ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2370
https://elibrary.ru/UALJNZ

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Мультикомпонентные композиты нанокомплексов циклодекстрина с биологически активными веществами для функциональных продуктов питания

В. П. Курченко[1,*], Т. Н. Головач[1], Н. В. Сушинская[1], Е. И. Тарун[1], Н. В. Дудчик[2], В. Г. Цыганков[2], И. А. Евдокимов[3], А. Д. Лодыгин[3]

[1] *Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

[2] *Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Минск, Республика Беларусь*

[3] *Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия*

Поступила в редакцию: 04.03.2022
Принята после рецензирования: 31.03.2022
Принята в печать: 14.06.2022

**В. П. Курченко: kurchenko@tut.by, https://orcid.org/0000-0002-4859-2389*
Т. Н. Головач: https://orcid.org/0000-0002-2096-8030
Н. В. Сушинская: https://orcid.org/0000-0003-4036-9825
Е. И. Тарун: https://orcid.org/0000-0001-5711-6037
Н. В. Дудчик: https://orcid.org/0000-0002-5877-9307
В. Г. Цыганков: https://orcid.org/0000-0003-2263-9959
И. А. Евдокимов: https://orcid.org/0000-0002-5396-1548
А. Д. Лодыгин: https://orcid.org/0000-0001-8460-2954

© В. П. Курченко, Т. Н. Головач, Н. В. Сушинская, Е. И. Тарун, Н. В. Дудчик, В. Г. Цыганков, И. А. Евдокимов, А. Д. Лодыгин, 2022

Аннотация.
Для разработки функциональных продуктов питания необходимы мультикомпонентные композиции, содержащие одновременно гидрофильные и гидрофобные соединения. Для этого применяются комплексы включения циклодекстринов (ЦД) с пептидами гидролизата белков и жирорастворимыми витаминами. Цель работы заключалась в разработке метода получения гипоаллергенных пептидов из ферментативного гидролизата белков сыворотки молока и их включения в *β*-ЦД, а также в получении нанокомплексов *β*-ЦД с препаратами жирорастворимых витаминов D_3 и А и создании на основе полученных клатратов мультикомпонентных композиций для функционального питания.
Объектами исследования являлись нанокомплексы *β*-ЦД с фракцией пептидов ферментативного гидролизата белков сыворотки молока и препаратами витаминов D_3 и А, а также их мультикомпонентные смеси. Применялись стандартные аналитические методы исследования: ВЭЖХ-МС, электрофорез, термогравиметрия и флуориметрия.
Разработана методика получения из ферментативного гидролизата белков молока гипоаллергенных фракций пептидов с молекулярной массой от 300–1500 Да (ФП-ГБС). Полученные пептиды содержат от 6 до 14 аминокислотных остатков и обладают гипоаллергенными свойствами, т. к. не содержит антигенные детерминанты, способные вызывать синтез IgE. Получены комплексы включения пептидов гидролизата белков молока и жирорастворимых витаминов А и D_3. Исследованы антиоксидантные и антимутагенные свойства. Дана токсиколого-гигиеническая оценка полученных клатратов. Клатраты пептидов обладали умеренным горьким вкусом. Комплексы включения жирорастворимых витаминов D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД позволили перевести их из раствора оливкового масла в порошкообразную форму, которая растворяется в воде. На основе комплексов включения был разработан мультикомпонентный композит, в 100 г которого содержалось 47 г ФП-ГБС, 1,06 мг витамина D_3 (42 500 МЕ), 3,44 мг витамина А (10 000 МЕ) и 1,54 г оливкого масла. Исследованы структурно-функциональные свойства полученных образцов комплексов включения. Токсиколого-гигиеническая оценка нанокомплексов ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД и их мультикомпонентного композита в экспериментах на *Tetrahymena pyriformis* показала, что по средней смертельной дозе они относятся к 5 классу опасности (неопасные вещества).
Полученные порошкообразные формы водорастворимых жирорастворимых витаминов и пептидов легко дозируются и могут быть использованы при разработке различных функциональных продуктов питания.

Ключевые слова. Циклодекстрины, витамин А, витамин D_3, пептиды, комплексы включения, функциональные продукты питания

Для цитирования: Мультикомпонентные композиты нанокомплексов циклодекстрина с биологически активными веществами для функциональных продуктов питания / В. П. Курченко [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52. № 2. С. 375–389. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2370

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2370
https://elibrary.ru/UALJNZ

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Multicomponent composites of cyclodextrin nanocomplexes with biologically active substances for functional foods

Vladimir P. Kurchenko[1,*], Tatsiana M. Halavach[1], Natallia V. Sushynskaya[1], Ekaterina I. Tarun[1], Natalia V. Dudchik[2], Vasili G. Tsygankow[2], Ivan A. Evdokimov[3], Aleksei D. Lodygin[3]

[1] *Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

[2] *Republican unitary enterprise "Scientific and Practical Center of Hygiene", Minsk, Republic of Belarus*

[3] *North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia*

Received: 04.03.2022
Revised: 31.03.2022
Accepted: 14.06.2022

**Vladimir P. Kurchenko: kurchenko@tut.by, https://orcid.org/0000-0002-4859-2389*
Tatsiana M. Halavach: https://orcid.org/0000-0002-2096-8030
Natallia V. Sushynskaya: https://orcid.org/0000-0003-4036-9825
Ekaterina I. Tarun: https://orcid.org/0000-0001-5711-6037
Natalia V. Dudchik: https://orcid.org/0000-0002-5877-9307
Vasili G. Tsygankow: https://orcid.org/0000-0003-2263-9959
Ivan A. Evdokimov: https://orcid.org/0000-0002-5396-1548
Aleksei D. Lodygin: https://orcid.org/0000-0001-8460-2954

© V.P. Kurchenko, T.M. Halavach, N.V. Sushynskaya, E.I. Tarun, N.V. Dudchik, V.G. Tsygankow, I.A. Evdokimov, A.D. Lodygin, 2022

Abstract.
Enzymatic protein hydrolysates of milk are used as a protein component of functional foods intended for children, athletes, and senior citizens. They are easy to absorb and possess hypoallergenic, antioxidant, antimicrobial, and antimutagenic properties. However, the peptides in their composition have a bitter taste, which limits the use of milk protein hydrolysates in food industry. Functional foods are often fortified with fat-soluble vitamins and other hydrophobic ingredients. They require multicomponent compositions that contain both hydrophilic and hydrophobic compounds. Complexes of *β*-cyclodextrins with peptides of whey protein hydrolyzates and fat-soluble vitamins can solve this problem.
The present research featured nanocomplexes of *β*-cyclodextrins with whey peptides and their multicomponent mixes with vitamins D_3 and A. The methodology involved HPLC-MS, electrophoresis, thermogravimetry, and fluorimetry.
The obtained clathrates were used to develop new multicomponent compositions for functional nutrition. The article introduces a new production method for hypoallergenic peptide fractions with a molecular weight of 300–1500 Da from enzymatic whey protein hydrolyzates. The obtained peptides contained 6–14 amino acid residues and demonstrated hypoallergenic properties because they contained no antigenic determinants capable of causing IgE synthesis. The complexes of inclusion contained hydrolyzate peptides of dairy proteins and fat-soluble vitamins A and D_3. The research revealed some antioxidant and antimutagenic properties, as well as the toxicological and hygienic profile of the clathrates. The resulting peptide clathrates had a less bitter taste. The inclusion complexes of fat-soluble vitamins D_3:*β*-cyclodextrins, and A:*β*-cyclodextrins could be converted from an olive oil solution into a soluble powder. 100 g of the multicomponent composite contained 47.0 g of whey protein hydrolyzate of low molecular weight fraction peptides, 1.06 mg of vitamin D_3 (42 500 IU), 3.44 mg of vitamin A (10 000 IU), and 1.54 g of olive oil. The article also describes the structural and functional properties of the inclusion complexes. Nanocomplexes of whey protein hydrolyzate of low molecular weight fraction peptides:*β*-cyclodextrins, D_3:*β*-cyclodextrins, and A:*β*-cyclodextrins and their multicomponent composite were tested for toxicological and hygienic properties using *Tetrahymena pyriformis*. They appeared to belong to the 5th hazard class in terms of the average lethal dose (non-hazardous substances). The obtained powder forms of fat-soluble vitamins and peptides are easily dosed and can be used to design new functional foods.

Keywords. Cyclodextrins, vitamin A, vitamin D_3, peptides, inclusion complexes, functional foods

For citation: Kurchenko VP, Halavach TM, Sushynskaya NV, Tarun EI, Dudchik NV, Tsygankow VG, *et al.* Multicomponent Composites of Cyclodextrin Nanocomplexes with Biologically Active Substances for Functional Foods. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(2):375–389. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2370

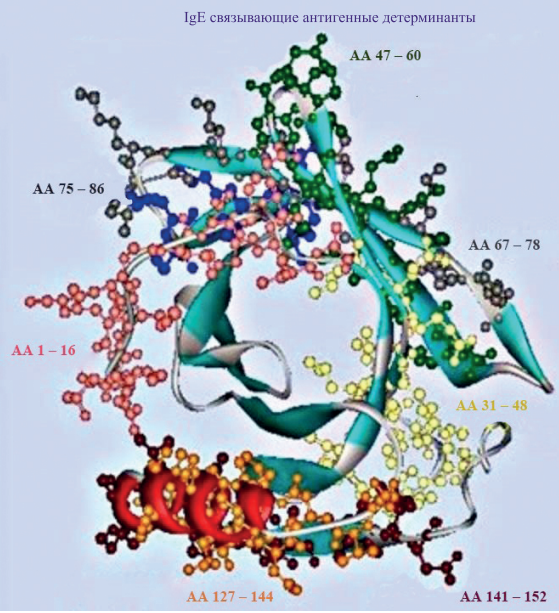
Введение

Состояние здоровья человека определяется характером и структурой питания. Нарушение структуры питания – главный фактор, наносящий непоправимый урон здоровью [1–4]. Европейским региональным комитетом ВОЗ предложен план действий в области пищевых продуктов по расширению производства специально созданной пищи или более широкому использованию функциональных продуктов питания [5].

Под функциональными пищевыми продуктами понимаются пищевые продукты, которые посредством добавления или элиминации определенных пищевых ингредиентов изменяются таким образом, что начинают оказывать регулирующее действие на физиологические функции и биохимические реакции человека. Также они способствуют снижению риска возникновения какого-либо заболевания и оказывают высокий эффект воздействия на здоровье человека в сравнении с традиционными пищевыми продуктами [2, 5, 6].

Вопросы производства гипоаллергенных продуктов питания для детей, спортсменов и пожилых людей актуальны. Это связано с тем, что до 10 % детей раннего возраста страдает пищевой аллергией, обусловленной развитием сенсибилизации организма больного к пищевым аллергенам. Клиническим проявлением пищевой аллергии выступает атопический дерматит – хроническое аллергическое воспаление кожи [7–9]. В раннем возрасте у детей наблюдается повышенная проницаемость желудочно-кишечного тракта для белков молока. Это связано с тем, что β-лактоглобулин (β-лг) и другие белки молока не гидролизуются пепсином. Такие нерасщепленные белки достигают эпителия тонкой кишки и адсорбируются энтероцитами, в которых происходит их частичный протеолиз. Около 10 % не гидролизованных белков в неизменном виде попадают в кровь. При их взаимодействии со специализированными клетками иммунной системы запускается синтез IgE к различным антигенным детерминантам этих белков. На рисунке 1 представлены такие детерминанты β-лг, к которым образуются специфические антитела класса IgE. Исследования показали, что у детей с пищевой аллергией установлена высокая частота обнаружения аллергенспецифических IgE к белкам коровьего молока (68,9 %) и его фракциям: казеину (70,6 %) и β-лактоглобулину (66,3 %).

Таким образом, развитие атопического дерматита, вызванного белками коровьего молока, связано с синтезам аллергенспецифических IgE [7, 8].



a

MKCLLLALALTCGAQALIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKP
TPEGDLEILLQKWENGECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKYLLFCMENSA
EPEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI

b

Рисунок 1. Третичная (a) и первичная (b) структура β-лактоглобулина с указанием антигенных детерминант к IgE [11]
Figure 1. Tertiary (a) and primary (b) structure of β-lactoglobulin with antigenic determinants to IgE [11]

У детей раннего возраста с признаками пищевой аллергии обнаружены аллергенспецифические IgE не только к белкам коровьего молока, но и к наиболее распространенным пищевым антигенам животного и растительного происхождения: мясо птицы и рыбы, фрукты, кисломолочные и глютенсодержащие продукты [8].

Для снижения аллергенности натуральных продуктов их ингредиенты модифицируются таким образом, что начинают проявлять гипоаллергенную физиологическую активность. В продуктах детского питания широко используются белки сыворотки молока. В состав сывороточных белков молока входят β-лг (53,5 %), α-лактоальбумин (α-ла) (21,1 %) и сывороточный альбумин (6,2 %). Все эти белки являются аллергенами [8]. Наибольшим аллергенным потенциалом обладает β-лг, который не гидролизуется пепсином. В его третичной структуре указана локализация 7 антигенных детерминант, вызывающих синтез аллергенспецифических IgE (рис. 1a). Как видно из рисунка 1b, первичная структура β-лг содержит линейные антигенные детерминанты, последовательности аминокислот которых вызывают синтез специфических IgE. Для снижения его аллергенного потенциала необходимо провести ферментативный гидролиз, в результате которого будут получены пептиды, не содержащие последовательности аминокислот, образующие антигенные детерминанты и вызывающие образование аллергенспецифических IgE [8]. В зависимости от глубины протеолиза белков гидролизаты разделяются на частичные и глубокие. Частичные гидролизаты со средней степенью гидролиза содержат пептиды различной длины и минимальное количество свободных аминокислот, глубокие представлены короткоцепочечными пептидами с молекулярной массой 3–5 кДа и менее. Увеличение глубины гидролиза белков ведет к снижению их аллергенных свойств. Продукты протеолиза сывороточных белков обладают антиоксидантными, антимикробными и антимутагенными свойствами, которые необходимы для создания функциональных продуктов питания [8, 10–15].

Низкомолекулярные пептиды, полученные путем глубокого ферментативного гидролиза молочной сыворотки, обладают горьким вкусом. Это затрудняет их использование при создании формул для детского питания [11].

Для разработки функциональных продуктов питания требуется создать мультикомпонентные композиции, в составе которых содержатся одновременно гидрофильные и гидрофобные соединения. Одним из путей решения этих проблем является применение комплексов включения циклодекстринов с пептидами гидролизата белков сыворотки молока, жирорастворимыми витаминами и другими ингредиентами [11, 16, 17]. Для детского питания натуральные продукты дополнительно обогащаются какими-либо функциональными ингредиентами, в частности жирорастворимыми витаминами. Однако из-за их высокой гидрофобности и плохой растворимости в воде практическое использование при создании многокомпонентных пищевых продуктов ограничено [1, 18–20].

Циклодекстрины (ЦД) получают путем ферментативного гидролиза крахмала. В зависимости от вида циклодекстринов в их состав входит от 6 до 8 остатков глюкозы, которые образуют тор [20–25]. Все ОН-группы в циклодекстринах находятся на внешней гидрофильной поверхности молекулы, а внутренняя полость является гидрофобной. В водных растворах гидрофобные вещества способны встраиваться в эту полость, образуя комплексы включения – клатраты. Такие молекулярные контейнеры способны удерживать во внутренней полости молекулы неполярных веществ, а за счет гидрофильной наружной поверхности придают им большую растворимость и стабильность и меняют их вкус, цвет и запах [20, 22, 24]. Циклодекстрины относятся к 5 классу токсичности и являются «не токсичными соединениями». Они рекомендованы в качестве пищевой добавки (Е459) (ТР ТС 029/2012).

При производстве специализированных пищевых продуктов для детского питания важную роль играет устойчивость и биодоступность клатратов циклодекстринов с пептидами и жирорастворимыми витаминами. Жирорастворимые витамины и другие гидрофобные вещества способны встраиваться в их внутреннюю полость, образуя клатраты, которые можно перевести в порошкообразную форму [25]. Благодаря комплексообразованию циклодекстринов с жирорастворимыми витаминами и другими гидрофобными веществами они приобретают большую растворимость и становятся стабильными в процессах хранения [11, 20–22]. В диетологии детского питания широко используются пептиды гидролизата белков сыворотки молока, которые обладают гипоаллергенными свойствами [7–9, 13, 15, 26]. Пептиды, входящие в гидролизат белков, обладают горьким вкусом, для уменьшения которого они могут быть включены в циклодекстрины. Клатраты пептидов включаются в формулы, которые содержат различные витамины и минералы [11, 22, 23, 25, 27]. Для включения в мультикомпонентные композиции жирорастворимых витаминов D_3 и А их необходимо перевести в порошкообразную форму путем комплексообразования с циклодекстринами. На основе порошкообразных комплексов включения в циклодекстрины пептидов, жирорастворимых витаминов и гидрофильных макро- и микронутриентов могут быть созданы мультикомпонентные композиции, пригодные для специализированных продуктов питания.

Целью работы являлась разработка метода получения гипоаллергенных пептидов из ферментативного гидролизата белков сыворотки молока и их включения в β-ЦД, а также исследование их антиоксидантной и антимутагенной активности, получение нанокомплексов β-ЦД с препаратами жирорастворимых витаминов D_3 и А и создание на основе полученных клатратов мультикомпонентных композиций для функционального питания.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись нанокомплексы β-ЦД с фракцией пептидов ферментативного гидролизата белков сыворотки молока и препаратами витаминов D_3 и А, а также их мультикомпонентные смеси.

В работе использованы: препарат витамина D_3 с содержанием 0,425 мг (соответствует 17 000 МЕ холекальциферола) в 1 мл растительного (оливкового) масла (СП ОО «Фармленд», Беларусь); препарат витамина А с содержанием 34,4 мг (соответствует 100 000 МЕ ретинол ацетата) в 1 мл растительного (оливкового) масла (ПРАТ «Технолог», Украина); β-циклодекстрин («Sigma», США, CAS 7585-39-9, E459); концентрат сывороточных белков, полученный методом ультрафильтрации (КСБ-УФ-70, ОАО «Щучинский маслосырзавод», ТУ BY 100377914.550-2008); алкалаза (protease from *Bacillus licheniformis*, активность 2,64 Е/г, «Sigma», США).

Получение ферментативного гидролизата белков молочной сыворотки и определение состава пептидов. Ферментативный гидролиз белков сыворотки молока (КСБ-УФ-70) проводили алкалазой при концентрации белка 5 %, температуре 50 °С и pH 8,0 в течение 2 ч. Для получения из гидролизата белков сыворотки (ГБС) низкомолекулярной фракции пептидов (ФП-ГБС) его фильтровали с использованием фильтров Spin-X UF Concentrator 20 (Corning, Англия) с пропускной способностью 5 кДа. Состав пептидов гидролизата белков сыворотки и ФП-ГБС анализировали с использованием денатурирующего электрофореза и хромато-масс-спектрометрии.

Для анализа молекулярно-массового распределения образцов ФП-ГБС и гидролизата белков сыворотки использовали хромато-масс-спектрометрическую систему Agilent 1290 (Agilent, США) с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения Q-TOF 6550. ВЭЖХ-анализ проводили с применением колонки Hypersil Gold (100×2,1 мм, 1,9 мкм, Agilent, США). Колонку уравновешивали 0,1 % водным раствором муравьиной кислоты. Разделение образцов осуществляли с использованием линейного градиента ацетонитрила 5–95 % в течение 55 мин при температуре 45 °С, скорость потока подвижной фазы – 200 мкл/мин, объем пробы – 15 мкл. Детекцию проводили при 230 и 280 нм. Параметры источника ионизации: температура газа – 290 °С, поток газа – 12 л/мин; температура оболочечного газа – 325 °С, поток оболочечного газа – 9 л/мин. Напряжение на фрагменторе устанавливали равным 150 V; диапазон регистрации спектров составил 100–3200 m/z (соотношение массы к заряду).

Электрофоретический анализ состава пептидов гидролизата белков сыворотки и ФП-ГБС проводили с использованием денатурирующего гель-электрофореза в полиакридном геле по методу Лэмли [28]. Использовали 8 % концентрирующий и 13 % разделяющий гели. Подготовку образцов белков для гель-электрофореза осуществляли с прогреванием в течение 5 мин при 100 °С с добавлением буфера в соотношении 1:1. Состав буфера – 0,2 М дитиотреитола, 4 % додецилсульфата натрия, 20 % глицерина и 0,125 М Трис-HCl (pH 6,8). По окончании электрофореза гели окрашивали при помощи красителя Кумаси R-250 в течение 30 мин при 40 °С. Определение молекулярных масс проводили с помощью программного обеспечения ImageLab («BioRad», США).

Получение комплексов включения β-ЦД с препаратами витаминов D_3, А и фракцией пептидов гидролизата белков сыворотки молока. Для комплексообразования β-ЦД с ФП-ГБС препаратами витаминов D_3 и А использовали метод соосаждения. Для получения клатрата с ФП-ГБС готовили 500 мл 5 % водного раствора β-ЦД при 50 °С. В полученный раствор вносился сухой препарат ФП-ГБС до конечной концентрации 2,5 % (в расчете на содержание сухого вещества в массовом соотношении 2:1). Раствор инкубировали в течение 4 ч при температуре 50 °С в условиях постоянного перемешивания (200 об/мин). После этого понижали температуру до +4 °С в течение 3 ч. Наблюдалось образование белого осадка комплекса включения. Для определения гравиометрическим методом количества пептидов, включенных в комплекс ФП-ГБС:β-ЦД, 100 мл полученной суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Полученный осадок клатратов лиофильно высушивали при температуре 53 °С и давлении 0,1 атм в течение 24–48 ч [11, 15]. Оставшуюся часть полученных комплексов также лиофильно высушивали.

При получении комплексов β-ЦД с препаратами витаминов D_3 и А использовали метод соосаждения. Витамины растворены в оливковом масле. Поэтому для предотвращения их термодеструкции комплексообразование проводили при 25 °С. Готовили насыщенный раствор β-ЦД, растворяя в 500 мл дистилированной воды 10 г β-ЦД при температуре 25 °С. Затем в него вносили 5 мл препаратов витамина D_3 или 1 мл витамина А. В массовом соотношении содержание β-ЦД было в 2 раза выше, чем препарата витамина. Такое соотношение необходимо для полного включения всех компонентов, входящих в

препараты витаминов D_3 и А. Раствор инкубировали в течение 4 ч при температуре 25 °С в условиях постоянного перемешивания (200 об/мин). После этого понижали температуру до +4 °С в течение 3 ч. Наблюдалось образование белого осадка комплекса включения. Полученные комплексы D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД отделялись центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин и лиофильно высушивались [11, 15].

Аналитические методы. Для оценки органолептических свойств ФП-ГБС и ФП-ГБС:*β*-ЦД готовились 1, 2, 3, 4 и 5 % растворы в дистиллированной воде при температуре 25 °С. Дегустацию проводили согласно методике [29].

Содержание пептидов в комплексах ФП-ГБС:*β*-ЦД и препаратов витаминов в комплексах D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД оценивалось расчетными методами с использованием гравиметрического анализа. Для элюции витаминов и жирных кислот, входящих в клатрат, навеску порошка комплексов массой 2 г промывали 4 мл гексана. Супернатант отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. Процедуру экстракции повторяли 3 раза. Осадок *β*-ЦД лиофильно высушивали и определяли его массу. По разнице масс полученного *β*-ЦД и комплексов D_3:*β*-ЦД или А:*β*-ЦД определяли содержание препаратов витаминов в комплексе включения. Аналогично определяли содержание пептидов в комплексе ФП-ГБС:*β*-ЦД. Контролем служил полученный комплекс *β*-ЦД с гексаном [11, 20].

Термогравиметрическим методом анализировалось образование комплексов D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и ФП-ГБС:*β*-ЦД и их стабильность при термическом разложении. Измерения проводились с помощью термоаналитической системы ТА-4000 (Mettler Toledo, Швейцария). Масса исследуемой навески составляла 20,0 мг. Использовалось программирование температуры в диапазоне 25–550 °С, скорость подъема температуры – 5 °С/мин, время проведения анализа – 110 мин [11]. Расчет эффективной энергии активации (E_a) проводили согласно методу Бройдо. Опыты проводились в 3-х повторностях.

Определение антиоксидантной активности комплексов включения. Для оценки антиоксидантной активности образцов D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и ФП-ГБС:*β*-ЦД применяли флуориметрический метод ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) [30]. Метод основан на измерении уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина при его взаимодействии с кислородными радикалами. Антиоксиданты в реакционной среде, взаимодействуя с кислородсодержащими радикалами, замедляют свободнорадикальное окисление флуоресцеина. Антиоксидантную активность комплексов D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД, ФП-ГБС:*β*-ЦД и их мультикомпонентного композита определяли по их способности связывать свободные радикалы, образованные в системе Фентона. Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 514 нм. Длина волны возбуждения – 490 нм. Расчет показателей антиоксидантной активности проводили по степени интенсивности флуоресценции (*A*, %) по формуле:

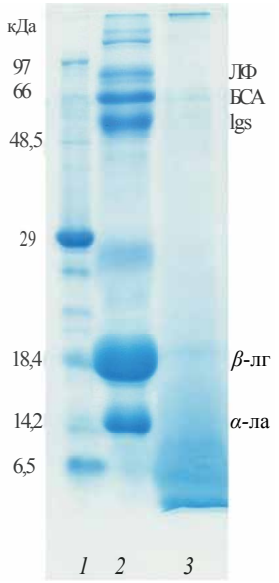
$$A = \frac{Fl}{Fl_0} \times 100 \qquad (1)$$

где Fl_0 – интенсивность флуоресценции контрольного образца флуоресцеина (раствор флуоресцеина без Fe^{2+}, ЭДТА, гидролизата и H_2O_2); *Fl* – интенсивность флуоресценции раствора после добавления антиоксиданта.

Графики зависимости интенсивности флуоресценции строили от содержания сухих веществ D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и ФП-ГБС:*β*-ЦД в анализируемых образцах. Согласно полученному уравнению рассчитывали концентрацию пробы IC_{50}, соответствующую 50 % ингибированию флуоресценции. Построение графиков и математическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003. Результаты независимых экспериментов представлены как среднее арифметическое значение ± доверительный интервал. Достоверность различий между выборками данных определяли методом доверительных интервалов.

Определение антимутагенных свойств комплексов включения. В качестве тест-объектов для определения антимутагенного действия комплексов D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД, ФП-ГБС:*β*-ЦД и мультикомпонентного композита были использованы ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimurium* ТА 100 и ТА 98. Наличие антимутагенного эффекта исследуемых препаратов учитывалось по снижению частоты индуцированных обратных мутаций стандартными мутагенами [31]. В качестве стандартных мутагенов для штамма *S. typhimurium* ТА 100 использовали азид натрия в концентрации 10 мкг/чашка, для штамма *S. typhimurium* ТА 98 – 2-нитрофлуорен 10 мкг/чашка. В рабочий раствор вносились различные концентрации комплексов включения D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД, ФП-ГБС:*β*-ЦД и мультикомпонентного композита. Визуальный учет результатов проводили через 72–120 ч, регистрируя число положительных лунок [31].

Токсиколого-гигиеническая оценка комплексов включения. Токсиколого-гигиеническую оценку комплексов включения D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД, ФП-ГБС:*β*-ЦД и мультикомпонентного композита проводили с использованием тест-объекта *Tetrahymena pyriformis* на основе принципов и методов, принятых в общей токсикологии: определение ос-



1 – белки маркеры, *2* – молочная сыворотка, *3* – гидролизат сывороточных белков; Igs – иммуноглобулины, *α*-ла – *α*-лактальбумин, *β*-лг – *β*-лактоглобулин, ЛФ – лактоферрин, БСА – бычий сывороточный альбумин

Рисунок 2. ДСН электрофореграмма образца гидролизата молочной сыворотки

Figure 2. SDS electropherogram of whey hydrolyzate

новных токсикологических параметров в остром и подостром экспериментах и установление класса опасности [31, 32].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики пакета «Анализ данных» программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

Для получения мультикомпонентных композиций, пригодных для создания функциональных продуктов питания, был получен гидролизат белков сыворотки. Из него путем фильтрации выделена фракция низкомолекулярных пептидов ФП-ГБС. Ее использовали для получения нанокомплекса с *β*-ЦД. Для включения в композиты были получены нанокомплексы *β*-ЦД с препаратами жирорастворимых витаминов А и D_3.

Ферментативный гидролиз белков сыворотки молока проводили с использованием алкалазы [7, 8, 11]. Белково-пептидный состав гидролизатов белков сыворотки молока определяли с применением денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. Полученный гидролизат содержал большое количество пептидов. Поэтому метод ВЭЖХ-МС не использовался, т. к. не было получено удовлетворительного разделения. На электрофореграмме, представленной на рисунке 2 (дорожка 2), отражен типичный состав молочной сыворотки.

Преобладающими белками сыворотки молока являются *β*-лактоглобулин (молекулярная масса 18 кДа) и *α*-лактальбумин (14 кДа). Также обнаружены бычий сывороточный альбумин (66 кДа), лактоферрин (80 кДа), иммуноглобулины (50 кДа) и следовые количества казеина (19–25 кДа). Анализ ДСН-электрофореграммы, представленной на рисунке 2 (дорожка 3), показал, что в ферментативном гидролизате молочной сыворотки наблюдался практически полный протеолиз *β*-лактоглобулина, *α*-лактальбумина и минорных белков на промежуточные пептиды. Полученный гидролизат белков сыворотки содержал около 20 % пептидов с молекулярными массами более 10 кДа. Такие пептиды могут содержать не менее двух антигенных детерминант, способных вызывать синтез IgE (рис. 1). Для увеличения доли низкомолекулярной фракции пептидов полученный гидролизат белков сыворотки фильтровали с использованием фильтров с разделяющей способностью 5 кДа.

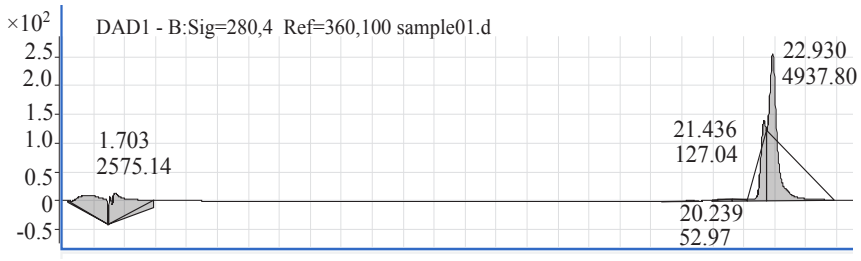
С использованием ВЭЖХ-МС исследован состав низкомолекулярной фракции пептидов гидролизатов сыворотки белков молока (ФП-ГБС). Согласно данным ВЭЖХ-МС профилей, которые представлены на рисунке 3b, пептиды ФП-ГБС элюируются с хроматографической колонки с 1 по 4 мин. Время удержания нативных белков сыворотки молока составляет от 20 до 24 мин (рис. 3a).

По данным масс-спектроскопии (рис. 4) в ФП-ГБС выявлены пептиды с молекулярной массой 300–1500 Да. По диапазонам молекулярных масс они распределились следующим образом: 300–500 ДА – 26,4 %, 500–700 ДА – 41,5 %, 700–1000 ДА – 26,4 %, 1000–1500 ДА – 5,7 %. Высокий уровень сигнала установлен для однозарядных ионов со значениями m/z 680–900 Да. Это соразмерно пептидам длиной 6–8 аминокислотных остатков. Таким образом, полученный ФП-ГБС обладает гипоаллергенными свойствами, т. к. не содержит пептиды с полноразмерными антигенными детерминантами, способными вызывать синтез IgE (рис. 1b).

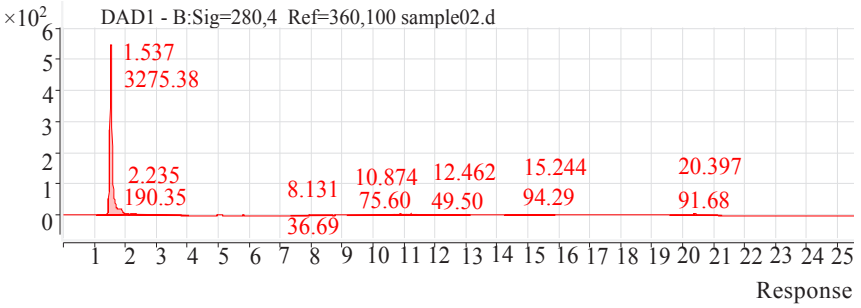
Лиофильно высушенный ФП-ГБС использовали для анализа биологической активности пептидов.

Фракция низкомолекулярных пептидов проявляла антиоксидантные и антимутагенные свойства (табл. 1), необходимые для создания функциональных продуктов питания.

Обладая важными функциональными свойствами, ФП-ГБС проявлял горький вкус, который затрудняет его использование в функциональных пищевых продуктах по органолептическим показателям. Для снижения горького вкуса ФП-ГБС была разработана технология получения нанокомплексов *β*-ЦД с низкомолекулярными пептидами.



a



b

Рисунок 3. ВЭЖХ-МС профиль белков молочной сыворотки (a) и ультрафильтрата гидролизованной молочной сыворотки (b)

Figure 3. HPLC-MS profile of whey proteins (a) and hydrolyzed whey ultrafiltrate (b)

Таблица 1. Характеристика биологической активности фильтрата пептидов глубоких гидролизатов белков сыворотки молока (ФП-ГБС)

Table 1. Biological activity of peptide filtrate of deep whey protein hydrolysates

Показатель	ФП-ГБС
Преобладающая пептидная фракция	300–1000 Да
Антиоксидантная активность, IC_{50}, мкг(белка)/мл	14,5 ± 0,3
Антимутагенная активность, *Salmonella typhimurium* TA 98/TA 100, %	19/14

Для получения комплексов пептидов с *β*-ЦД возможно использование различных методов: сорастирания, соиспарения, соосаждения и др. Метод соосаждения технологически более прост и позволяет получить комплексы *β*-ЦД с ФП-ГБС и препаратами витаминов D_3 и А в больших количествах. Встраивание гидрофобных пептидов в *β*-ЦД зависит от температуры. Это связано с плохой растворимостью *β*-ЦД. При 50 °С растворимость *β*-ЦД в воде составляет 50 мг/мл, а при 20 °С – 18,5 мг/мл. Проведение реакции при 50 °С позволяет в 2,7 раза увеличить растворимость комплексообразователя и получить насыщенный раствор. Внесение в систему комплексанта, инкубация и последующее понижение температуры приводят к выпадению в осадок комплекса-включения. В связи с этим были получены клатраты ФП-ГБС с *β*-ЦД при 50 °С. С использованием гравиметрического метода определена степень включение пептидов ФП-ГБС в *β*-ЦД. Анализ результатов показал, что комплексы ФП-ГБС:*β*-ЦД содержат 78 % пептидов ФП-ГБС. Учитывая, что не все пептиды ФП-ГБС проявляют гидрофобные свойства и способны образовывать клатраты, для дальнейших исследований они не отделялись от комплексов ФП-ГБС:*β*-ЦД. Таким образом, для сохранения комплекса биологической активности пептидов, входящих в состав ФП-ГБС, по разработанной технологии получена смесь клатратов и пептидов, не вошедших в *β*-ЦД.

Горький вкус ФП-ГБС могут придавать дипептиды: *Phe-Ala*, *Pro-Pro*, *Pro-Leu*, *Leu-Val*, *Arg-Val* и трипептиды: *Arg-His-Gly*, *Ser-Leu-Ala*, *Leu-Leu-Pro* и *Try-Try-Gln*. В ди- или трипептидах объемные гидрофобные аминокислоты в любом положении обеспечивают проявление горечи. Горький вкус *Pro*-содержащих пептидов определяется их взаимодействием с рецептором горького вкуса [6, 7]. Пептиды, содержащие в своей структуре аминокислоты *Leu*, *Tyr* и *Phe*, также являются причиной горечи ФП-ГБС. Эти пептиды, входящие в ФП-ГБС, эффективно встраиваются в *β*-ЦД. В результате этого полученные клатраты не способны

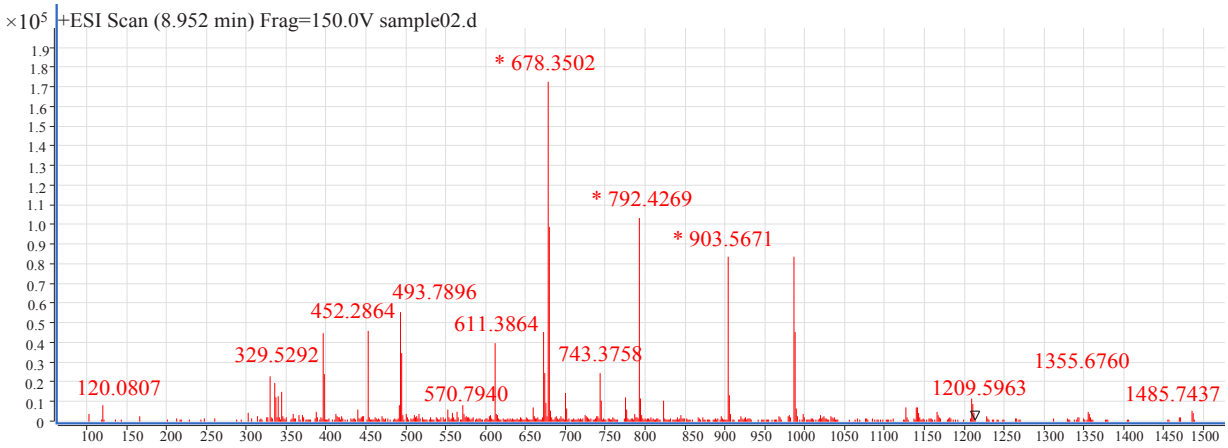


Рисунок 4. Масс-спектр фильтрата гидролизата белков молочной сыворотки (ФП-ГБС)

Figure 4. Mass spectrum of whey protein hydrolyzate filtrate

Таблица 2. Сравнительный анализ параметров термического разложения контрольных образцов: ФП-ГБС, механической смеси ФП-ГБС и *β*-ЦД и комплекса ФП-ГБС:*β*-ЦД согласно данным ДТГ/ТГ-профилей

Table 2. Thermal decomposition based on differential thermogravimetry: whey protein hydrolyzate of low molecular weight fraction peptides vs. their mechanical mix with *β*-cyclodextrins vs. their complex with *β*-cyclodextrins

Условия образования комплекса / Наименование образца	Температура максимальной скорости деструкции (T_{Vmax}), °C	Максимальная скорость деструкции (V_{max}), мг/°C	Количество образца в системе при T_{Vmax}, % от исходного содержания	Энергия активации (E_a), кДж/моль
ФП-ГБС	268,3	0,029	80,9	76
Механическая смесь (ФП-ГБС и *β*-ЦД = 1:2)	297,5	0,29	68,8	118
Комплекс включения (ФП-ГБС:*β*-ЦД = 1:2)	305,1	0,15	55,6	105

взаимодействовать с рецепторами горького вкуса. Пептиды с более высокой молекулярной массой могут не образовывать клатраты и сохранять слабый горький вкус.

Образование комплекса включения ФП-ГБС:*β*-ЦД анализировалось методом термогравиметрии, а также по органолептическим показателям. Фильтрат пептидов гидролизата сывороточных белков растворяется в воде при температуре 25 °C. Когда его концентрация достигает 5 %, он проявляет максимальный горький вкус, оцененный в 10 баллов. Улучшение органолептических свойств проявил комплекс ФП-ГБС:*β*-ЦД. При его концентрации 5 % установлено снижение горечи до умеренно горького вкуса (5 баллов). Снижение горечи пептидов свидетельствует об их включении в *β*-ЦД. С целью подтверждения образования клатратов ФП-ГБС:*β*-ЦД использовали термогравиметрический анализ. Он основан на фиксации изменения массы исследуемого образца при его термическом разложении в диапазоне температур 20–600 °C. Установлены стадии термического разложения образцов в условиях программируемого нагрева со скоростью 5 °C/мин. В таблице 2 представлена сравнительная характеристика параметров термического разложения ФП-ГБС, механической смеси ФП-ГБС:*β*-ЦД и комплекса ФП-ГБС:*β*-ЦД (60 °C) по данным ДТГ/ТГ-профилей.

Для образца *β*-ЦД характерен пик потери массы при 301,8 °C с максимумом скорости термодеструкции, достигающей 0,43 мг/°C. В случае ФП-ГБС выявлены пики разложения с максимумами скорости потери массы при 159,6, 203,9, 268,3 и 541,3 °C (0,006, 0,014, 0,29 и 0,40 мг/°C соответственно).

Как показано на рисунке 5, ДТГ-профили механической смеси ФП-ГБС с *β*-ЦД представляют собой наложение пиков потери массы индивидуальных соединений. Установлено смещение пика термодеструкции *β*-ЦД с 301,8 до 297,5 °C для механической смеси *β*-ЦД и ФП-ГБС и до 305,1 °C для комплекса ФП-ГБС:*β*-ЦД. В образце клатрата сохраняется доминирующий пик термодеструкции *β*-ЦД со смещением и изменением его конфигурации, тогда как практически не выявляются пики разложения, характерные для смеси пептидов. Это

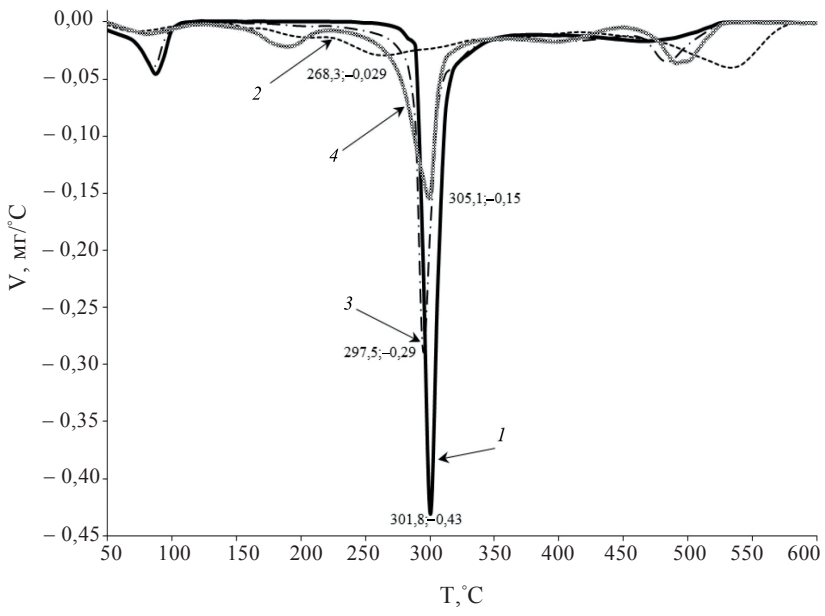


Рисунок 5. ДТГ-профили *β*-ЦД (*1*), гидролизата молочной сыворотки (*2*), их механической смеси (*3*) и комплекса включения (*4*)

Figure 5. DTG profiles: *β*-cyclodextrins (*1*), whey hydrolyzates (*2*), their mechanical mix (*3*), and inclusion complex (*4*)

подтверждает образование комплексов включения.

Получение клатратов жирорастворимых витаминов с *β*-ЦД имеет свои особенности. Использованные в работе препараты витаминов D_3 и А растворены в растительном масле, которые также включаются в клатраты. В связи с этим для предотвращения перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот комплексообразование проводили при 25 °С. В массовом соотношении содержание *β*-ЦД было в 2 раза выше, чем препарата витамина. Такое соотношение необходимо для полного включения всех компонентов, входящих в препараты витаминов D_3 и А. После лиофильной сушки полученных клатратов D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД готовился ряд их водных растворов с различной концентрацией. Максимальная растворимость клатратов D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД при 25 °С не превышала 1,6 и 1,4 мг/мл соответственно. С использованием гравиметрического метода определено содержание жирных кислот и витаминов D_3 и А в клатратах D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД. Показано, что D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД содержат в 5 г комплекса 1,06 мг витамина D_3 и 17,2 мг витамина А.

С целью подтверждения образования клатратов *β*-ЦД с препаратами жирорастворимых витаминов использовали термогравиметрический анализ. Для лиофильно высушенных комплексов D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД установлены стадии термического разложения в условиях программируемого нагрева от 20 до 600 °С со скоростью 5 °С/мин. Температура максимальной скорости окислительной деструкции клатратов препаратов витаминов приходится на 308,26 °С и составляет 1,77 мг/мин. Образование комплексов включения D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД приводит к изменению их физико-химических свойств, что влияет на изменение параметров их термического разложения. Эти результаты свидетельствуют об образовании комплексов включения с витаминами и жирными кислотами растительного масла.

Для создания функциональных продуктов питания на основе нанокомплексов *β*-ЦД с препаратами витаминов и пептидами гидролизата белков сыворотки молока были проведены исследования органолептических и антиоксидантных свойств, антимутагенной активности, а также дана токсико-гигиеническая оценка комплексов ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД. Полученные результаты, представленные в таблице 2, позволили разработать сбалансированный по составу мультикомпонентный композит из порошкообразных форм ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД. Оптимизация состава композита подразумевала возможность получения сбалансированной по составу смеси клатратов, пригодной для дальнейшего применения в качестве функционального питания в лечебных целях, особенно при аллергии у детей. Это требовало включения в состав мультикомпонентного композита клатратов жирорастворимых витаминов в дозах, превосходящих суточные рекомендованные, которые применяются для практически здоровых людей с имеющимся дефицитом витаминов D_3 и А. О безопасности таких добавок

с высоким содержанием витамина D_3 сообщалось ранее [33, 34].

Существуют доказательства, указывающие на ключевую роль изменения микробиома под влиянием современных факторов образа жизни в развитии пищевой аллергии [35]. Показано, что структура микробиома в раннем возрасте, особенно в первые 6 месяцев жизни, играет роль в развитии пищевой аллергии [36]. Современные данные указывают на то, что применение высоких доз витамина D_3 способствует улучшению состояния микробиоты кишечника и степени воспаления слизистой. Уменьшение такой воспалительной среды с помощью витамина D_3 позволяет уменьшить конкурентное преимущество оппортунистических патогенов, таких как *Escherichia*/*Шигелла* spp. или *Pseudomonas* spp., которые лучше адаптированы к воспалению и могут вытеснять комменсальные бактерии, стимулирующие выработку иммуноглобулина А и активацию провоспалительных и регуляторных Т-клеток [37].

Препарат витамина А был выбран для композиции, т. к. имеет огромное значение на протяжении всей жизни. Вместе со своими производными он регулирует различные процессы, включая репродукцию, эмбриогенез, зрение, рост, клеточную дифференцировку и пролиферацию, поддержание целостности эпителиальных клеток и иммунную функцию [38]. Дефицит витаминов А и D_3 приводит к разнообразным дисбиотическим микробным сообществам и повышенной восприимчивости к инфекции или повреждению желудочно-кишечного тракта. Рецепторы витаминов А и D_3 являются ядерными рецепторами, экспрессируемыми хозяином. Витамины А и D_3 совместно регулируют экспрессию белков плотного соединения на эпителиальных клетках кишечника, которые имеют решающее значение для барьерной функции в кишечнике. Другие общие функции витаминов А и D_3 включают поддержку врожденных лимфоидных клеток, продуцирующих ряд интерлейкинов [39].

Ферментативный гидролизат сывороточных белков молока с глубокой степенью гидролиза получен в оптимизированных условиях согласно проведенным ранее исследованиям [40, 41]. Наряду с этим охарактеризованы биологические активности пептидов сыворотки молока и молозива и их комплексов включения с β-ЦД. Экспериментальные образцы гидролизатов и клатратов обладали подтвержденными антиоксидантными, антибактериальными и антимутагенными действиями [11, 42]. По результатам токсиколого-гигиенической оценки на тест-объекте *T. pyriformis* комплекс включения β-ЦД и гидролизат сывороточных белков молока отнесены к малопасным соединениям. Согласно исследованию цитотоксических и цитогенетических повреждений лейкоцитов при энтеральном введении рандомбредным белым крысам *Rattus norvegicus* комплекс включения β-ЦД с гидролизатом сыворотки молока является нетоксичным [42].

Все вышеизложенное легло в основу выбора оптимизированного состава мультикомпонентного композита: ФП-ГБС:β-ЦД – 94 г, D_3:β-ЦД – 5 г и А:β-ЦД – 1 г. В полученной порошкообразной форме клатратного композита содержалось 47,0 г ФП-ГБС, 1,06 мг витамина D_3 (42500 МЕ), 3,44 мг витамина А (10000 МЕ) и 1,54 г оливкового масла. Анализ результатов, представленных в таблице 3, показывает, что включение в циклодекстрин ФП-ГБС привело к снижению горького вкуса пептидов до 5 баллов. Порошкообразный мультикомпонентный композит имел белый цвет, отсутствие запаха и слабый горький вкус до 3 баллов.

Определение антиоксидантной активности комплексов включения ФП-ГБС:β-ЦД, D_3:β-ЦД и А:β-ЦД и их мультикомпонентного композита проводилось методом ORAC. В проведенных экспериментах рассчитана концентрация исследуемых образцов, вызывающих 50 % ингибирование образования активных форм кислорода (IC_{50}). Из

Таблица 3. Биологическая активность нанокомплексов: β-ЦД с препаратом витамина D_3 (D_3:β-ЦД), препаратом витамина А (А:β-ЦД), фильтратом гидролизата сывороточных белков молока (ФП-ГБС:β-ЦД) и мультикомпонентного композита при их соотношении 94:5:1

Table 3. Biological activity of nanocomplexes: β-hydrolyzates with vitamin D_3, with vitamin A, with whey protein hydrolyzate filtrate, and a multicomponent composite at their ratios of 94:5:1

Показатели	D_3:β-ЦД	А:β-ЦД	ФП-ГБС:β-ЦД	Мультикомпонентный композит
Органолептические свойства, горечь, баллы	0	0	5	3
Антиоксидантная активность, IC_{50}, мкг (сухого вещества)/мл	65,7 ± 1,5	16,1 ± 1,2	12,5 ± 0,6	15,1 ± 0,9
Антимутагенная активность, *Salmonella typhimurium* TA 98/TA 100), %	0/0	0/0	18/12	16/12
Токсичность, острая	5	5	5	5

результатов, представленных в таблице 3, видно, что полученные нанокомплексы способны связывать свободные кислородосодержащие радикалы. Сравнительный анализ образцов комплексов включения показал, что антирадикальная активность убывает в ряду исследованных образцов: ФП-ГБС:*β*-ЦД, мультикомпонентный композит, А:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД.

Для анализа антимутагенной активности ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и мультикомпонентного композита в тесте Эймса использовались штаммы *S. typhimurium* ТА 98 и ТА 100. *S. typhimurium* ТА 98 позволяет идентифицировать повреждения ДНК, вызывающие сдвиг рамки считывания, а с помощью *S. typhimurium* ТА 100 идентифицируются мутации замены пары оснований. Для оценки антимутагенного действия исследуемых образцов у штаммов *S. typhimurium* ТА 98 и ТА 100 вызывали индуцированный мутагенез, приводящий к увеличению ревертантов. Выявленные различия в количестве ревертантов в контроле и опыте были статистически достоверны для концентрации ФП-ГБС:*β*-ЦД 0,5 мг/чашку. Проведенное исследование показало, что ФП-ГБС:*β*-ЦД и мультикомпонентная композиция проявляют антимутагенное действие, предотвращая мутации замены пар оснований у штамма *S. typhimurium* ТА 100 и сдвиг рамки считывания у *S. typhimurium* ТА 98.

На основе принципов и методов гигиенического регламентирования, принятых в общей токсикологии, и согласно нормативно-методической документации, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь, токсиколого-гигиенические исследования комплексов включения ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и их мультикомпонентного композита осуществлялись на *T. pyriformis* [16, 29, 30]. Принцип методов исследований на *T. pyriformis* заключается в анализе характера роста популяции в среде культивирования, содержащей исследуемые комплексы включения. Эффект токсического действия оценивался по альтернативному состоянию «жизнь – смерть». По результатам токсиколого-гигиенической оценки, представленной в таблице 2, в острых (4 ч) экспериментах на *T. pyriformis* ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и их мультикомпонентный композит по средней смертельной дозе относятся к 5 классу опасности (неопасные вещества).

Выводы

Для создания функциональных пищевых продуктов на основе белков сыворотки молока получены их ферментативные гидролизаты. Продукты протеолиза представлены пептидами, которые обладают гипоаллергенными, антиоксидантными и антимутагенными свойствами и имеют горький вкус. Для снижения горького вкуса пептиды включены в циклодекстрины. Такие клатраты не способны взаимодействовать с рецепторами, т. к. *Pro*-содержащие пептиды и другие пептиды, вызывающие горечь, входят в гидрофобную полость циклодекстрина. В результате они не взаимодействуют с рецепторами горького вкуса.

При создании мультикомпонентных композиций для функциональных пищевых продуктов получены нанокомплексы препаратов жирорастворимых витаминов А и D_3. Образование жирорастворимыми витаминами комплексов включения D_3:*β*-ЦД и А:*β*-ЦД привело к изменению их физико-химических свойств. Они из жидкого состояния в оливковом масле переведены в порошкообразную форму. Эти клатраты обладали повышенной термостабильностью и растворимостью в воде.

Были изучены антиоксидантные свойства и антимутагенная активность, а также дана токсиколого-гигиеническая оценка комплексов ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и их мультикомпонентного композита. Разработана оптимизированная по составу мультикомпонентная композиция, в которую входил ФП-ГБС:*β*-ЦД – 94 г, D_3:*β*-ЦД – 5 г и А:*β*-ЦД – 1 г. Сравнительный анализ антиоксидантной активности образцов комплексов включения ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и их мультикомпонентного композита показал, что она убывает в ряду ФП-ГБС:*β*-ЦД, мультикомпонентный композит, А:*β*-ЦД и D_3:*β*-ЦД. С использованием модели индуцированного мутагенеза в тесте Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 исследована антимутагенная активность ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и их мультикомпонентного композита. Экспериментально доказано, что ФП-ГБС:*β*-ЦД и мультикомпонентная композиция проявляют антимутагенное действие, предотвращая мутации у штамма *S. typhimurium* ТА 100 и ТА 98. Проведенная токсиколого-гигиенической оценка в остром и подостром экспериментах на *Tetrahymena pyriformis* нанокомплексов ФП-ГБС:*β*-ЦД, D_3:*β*-ЦД, А:*β*-ЦД и их мультикомпонентного композита показала, что по средней смертельной дозе и коэффициенту кумуляции они относятся к 5 классу опасности (неопасные вещества).

Таким образом, проведенные исследования позволили создать мультикомпонентную композицию, пригодную для использования в качестве функциональных пищевых продуктов. Полученные порошкообразные формы жирорастворимых витаминов и пептидов легко дозируются и могут быть использованы при разработке различных функциональных продуктов питания.

Критерии авторства

В. П. Курченко – сбор и обобщение материала, написание статьи. Т. Н. Головач – получение ферментативных гидролизатов белков сыворотки молока, проведение ВЭЖХ-МС анализа и получение комплексов циклодекстрина с пептидами.

Н. В. Сушинская – проведение экспериментальных работ по электрофоретическому исследованию белков, получение нанокомплексов с витаминами. Е. И. Тарун – изучение антиоксидантной активности объектов исследования. Н. В. Дудчик – изучение антимутагенной активности объектов исследования. В. Г. Цыганков – изучение токсичности объектов исследования. И. А. Евдокимов – анализ результатов исследования и обсуждение результатов. А. Д. Лодыгин – анализ результатов физико-химических свойств и биологической активности объектов исследования

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Contribution

V.P. Kurchenko collected the data and wrote the article. T.N. Halavach obtained the enzymatic hydrolysates of whey proteins, conducted the HPLC-MS analysis, and obtained the cyclodextrin peptide complexes. N.V. Sushynskaya performed the electrophoretic experiments and obtained the nanocomplexes with vitamins. E.I. Tarun studied the antioxidant activity. N.V. Dudchik studied the antimutagenic activity. V.G. Tsygankow studied the toxicity. I.A. Evdokimov analyzed the results. A.D. Lodygin analyzed the physicochemical properties and biological activity.

Conflict of interest

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

References/Список литературы

1. Tutel′yan VA, Nechaev AP. Food ingredients in modern food products. Moscow: DeLi plyus; 2013. 520 p. (In Russ.).

Тутельян В. А., Нечаев А. П. Пищевые ингредиенты в создании современных продуктов питания. М.: ДеЛи плюс, 2013. 520 с.

2. Asgary S, Rastqar A, Keshvari M. Functional food and cardiovascular disease prevention and treatment: A review. Journal of the American College of Nutrition. 2018;37(5):429–455. https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1410867

3. Sharma SK, Bansal S, Mangal M, Dixit AK, Gupta RK, Mangal AK. Utilization of food processing by-products as dietary, functional, and novel fiber: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2016;56(10):1647–1661. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.794327

4. Domínguez Díaz L, Fernández-Ruiz V, Cámara M. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2020;60(10):1738–1746. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1592107

5. Tsygankov VG, Lovkis ZV, Stigaylo IN, Simonenko SV. Tasks and prospects of functional food industry. Proceedings of the Belarusian State University. 2009;4(1):60–67. (In Russ.).

Задачи и перспективы разработки продуктов функционального питания / В. Г. Цыганков [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. 2009. Т. 4. № 1. С. 60–67.

6. Plasek B, Lakner Z, Kasza G, Temesi Á. Consumer evaluation of the role of functional food products in disease prevention and the characteristics of target groups. Nutrients. 2020;12(1). https://doi.org/10.3390/nu12010069

7. Halavach TM, Dudchik NV, Tarun EI, Zhygankov VG, Kurchenko VP, Romanovich RV, *et al.* Biologically active properties of hydrolysed and fermented milk proteins. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2020;9(4):714–720. https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.714-720

8. Halavach TM, Kurchenko VP. Allergenicity of milk proteins and ways of its decrease. Proceedings of the Belarusian State University. 2010;5(1):9–55. (In Russ.).

Головач Т. Н., Курченко В. П. Аллергенность белков молока и пути ее снижения // Труды Белорусского государственного университета. 2010. Т. 5. № 1. С. 9–55.

9. Borovik TE, Makarova SG, Darchiya SN, Gamaleyeva AV. The role of compounds based on hydrolyzed protein in prophylaxis and diet treatment of alimentary allergy in infants. Current Pediatrics. 2010;(1):150–156. (In Russ.).

Роль смесей гидролизатов белка в профилактике и диетотерапии пищевой аллергии у детей раннего возраста / Т. Э. Боровик [и др.] // Вопросы современной педиатрии. 2010. Т. 9. № 1. С. 150–156.

10. Görgüç A, Gençdağ E, Ylmaz FM. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: biological activities and techno-functional utilizations in food developments – A review. Food Research International. 2020;136. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109504

11. Halavach TM, Savchuk ES, Bobovich AS, Dudchik NV, Tsygankow 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. 2021;11(2):8626–8638. https://doi.org/10.33263/BRIAC112.86268638

12. Serafini M, Peluso I. Functional foods for health: The interrelated antioxidant and anti-inflammatory role of fruits, vegetables, herbs, spices and cocoa in humans. Current Pharmaceutical Design. 2017;22(44):6701–6715. https://doi.org/10.2174/1381612823666161123094235

13. Golovach TN, Tarun EI, Dudchik NV, Romanovich RV, Bubra IA, Kurchenko VP. Description of biologically active protein hydrolysates of whey and colostrum. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series. 2018;63(4):409–418. (In Russ.). https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-409-418

14. Golovach TN, Romanovich RV, Kurchenko VP, Tarun EI. Antioxidant potential of bovine colostrum fermented with acidophilus bacillus. Food Industry. 2019;(4):30–31. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10014

15. Golovach TN, Tarun EI, Dudchik NV, Romanovich RV, Bubra IA, Kurchenko VP. Antiradical activity, antimutagenic and antigenic properties of enzymatic bovine colostrum hydro lysates. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2018;(1):50–59. (In Russ.).

Антирадикальная активность, антимутагенные и антигенные свойства ферментативных гидролизатов коровьего молозива / Т. Н. Головач [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018. № 1. С. 50–59.

16. Manzoor M, Singh J, Bandral JD, Gani A, Shams R. Food hydrocolloids: Functional, nutraceutical and novel applications for delivery of bioactive compounds. International Journal of Biological Macromolecules. 2020;165:554–567. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.182

17. Zhu J, Huang Q. Nanoencapsulation of functional food ingredients. Advances in Food and Nutrition Research. 2019;88:129–165. https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.03.005

18. Kim SB, Ki KS, Khan MA, Lee WS, Lee HJ, Ahn BS. Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. Journal of Dairy Science. 2007;90(9):4043–4050. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0169

19. Edwards PJB, Jameson GB, Palmano KP, Creamer LK. Heat-resistant structural features of bovine *β*-lactoglobulin A revealed by NMR H/D exchange observations. International Dairy Journal. 2002;12(4):331–344. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00029-8

20. Shikhar G, Aviral K, Sanjay V. Solubility studies of the β-cyclodextrins inclusion complexes: A review. International Research Journal of Pharmacy. 2012;3(10):178–181.

21. Das SK, Rajabalaya R, David S, Gani N, Khanam J, Nanda A. Cyclodextrins – the molecular container. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2013;4(2):1694–1720.

22. Varan G, Varan C, Erdoğar N, Hıncal AA, Bilensoy E. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics. 2017;531(2):457–469. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.010

23. Menezes PDP, Andrade TA, Frank LA, de Souza EPBSS, Trindade GGG, Trindade IAS, *et al.* Advances of nanosystems containing cyclodextrins and their applications in pharmaceuticals. International Journal of Pharmaceutics. 2019;559:312–328. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.041

24. Fernández MA, Silva OF, Vico RV, de Rossi RH. Complex systems that incorporate cyclodextrins to get materials for some specific applications. Carbohydrate Research. 2019;480:12–34. https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.05.006

25. Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics. 2018;535(1–2):272–284. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018

26. Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Lee WS, Lee HJ, *et al.* Enzymatic hydrolysis of heated whey: Iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. Journal of Dairy Science. 2007;90(9):4033–4042. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0228

27. Loftsson T, Brewster ME. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012;101(9):3019–3032. https://doi.org/10.1002/jps.23077

28. Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. 3 Volumes Set. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013. 1599 p.

29. Linde GA, Junior AL, Faria EV, Colauto NB, Moraes FF, Zanin GM. The use of 2D NMR to study β-cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides. Food Research International. 2010;43(1):187–192. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.025

30. Tarun EI. A comparative analysis of antioxidant activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. Proceedings of the Belarusian State University. 2014;9(1):186–191. (In Russ.).

Тарун Е. И. Сравнение антиоксидантных активностей галловой, кофейной и хлорогеновой кислот // Труды Белорусского государственного университета. 2014. Т. 9. № 1. С. 186–291.

31. Dudchik NV. Quantitative evaluation of antimutagenic activity of plant composition in short-term tests. Health and Environment. 2014;1(24):218–221. (In Russ.).

Дудчик Н. В. Количественная оценка антимутагенной активности растительной композиции в краткосрочном тесте // Здоровье и окружающая среда. 2014. Т. 1. № 24. С. 218–221.

32. Bogdan AS, Kuznetsova ZP, Sokolov SM, Tsygankov VG, Bondaruk AM. Guidelines for preclinical testing of biologically active food additives and phytopreparations MR No. 119-0010. Minsk: Ministerstvo zdravookhraneniya Respubliki Belarus′; 2000. 35 p. (In Russ.).

Методические рекомендации по доклиническому испытанию биологически активных пищевых добавок и фитопрепаратов МР №119-0010 / А. С. Богдан [и др.]. Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2000. 35 с.

33. Prietl B, Treiber G, Mader JK, Hoeller E, Wolf M, Pilz S, *et al.* High-dose cholecalciferol supplementation significantly increases peripheral $CD4^+$ Tregs in healthy adults without negatively affecting the frequency of other immune cells. European Journal of Nutrition. 2014;53(3):751–759. https://doi.org/10.1007/s00394-013-0579-6

34. Bashir M, Prietl B, Tauschmann M, Mautner SI, Kump PK, Treiber G, *et al.* Effects of high doses of vitamin D_3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. European Journal of Nutrition. 2016;55(4):1479–1489. https://doi.org/10.1007/s00394-015-0966-2

35. Iweala OI, Nagler CR. The microbiome and food allergy. Annual Review of Immunology. 2019;37:377–403. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041621

36. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, *et al.* Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2016;138(4):1122–1130. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.041

37. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, *et al.* Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. PLoS Biology. 2007;5(10):2177–2189. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050244

38. Bar-El Dadon S, Reifen R. Vitamin A and the epigenome. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017;57(11):2404–2411. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1060940

39. Cantorna MT, Snyder L, Arora J. Vitamin a and vitamin d regulate the microbial complexity, barrier function, and the mucosal immune responses to ensure intestinal homeostasis. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2019;54(2):184–192. https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1611734

40. Halavach TM, Tarun EI, Asafov VA. Enzymatic protein hydrolysates of whey and colostrum with extensive degree of hydrolysis. AIP Conference Proceedings. 2022;2390. https://doi.org/10.1063/5.0069049

41. Halavach T. Proteolysis of bovine whey, milk and colostrum with serine endopeptidases. In: Kurchenko V, Lodygin A, da Costa RMM, Samoylenko I, editors. Intelligent biotechnologies of natural and synthetic biologically active substances. Cham: Springer; 2022. pp. 35–45. https://doi.org/10.1007/978-3-030-96641-6_5

42. Halavach TM, Kurchenko VP, Tsygankow VG, Bondaruk AM, Tarun EI, Asafov VA. β-Cyclodextrin nanocomplexes with biologically active peptides from hydrolysed bovine whey and colostrum. Biointerface Research in Applied Chemistry. 2022;12(6):8502–8514. https://doi.org/10.33263/BRIAC126.85028514