

Биокаталитическая конверсия белка молочной сыворотки микроорганизмами рода *Aspergillus oryzae* для снижения аллергенности

Т. В. Подлегаева^{1,*}, О. В. Козлова¹, О. В. Кригер^{1,2}, Н. А. Потураева¹



¹ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»,
650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6

² ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»,
236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14

Дата поступления в редакцию: 25.03.2020
Дата принятия в печать: 24.07.2020

*e-mail: tpodlegaeva@yandex.ru



© Т. В. Подлегаева, О. В. Козлова, О. В. Кригер, Н. А. Потураева, 2020

Аннотация.

Введение. Более 170 пищевых продуктов могут вызывать у человека аллергические реакции. Одно из ключевых мест занимают молочные продукты. Для снижения антигенных свойств молочное сырье можно подвергнуть тепловой обработке. Однако длительное нагревание уменьшает питательную ценность молока, приводит к снижению растворимости и слабой перевариваемости продукта. Проведение биокаталитической конверсии считается эффективным способом снижения аллергенности белков молока и молочной продукции.

Объекты и методы исследования. Объектом исследований выбрана молочная сыворотка. Для проведения процесса биоконверсии использовали ферментный комплекс грибной протеазы и экзо-пептидазы, продуцируемых *Aspergillus oryzae*. В ходе работы определяли рациональную концентрацию ферментного препарата; параметры температурного режима и продолжительности реакции; влияния pH на интенсивность процесса. Использовали стандартные общепринятые методы. Массовую долю свободных аминокислот определяли методом распределительной хроматографии после гидролиза белков.

Результаты и их обсуждение. Установлена зависимость величины степени гидролиза сывороточных белков в результате биоконверсии от продолжительности ферментативной обработки и pH реакционной смеси. Максимальная степень гидролиза наблюдается при pH смеси $4,0 \pm 0,1$ при фермент-субстратном соотношении 1:700. Степень гидролиза в образцах с фермент-субстратным соотношением 1:1000 и 1:700 отличается незначительно. Поэтому, с точки зрения экономичности, за основу приняли фермент-субстратное соотношение 1:1000. Отмечено возрастание концентрации многих аминокислот, что говорит о гидролитическом расщеплении белка. Были определены рациональные параметры процесса биокаталитической конверсии молочной сыворотки данным ферментным комплексом: соотношение фермент-субстрат – 1:1000, продолжительность процесса – 60–90 мин, pH среды – $4,0 \pm 0,1$, температура – 35–45 °С.

Выводы. Результаты исследований образцов сыворотки, подвергнутой биокаталитической конверсии ферментным комплексом протеаз рода *Aspergillus oryzae*, показывают присутствие в составе молочной сыворотки низкомолекулярных пептидов, что говорит об эффективности процесса и снижения аллергенности сывороточного белка.

Ключевые слова. Биоконверсия, молочные продукты, антигенны, экзо-пептидаза, протеаза, хроматограмма, деминерализация, протеолиз, аминокислоты, белок

Финансирование. Исследование финансировалось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России) в рамках Гранта Президента РФ при государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2694.2020.4).

Для цитирования: Биокаталитическая конверсия белка молочной сыворотки микроорганизмами рода *Aspergillus oryzae* для снижения аллергенности / Т. В. Подлегаева, О. В. Козлова, О. В. Кригер [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 3. – С. 415–424. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-3-415-424>.

Original article

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

Reducing Allergenicity by Biocatalytic Conversion of Whey Protein Using *Aspergillus oryzae*

Tatiana V. Podlegaeva^{1,*}, Oksana V. Kozlova¹, Olga V. Kriger²,
Natalia L. Poturaeva¹

¹ Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia

Received: March 25, 2020

Accepted: July 24, 2020

² Immanuel Kant Baltic Federal University,
14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia

*e-mail: tpodlegaeva@yandex.ru



© T.V. Podlegaeva, O.V. Kozlova, O.V. Kriger, N.L. Poturaeva, 2020

Abstract.

Introduction. More than 170 foods can cause allergic reactions in humans. The list of potential allergens includes a lot of dairy products. To reduce the antigenic properties, dairy raw materials can be subjected to thermal treatment. However, prolonged heating reduces the nutritional value, solubility, and digestibility of the final product. Biocatalytic conversion is considered a more effective way to reduce the allergenicity of milk proteins and dairy products.

Study objects and methods. The research featured the bioconversion process of milk whey using an enzyme complex of fungal protease and exo-peptidase produced by *Aspergillus oryzae*. The research provided an optimal concentration of the enzyme preparation, as well as temperature parameters, reaction time, and the effect of pH on the intensity of the process. The experiment involved standard research methods. The mass fraction of free amino acids was determined by distribution chromatography after protein hydrolysis.

Results and discussion. The research helped to define the effect of enzymatic treatment time and the pH on the hydrolysis of serum proteins after bioconversion. The indicator of the degree of hydrolysis and its time was affected by the concentration of the introduced enzyme preparation. The maximum degree of hydrolysis was observed at $\text{pH} = 4.0 \pm 0.1$ with an enzyme-substrate ratio of 1:700. The degree of hydrolysis in samples with an enzyme-substrate ratio of 1:1,000 and 1:700 was almost the same. Therefore, the enzyme-substrate ratio of 1:1,000 proved more effective. The concentration of many important amino acids increased, which indicated the hydrolytic cleavage of the protein. The research made it possible to determine the most effective parameters of the process of biocatalytic conversion of whey enzyme by the protease complex *Aspergillus oryzae*: the ratio of enzyme-substrate – 1:1,000, time – 60–90 min, $\text{pH} = 4.0 \pm 0.1$, temperature – 35–45°C.

Conclusion. The whey samples subjected to biocatalytic conversion by an enzyme complex of the genus *Aspergillus oryzae* showed the presence of low-molecular peptides in its composition, which indicated the effectiveness of the process and reducing the allergenicity of the whey protein.

Keywords. Bioconversion, dairy products, antigens, exopeptidase, protease, chromatogram, demineralization, proteolysis, amino acids, protein

Funding. The research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauka) as part of the Grant of the President of the Russian Federation for state support of leading scientific schools (No. NSH-2694.2020.4).

For citation: Podlegaeva TV, Kozlova OV, Kriger OV, Poturaeva NL. Reducing Allergenicity by Biocatalytic Conversion of Whey Protein Using *Aspergillus oryzae*. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(3):415–424. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-3-415-424>.

Введение

Пищевая аллергия и пищевая непереносимость являются серьезным и опасным заболеванием. Проявления аллергии могут наблюдаться как в детском (или быть наследованными), так и быть приобретенными уже во взрослом возрасте. С проблемами непереносимости и проявлением аллергии той или иной степени тяжести в настоящее время сталкивается более 20 % населения планеты, из них более 50 % – дети грудного возраста. Данные цифры постоянно растут. По сообщению Центров по контролю и профилактике заболеваний (США) распространенность пищевой аллергии у детей с 1997 года увеличилась на 50 % [1].

Более 170 пищевых продуктов могут вызывать у человека аллергические реакции. Несмотря на то, что степень аллергенности, в зависимости от региона проживания, меняется, наиболее распространенными пищевыми аллергенами считаются продукты, называемые во многих странах «большой восьмеркой». Одно из первых мест в этой восьмерке занимает молоко. В частности, это молочные белки, которые содержатся в коровьем молоке и продуктах его переработки.

Чтобы избежать аллергической реакции, следует соблюдать строгую диету. Определить количество аллергенной пищи, вызывающее реакцию организма, довольно затруднительно. Поэтому медики советуют избегать ее полного употребления.

В настоящее время исследование и лечение пищевой аллергии находится на переломном этапе. Для поддержания здоровья ученые всего мира находят вспомогательные источники безопасных и необходимых для здоровья продуктов.

Технология производства молочных продуктов функционального питания берет в расчет современные достижения науки в области энзимологии, микробиологии, биоорганической химии и др. Предпочтение отдается достижению функциональных свойств за счет биологической обработки.

Пищевыми аллергенами чаще всего являются сложные белки, имеющие молекулярную массу в пределах 10–70 кДа, реже – полипептиды и гаптены, которые соединяются с белками пищи. Они имеют трехмерную структуру и хорошо растворяются в воде. Некоторые из них проявляют значительную термостабильность и устойчивость к воздействию протеолитических ферментов [1].

Биокаталитическая конверсия молочных белков, направленная на получение их гидролизатов с заданным молекулярно-массовым распределением и остаточной аллергенностью, является наиболее перспективным подходом для снижения аллергических проявлений. Ярко выраженными антигенными свойствами обладает сывороточный белок β -лактоглобулин, содержащийся в коровьем молоке. Для снижения антигенных свойств молочное сырье можно подвергнуть тепловой обработке. Однако длительное нагревание приводит к снижению питательной ценности молока, к уменьшению растворимости и слабой перевариваемости продукта. Современные научные исследования показывают, что проведение биокаталитической конверсии является эффективным способом уменьшения аллергенности белков молочной сыворотки [5–7].

Главная задача биоконверсии белка сводится к такому расщеплению белковой формулы, при котором организм не сможет распознать в измененном коровьем белке аллерген. Чем более мелкие части белка образуются в процессе расщепления, тем меньше вероятность того, что организм их распознает и ответит аллергической реакцией.

Среди веществ, оказывающих воздействие на модификацию молочных белков, значительное место занимают протеолитические ферменты различного происхождения. Под действием протеаз в белковой молекуле происходит специфическое расщепление пептидных связей. В результате уменьшается ее молекулярная масса, повышаются гидрофобность белка и его усвояемость организмом.

Наиболее популярным источником протеиназ являются микроорганизмы, относящиеся к родам *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces* [8–11]. Для гидролиза белков молочной сыворотки также используются протеиназы животного происхождения и микробиологические препараты.

Цель исследования – изучение процесса и определение рациональных параметров биокаталитической конверсии молочной сыворотки микроорганизмами рода *Aspergillus oryzae* для снижения аллергенности.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований выбрана деминерализованная молочная сыворотка (ГОСТ 53438-2009) с

содержанием белка 0,7 %, рН реакционной смеси 4,45. Для доведения рН до исследуемых значений действия ферментов использовали 5 % КОН. Инактивация ферментов проводилась инкубированием смеси в течение 10 мин при температуре 85 ± 1 °С.

Деминерализацию молочной сыворотки проводили методом электродиализа на лабораторной электродиализной установке ЭДУ при температуре 20 ± 2 °С в течение 1 ч с использованием ионообменной колонки с катионитами и анионитами марками КУ 2-8 и АВ-17-8. Метод основан на мембранном разделении, в котором ионы растворенного вещества переносятся через мембрану, под действием электрического поля.

На начальном этапе молочную сыворотку подвергали деминерализации, процесс которой описан ранее [9]. В результате получили основу со следующими физико-химическими показателями (табл. 1).

Результаты проведенных исследований показали, что в процессе электродиализной обработки молочной сыворотки происходит снижение содержания одно- и двухвалентных металлов на 50 %.

Для исследований использовали стандартные общепринятые методы исследований. Массовую долю растворимых сухих веществ определяли по методике ГОСТ 28562-90 на рефрактометре ИРФ-45452 М; массовую долю жира – по ГОСТ 29247-91; массовую долю белка – по ГОСТ 23621-79; массовую долю влаги выявляли по ГОСТ 29246-91 высушиванием навески на приборе КВАРЦ-21 М (аналог прибора Чижовой) при температуре 160 ± 2 °С. Титруемую кислотность устанавливали по ГОСТ 25555.0-82.

Для исследования процесса биокаталитической конверсии использовали ферментный комплекс грибной протеазы и экзо-пептидазы, продуцируемых *Aspergillus oryzae* (Дания). Эндо- и экзо-пептидазы в сочетании создают оптимальные условия для проведения реакции: первые расщепляют молекулу белка на более мелкие фрагменты, ферменты второй группы отщепляют одну за другой концевые аминокислоты. Оптимальными условиями активности данного фермента являются: температура 30–75 °С, рН 2,0–4,0; пептидаза – диапазон температуры 30–65 °С, рН 4,0–9,0.

Комплекс микроорганизмов рода *Aspergillus oryzae* характеризуется сочетанием ферментов, в

Таблица 1. Физико-химические показатели сыворотки после ЭД-обработки

Table 1. Physicochemical profile of whey after demineralization

Сырье	Массовая доля, %					Кислотность	
	сухих веществ	в том числе, %				титруемая, °Т	активная
		белка	жира	лактозы	зола		
Сыворотка подсырная	6,04 ± 0,20	0,64 ± 0,30	0,3 ± 0,02	4,9 ± 0,01	0,3 ± 0,01	12,0 ± 0,5	6,2 ± 0,10
Сыворотка творожная	5,42 ± 0,20	0,52 ± 0,30	0,3 ± 0,02	4,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	33,0 ± 0,5	6,0 ± 0,10

котором протеаза проявляет свою активность при температурном режиме 30–45 °С, а экзо-пептидаза – при 30–55 °С. Поэтому для экспериментов были выбраны температурные режимы: 30 ± 1 °С, 35 ± 1 °С, 45 ± 1 °С, 55 ± 1 °С и значения рН среды: 3,0 ± 0,1; 4,0 ± 0,1; 5,0 ± 0,1.

В ходе проведения реакции определяли:

- рациональную концентрацию ферментного препарата (фермент-субстратного соотношения);
- рациональные значения температурного режима и продолжительности реакции протеолиза;
- влияния рН на интенсивность процесса.

Ферментативный гидролиз деминерализованной сыворотки проводили на термостатируемой качалке в герметично закрытых колбах объемом 1 см³ при частоте вращения 66 об/мин.

В исследуемом образце ферментированной сыворотки определяли массовую долю свободных аминокислот методом распределительной хроматографии после гидролиза белков на аминокислотном анализаторе «ARACUS». Принцип метода состоит в том, что навеску вещества помещают в двухфазную систему, между которыми происходит распределение аминокислот в зависимости от коэффициента подвижности.

Результаты и их обсуждение

Основной задачей следующей стадии исследования является определение рациональных технологических параметров проведения биоконверсии молочной сыворотки микроорганизмом рода *Aspergillus oryza* в целях получения сывороточной основы со сниженной аллергенностью.

На рисунках 1–3 представлены кинетические зависимости степени гидролиза от продолжитель-

ности действия ферментного препарата с различной концентрацией температурных режимов и рН среды.

Анализ результатов, представленных на рисунке 1, показал, что в ходе реакции наибольшая степень гидролиза отмечена у образцов сыворотки, имеющих рН 4,0 ± 0,1. Интенсивное нарастание содержания свободных аминокислот, отражающее изменение степени гидролиза, происходит до 90 мин ферментативного воздействия (67 %). Далее изменение данных происходит незначительно: по истечении 105 мин – 68,8 %, после 120 мин – 69 %, 135 мин – 70,1 %, после 150 мин – 71 %. Это связано с образованием побочных продуктов гидролиза, ингибирующих реакцию.

При рН ферментируемой смеси 3,0 ± 0,1 и 5,0 ± 0,1 наблюдается увеличение количества расщепленного белка. Но при этом степень гидролиза меньше предыдущего показателя на 30,4 % и 6 % после ферментации в течение 60 мин и на 33,5 % и 9,7 % через 2,5 ч соответственно. Таким образом, на степень гидролиза белков молочной сыворотки оказывает влияние не только продолжительность реакции, но и активная кислотность смеси.

Аналогичная зависимость прослеживается при фермент-субстратном соотношении 1:2000. Основываясь на данных рисунка 2, наибольшая степень гидролиза после окончания процесса отмечается у сыворотки с рН среды 4,0 ± 0,1 – 38,1 %. При рН ферментируемой смеси 3,0 ± 0,1 этот показатель составил 29,8 %, при рН 5,0 ± 0,1 – 35,9 %.

При фермент-субстратном соотношении 1:700, используя данные рисунка 3, наблюдается интенсивное увеличение степени гидролиза при всех значениях рН среды. Максимальное значение характерно для образцов сыворотки с рН 4,0 ± 0,1:

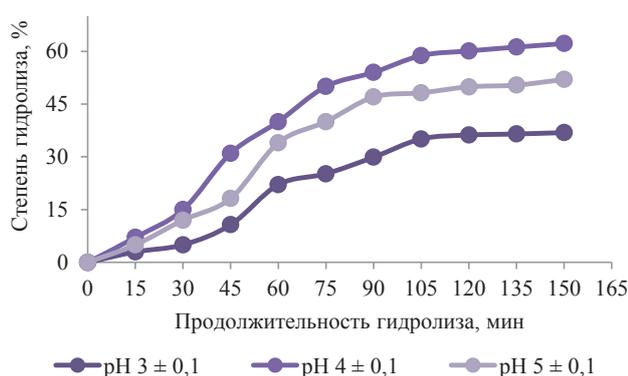


Рисунок 1. Влияние продолжительности биоконверсии на степень гидролиза белков молочной сыворотки при использовании препарата микроорганизмов рода *Aspergillus oryza* (соотношение фермент-субстрат 1:1000)

Figure 1. Effect of bioconversion time on the degree of hydrolysis of whey proteins when using *Aspergillus oryza* (enzyme-substrate ratio – 1:1,000)

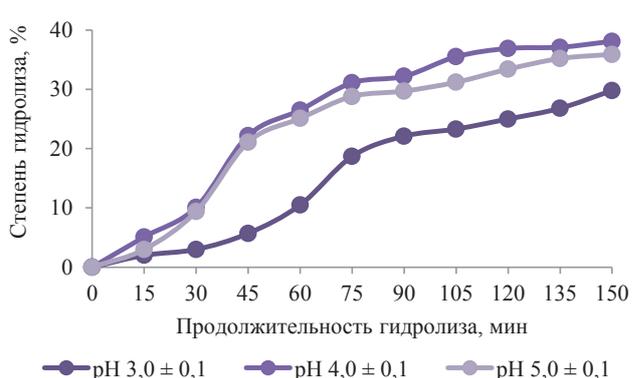


Рисунок 2. Влияние продолжительности биоконверсии на степень гидролиза белков молочной сыворотки при использовании препарата микроорганизмов рода *Aspergillus oryza* (соотношение фермент-субстрат 1:2000)

Figure 2. Effect of bioconversion time on the degree of hydrolysis of whey proteins when using *Aspergillus oryza* (enzyme-substrate ratio – 1:2,000)

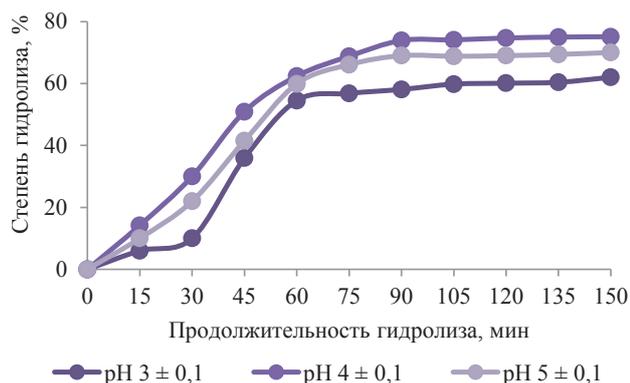


Рисунок 3. Влияние продолжительности биоконверсии на степень гидролиза белков молочной сыворотки при использовании ферментного препарата микроорганизмов рода *Aspergillus oryzae* (соотношение фермент-субстрат 1:700)

Figure 3. Effect of bioconversion time on the degree of hydrolysis of whey proteins when using *Aspergillus oryzae* (enzyme-substrate ratio – 1:700)

после 60 мин гидролиза степень гидролиза составила 62,4 %, после 90 мин – 73,9 %, после окончания процесса (150 мин) – 75,0 %. Таким образом, можно сделать вывод о сокращении продолжительности биокаталитической конверсии при повышении концентрации ферментного препарата. Значительный рост количества расщепленного белка происходит до 60 мин процесса. В дальнейшем этот показатель меняется незначительно.

Анализируя полученные данные, представленные на рисунках 1–3, установлена зависимость величины степени гидролиза сывороточных белков от продолжительности ферментативной обработки и pH реакционной смеси. Кроме того, на показатель степени гидролиза и его продолжительности сказывается концентрация вносимого ферментного препарата. Максимальная степень расщепления наблюдается при pH смеси 4,0 ± 0,1 при фермент-субстратном соотношении 1:700.

Отмечено, что степень протеолиза в точке максимального роста (после 90 мин ферментативного процесса) в образцах с фермент-субстратном соотношении 1:1000 и 1:700 (pH 4,0 ± 0,1) отличается незначительно: 67 % и 73,9 % соответственно. Поэтому, с точки зрения экономичности процесса,

целесообразно принять за основу фермент-субстратное соотношение 1:1000. Кроме того, по истечении 90 мин и увеличении времени в дальнейшем в образцах сыворотки с большей концентрацией появляется горечь, что значительно ухудшает органолептические показатели сывороточной основы. Это связано с образованием большого количества свободных аминокислот, придающих ферментированной сыворотке горький привкус.

Следующим этапом исследований было изучение влияния температуры на процесс ферментативного гидролиза. Эксперименты проводились на установленных ранее данных: рациональное соотношение фермент-субстрат 1:1000, pH среды 4,0 ± 0,1. Результаты данных эксперимента представлены в таблице 2.

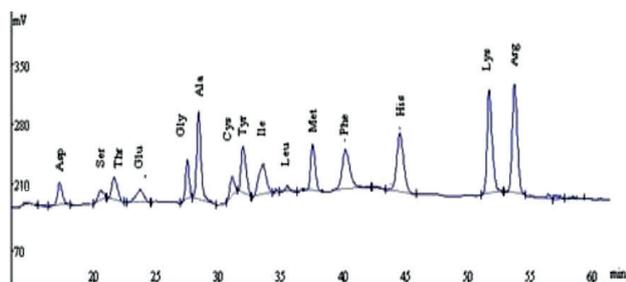
Анализ данных таблицы 2 показывает, что практически во всех образцах наблюдается значительное увеличение количества расщепленного белка. Наиболее заметные изменения у образцов, подвергавшихся расщеплению при температурах 35 и 45 °C при продолжительности 120 мин – 68,8 % и 62,0 % соответственно. Уменьшение температуры гидролиза до 30 °C снижает активность ферментного препарата, что выражается в относительно невысокой степени гидролиза – 40 % и 53 % после 90 мин и 120 мин соответственно. Увеличение температуры до 55 °C выражается несколько меньшими значениями степени гидролиза, чем у температурных режимов в 35–45 °C. В данном случае это показатели 40,1 % при 60 мин процесса и 63,1 % после 120 мин с начала ферментации. Заметный рост количества гидролизованного белка наблюдался до 90 мин протеолиза. В течение следующих 60 мин количество свободных аминокислот увеличивается незначительно. Поэтому считаем, что дальнейшее продолжение процесса нецелесообразно. Величина pH практически не изменяется на протяжении всей реакции и находится в пределах ранее определенных значений pH для ферментации данным комплексом.

Исследования данного этапа эксперимента позволили определить рациональные параметры биокаталитической конверсии молочной сыворотки ферментным комплексом рода *Aspergillus oryzae*: соотношение фермент-субстрат – 1:1000, продолжительность процесса – 60–90 мин, pH среды – 4,0 ± 0,1, температура – 35–45 °C.

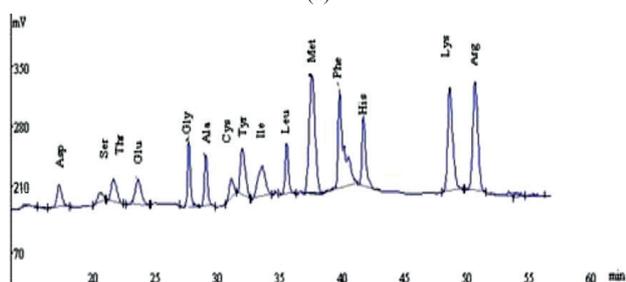
Таблица 2. Состав и свойства гидролизатов, полученных при биокаталитической конверсии сывороточных белков комплексом микроорганизмов рода *Aspergillus oryzae*

Table 2. Composition and properties of hydrolysates obtained by biocatalytic conversion of whey proteins by *Aspergillus oryzae*

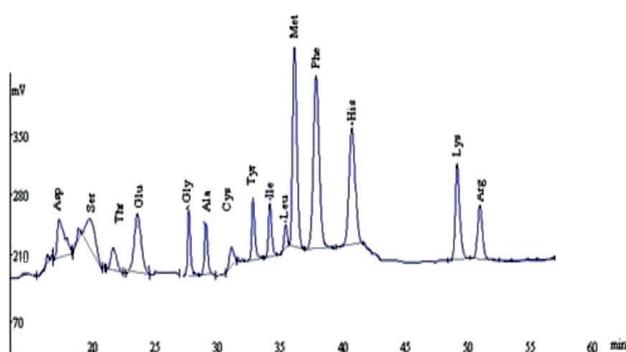
Показатель	Контроль	Температура гидролиза (°C) при продолжительности (мин)											
		30			35			45			55		
		60	90	120	60	90	120	60	90	120	60	90	120
Степень гидролиза, %	0	27,0	40,0	53,0	45,3	65,0	68,8	32,0	47,0	62,0	40,1	61,2	63,1
pH	4,00	3,78	3,63	3,56	3,79	3,76	3,69	3,80	3,69	3,66	3,76	3,68	3,65



(a)



(b)



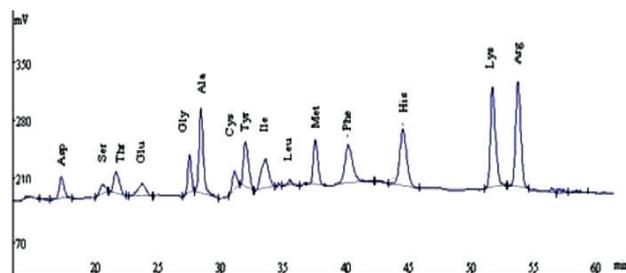
(c)

Рисунок 4. Хроматограммы свободных аминокислот, полученных в результате биокаталической конверсии белков молочной сыворотки ферментным препаратом микроорганизмов рода *Aspergillus oryza* при температуре $45 \pm 1^\circ\text{C}$ и ферментсубстратном отношении 1:2000: а) $2,00 \pm 0,05$ ч; б) $4,00 \pm 0,05$ ч; в) $8,00 \pm 0,05$ ч

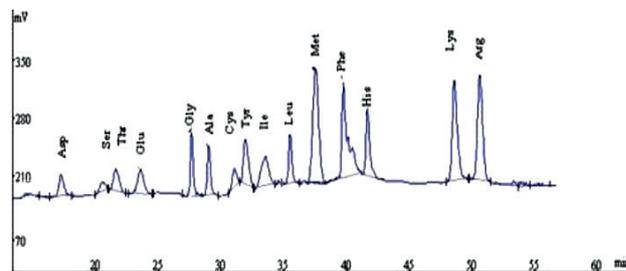
Figure 4. Chromatograms of free amino acids obtained as a result of biocatalytic conversion of whey proteins by an enzyme preparation of *Aspergillus oryza* at $45 \pm 1^\circ\text{C}$ and an enzyme substrate ratio of 1:2,000: а) 2.00 ± 0.05 h; б) 4.00 ± 0.05 h; в) 8.00 ± 0.05 h

Степень гидролиза является объективной характеристикой, отражающей совокупные изменения аминокислотного состава сывороточных белков. В связи с этим актуальным является изучение аминокислотного состава полученного гидролизата.

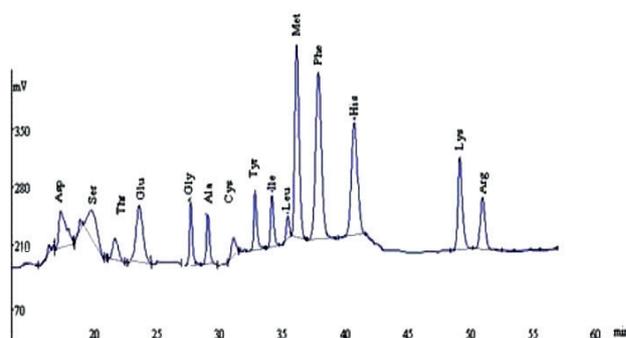
Проанализирована динамика накопления свободных аминокислот в процессе реакции биоконверсии, проводимой при различных условиях. Для более полного гидролиза процесс проводили в течение 2, 4 и 8 ч. Результаты исследований при проведении ферментативного гидролиза с ферментным препаратом микроорганизмов рода *Aspergillus oryza* приведены на рисунках 4–6 и таблице 3.



(a)



(b)



(c)

Рисунок 5. Хроматограммы свободных аминокислот, полученных в результате биокаталической конверсии белков молочной сыворотки ферментным препаратом микроорганизмов рода *Aspergillus oryza* при температуре $45 \pm 1^\circ\text{C}$ и ферментсубстратном отношении 1:1000: а) $2,00 \pm 0,05$ ч; б) $4,00 \pm 0,05$ ч; в) $8,00 \pm 0,05$ ч

Figure 5. Chromatograms of free amino acids obtained as a result of biocatalytic conversion of whey proteins by an enzyme preparation of *Aspergillus oryza* at $45 \pm 1^\circ\text{C}$ and an enzyme substrate ratio of 1:1,000: а) 2.00 ± 0.05 h; б) 4.00 ± 0.05 h; в) 8.00 ± 0.05 h

При фермент-субстратном соотношении 1:1000 и продолжительности процесса $8,00 \pm 0,05$ ч накопление свободных аминокислот происходит значительно интенсивнее. Это связано с глубоким гидролизом молочной сыворотки под действием фермента. При соотношениях 1:2000 и 1:700 с увеличением продолжительности реакции наблюдается аналогичная ситуация с накоплением свободных аминокислот, а именно лизина, лейцина, аргинина, метионина и фенилаланина.

По результатам анализа данных, представленных в таблице 3, видно, что в процессе ферментативного гидролиза концентрация многих важных аминокислот существенно возрастает. Это говорит о гидролитическом расщеплении белка. Среди

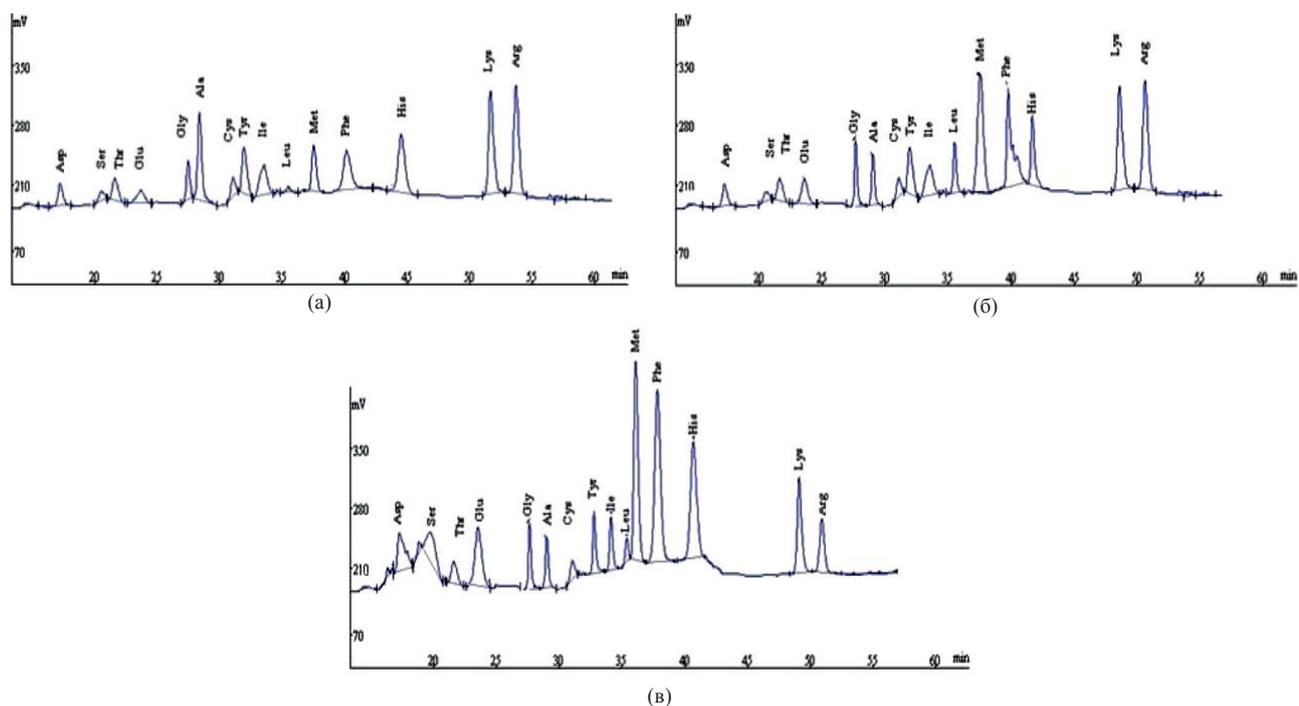


Рисунок 6. Хроматограммы свободных аминокислот, полученных в результате биокаталической конверсии белков молочной сыворотки ферментным препаратом микроорганизмов рода *Aspergillus oryza* при температуре $45 \pm 1^\circ\text{C}$ и фермент-субстратном отношении 1:700: а) $2,00 \pm 0,05$ ч; б) $4,00 \pm 0,05$ ч; в) $8,00 \pm 0,05$ ч

Figure 6. Chromatograms of free amino acids obtained as a result of biocatalytic conversion of whey proteins by an enzyme preparation of *Aspergillus oryza* at $45 \pm 1^\circ\text{C}$ and an enzyme substrate ratio of 1:700: a) 2.00 ± 0.05 h; б) 4.00 ± 0.05 h; в) 8.00 ± 0.05 h

Таблица 3. Динамика накопления свободных аминокислот в результате обработки ферментным комплексом микроорганизмов рода *Aspergillus oryza*

Table 3. Dynamics of accumulation of free amino acids as a result of treatment with *Aspergillus oryza* enzyme complex

Аминокислоты, мкмоль/л	Контроль, г/100 г белка	Фермент-субстратное соотношение								
		1:700			1:1000			1:2000		
		продолжительность ферментативного гидролиза, ч								
		2,00 ± 0,05	4,00 ± 0,05	8,00 ± 0,05	2,00 ± 0,05	4,00 ± 0,05	8,00 ± 0,05	2,00 ± 0,05	4,00 ± 0,05	8,00 ± 0,05
Фенилаланин (Phe)	Сл.	0,115 ± 0,02	0,171 ± 0,02	0,116 ± 0,02	0,115 ± 0,02	0,116 ± 0,02	0,117 ± 0,02	0,116 ± 0,02	0,117 ± 0,02	0,119 ± 0,02
Лейцин (Leu)	Сл.	4,060 ± 0,02	4,235 ± 0,02	4,378 ± 0,02	3,872 ± 0,02	4,312 ± 0,02	4,345 ± 0,02	2,596 ± 0,02	2,761 ± 0,02	2,915 ± 0,02
Треонин (Thr)	Сл.	0,077 ± 0,02	0,100 ± 0,02	0,132 ± 0,02	0,022 ± 0,02	0,132 ± 0,02	0,286 ± 0,02	0,0198 ± 0,02	0,561 ± 0,02	1,375 ± 0,02
Метионин (Met)	Сл.	0,198 ± 0,02	0,220 ± 0,02	0,308 ± 0,02	0,121 ± 0,02	0,143 ± 0,02	0,198 ± 0,02	0,220 ± 0,02	0,363 ± 0,02	0,836 ± 0,02
Лизин (Lys)	0,151	1,254 ± 0,02	2,112 ± 0,02	2,816 ± 0,02	0,946 ± 0,02	1,397 ± 0,02	2,618 ± 0,02	2,475 ± 0,02	5,544 ± 0,02	6,248 ± 0,02
Валин (Val)	Сл.	0,088 ± 0,02	0,165 ± 0,02	0,198 ± 0,02	0,100 ± 0,02	0,121 ± 0,02	0,187 ± 0,02	0,308 ± 0,02	0,495 ± 0,02	1,375 ± 0,02
Гистидин (His)	Сл.	0,726 ± 0,02	0,792 ± 0,02	1,045 ± 0,02	0,150 ± 0,02	0,274 ± 0,02	0,278 ± 0,02	0,310 ± 0,02	0,352 ± 0,02	0,900 ± 0,02
Аргенин (Arg)	Сл.	0,100 ± 0,02	0,124 ± 0,02	0,189 ± 0,02	0,121 ± 0,02	0,144 ± 0,02	0,229 ± 0,02	0,304 ± 0,02	0,519 ± 0,02	1,088 ± 0,02
Аланин (Ala)	Сл.	0,123 ± 0,02	0,156 ± 0,02	0,178 ± 0,02	0,097 ± 0,02	0,135 ± 0,02	0,178 ± 0,02	0,211 ± 0,02	0,392 ± 0,02	0,944 ± 0,02
Серин (Ser)	0,039	0,012 ± 0,02	0,019 ± 0,02	0,034 ± 0,02	0,036 ± 0,02	0,085 ± 0,02	0,167 ± 0,02	0,031 ± 0,02	0,130 ± 0,02	0,702 ± 0,02
Глутаминовая кислота (Glu)	0,908	0,490 ± 0,02	0,590 ± 0,02	3,520 ± 0,02	0,410 ± 0,02	0,654 ± 0,02	2,760 ± 0,02	6,480 ± 0,02	8,701 ± 0,02	5,461 ± 0,02
Аспарагиновая кислота (Asp)	Сл.	0,034 ± 0,02	0,211 ± 0,02	0,240 ± 0,02	0,068 ± 0,02	0,389 ± 0,02	0,459 ± 0,02	0,024 ± 0,02	0,178 ± 0,02	0,366 ± 0,02
Цистеин (Cys)	Сл.	0,450 ± 0,02	0,530 ± 0,02	0,688 ± 0,02	0,308 ± 0,02	0,440 ± 0,02	0,539 ± 0,02	0,668 ± 0,02	0,932 ± 0,02	0,966 ± 0,02
Тирозин (Tyr)	0	0,040 ± 0,02	0,041 ± 0,02	0,044 ± 0,02	0,042 ± 0,02	0,046 ± 0,02	0,047 ± 0,02	0,090 ± 0,02	0,092 ± 0,02	0,095 ± 0,02
Глицин (Gly)	0,209	0,477 ± 0,02	0,511 ± 0,02	0,681 ± 0,02	0,101 ± 0,02	0,170 ± 0,02	0,177 ± 0,02	0,020 ± 0,02	0,244 ± 0,02	0,633 ± 0,02

обнаруженных после процесса биокаталической конверсии аминокислот около 25,8 % приходится на долю лизина, лейцина, аргинина, метионина и фенилаланина.

Выводы

В ходе работы были определены рациональные параметры процесса биокаталической конверсии ферментным комплексом микроорганизмов рода

Aspergillus oryzae season: соотношение фермент-субстрат – 1:1000, продолжительность процесса – 60–90 мин, pH среды – 4,0 ± 0,1, температура – 35–45 °C.

Результаты исследований образцов сыворотки в результате реакции показали присутствие в своем составе низкомолекулярных пептидов. Это говорит об эффективности процесса и снижения аллергенности сывороточного белка.

Критерии авторства

Т. В. Подлегаева руководила проектом. О. В. Козлова, О. В. Кригер и Н. Л. Потураева принимали участие

в экспериментальных исследованиях.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликта интересов нет

Contribution

T.V. Podlegaeva supervised the project. O.V. Kozlova, O.V. Krieger, and N.L. Poturaeva took part in the experimental studies.

Conflict of interest

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

Список литературы

1. Лусс, Л. В. Пищевые аллергены и пищевые добавки: роль в формировании пищевой аллергии и пищевой непереносимости / Л. В. Лусс // Эффективная фармакотерапия. – 2014. – № 33. – С. 12–19.
2. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy / A. Muraro, T. Werfel, K. Hoffmann-Sommergruber [et al.] // Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2014. – Vol. 69, № 8. – P. 1008–1025. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.12429>.
3. К вопросу о перспективных направлениях борьбы с аллергией / В. Д. Харитонов, В. Г. Будрик, Е. Ю. Агаркова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – Т. 27, № 4. – С. 3–6.
4. Immunomodulatory properties of the milk whey products obtained by enzymatic and microbial hydrolysis / S.-M. Huang, K.-N. Chen, Y.-P. Chen [et al.] // International Journal of Food Science and Technology. – 2010. – Vol. 45, № 5. – P. 1061–1067. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02239.x>.
5. Gauthier, S. F. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins / S. F. Gauthier, Y. Pouliot, D. Saint-Sauveur // International Dairy Journal. – 2006. – Vol. 16, № 11. – P. 1315–1323. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014>.
6. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of pre-treatment and enzyme specificity / R. Ajonu, G. Doran, P. Torley [et al.] // Food Chemistry. – 2013. – Vol. 136, № 3–4. – P. 1435–1443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.053>.
7. A study of polyfunctional properties of biologically active peptides / A. Prosekov, O. Babich, L. Dyshlyuk [et al.] // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – Vol. 7, № 4. – P. 2391–2400.
8. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 / A. A. Osmolovskiy, E. A. Popova, V. G. Kreyer [et al.] // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2016. – Vol. 71, № 1. – P. 62–66. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0096392516010053>.
9. Deriving biologically active peptides and study of their qualities / I. S. Milenteva, L. S. Dyshlyuk, A. Yu. Prosekov [et al.] // Science Evolution. – 2016. – Vol. 1, № 2. – P. 20–33. DOI: <https://doi.org/10.21603/2500-1418-2016-1-2-20-33>.
10. The proteolytic activity research of the lactic acid microorganisms of different taxonomic groups / A. Prosekov, O. Babich, S. Asukhikh [et al.] // World Applied Sciences Journal. – 2013. – Vol. 23, № 10. – P. 1284–1290.
11. Functional properties of the enzyme-modified protein from oat bran / A. Prosekov, O. Babich, O. Kriger [et al.] // Food Bioscience. – 2018. – Vol. 24. – P. 46–49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.003>.
12. Identification of bioactive peptides in a functional yoghurt by micro liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry assisted by retention time prediction / P. B. Kunda, F. Benavente, S. Catala-Clariana [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2012. – Vol. 1229. – P. 121–128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.093>.
13. Baldasso, C. A comparison of different electrodes solutions on demineralization of permeate whey / C. Baldasso, L. D. F. Marczak, I. C. Tessaro // Separation Science and Technology. – 2014. – Vol. 49, № 2. – P. 179–185.
14. Деминерализация молочной сыворотки для производства продуктов с пониженной аллергенностью / Н. Л. Потураева, О. В. Кригер, Т. В. Подлегаева [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2013. – № 8. – С. 24–26.
15. Use of cation-coated filtration membranes for demineralization by electro dialysis / W. Villeneuve, V. Perreault, P. Chevallier [et al.] // Separation and Purification Technology. – 2019. – Vol. 218. – P. 70–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.02.032>.
16. Modeling the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptide mixtures obtained from cheese whey hydrolysates using concentration-response curves / N. Estévez, P. Fuciños, A. C. Sobrosa [et al.] // Biotechnology Progress. – 2012. – Vol. 28, № 5. – P. 1197–1206. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.1587>.
17. Proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* VB63F for reduction of allergenicity of bovine milk proteins / V. Biscola, F. L. Tulini, Y. Choiset [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2016. – Vol. 99, № 7. – P. 5144–5154. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11036>.

18. Prosekov, A. Yu. Foresight of food industry development up to 2030: challenges and solutions / A. Yu. Prosekov, T. F. Kiseleva // Smart Innovation, Systems and Technologies. – 2019. – Vol. 139. – P. 349–356. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-18553-4_44.

19. Prosekov, A. Yu. Identification of industrially important lactic acid bacteria in foodstuffs / A. Yu. Prosekov, O. O. Babich, K. V. Bespomestnykh // Foods and Raw Materials. – 2013. – Vol. 1, № 2. – P. 42–45. DOI: <https://doi.org/10.12737/2053>.

References

1. Luss LV. Food allergens and food additives: the role in the development of food allergy and food intolerance. Effective Pharmacotherapy. 2014;(33):12–19. (In Russ.).

2. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014;69(8):1008–1025. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.12429>.

3. Kharitonov VD, Budrik VG, Agarkova EJ, Botina SG, Berezkina KA, Kruchinin AG, et al. Perspective directions of struggle with allergy. Food Processing: Techniques and Technology. 2012;27(4):3–6. (In Russ.).

4. Huang S-M, Chen K-N, Chen Y-P, Hong W-S, Chen M-J. Immunomodulatory properties of the milk whey products obtained by enzymatic and microbial hydrolysis. International Journal of Food Science and Technology. 2010;45(5):1061–1067. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02239.x>.

5. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. International Dairy Journal. 2006;16(11):1315–1323. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014>.

6. Ajonu R, Doran G, Torley P, Agboola S. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of pre-treatment and enzyme specificity. Food Chemistry. 2013;136(3–4):1435–1443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.053>.

7. Prosekov A, Babich O, Dyshlyuk L, Noskova S, Suhih S. A study of polyfunctional properties of biologically active peptides. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7(4):2391–2400.

8. Osmolovskiy AA, Popova EA, Kreyer VG, Baranova NA, Egorov NS. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2016;71(1):62–66. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0096392516010053>.

9. Milenteva IS, Dyshlyuk LS, Prosekov AYU, Babich OO, Shishin MV. Deriving biologically active peptides and study of their qualities. Science Evolution. 2016;1(2):20–33. DOI: <https://doi.org/10.21603/2500-1418-2016-1-2-20-33>.

10. Prosekov A, Babich O, Asukhikh S, Noskova S, Dushlyuk L. The proteolytic activity research of the lactic acid microorganisms of different taxonomic groups. World Applied Sciences Journal. 2013;23(10):1284–1290.

11. Prosekov A, Babich O, Kriger O, Ivanova S, Pavsky V, Sukhikh S, et al. Functional properties of the enzyme-modified protein from oat bran. Food Bioscience. 2018;24:46–49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.003>.

12. Kunda PB, Benavente F, Catala-Clariana S, Giménez E, Barbosa J, Sanz-Nebot V. Identification of bioactive peptides in a functional yoghurt by micro liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry assisted by retention time prediction. Journal of Chromatography A. 2012;1229:121–128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.093>.

13. Baldasso C, Marczak LDF, Tessaro IC. A comparison of different electrodes solutions on demineralization of permeate whey. Separation Science and Technology. 2014;49(2):179–185.

14. Poturaeva NL, Kriger OV, Podlegaeva TV, Drozdova TM. Demineralization of whey for the production of products with low allergenicity. Storage and Processing of Farm Products. 2013;(8):24–26. (In Russ.).

15. Villeneuve W, Perreault V, Chevallier P, Mikhaylin S, Bazinet L. Use of cation-coated filtration membranes for demineralization by electrodialysis. Separation and Purification Technology. 2019;218:70–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.02.032>.

16. Estévez N, Fuciños P, Sobrosa AC, Pastrana L, Pérez N, Luisa Rúa M. Modeling the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptide mixtures obtained from cheese whey hydrolysates using concentration-response curves. Biotechnology Progress. 2012;28(5):1197–1206. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.1587>.

17. Biscola V, Tulini FL, Choiset Y, Rabesona H, Ivanova I, Chobert J-M, et al. Proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* VB63F for reduction of allergenicity of bovine milk proteins. Journal of Dairy Science. 2016;99(7):5144–5154. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11036>.

18. Prosekov AYU, Kiseleva TF. Foresight of food industry development up to 2030: challenges and solutions. Smart Innovation, Systems and Technologies. 2019;139:349–356. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-18553-4_44.

19. Prosekov AYU, Babich OO, Bespomestnykh KV. Identification of industrially important lactic acid bacteria in foodstuffs. Foods and Raw Materials. 2013;1(2):42–45. DOI: <https://doi.org/10.12737/2053>.

Сведения об авторах

Подлегаева Татьяна Викторовна

канд. техн. наук, доцент кафедры технологии и организации общественного питания, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (3842) 39-68-56, e-mail: tpodlegaeva@yandex.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-8542-9601>

Козлова Оксана Васильевна

канд. техн. наук, доцент кафедры бионанотехнологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (3842) 39-00-51, e-mail: ms.okvk@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-2960-0216>

Кригер Ольга Владимировна

д-р техн. наук, профессор Института живых систем, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, ведущий научный сотрудник НИИ биотехнологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (923) 498-45-64, e-mail: olgakruger58@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-1489-0716>

Потураева Наталья Леонидовна

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (960) 920-03-61, e-mail: 020678@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0001-5950-2986>

Information about the authors

Tatiana V. Podlegaeva

Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor of the Department of Catering Technology and Organization, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-56, e-mail: tpodlegaeva@yandex.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-8542-9601>

Oksana V. Kozlova

Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor of the Department of Bionanotechnology, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (3842) 39-00-51, e-mail: ms.okvk@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-2960-0216>

Olga V. Kriger

Dr.Sci.(Eng.), Professor of the Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, Leading Researcher of the Institute of Biotechnology, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (923) 498-45-64, e-mail: olgakruger58@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-1489-0716>

Natalia L. Poturaeva

Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (960) 920-03-61, e-mail: 020678@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0001-5950-2986>