УДК 547.458.5+637.144.5
DOI: 10.31515/1019-8946-2023-03-28-31

# Использование полисахаридов для снижения горького вкуса гипоаллергенных пептидов гидролизата белков сыворотки молока*

**Владимир Петрович Курченко,** канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией
E-mail: kurchenko@tut.by
**Татьяна Николаевна Головач,** канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник
**Наталья Владимировна Сушинская,** научный сотрудник
Белорусский государственный университет
**Мария Ивановна Шрамко,** канд. биол. наук, доцент, заведующая лабораторией
**Людмила Руслановна Алиева,** д-р техн. наук, доцент
**Алексей Дмитриевич Лодыгин,** д-р техн. наук, доцент, заведующий кафедрой
**Иван Алексеевич Евдокимов,** д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой
E-mail: ievdokimov@ncfu.ru
Северо-Кавказский федеральный университет

*Глубокие гидролизаты белков сыворотки молока (ГСБ) проявляют гипоаллергенные свойства. Однако входящие в их состав низкомолекулярные пептиды обладают горьким вкусом. Для использования гидролизатов белков в качестве компонента функциональных продуктов питания необходимо исключить взаимодействие пептидов с рецепторами горького вкуса. С этой целью пептиды включены в состав нанокомплекса с циклодекстрином (β-ЦД). Аминокислоты пептидов входят в гидрофобную полость β-ЦД, благодаря чему экранируется их взаимодействие с рецепторами вкуса. В комплекс ГСБ:β-ЦД включается до 78 % пептидов ГСБ. В результате горечь пептидов уменьшается с очень интенсивного (10 баллов) до слабого (5 баллов), что позволяет использовать ГСБ в функциональных продуктах питания. Также показано, что за счет электростатического взаимодействия между амино- и карбоксильными группами пептидов с положительно заряженным хитозаном (ХЗ) или отрицательно заряженным сукцинилированным хитозаном (СХЗ) образуются высокомолекулярные комплексы. За счет стерических эффектов такие комплексы не взаимодействуют с рецепторами горького вкуса. Высокомолекулярные комплексы СХЗ–ГСБ и ХЗ–ГСБ обладают слабым горьким вкусом (5 баллов), и их можно применять в диетическом питании.*
***Ключевые слова:*** *циклодекстрин, хитозан, сукцинилированный хитозан, пептиды сыворотки молока, биокомпозиты хитозана и циклодекстрина.*

***Kurchenko V.P.[1] , Golovach T.N.[1] , Sushynskaya N.V.[1] Shramko M.I.[2], Alieva L.R.[2], Lodygin A.D.[2], Evdokimov I.A.[2] The use of polysaccharides to reduce the bitter taste of hypoallergenic peptides of milk whey protein hydrolysate***
***[1]Belarusian State University***
***[2]North Caucasus Federal University***

*Deep whey protein hydrolysates (WPHs) exhibit hypoallergenic properties. However, low molecular weight peptides included in their composition have a bitter taste. To use protein hydrolysates as a component of functional foods, it is necessary to exclude the interaction of peptides with bitter taste receptors. For this, the peptides are included in the composition of the nanocomplex with cyclodextrin (β-CD). Amino acids of the peptides enter the hydrophobic cavity of β-CD, due to which their interaction with receptors is shielded. The composition of such a complex includes up to 78 % of the peptides included in the WPH. As part of the WPH:β-CD complex, the bitterness of the peptides decreases from a very bitter taste (10 points) to a weak bitter taste (5 points), which makes it possible to use it in functional foods. It was also shown that due to the electrostatic interaction between the amino and carboxyl groups of the peptides with positively charged chitosan (CS) or negatively charged succinylated chitosan (SCS), high-molecular complexes are formed. Due to steric hindrance, they do not interact with bitter taste receptors. High-molecular-weight complexes SCS -WPH and CS-WPH have a weak bitter taste (5 points), due to which they can be used in dietary nutrition.*
***Key words:*** *cyclodextrin, chitosan, succinylated chitosan, whey peptides, biocomposites of chitosan and cyclodextrin.*

Задачей при создании функциональных продуктов питания является придание им дополнительных физиологических преимуществ и снижение риска развития хронических заболеваний. Некоторые компоненты натуральных продуктов препятствуют проявлению физиологической активности, в таких случаях разрабатываются технологии их удаления или биохимической трансформации [1]. Многие растительные и животные продукты содержат вещества, вызывающие аллергию. Обычно это белки или пептиды, которые инициируют образование антител класса IgE [2, 3].

Сенсибилизацию IgE животными пищевыми аллергенами в наибольшей степени вызывают белки молока: α-лактальбумин, казеины, β-лактоглобулин и бычий сывороточный альбумин. Для снижения аллергенности молочных белков применяется ферментативный гидролиз до низкомолекулярных пептидов, которые не содержат антигенных детерминант, способных вызывать синтез иммуноглобулинов IgE [4]. Это позволяет получить пептиды с антиоксидантными, антимутагенными и другими функциональными свойствами. Такой продукт имеет повышенную усвояемость и сохраняет высокую питательную ценность [5]. Однако содержание короткоцепочечных пептидов с выраженной горечью ограничивает использование глубоких гидролизатов белков молока в гипоаллергенных продуктах [6].

Горький вкус связан с наличием в структуре пептидов аминокислот L-триптофана, L-валина, L-лейцина, L-метионина, L-аргинина, которые взаимодействуют с рецепторами горького вкуса [7]. Для снижения горького вкуса пептидов предлагаются два метода. Первый направлен на встраивание аминокислотных остатков пептидов в циклодекстрин.

Циклодекстрины (ЦД) получают при ферментативном гидролизе крахмала до молекул с 6–8 остатками глюкозы. ЦД имеют форму тора, в котором все ОН-группы на-

**Исследование финансировалось из средств гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Изучение механизмов взаимодействия молочнокислых микроорганизмов, лактозосбраживающих дрожжей и биологически активных веществ при микроинкапсулировании различных фракций микробиоты». Соглашение № 075-15-2022-1129 от 01.07.2022 г.*

ходятся на внешней поверхности молекулы, придавая ей гидрофильные свойства. Во внутреннюю гидрофобную полость встраиваются аминокислотные остатки пептидов и образуются комплексы, что приводит к экранированию взаимодействия пептидов с рецепторами горького вкуса [8]. Циклодекстрины не токсичны и по Регламенту (ЕС) 2015/2283 разрешены в качестве пищевой добавки. Их использование обеспечивает сохранность биологически активных компонентов и позволяет улучшить органолептические свойства гидролизата белков сыворотки молока.

Второй метод основан на электростатическом взаимодействии между амино- и карбоксильными группами пептидов и ионными полисахаридами, в результате чего образуются растворимые и нерастворимые комплексы. Растворимые комплексы образуются, если два разноименно заряженных полимера имеют разный по величине заряд, а нерастворимые — если заряд комплекса близок к нулю [9]. Такие высокомолекулярные комплексы за счет стерических затруднений не будут взаимодействовать с рецепторами.

Среди ионных полисахаридов особый интерес представляет хитозан — единственный природный катионный полисахарид. Каждый мономер хитозана содержит аминогруппу, которая в кислой среде находится в протонированном состоянии. Путем молекулярного моделирования показано, что сильное электростатическое взаимодействие происходит между карбоксильной группой аминокислоты и аминогруппой хитозана [10]. Благодаря этому он легко связывается с отрицательно заряженными молекулами биологически активных веществ, аминокислотами, пептидами и белками [11]. Исследования показали, что низкомолекулярные производные хитозана — олигохитозаны при pH ниже 6,5 ед. способны образовывать электростатические комплексы с различными белками молока [12, 13]. В соответствии с Техническим регламентом Таможенного союза (ТР ТС 029/2012) хитозан разрешен для использования в пищевой промышленности.

Комплексообразование пептидов гидролизата белков сыворотки молока с циклодекстринами и хитозаном создает возможность получения композитов с пониженной горечью и перспективными свойствами для использования в функциональных продуктах.

Цель работы — получение биокомпозитов циклодекстрина и хитозана с пептидами гидролизата белков сыворотки молока, характеризующихся улучшенными вкусовыми свойствами.

В исследовании использовали:

- гидролизат сывороточных белков молока (ГСБ) «Peptigen IF 3080 WPH» (массовая доля белка 80 %, производитель Arla Foods Ingredients Group, Дания), в составе которого содержится пептидная фракция с молекулярной массой менее 10 кДа;
- гидролизат белков сыворотки молока (КСБ-УФ-70), полученный ферментацией алкалазой при концентрации белка 5 %, температуре 50 °С и pH 8,0 ед. в течение 2 ч и фильтрацией с использованием фильтров «Spin-X UF Concentrator 20» (Corning, Англия) пропускной способностью 5 кДа;
- β-циклодекстрин (β-ЦД), CAS 7585-39-9, E459 (производитель Sigma, США);
- хитозан (ХЗ) с молекулярной массой 100 кДа и степенью деацетилирования 90 % и сукцинилированный хитозан (СХЗ) с молекулярной массой 200 кДа и степенью замещения аминогрупп 75,1 % (ЗАО «Биопрогресс», Россия).

Получение комплексов включения β-ЦД с фракцией пептидов гидролизата белков сыворотки молока проводили методом соосаждения. Для получения клатрата готовили 500 мл 5 %-ного водного раствора β-ЦД при 50 °С и вносили сухой препарат ГСБ до конечной концентрации 2,5 %. Раствор инкубировали 4 ч при 50 °С и постоянном перемешивании. Затем понижали температуру до 4 °С в течение 3 ч. Образовавшийся белый осадок комплекса ГСБ:β-ЦД лиофильно высушивали и определяли в нем содержание пептидов гравиметрическим методом [8].

Для получения биокомпозитов ХЗ и СХЗ с пептидами сывороточных белков молока к 50 мл 0,1 %-ного раствора ХТ или СХТ добавляли 250 мкл 15 %-ного раствора ГСБ при интенсивном перемешивании. Всего проведено 20 циклов внесения гидролизата, что составило 0,08–1,34 % ГСБ. После каждого добавления определяли активную кислотность и оптическую плотность образцов растворов комплексов ГСБ с ХЗ или СХТ. Активную кислотность измеряли на приборе «HANNA HI 83141» (Hanna Instruments, Германия), оптическую плотность — на спектрофотометре «Metertech UV/VIS SP 8001» (Metertech, Тайвань) при длине волны 640 нм.

Органолептические свойства ГСБ, ХЗ, СХЗ и комплексов ГСБ:β-ЦД, ХЗ—ГСБ и СХЗ—ГСБ оценивали по 10-балльной шкале. Для определения уровня горечи использовали калибровочные растворы, содержащие 0,5, 0,05 и 0,01 % ГСБ или хитозанов. Уровень 0 баллов указывал на отсутствие горечи, 1–2 — присутствие очень слабого горького вкуса, 3–4 — слабую горечь, 5–6 — умеренный горький вкус, 7–8 баллов — выраженный горький вкус, 9–10 баллов — очень сильный горький вкус. Опыты проводились в трех повторах [14].

## ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕПТИДОВ ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ МОЛОКА В ЦИКЛОДЕКСТРИН

Для снижения горького вкуса пептиды, входящие в гидролизаты белков сыворотки молока, были включены в β-циклодекстрин. Такой нанокомплекс обладал улучшенными органолептическими свойствами. Пептидный состав в фильтрате ГСБ, по данным ВЭЖХ-МС, следующий: пептиды 300–500 Да (26,4 %); 500–700 Да (41,5 %); 700–1000 Да (26,4 %); 1000–1500 Да (5,7 %). Молекулы этих пептидов состоят из 6–8 аминокислотных остатков, благодаря чему обладают гипоаллергенными свойствами, так как не содержат полноразмерные антигенные детерминанты, способные вызывать синтез IgE [14].

Горький вкус могут придавать дипептиды Phe-Ala, Pro-Pro, Pro-Leu, Leu-Val, Arg-Val и трипептиды Arg-His-Gly, Ser-Leu-Ala, Leu-Leu-Pro, Try-Try-Gln. В ди- или трипептидах объемные гидрофобные аминокислоты в любом положении обеспечивают проявление горечи. Горький вкус пролинсодержащих пептидов определяется их взаимодействием с вкусовым рецептором [15]. Пептиды, содержащие Leu, Tyr, Phe, также являются причиной горечи ГСБ. Эти пептиды, входящие в состав ГСБ, эффективно встраиваются в β-ЦД, в результате полученные клатраты теряют способность взаимодействовать с рецепторами горького вкуса [14].

Встраивание гидрофобных пептидов в β-циклодекстрин зависит от температуры, поскольку β-ЦД плохо растворяется в воде: при 50 °С его растворимость составляет 50 мг/мл, при 20 °С — 18,5 мг/мл. В связи с этим ГСБ с β-ЦД смешивали при 50 °С, что позволяет в 2,7 раза увеличить

**Таблица 1**

**Органолептические свойства гидролизата сывороточных белков, их механической смеси с циклодекстрином и нанокомплексов**

| Образец | Органолептические свойства | Оценка, балл |
|---|---|---|
| ГСБ | Очень горький вкус | 10 |
| Механическая смесь ГСБ и β-ЦД в соотношении 1:2 | Выраженный горький вкус | 8 |
| Комплекс включения ГСБ:β-ЦД в соотношении 1:2 | Слабый горький вкус | 5 |

растворимость комплексообразователя и получить насыщенный раствор. Внесение в систему комплексанта, инкубация и последующее понижение температуры приводят к выпадению осадка. Степень включения пептидов ГСБ в β-ЦД С определяли гравиметрическим методом. Анализ результатов показал, что комплексы ГСБ:β-ЦД содержат 78 % пептидов. Учитывая, что не все пептиды ГСБ проявляют гидрофобные свойства и способны образовывать клатраты, для дальнейших исследований они не отделялись от комплексов ГСБ:β-ЦД. Таким образом для сохранения биологической активности пептидов, входящих в состав ГСБ, по разработанной технологии получена смесь клатратов и пептидов, не вошедших в β-ЦД. Пептиды с более высокой молекулярной массой могут не образовывать клатраты и при этом сохранять слабый горький вкус.

Образование комплекса включения ГСБ:β-ЦД анализировали по органолептическим показателям и с применением метода термогравиметрии. Фильтрат пептидов ГСБ хорошо растворим в воде при 25 °С и при концентрации 5 % проявляет максимальный горький вкус (10 баллов). Органолептические свойства существенно улучшились в комплексе включения ГСБ:β-ЦД (табл. 1). При той же концентрации пептидов (5 %) горечь снизилась до умеренной (5 баллов), что свидетельствует о включении пептидов в β-циклодекстрин.

## КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА И СУКЦИНИЛИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С ПЕПТИДАМИ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА

Исследования показали, что не все пептиды гидролизата белков сыворотки молока в зависимости от их молекулярной массы способны образовывать комплексы включения с циклодекстрином, поэтому полученный продукт имеет слабогорький вкус. Для снижения горечи разработан другой подход для улучшения органолептических свойств ферментативных ГСБ: преобразовать полученные низкомолекулярные пептиды в высокополимерную форму, которая не будет взаимодействовать с рецепторами горького вкуса.

Использовались катионные и анионные полисахариды хитозан и сукцинилированный хитозан, связывающие аминокислоты и пептиды за счет электростатического взаимодействия. Изучен процесс получения комплексов с ХЗ и СХЗ гидролизата сывороточных белков молока «Peptigen IF 3080 WPH» с выраженным горьким вкусом при различной его концентрации. С увеличением доли пептидов в растворе 0,1 %-ного хитозана происходило существенное изменение pH с 3,5 до 5,4 ед., что объясняется связыванием протонов при комплексообразовании. Кроме того, выявлено значительное возрастание окислительного потенциала (ΔОП) образцов с 0,05 до 1,1 отн. ед. в диапазоне концентраций ГСБ 1,0–1,3 %, свидетельствующее об активной агрегации электронейтральных макромолекулярных комплексов ХЗ—ГСБ. Согласно данным спектрофотометрии, точка эквивалентности взаимодействия ГСБ с ХЗ достигается при содержании гидролизата 1,3 %.

Добавление гидролизованных белков в раствор 0,1 %-ного сукцинилированного хитозана обусловило снижение pH с 7,5 до 6,75 ед. По данным pH-метрии, точка эквивалентности взаимодействия СХЗ с ГСБ достигается при содержании гидролизата около 0,25 %. Оптическая плотность образцов практически не изменялась, поскольку образующиеся наноструктуры СХЗ—ГСБ не способны к коагуляции из-за сохранения одноименных зарядов на поверхности комплексов. Проанализированы вкусовые показатели ГСБ, ХЗ, СХЗ и их комплексов (табл. 2).

**Таблица 2**

**Органолептические свойства ГСБ, ХЗ, СХЗ и их комплексов**

| Образец | Характеристика вкуса | Горечь, балл |
|---|---|---|
| ГСБ 1,3 % | Умеренный горький | 6 |
| ХЗ 0,1 % | Очень слабый терпкий | 2 |
| 0,1 % ХЗ–ГСБ 1,3 % | Слабый горький | 4 |
| 0,1 % ХЗ–ГСБ 0,7% | Очень слабый горький | 2 |
| СХЗ 0,1 % | Отсутствие горечи, безвкусный | 0 |
| 0,1 % СХЗ–ГСБ 1,3 % | Слабый горький | 5 |
| 0,005 % СХЗ–ГСБ 0,25 % | Отсутствие горечи, безвкусный | 0 |

Специфическим горьким вкусом обладает глубокий гидролизат сывороточных белков, тогда как образцы хитозана отличаются слабовыраженным терпким вкусом. Интенсивность ощущения горечи определяется концентрацией компонентов в растворе. В результате взаимодействия пептидов ГСБ с положительно заряженным хитозаном или отрицательно заряженным сукцинилированным хитозаном происходит снижение горечи их комплексов СХЗ—ГСБ и ХЗ—ГСБ на 1–2 балла.

Таким образом, исследование возможности снижения горького вкуса гидролизата белков сыворотки молока с использованием ЦД и ХЗ показало, что их комплексообразование приводит к улучшению органолептических свойств пептидов до слабого горького вкуса. Наибольший практический интерес представляет процесс комплексообразования пептидов с ХЗ. Такое взаимодействие может быть реализовано на стадии завершения ферментативного гидролиза белков сыворотки молока или добавлением в готовый ферментативный гидролизат.

При последующей распылительной сушке комплексов гипоаллергенный молочный продукт сохраняет растворимость и может быть использован при производстве детского и спортивного питания. В состав полученного продукта входит незначительное количество хитозана, который имеет низкую стоимость, что экономически оправдывает его использование.

## ВЫВОДЫ

- Глубокие гидролизаты белков сыворотки молока содержат пептиды молекулярной массой от 300 до 1500 Да, которые обладают очень горьким вкусом.
- Предложена технология включения пептидов в циклодекстрин, которая позволяет получить в составе нанокомплекса до 78 % пептидов, входящих в ГСБ.
- Включение пептидов ГСБ в состав комплекса ГСБ:β-ЦД приводит к снижению горечи до умеренно горького вкуса (5 баллов), что позволяет использовать его в функциональных продуктах питания.
- В результате ионного взаимодействия пептидов ГСБ с положительно заряженным хитозаном или отрицательно заряженным сукцинилированным хитозаном образуются высокомолекулярные композиты.
- Высокомолекулярные комплексы СХЗ—ГСБ и ХЗ—ГСБ обладают слабым горьким вкусом, благодаря чему могут найти применение в диетическом питании.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. ***Головач, Т.Н.*** *Аллергенность белков молока и пути ее снижения/ Т.Н.Головач, В.П.Курченко// Труды БГУ. 2010. Т. 5. Ч. 1. С. 9–55.*
2. ***Mohd Adnan Kausar.*** *A review on Respiratory allergy caused by insects/ Mohd Adnan Kausar// Bioinformation. 14(9): 540-553 (2018) doi: 10.6026/97320630014540*
3. ***Simon, D.*** *Recent Advances in Clinical Allergy and Immunology 2019/ D.Simon// International Archives of Allergy and Immunology. 2019. 1–15. doi:10.1159/000504364 ].*
4. ***Halavach, T.M.*** *Biologically active properties of hydrolysed and fermented milk proteins/ T.M.Halavach, N.V.Dudchik, E.I.Tarun, V.G.Zhygankov [et al.]// The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2020. V. 9. No 4. P. 714–720. DOI: https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.714-720.*
5. ***Головач, Т.Н.*** *Характеристика биологически активных гидролизатов белков молочной сыворотки и молозива/ Т.Н.Головач, Е.И.Тарун, Н.В.Дудчик, Р.В.Романович [и др.]// Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2018. Т. 63. № 4. С. 409–418.*
6. ***Yang, P.*** *Sensory directed flavour analysis of off-flavour compounds in infant formula with deeply hydrolyzed milk protein and their possible sources/ P.Yang, C.Liu, H.Song, L.Wang [et al.]// LWT – Food Science and Technology. 2020. V. 119. 108861. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108861.*
7. ***Liang, S.*** *A review of the preparation, analysis and biological functions of chitooligosaccharide/ S.Liang, Y.Sun, X.Dai// International Journal of Molecular Sciences. 2018. V. 19(8). 2197. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms19082197.*
8. ***Halavach,T.M.*** *Antimutagenic and antibacterial activity of β-cyclodextrin clathrates with extensive hydrolysates of colostrum and whey/ T.M.Halavach, E.S.Savchuk, A.S.Bobovich, N.V.Dudchik [et al.]// Biointerface Research in Applied Chemistry. 2021. V. 11(2). P. 8626–8638. DOI: https://doi.org/10.33263/BRIAC112.86268638.*
9. ***Tolstoguzov, V.*** *Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages/ V.Tolstoguzov// Critical Reviews in Biotechnology. 2002. V. 22. No 2. P. 89–174.*
10. ***Deka, B.C.*** *DFT study on host-guest interaction in chitosan–amino acid complexes / B.C.Deka, P.K.Bhattacharyya// Computational and Theoretical Chemistry. 2017. V. 1110. P. 40–49. DOI: https://doi.org/10.1016/j.comptc.2017.03.036*
11. ***Курченко, В.П.*** *Влияние хитозана на продление срока хранения кисломолочных продуктов с Lactobacillus acidophilus/ В.П.Курченко, Т.Н.Головач, К.И.Майорова, М.И.Шрамко [и др.]// Молочная промышленность. 2022. № 3. С. 52–55.*
12. ***Kurchenko, V.P.*** *Influence of Molecular Weight of Chitosan on Interaction with Casein/ V.P.Kurchenko, T.V.Radzevich (Butkevich), S.V.Rizevskya, V.P.Varlamov [et al.]// Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. V. 54. No 5. P. 501–504. DOI: 10.1134/S0003683818050113*
13. ***Курченко, В.П.*** *Использование хитозана для получения казеина/ В.П.Курченко, Т.В.Радевич (Буткевич), С.В.Ризевский [и др.]// Молочная промышленность. 2018. № 4. С. 56–57.*
14. ***Kurchenko, V.P.*** *Multicomponent Composites of Cyclodextrin Nanocomplexes with Biologically Active Substances for Functional Foods/ V.P.Kurchenko, T.M.Halavach, N.V.Sushynskaya, E.I.Tarun [et al.]// Food Processing: Techniques and Technology. 2022. V. 52(2). P. 375–389. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2370.*
15. ***Plasek, B.*** *Evaluation of the role of functional food products in disease prevention and the characteristics of target groups/ B.Plasek, Z.Lakner, G.Kasza, Á.Temesi// Nutrients. 2019. 12(1): 69, pp. 1–19. DOI:10.3390/nu12010069.*