfan M, Khan IU, Khalid SH. Cyclodextrins: An Overview of Fundamentals, Types, and Applications. In: Ali R, editor. *Cyclodextrins - Core Concepts and New Frontiers*. London: IntechOpen; 2023. <https://doi.org/10.5772/intechopen.108078>

15. Singh A, Idowu AT, Benjakul S, Kishimura H, Aluko RE, Kumagai Y. Debittering of salmon (*Salmo salar*) frame protein hydrolysate using 2-butanol in combination with β -cyclodextrin: Impact on some physicochemical characteristics and antioxidant activities. *Food Chemistry*. 2020;321:126686. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126686>
16. Xia Y, Zhu L, Wu G, Liu T, Li X, Wang X, et al. Comparative study of various methods used for bitterness reduction from pea (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates. *LWT*. 2022;159:113228. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113228>
17. Sviridenko YY, Abramov DV, Myagkonosov DS, Ovchinnikova EG, Tutelyan VA, Mazo VK, et al. Method for producing hydrolysate of whey proteins. Russia patent RU 2663583C2. 2018. [Способ производства гидролизата сывороточных белков: пат. 2663583C2 Рос. Федерация. № 2015156941 / Ю. Я. Свириденко [и др.]; заявл. 30.12.2015; опубл.07.08.2018. 15 с. Бюл. № 22.].
18. Prosekov AJ, Ulrikh EV, Poturaeva NL, Koroleva OV, Budrik VG, Botina SG, et al. Method of production of enzymatic whey proteins. Russia patent RU 2528068C1. 2014. [Способ получения ферментативного сывороточных белков: пат. 2528068C1 / А. Ю. Просеков [и др.]; заявл. 04.04.2013; опубл. 10.09.2014. 8 с. Бюл. №. 25].
19. Kruglik VI, Zorin SN, Gmshinskij IV, Nikitina NE, Volkova IN, Revjakina NV, et al. Method of producing whey protein hydrolysate with high degree of hydrolysis and whey protein hydrolysate with high degree of hydrolysis. Russia patent RU 2428047C1. 2011. [Способ получения гидролизата сывороточных белков с высокой степенью гидролиза и гидролизат сывороточных белков с высокой степенью гидролиза: пат. 2428047C1 Рос. Федерация. № 2010105819/10 / В. И. Круглик [и др.]; заявл.19.02.2010; опубл. 10.09.2011. 20 с. Бюл. № 25.].
20. Golovach TN, Dudchik NV, Veremeenko EG, Tsygankov VG, Bondarchuk AM, Filonyuk VA, et al. Evaluation of antimutagenic and antifungal properties, parameters of acute toxicity and sensitizing activity of enzymatic whey protein hydrolysate. *Foods and Raw Materials*. 2016;4(2):38–47. <http://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-2-38-47>; <https://www.elibrary.ru/XKQBGN>
21. Milentyeva IS, Davydenko NI, Rasshchepkin 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>
22. Halavach TM. Hypoallergenic hydrolysates of whey proteins with average degree of hydrolysis. *AIP Conference Proceedings*. 2022;2390:030030. <https://doi.org/10.1063/5.0069050>
23. Halavach TM, Kurchenko VP, Tarun EI, Yantsevich AV, Shchur VV, Tsygankov VG, et al. Effect of hydrolysis degree with alcalase on antioxidant and antigenic properties of whey and colostrum protein hydrolysates. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2024;15:100975. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.100975>
24. Halavach TM, Savchuk ES, Bobovich AS, Dudchik NV, Tsygankov VG, Tarun EI, et al. Antimutagenic and antibacterial activity of β -cyclodextrin clathrates with extensive hydrolysates of colostrum and whey. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2020;11(2):8626–8638. <https://doi.org/10.33263/BRIAC112.86268638>
25. Halavach TM, Kurchenko VP, Tarun EI, Dudchik NV, Yatskou MM, Lodygin AD, et al. Influence of complexation with β - and γ -cyclodextrin on bioactivity of whey and colostrum peptides. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(18):13987. <https://doi.org/10.3390/ijms241813987>
26. Kalb VF Jr, Bernlohr RW. A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Analytical Biochemistry*. 1977;82(2):362–371. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90173-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90173-7)
27. Walter. Measuring Protein Concentration in the Presence of Nucleic Acids by A280/A260: The Method of Warburg and Christian. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006;2006(1):pdb.prot4252. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4252>
28. Borlinghaus J, Reiter J, Ries M, Gruhlke MCH. Screening procedures and tests for antioxidants. *Pathology*. 2020: 389–395. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00037-8>
29. Borlinghaus J, Reiter J, Ries M, Gruhlke MCH. Screening procedures and tests for antioxidants. In: Preedy VR, editor. *Pathology: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Academic Press; 2020. pp. 389–395. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00037-8>
30. Chambers JM, Freeny AE, Heiberger RM. Analysis of Variance; Designed Experiments. In: Chambers JM, Hastie T, editors. *Statistical Models in S. California: Routledge*; 1992. Pp. 145–190.
31. Dunnett CW. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association*. 1955;50(272):1096–1121. <https://doi.org/10.2307/2281208>
32. Miller RG. *Simultaneous Statistical Inference*. New York: Springer Verlag; 1981. 299 p.
33. Yandell BS. *Practical Data Analysis for Designed Experiments*. Madras: Chapman and Hall; 1997. 312 p.
34. Team RC. *R Foundation for Statistical Computing. R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2014;1.
35. Signorell A, Aho K, Alfons A, Anderegg N, Aragon T, Arachchige C, et al. *Tools for Descriptive Statistics. R Package Version*. 2019; 28(17).
36. Nikoo M, Regenstien JM, Yasemi M. Protein hydrolysates from fishery processing by-products: production, characteristics, food applications, and challenges. *Foods*. 2023;12(24):4470. <https://doi.org/10.3390/foods12244470>

37. Mansinhbhai CH, Sakure A, Maurya R, Bishnoi M, Kondepudi KK, Das S, et al. Significance of whey protein hydrolysate on anti-oxidative, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities and release of peptides with biofunctionality: an in vitro and in silico approach. *Journal of Food Science and Technology*. 2021;59(7):2629–2642. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05282-3>
38. Kleekayai T, O'Neill A, Clarke S, Holmes N, O'Sullivan B, Fitzgerald RJ. Contribution of hydrolysis and drying conditions to whey protein hydrolysate characteristics and in vitro antioxidative properties. *Antioxidants*. 2022;11(2):399. <https://doi.org/10.3390/antiox11020399>
39. Jo YJ, Cho HS, Chun JY. Antioxidant activity of β -cyclodextrin inclusion complexes containing trans-cinnamaldehyde by DPPH, ABTS and FRAP. *Food Science and Biotechnology*. 2021;30(6):807–814. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00914-y>
40. Zheng X, Du Y, Chai Y, Zheng Y. A DFT-based mechanism analysis of the cyclodextrin inclusion on the radical scavenging activity of apigenin. *Antioxidants*. 2023;12(11):2018. <https://doi.org/10.3390/antiox12112018>
41. Abbas Z, Sulaiman G, Jabir M, Mohammed H, Mohammed S. Antioxidant properties of galangin with β -cyclodextrin: an *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of Applied Sciences and Nanotechnology*. 2023;3(1):80–89. <https://doi.org/10.53293/jasn.2022.4876.1157>
42. Liang X, Qian G, Sun J, Yang M, Shi X, Yang H, et al. Evaluation of antigenicity and nutritional properties of enzymatically hydrolyzed cow milk. *Scientific Reports*. 2021;11(1):18623. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98136-z>
43. Liang X, Yang H, Sun J, Cheng J, Luo X, Wang Z, et al. Effects of enzymatic treatments on the hydrolysis and antigenicity reduction of natural cow milk. *Food Science and Nutrition*. 2020;9(2):985–993. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2066>
44. Liang X, Gou X, Hu X, Pu Y, Yan S, Zhou W, et al. Evaluation of the immunoreactivity and quality characteristics of cow milk following combined fermentation and enzymatic hydrolysis. *LWT – Food Science and Technology*. 2023;185:115161. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115161>
45. Rubak YT, Nuraida L, Iswantini D, Prangdimurti E, Sanam MUE. Peptide profiling of goat milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BD7: Identification of potential biological activity. *Biodiversitas*. 2021;22(8):3136–3145. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220807>
46. Suárez-Jiménez GM, Burgos-Hernández A, Torres-Arreola W, López-Saiz CM, Velázquez Contreras CA, Ezquerra-Brauer JM. Bioactive peptides from collagen hydrolysates from squid (*Dosidicus gigas*) by-products fractionated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science and Technology*. 2019;54(4):1054–1061. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13984>
47. Mokhtari R, Rezaei M, Kazemi Fard M, Dirandeh E. Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Casein-Derived Bioactive Peptides Using Trypsin Enzyme. *Pandiselvam R, ed. Journal of Food Quality*. 2023;2023:1–9. <https://doi.org/10.1155/2023/1792917>
48. Zanutto-Elgui MR, Vieira JCS, Prado DZ do, Buzalaf MAR, de Padilha PM, de Oliveira DE, et al. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *Food Chemistry*. 2019;278:823–831. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.119>
49. Vargas-Bello-Pérez E, Márquez-Hernández RI, Hernández-Castellano LE. Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health. *Journal of Dairy Research*. 2019;86(2):136–144. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000384>
50. Chaudhary A, Bhalla S, Patiyal S, Raghava GPS, Sahni G. *FermFoodDb*: A database of bioactive peptides derived from fermented foods. *Heliyon*. 2021;7(4):e06668. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06668>
51. Wan GY, Lam KM, Wong II, FONG P, Meng LR. Extraction of antibacterial peptides against *Helicobacter* from bovine milk casein. *Archives of Medical Science*. 2022;18(2):376–381. <https://doi.org/10.5114/aoms/109942>
52. Khazaei Monfared Y, Mahmoudian M, Hoti G, Caldera F, López Nicolás JM, Zakeri-Milani P, et al. Cyclodextrin-based nanosponges as perse antimicrobial agents increase the activity of natural antimicrobial peptide nisin. *Pharmaceutics*. 2022;14(3):685. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030685>
53. Hu Y, Xing K, Li X, Sang S, McClements DJ, Chen L, et al. Cyclodextrin carboxylate improves the stability and activity of nisin in a wider range of application conditions. *Npj Science of Food*. 2023;7(1):20. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00181-7>
54. Liu H, Wang L, Yao C. Optimization of antibacterial activity and biosafety through ultrashort peptide/cyclodextrin inclusion complexes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(19):14801. <https://doi.org/10.3390/ijms241914801>
55. Liu B, Li N, Chen F, Zhang J, Sun X, Xu L, et al. Review on the release mechanism and debittering technology of bitter peptides from protein hydrolysates. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2022;21(6):5153–5170. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13050>
56. Mirzapour-Kouhdasht A, McClements DJ, Taghizadeh MS, Niazi A, Garcia-Vaquero M. Strategies for oral delivery of bioactive peptides with focus on debittering and masking. *Npj Science of Food*. 2023;7(1):22. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00198-y>