

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2026-9-1-32-43>



Поступила 15.09.2025

Поступила после рецензирования 18.02.2026

Принята в печать 24.02.2026

© Кручинин А. Г., Спирина М. Е., 2026

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Открытый доступ

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ГИДРОЛИЗАТОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ, ФРАКЦИОНИРОВАННЫХ КАСКАДНО-СЕЛЕКТИВНОЙ МЕМБРАННОЙ ФИЛЬТРАЦИЕЙ

Кручинин А. Г.\*, Спирина М. Е.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Москва, Россия

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

гидролиз,  
биоактивные пептиды,  
ультрафильтрация,  
нанофильтрация,  
свободные аминокислоты,  
минеральные вещества,  
перевариваемость

В данной статье обсуждается вопрос использования промышленных методов каскадно-селективной мембранной фильтрации для очистки ферментативных гидролизатов сыровоточных белков и фракционирования биоактивных пептидов. Основное внимание уделено комплексной оценке влияния данного технологического процесса на аминокислотный состав, биологическую ценность и кинетику переваривания *in vitro* полученных пептидных фракций в сравнении с интактными белками. Нативный и термоденатурированный концентрат сыровоточных белков гидролизали биферментной композицией (Alcalase и Formea CTL) и фракционировали методами ультра-, нанофильтрации и обратного осмоса. Основные результаты показали, что разработанный процесс каскадно-селективной ультра-нанофильтрации позволяет эффективно удалять высокомолекулярные белковые соединения, минеральные вещества и свободные аминокислоты. При этом в составе гидролизатов сохраняется фракция пептидов с молекулярной массой 0,4–5 кДа, обладающая максимальными антиоксидантной (1280 и 979 мкМ ТЭ/г БЭ) и АПФ-ингибирующей ( $IC_{50}=0,10$  и  $0,19$  мг/мл) активностями. Очищенные гидролизаты характеризовались сбалансированным аминокислотным профилем (отношение НАК/ЗАК 0,77–0,78), высоким содержанием ВСАА (19,07–19,20 г/100 г белка) и повышенным коэффициентом утилитарности (0,71–0,72) по сравнению с исходными концентратами сыровоточных белков. Оценка перевариваемости на модели INFOGEST 2.0 подтвердила высокую биодоступность, более быстрое и полное переваривание фракционированных гидролизатов по сравнению интактными белками. Полученные результаты открывают перспективы промышленного масштабирования технологии производства гидролизатов сыровоточных белков и их использования в качестве функциональных ингредиентов. Такие ингредиенты могут применяться при создании продуктов функционального и специализированного питания, включая протеиновые формулы для спортивного питания, нутритивной поддержки при метаболическом синдроме и возрастной саркопении, а также для коррекции хронического оксидативного стресса и профилактики гипертонии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследования проводились в рамках государственного задания ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН FGUS-2024.0001.

Received 15.09.2025

Accepted in revised 18.02.2026

Accepted for publication 24.02.2026

© Kruchinin A. G., Spirina M. E., 2026

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

## AMINO ACID COMPOSITION AND BIOLOGICAL VALUE OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES FRACTIONATED BY CASCADE-SELECTIVE MEMBRANE FILTRATION

Aleksandr G. Kruchinin\*, Maria E. Spirina

<sup>1</sup> V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

### KEYWORDS:

hydrolysis,  
bioactive peptides,  
ultrafiltration,  
nanodiafiltration, free amino acids, minerals,  
digestibility

### ABSTRACT

This article discusses the application of industrial cascade-selective membrane filtration techniques for the purification of enzymatic hydrolysates of whey proteins and the fractionation of bioactive peptides. The main focus is on a comprehensive assessment of the impact of this technological process on the amino acid composition, biological value, and *in vitro* digestion kinetics of the obtained peptide fractions in comparison with intact proteins. Native and heat-denatured whey protein concentrates were hydrolyzed using a two-enzyme system (Alcalase and Formea CTL) and fractionated by ultrafiltration, nanodiafiltration, and reverse osmosis. The key results showed that the developed cascade-selective ultra-nanodiafiltration process effectively removes high-molecular-weight protein compounds, minerals, and free amino acids. The hydrolysates retain a peptide fraction with a molecular weight of 0.4–5 kDa, which exhibits maximal antioxidant (1280 and 979 μM TE/g protein equivalent) and ACE-inhibitory ( $IC_{50}=0.10$  and  $0.19$  mg/mL) activities. The purified hydrolysates were characterized by a balanced amino acid profile (EAA/NEAA ratio of 0.77–0.78), a high content of BCAA (19.07–19.20 g/100 g protein), and an increased coefficient of utility (0.71–0.72) compared to the initial whey protein concentrates. Digestibility assessment using the INFOGEST 2.0 model confirmed high bioavailability, as well as faster and more complete digestion of the fractionated hydrolysates compared to intact proteins. The obtained results open prospects for the industrial scaling of the technology for producing whey protein hydrolysates and their use as functional ingredients. Such ingredients can be applied in the development of functional and specialized food products, including protein formulas for sports nutrition, nutritional support for metabolic syndrome and age-related sarcopenia, as well as for the correction of chronic oxidative stress and the prevention of hypertension.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FGUS-2024–0001 of the state assignment of the V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of RAS.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Кручинин, А. Г., Спирина, М. Е. (2026). Аминокислотный состав и биологическая ценность гидролизатов сыровоточных белков, фракционированных каскадно-селективной мембранной фильтрацией. *Пищевые системы*, 9(1), 32–43. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2026-9-1-32-43>

FOR CITATION: Kruchinin, A. G., Spirina, M. E. (2026). Amino acid composition and biological value of whey protein hydrolysates fractionated by cascade-selective membrane filtration. *Food Systems*, 9(1), 32–43. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2026-9-1-32-43>

## 1. Введение

Современные мировые тенденции в области пищевой промышленности, нутрициологии, спортивного, детского и специализированного питания преобладают повышенный спрос на коммерческие концентраты белков, сбалансированные по аминокислотному составу и обладающие высокой биологической ценностью [1,2]. В данном аспекте особое внимание уделяется белкам молочной сыворотки, биологическая ценность и аминокислотный индекс усвояемости (PDCAAS) которых сопоставимы с яичным белком, считающимся эталонным. Белки молочной сыворотки характеризуются высоким содержанием незаменимых аминокислот и аминокислот с разветвленной цепью (BCAA), которые играют ключевую роль в активации mTOR-пути и стимуляции мышечного белкового синтеза. Кроме того, они богаты серосодержащими аминокислотами, задействованными в одноуглеродном метаболизме, процессах сворачивания и функционирования белков; именно эти аминокислоты служат лимитирующим субстратом для синтеза глутатиона — ключевого внутриклеточного антиоксиданта [3,4]. Высокий уровень сбалансированности аминокислотного профиля в сочетании с высокой биодоступностью и быстрой абсорбцией делает сывороточные белки ключевым компонентом специализированных протеиновых формул для различных физиологических потребностей в спортивном питании (ускорение восстановления и рост мышечной массы) [5–8], геронтологическом питании (профилактика саркопении) [9,10], детском питании (аминокислотный профиль максимально приближен к грудному молоку) [11–13], клинической нутрициологии (восстановление после травм и операций) [14–16] и пр.

Наряду с нативными сывороточными белками особый научный и практический интерес представляют их гидролизованные формы, получаемые путем направленной ферментативной биоконверсии пептидных связей в аминокислотной последовательности белковой молекулы. В отличие от нативных форм белка, гидролизаты сывороточных белков обладают рядом доказанных преимуществ, включая более быстрое переваривание и транспорт аминокислот в кровоток [17], сниженную аллергенность [18], более высокую скорость смачиваемости и растворимости, повышенную термоустойчивость в широком диапазоне pH [19]. С развитием современных аналитических методов в области пищевой пептидомики в гидролизатах сывороточных белков идентифицирован широкий спектр биоактивных пептидов, проявляющих регуляторные функции в организме и оказывающие целенаправленное физиологическое воздействие, выходящее за рамки простого нутритивного обеспечения организма. Многочисленными исследованиями доказано, что данные соединения обладают рядом фармакологических эффектов, таких как антиоксидантная [17,20–22], антигипертензивная [23–26], антидиабетическая [27–30], антимикробная [31,32] и иммуномодулирующая [33–35] активности. Указанные эффекты обусловлены наличием в их структуре специфических аминокислотных последовательностей, способных взаимодействовать с ключевыми биологическими мишенями. Выход пептидов с целевой биологической функцией напрямую зависит от субстратной специфичности протеаз (комплекса протеаз), конформационных особенностей и аминокислотной последовательности белкового субстрата, а также от степени гидролиза, регулируемой кинетическими параметрами процесса (субстрат-ферментное соотношение, pH, температура, продолжительность реакции) [36]. При этом следует констатировать, что даже использование современных методов таргетированной ферментативной биоконверсии белка, основанных на селективном протеолизе, приводит к получению гетерогенных смесей пептидов и свободных аминокислот с полимодальным распределением по молекулярной массе и с варибельным профилем биоактивности [37]. В связи с этим биоактивные пептиды, полученные в результате таргетированной биоконверсии сывороточных белков, требуют дальнейшей очистки от компонентов сложной матрицы гидролизата и последующего фракционирования с целью сохранения/усиления биофункциональных свойств. В работах [38,39] показано, что повышенное содержание свободных аминокислот в гидролизатах, особенно при глубоком протеолизе, увеличивает горечь и осмотичность, снижая их биологическую ценность по сравнению с очищенными пептидами. Кроме того, технологический процесс получения гидролизатов сопряжен с необходимостью коррекции электрохимических параметров среды (поддержание статического pH), что предопределяет необходимость дополнительной обработки реакционной смеси для снижения pH, ионной силы и концентрации солей. В то же время в ряде работ [40,41] отмечено, что ферментативный гидролиз эффективно снижает антигенность молочных белков, однако протеазы, являясь белковыми веществами, способны сенсibilизировать иммун-

ную систему и инициировать перекрестные аллергические реакции. Таким образом, разработка эффективных технологий мембранной очистки и фракционирования биоактивных пептидов представляется актуальным и стратегически важным направлением для решения обозначенных проблем, что напрямую будет способствовать повышению биологической ценности, функциональности и безопасности конечного продукта.

Целью данного исследования является разработка технологии мембранного фракционирования и очистки ферментативных гидролизатов сывороточных белков, направленной на селективное удаление балластных компонентов, включая свободные аминокислоты, минеральные вещества и остаточные протеазы. Разрабатываемая технология позволяет получать гидролизаты, обогащенные пептидными фракциями с целевой биологической активностью, в частности антиоксидантной и АПФ-ингибирующей. Кроме того, в работе исследовано влияние проведенной обработки на аминокислотный профиль, биологическую ценность и кинетику переваривания *in vitro* гидролизатов по сравнению с интактными концентратами белков. Данные исследования являются критически важными для решения технологических задач, связанных со стандартизацией состава и биодоступностью активных пептидных фракций, что позволит в полной мере реализовать их терапевтический потенциал в создании продуктов специализированного назначения от гипоаллергенных смесей и средств энтерального питания до спортивных нутрицевтиков и функциональных продуктов, направленных на профилактику возраст-индуцированных заболеваний, таких как хронический оксидативный стресс организма и гипертония.

## 2. Объекты и методы

### 2.1. Объекты

Сладкая сыворотка, полученная от производства полутвердого сыра «Мантова», была предоставлена компанией ООО «Итальянские традиции» (Москва, Россия). Коммерческие ферментные препараты Alcalase 2.4L (субтилизин) с протеолитической активностью 2,4 AU-А/г и Formea CTL (химотрипсиноподобная эндопротеаза) с протеолитической активностью 300 KPROT/г были приобретены у российского дистрибьютора компании Novozymes A/S, (Багсверд, Дания). Все реактивы, используемые в исследовании, были аналитической степени чистоты. Во всех экспериментах использовалась бидистиллированная вода.

### 2.2. Концентрирование сывороточных белков

Полученную сыворотку подогрели до температуры  $(40 \pm 5)^\circ\text{C}$  в вискубаторе FlowTech 4/5–10 (Them, Дания), обезжирили и очистили от казеиновой пыли на лабораторном сепараторе FJ 90 PP (MilkyDay, Чехия). Осветленную и обезжиренную сыворотку разделяли на две аликвотные части равного объема. Первую часть подсырной сыворотки (CHW (RC)) пастеризовали в вискубаторе FlowTech 4/5–10 (Them, Дания) при температуре  $(72 \pm 2)^\circ\text{C}$  с выдержкой 20–25 с и охлаждали до температуры  $(10 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Концентрирование белка проводилось с использованием ультрафильтрации на пилотной экспериментальной установке AL 362 (ООО «Альтаир», Россия), оснащенной блоком мембранных элементов из полиэфирсульфона с отсечкой по молекулярной массе (MWCO) 5 кДа. Концентрирование белка осуществляли при давлении  $0,50 \pm 0,05$  МПа на входе в мембранный аппарат и  $0,37 \pm 0,03$  МПа на выходе. Объемный фактор концентрирования составлял 5, что соответствовало на выходе массовой доли белка 3,4%. Другую часть сыворотки подвергли термоденатурации белка (CHW (RC) HD) в вискубаторе FlowTech 4/5–10 (Them, Дания) в присутствии 10 мМ сульфата кальция при температуре  $(95 \pm 2)^\circ\text{C}$  и продолжительности 120 минут. Термоденатурированный белок отделяли с использованием технологии Centry Whey на экспериментальной декантерной центрифуге периодического действия при скорости вращения 4000 об/мин (3500 g), температуре  $(55 \pm 5)^\circ\text{C}$  и продолжительности процесса 10 минут, что позволяло получать концентрат с массовой долей белка 11%. Полученный концентрат стандартизовали вторичной сывороткой до массовой доли белка 3,4% и подвергли одноступенчатой гомогенизации при давлении 45 МПа на плунжерном гомогенизаторе HomoLab 2.20 (FBB, Италия).

### 2.3. Гидролиз сывороточных белков

Ферментативный гидролиз концентратов сывороточных белков CHW (RC) и CHW (RC) HD проводили с использованием биферментной системы Alcalase 2.4L (субтилизин) и Formea CTL (химотрипсиноподобная эндопротеаза) в соотношении 75/25 в пересчете на белковую часть. Гидролиз осуществляли в биореакторе с рубашкой

«Алхитех», Россия) объемом 5000 мл с магнитной мешалкой SP-16 (MIULAB, Китай), соединенных последовательно с циркулирующей водяной баней. Биореактор был оборудован pH-метром Starter 300 с электродом ST 320 (Ohaus, США) и перистальтическим насосом для дозирования 5 М раствора гидроксида калия, что обеспечивало поддержание статического pH реакционной среды с допустимым отклонением  $\pm 0,02$ . Процесс гидролиза проводили биферментной композицией в соотношении ферментов (в пересчете на белковую часть) к субстрату 1:1000 (мас./мас.) при температуре  $(51 \pm 1)^\circ\text{C}$ , активной кислотности реакционной среды  $8,30 \pm 0,02$  ед. pH и продолжительности 180 минут. Термическую инактивацию ферментных препаратов осуществляли посредством непрерывной подачи гидролизата через трубчатый теплообменник в соседний биореактор, где гидролизат сывороточных белков мгновенно нагревался до температуры  $(87 \pm 2)^\circ\text{C}$  и выдерживался на протяжении 10 минут, после чего происходило его охлаждение до температуры  $(10 \pm 2)^\circ\text{C}$  по обратной схеме.

#### 2.4. Очистка и фракционирование гидролизатов сывороточных белков

Гидролизаты сывороточных белков очищали от высокомолекулярных белковых соединений на пилотной экспериментальной установке AL 362 (ООО «Альтаир», Россия) с использованием ультрафильтрационных мембранных модулей из полиэфирсульфона с MWCO 5 и 10 кДа. Рабочее давление на входе в мембранный аппарат составляло  $0,50 \pm 0,05$  МПа, а на выходе —  $0,37 \pm 0,03$  МПа. Очистка от свободных аминокислот и минеральных солей, а также концентрирование пептидов проводились на той же установке с использованием нанофильтрационного мембранного модуля из полиэфирсульфона с MWCO 0,4 кДа. Давление на входе/выходе поддерживали на уровне 1,5/1,1 МПа соответственно. Диафильтрацию проводили с применением обратноточеской воды в соотношении 1:1 к концентрату гидролизованных белков. Снижение активной кислотности проводили на промежуточной стадии диафильтрации путем введения 1М раствора соляной кислоты до достижения уровня pH 6,8. Концентрированные образцы гидролизованных сывороточных белков после процесса очистки и фракционирования подвергались дегидратации на распылительной сушилке BXT-2000MLH (Shanghai Yuhua Instrument Equipment Co. Ltd, Китай) с диаметром форсунки 1 мм при температуре воздуха на входе  $(175 \pm 5)^\circ\text{C}$  и на выходе —  $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$ .

#### 2.5. Химический и физический анализ

Для исследования физико-химических свойств сыровотки использовались стандартизованные методы. Массовую долю белка (в эквиваленте) определяли методом Кьельдаля через содержание общего азота в соответствии с ISO 1871:2009<sup>1</sup>, ISO 8968–1:2014<sup>2</sup> на автоматическом анализаторе Kjeltec-2400 (Foss Electric, Дания) с последующим его пересчетом на белок с коэффициентом 6,28. Массовую долю жира определяли методом Гербера в соответствии с ISO 19662:2018<sup>3</sup> и ISO 11870:2009<sup>4</sup>. Массовую долю лактозы определяли ферментативным методом в соответствии с ISO 26462:2010<sup>5</sup>. Массовую долю сухих веществ измеряли термогравиметрическим методом в соответствии с ISO 6731:2010<sup>6</sup>. Общее содержание минеральных веществ определяли сжиганием высушенных образцов при температуре  $550^\circ\text{C}$  в муфельной электропечи МП-2УМ (Утянский завод лабораторных электропечей, Литва) в соответствии с методикой [42]. Активную кислотность измеряли потенциометрическим методом с помощью стационарного pH-метра Aquasearcher AB33PH с электродом ST 320 (Ohaus, США). Концентрацию кальция, магния, натрия, калия и фосфора определяли с помощью оптической эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES) на приборе Agilent 5110 ICP-OES (Agilent Technologies, Малайзия) в соответствии с методикой производителя.

Молекулярно-массовое распределение белково-пептидных фракций проводили методом высокоэффективной жидкостной хромато-

графии в соответствии с протоколом [43] на хроматографе «МАЭСТРО» (ООО «Интерлаб», Россия). Хроматографическое разделение проводили при температуре  $25^\circ\text{C}$  и скорости потока 1 мл/мин с введением образца объемом 20 мкл в аналитическую колонку ZORBAX C18 250 мм  $\times$  4,6 мм, диаметр пор 300 Å (Agilent Technologies Inc., США). Детекцию осуществляли при длине волны 214 и 280 нм. В полученных хроматограммах с использованием программного обеспечения «Мультихром» (ООО «Амперсэнд», Россия) было идентифицировано относительное содержание фракций с молекулярно-массовым распределением:  $< 1$  кДа, 1–5 кДа, 5–10 кДа и  $> 10$  кДа.

Содержание и идентификацию аминокислот определяли согласно ГОСТ Р 55569–2013<sup>7</sup> и методике М 04–94–2021<sup>8</sup> «Пищевая продукция. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель»» на приборе «Капель 205М» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия). В качестве аналитических стандартов использовали чистые аминокислоты с содержанием основного вещества не менее 98 % (Sigma-Aldrich, США).

#### 2.6. Анализ функциональных свойств и биологической ценности

Степень гидролиза оценивали спектрофотометрическим методом согласно протоколам, описанным в [44,45], на спектрофотометре-флуориметре Feyond-A400 (Allsheng, Китай) с применением реактива TNBS (2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота), специфически реагирующего с первичными аминогруппами с образованием хромофора с максимумом поглощения при длине волны 340 нм.

Определение антиоксидантной активности по методу TEAC проводили в соответствии с протоколом [46]. Метод основан на способности образца нейтрализовать катион-радикал ABTS (2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты)) с последующим выражением антиоксидантной активности в эквивалентах Тролокса относительно калибровочного графика. Нейтрализацию катион-радикала ABTS оценивали с использованием спектрофотометра-флуориметра Feyond-A400 (Allsheng, Китай) при длине волны 734 нм.

Оценку гипотензивных свойств гидролизованных белков молочной сыровотки проводили по способности ингибировать ангиотензин-1-превращающий фермент (АПФ) в соответствии с протоколом [47,48] и выражали в концентрации (мг белка/мл), ингибирующей 50 % активности АПФ (IC50). Кинетику возрастания интенсивности флуоресценции регистрировали в течение 15 мин с интервалом в 20 с на микропланшетном спектрофотометре-флуориметре Feyond-A400 (Allsheng, Китай) при температуре  $37^\circ\text{C}$ , длине волны возбуждения и регистрации флуоресценции 320 и 420 нм соответственно.

Расчеты сбалансированности аминокислотного состава, такие как аминокислотный скор, отношение незаменимых аминокислот (НАК) к заменимым аминокислотам (ЗАК), отношение незаменимых кислот к общему содержанию аминокислот в белке, коэффициент утилитарности, избыточность и сопоставимую избыточность незаменимых аминокислот, индекс незаменимых аминокислот проводили в соответствии с общепринятыми методиками, приведенными в работе [49].

Моделирование переваривания *in vitro* осуществляли по стандартизированному международному протоколу INFOGEST 2.0 [50]. Анализ продуктов переваривания на каждой стадии процесса проводили по методикам, описанным в [51], с изменением в части оценки коэффициента перевариваемости. В частности, к инкубационной смеси по окончании каждой стадии переваривания добавлялся 24 % раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) для осаждения белков и пептидов с молекулярной массой более  $\sim 1\text{--}3$  кДа. Образцы инкубировали при комнатной температуре, охлаждали до  $4^\circ\text{C}$  и центрифугировали (8000g) в течение 10 минут. Для измерения содержания белка в осадке применялся анализ по методу Кьельдаля. Коэффициент перевариваемости (КП) рассчитывался по формуле 1:

$$\text{КП} = (m_{\text{исх}} \times B_{\text{исх}} - (m_{\text{исх}} \times B_{\text{исх}} - m_{\text{ф}} \times B_{\text{ф}})) / (m_{\text{исх}} \times B_{\text{исх}}) \times 100 \quad (1),$$

где:  $m_{\text{исх}}$  — масса исходного образца, г;  $m_{\text{ф}}$  — масса фильтра после центрифугирования, г;  $B_{\text{исх}}$  — белок в исходном образце, %;  $B_{\text{ф}}$  — белок в фильтрате после центрифугирования, %

<sup>7</sup> ГОСТ Р 55569–2013 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза». М.: Стандартинформ, 2020. — 18 с.

<sup>8</sup> М 04–94–2021 «Пищевая продукция. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель»». ООО «Люмэкс-маркетинг», 2021. (Свидетельство об аттестации методики измерений № 032/РА.RU.311278/2022 от 15 апреля 2022 г.).

## 2.7. Статистика

Статистический анализ данных был выполнен с использованием пакета программного обеспечения Statistica 2010 (Statsoft, США). Все измерения проводились в трех независимых повторностях. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ экспериментальных данных осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Тьюки с использованием пакета статистических программ RStudio (Posit Software, США) при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Оценка биологической активности гидролизованных фракций сывороточных белков

Молекулярная масса пептидов является ключевым фактором, определяющим их функциональные и биоактивные свойства в белковых гидролизатах. Контроль молекулярно-массового распределения на этапе производства позволяет целенаправленно изолировать фракции с заданной биологической активностью (антиоксидантной и антигипертензивной) и одновременно производить очистку от высокомолекулярных соединений и свободных аминокислот. В данном исследовании гидролизаты сывороточных белков фракционировали последовательно на полиэфирсульфоновых мембранах с размером пор 10 кДа (УФ-10), 5 кДа (УФ-5), 0,4 кДа (НФ-0,4) и 0,1 нм (ОО). На каждом этапе проводили диалфильтрацию обратноточной водой для максимальной очистки и получения валидных результатов. Исследование молекулярно-массового распределения в исходном сырье, гидролизатах, а также в их белково-пептидных фракциях (ретенатах) представлено на Рисунке 1.

Анализ молекулярно-массового распределения показал, что в концентратах CHW (RC) и CHW (RC) HD доминируют высокомолекулярные белковые фракции с молекулярной массой выше 10 кДа, что характерно для негидролизованных белков молочной сыворотки и ассоциированных форм (димеров/тримеров) гликомакропептида [52]. Также в составе концентратов CHW (RC) и CHW (RC) HD идентифицировано 7,7% и 10,5% фракций с молекулярной массой 5–10 кДа, что соотносится с молекулярной массой мономерной формы гликомакропептида (~7,5 кДа) [53] и протеозо-пептонной фракции PP8S (~9,0 кДа) [54]. Кроме того, в анализируемых белковых концентратах идентифицировано 2,5% (CHW (RC)) и 3,6% (CHW (RC) HD) фракций с молекулярной массой 1–5 кДа, очевидно, представляющих собой протеозо-пептонную фракцию PP8F (~4,0 кДа) [55] и другие пептидные фрагменты частичного расщепления белков аутохтонными протеазами молока. В образцах гидролизатов сывороточных белков CHW (RC) и CHW (RC) HD со степенью гидролиза  $19,9 \pm 0,4$  и  $21,2 \pm 0,8$  соответственно отмечено резкое снижение доли высокомолекулярной фракции (> 10 кДа) до 1,21% и 1,32% по сравнению с интактными белками. В обоих образцах гидролизатов доминируют фракции с молекулярной массой 1–5 кДа (51,8% и 59,5%) и в меньшей степени фракции с молекулярной массой 5–10 кДа (37,4% и 27,2%). Содержание короткоцепочечных пептидов и свободных аминокислот в гидролизатах сывороточных белков находилось на уровне 9,6% для CHW (RC) и 12,0% для CHW (RC) HD. Применение для очистки гидролизатов ультрафильтрации с MWCO 10 кДа привело к селективной

изоляции и концентрированию высокомолекулярных белковых соединений, на долю которых приходилось 68,6% для CHW (RC) и 61,1% для CHW (RC) HD. Последующая ультрафильтрация с MWCO 5 кДа позволила получить фракции с доминированием пептидов среднего размера (5–10 кДа) 88,3% и 84,1% соответственно при отсутствии высокомолекулярных белковых компонентов, что указывает на селективное удаление негидролизованных белков и протеолитических ферментов (по данным Uniprot, молекулярная масса субъединицы ~38 кДа, а химотрипсиноподобной эндопроtease ~27 кДа). Дальнейшее фракционирование гидролизатов сывороточных белков CHW (RC) и CHW (RC) HD с использованием нанофильтрации с MWCO 0,4 кДа позволило получить ретенат, где основная масса белковых веществ (74,4% и 78,7%) приходится на пептиды с молекулярной массой 1–5 кДа. В то же время в ретенате, полученном нанофильтрацией, 22,3% и 19,2% составляют фракции с молекулярной массой < 1 кДа, удержание которых может объясняться селективностью мембраны, а также возникновением эффекта поляризационной концентрации на поверхности мембраны и формированием вторичного динамического слоя с меньшей пористостью [56,57]. Пермеат, полученный после нанофильтрации и сконцентрированный обратным осмосом, состоял исключительно из компонентов с молекулярной массой < 1 кДа, представляя собой смесь свободных аминокислот и короткоцепочечных пептидов.

На следующем этапе было проведено комплексное исследование взаимосвязи между молекулярно-массовым распределением пептидных фракций, полученных методами каскадной ультра- и нанофильтрации, и их биологической активностью (Рисунок 2).

Полученные данные демонстрируют существенные различия в биологической активности между нативными и термоденатурированными белками, а также их гидролизатами. Гидролизаты CHW (RC) и CHW (RC) HD показали в 5,2 и 5,0 раза более высокую антиоксидантную активность (984 и 768 мкМ ТЭ/г БЭ) по сравнению с нативным и термоденатурированным концентратами сывороточных белков (189 и 153 мкМ ТЭ/г БЭ) соответственно. Среди фракций наибольшей антиоксидантной активностью обладала фракция 0,4–5 кДа (1280 и 979 мкМ ТЭ/г БЭ), что в среднем на 29% выше, чем у соответствующих гидролизатов сывороточных белков. Фракция 5–10 кДа продемонстрировала умеренную антиоксидантную активность (430 и 380 мкМ ТЭ/г БЭ), в то время как фракция > 10 кДа (271 и 217 мкМ ТЭ/г БЭ) по антиоксидантной активности была незначительно выше соответствующих гидролизатов до момента их фракционирования. При этом фракция < 0,4 кДа характеризовалась минимальной антиоксидантной активностью (18 и 15 мкМ ТЭ/г БЭ), что свидетельствует о потере антиоксидантных свойств при переходе к свободным аминокислотам и короткоцепочечным пептидам. Результаты оценки АПФ-ингибирующей активности показали, что для гидролизатов CHW (RC) и CHW (RC) HD характерно ее увеличение в 65 и 48 раз по сравнению с соответствующими концентратами нативных (снижение IC50 с 17,61 до 0,27 мг БЭ/мл) и термоденатурированных (снижение IC50 с 22,89 до 0,48 мг БЭ/мл) белков. Максимальной АПФ-ингибирующей активностью обладала фракция 0,4–5 кДа гидролизатов нативных белков (IC50=0,10 мг БЭ/мл) и термоденатурированных белков (IC50=0,19 мг БЭ/мл), что в 2,7 и 2,5 раза превышает активность исходных гидролизатов сывороточных белков. Фракция

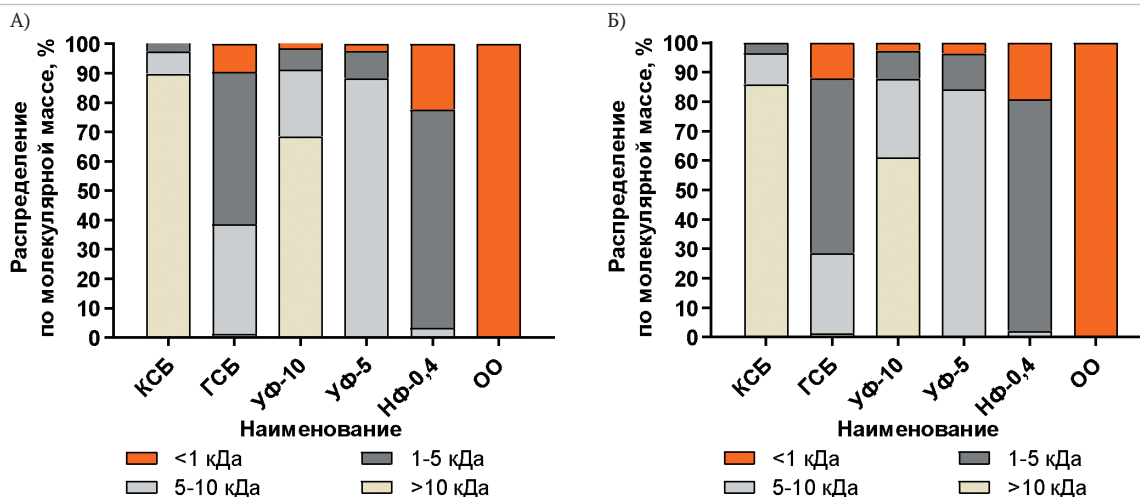
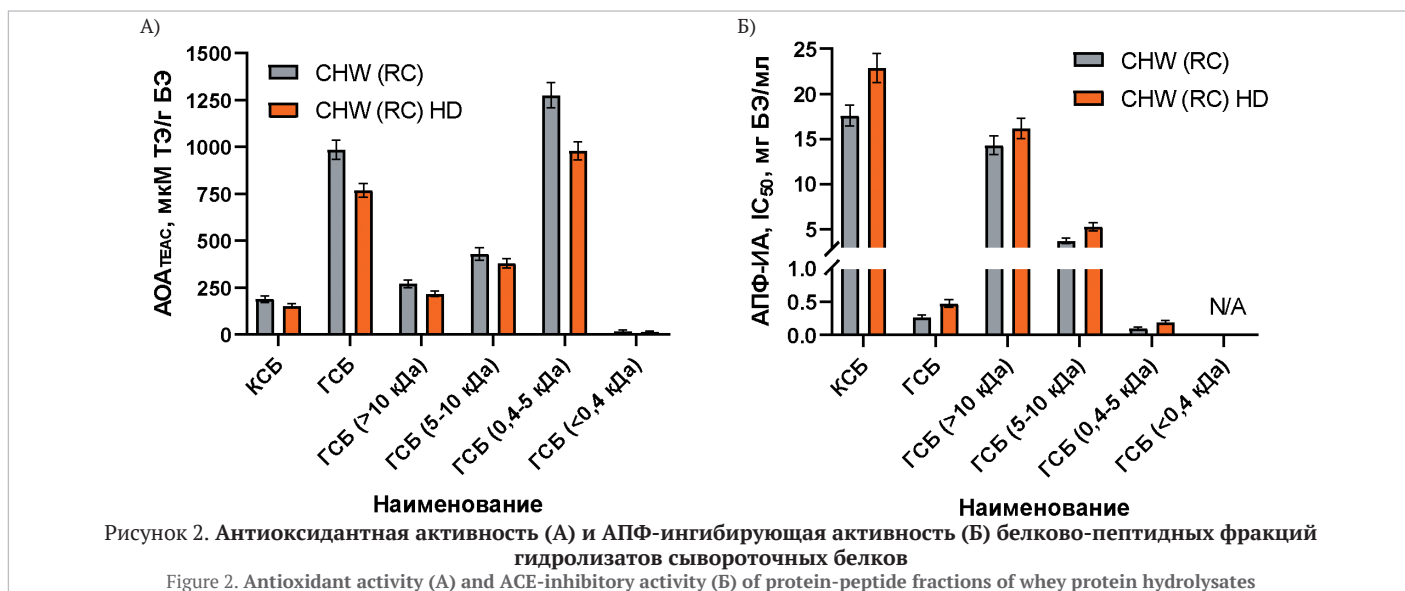


Рисунок 1. Молекулярно-массовое распределение белково-пептидных фракций (А – CHW (RC); Б – CHW (RC) HD)  
Figure 1. Molecular weight distribution of protein-peptide fractions (A – CHW (RC); B – CHW (RC) HD)



5–10 кДа показала значимую, но меньшую АПФ-ингибирующую активность, IC<sub>50</sub> которой составляла 3,73 мг БЭ/мл для CHW (RC) и 5,30 мг БЭ/мл для CHW (RC) HD. АПФ-ингибирующая активность в ретентатах высокомолекулярных фракций > 10 кДа была всего в 1,2 и 1,4 раза выше, чем в соответствующих концентратах сывороточных белков, в том числе за счет присутствия в составе более мелких фракций (Рисунок 1). Во фракции с молекулярной массой < 0,4 кДа АПФ-ингибирующая активность не обнаружена, что подтверждает необходимость определенной длины пептидной цепи для проявления данной биологической активности.

Таким образом, последовательная фильтрация с удалением негидролизованых высокомолекулярных белковых соединений и протеаз методом ультрафильтрации (MWCO 10 кДа), а также концентрирование пептидных фракций методом нанофильтрации (MWCO 0,4 кДа) представляет собой научно обоснованный подход. Фракционирование пептидов с молекулярной массой 0,4–10 кДа методом каскадно-селективной ультра-нанофильтрации является компромиссом между высокой биологической (антиоксидантной и АПФ-ингибирующей) активностью и потенциальной минимизацией горького вкуса, умеренной осмоляльностью, сохранением высокой биологической ценности и сбалансированности по незаменимым аминокислотам.

### 3.2. Фракционирование и очистка биологически активных фракций сывороточных белков

Многочисленные работы [58,59] показали, что классический электродиализ не эффективен для очистки гидролизатов пищевых белков от минеральных солей ввиду разнонаправленной миграции

основных/катионных, кислых/анионных пептидов и аминокислот в электрическом поле, что может оказать негативное влияние на биофункциональные свойства гидролизатов. Исходя из этого, на следующем этапе работ были исследованы подходы к частичной деминерализации (очищенных с помощью ультрафильтрации с MWCO 10 кДа) гидролизатов методом нанодиафильтрации, где на 1 этапе гидролизат концентрировали (ГСБ-Н), на 2 этапе подкисляли ретендат раствором соляной кислоты и промывали одинарным объемом обратноосмотической воды (ГСБ ДФ-1), а на третьем этапе осуществляли окончательную промывку одинарным объемом обратноосмотической воды (ГСБ ДФ-2). Результаты изменения физико-химических показателей в процессе диафильтрации представлены в Таблице 1.

Анализ данных Таблицы 1 показал, что при применении одноступенчатой нанофильтрации гидролизатов сывороточных белков уровень деминерализации составляет 28–29% (по отношению к м.д. сухих веществ), при этом кислотность системы достоверно не изменяется. Нанодиафильтрация с использованием подкисленной воды позволила снизить активную кислотность до нейтрального pH и повысить уровень деминерализации до 36%, а дальнейшая диафильтрация обратноосмотической водой — до 54–56%. Детализация изменений минерального состава представлена в Таблице 2. При этом совокупная потеря азотистых веществ в эквиваленте белка составила 6,1% для гидролизата нативных сывороточных белков CHW (RC) и 7,8% для гидролизата термоденатурированных сывороточных белков CHW (RC) HD. Данные значения коррелируют

Таблица 1. Изменение физико-химических показателей в процессе нанодиафильтрации гидролизатов сывороточных белков

Table 1. Changes in physicochemical parameters during nanodiafiltration of whey protein hydrolysates

| Наименование показателя | Массовая доля жира, % | Массовая доля белка (эквивалент), % | Массовая доля лактозы, %  | Массовая доля сухих веществ, % | Массовая доля золь, %     | Активная кислотность, pH |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Гидролизат CHW (RC)     |                       |                                     |                           |                                |                           |                          |
| ГСБ                     | Отс.                  | 3,32 ± 0,09 <sup>c</sup>            | 4,95 ± 0,14 <sup>c</sup>  | 9,79 ± 0,21 <sup>c</sup>       | 1,05 ± 0,04 <sup>c</sup>  | 8,25 ± 0,05 <sup>a</sup> |
| Ретендат ГСБ            | Отс.                  | 6,70 ± 0,14 <sup>a</sup>            | 8,92 ± 0,32 <sup>a</sup>  | 17,80 ± 0,42 <sup>ab</sup>     | 1,34 ± 0,07 <sup>a</sup>  | 8,21 ± 0,11 <sup>a</sup> |
| Пермеат ГСБ             | Отс.                  | 0,23 ± 0,02 <sup>d</sup>            | 0,45 ± 0,05 <sup>d</sup>  | 1,45 ± 0,08 <sup>d</sup>       | 0,54 ± 0,03 <sup>e</sup>  | 8,30 ± 0,06 <sup>a</sup> |
| Ретендат ГСБ ДФ-1       | Отс.                  | 6,49 ± 0,16 <sup>ab</sup>           | 8,61 ± 0,29 <sup>a</sup>  | 17,04 ± 0,37 <sup>b</sup>      | 1,15 ± 0,05 <sup>bc</sup> | 6,82 ± 0,06 <sup>b</sup> |
| Пермеат ГСБ ДФ-1        | Отс.                  | 0,13 ± 0,03 <sup>ef</sup>           | 0,12 ± 0,07 <sup>e</sup>  | 0,87 ± 0,16 <sup>ef</sup>      | 0,46 ± 0,04 <sup>fg</sup> | 6,87 ± 0,07 <sup>b</sup> |
| Ретендат ГСБ ДФ-2       | Отс.                  | 6,33 ± 0,10 <sup>b</sup>            | 8,39 ± 0,30 <sup>a</sup>  | 16,22 ± 0,44 <sup>b</sup>      | 0,76 ± 0,04 <sup>d</sup>  | 6,75 ± 0,09 <sup>b</sup> |
| Пермеат ГСБ ДФ-2        | Отс.                  | 0,07 ± 0,02 <sup>f</sup>            | 0,09 ± 0,06 <sup>e</sup>  | 0,69 ± 0,10 <sup>f</sup>       | 0,34 ± 0,03 <sup>h</sup>  | 6,82 ± 0,07 <sup>b</sup> |
| Гидролизат CHW (RC) HD  |                       |                                     |                           |                                |                           |                          |
| ГСБ                     | Отс.                  | 3,43 ± 0,08 <sup>c</sup>            | 4,79 ± 0,17 <sup>c</sup>  | 9,88 ± 0,24 <sup>c</sup>       | 1,12 ± 0,07 <sup>c</sup>  | 8,17 ± 0,08 <sup>a</sup> |
| Ретендат ГСБ            | Отс.                  | 6,76 ± 0,15 <sup>a</sup>            | 8,83 ± 0,30 <sup>a</sup>  | 17,98 ± 0,36 <sup>a</sup>      | 1,46 ± 0,09 <sup>a</sup>  | 8,14 ± 0,05 <sup>a</sup> |
| Пермеат ГСБ             | Отс.                  | 0,30 ± 0,03 <sup>d</sup>            | 0,52 ± 0,06 <sup>d</sup>  | 1,58 ± 0,15 <sup>d</sup>       | 0,57 ± 0,03 <sup>e</sup>  | 8,25 ± 0,07 <sup>a</sup> |
| Ретендат ГСБ ДФ-1       | Отс.                  | 6,38 ± 0,12 <sup>b</sup>            | 8,33 ± 0,26 <sup>ab</sup> | 16,86 ± 0,30 <sup>b</sup>      | 1,21 ± 0,06 <sup>b</sup>  | 6,84 ± 0,06 <sup>b</sup> |
| Пермеат ГСБ ДФ-1        | Отс.                  | 0,17 ± 0,04 <sup>e</sup>            | 0,27 ± 0,08 <sup>e</sup>  | 1,14 ± 0,16 <sup>e</sup>       | 0,49 ± 0,04 <sup>f</sup>  | 6,93 ± 0,04 <sup>b</sup> |
| Ретендат ГСБ ДФ-2       | Отс.                  | 6,25 ± 0,12 <sup>b</sup>            | 8,24 ± 0,27 <sup>b</sup>  | 16,24 ± 0,31 <sup>b</sup>      | 0,84 ± 0,03 <sup>d</sup>  | 6,79 ± 0,07 <sup>b</sup> |
| Пермеат ГСБ ДФ-2        | Отс.                  | 0,09 ± 0,02 <sup>f</sup>            | 0,14 ± 0,05 <sup>e</sup>  | 0,81 ± 0,09 <sup>f</sup>       | 0,37 ± 0,04 <sup>gh</sup> | 6,87 ± 0,08 <sup>b</sup> |

Примечание: Данные в таблице представлены как среднее значение ± SD (n=3). Надстрочные буквы (a–g) в пределах одного столбца отражают значительные различия между группами, по данным дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки (p < 0,05).

Таблица 2. Изменение содержания основных минеральных веществ (макроэлементов) при нанодиафильтрации гидролизатов сывороточного белка

Table 2. Changes in major mineral content (macroelements) during nanodiafiltration of whey protein hydrolysates

| Наименование показателя | Содержание основных минеральных веществ (макроэлементов), мг/кг |                           |                        |                       |                        |
|-------------------------|---|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                         | Кальций   | Калий                     | Магний                 | Натрий                | Фосфор                 |
| Гидролизат CHW (RC)     |   |                           |                        |                       |                        |
| ГСБ                     | 582 ± 50 <sup>d</sup>   | 3657 ± 284 <sup>bcd</sup> | 125 ± 18 <sup>ab</sup> | 398 ± 30 <sup>b</sup> | 569 ± 27 <sup>cd</sup> |
| Ретентат ГСБ            | 846 ± 85 <sup>abc</sup>   | 4238 ± 302 <sup>ab</sup>  | 173 ± 21 <sup>a</sup>  | 569 ± 42 <sup>a</sup> | 793 ± 42 <sup>a</sup>  |
| Пермеат ГСБ             | 16 ± 3 <sup>f</sup>   | 1508 ± 102 <sup>f</sup>   | 15 ± 4 <sup>c</sup>    | 242 ± 24 <sup>c</sup> | 65 ± 7 <sup>e</sup>    |
| Ретентат ГСБ ДФ-1       | 791 ± 68 <sup>bcd</sup>   | 3055 ± 235 <sup>d</sup>   | 155 ± 20 <sup>ab</sup> | 383 ± 30 <sup>b</sup> | 650 ± 35 <sup>bc</sup> |
| Пермеат ГСБ ДФ-1        | 38 ± 6 <sup>e</sup>   | 1144 ± 88 <sup>g</sup>    | 8 ± 2 <sup>d</sup>     | 155 ± 17 <sup>d</sup> | 52 ± 5 <sup>ef</sup>   |
| Ретентат ГСБ ДФ-2       | 747 ± 59 <sup>cd</sup>  | 2009 ± 157 <sup>e</sup>   | 127 ± 19 <sup>ab</sup> | 253 ± 25 <sup>c</sup> | 564 ± 31 <sup>cd</sup> |
| Пермеат ГСБ ДФ-2        | 21 ± 5 <sup>ef</sup>  | 859 ± 55 <sup>h</sup>     | 7 ± 2 <sup>d</sup>     | 105 ± 10 <sup>e</sup> | 49 ± 6 <sup>ef</sup>   |
| Гидролизат CHW (RC) HD  |   |                           |                        |                       |                        |
| ГСБ                     | 716 ± 57 <sup>cd</sup>  | 3913 ± 294 <sup>abc</sup> | 124 ± 18 <sup>ab</sup> | 398 ± 31 <sup>b</sup> | 534 ± 25 <sup>d</sup>  |
| Ретентат ГСБ            | 1041 ± 103 <sup>a</sup>   | 4535 ± 325 <sup>a</sup>   | 171 ± 21 <sup>ab</sup> | 569 ± 42 <sup>a</sup> | 745 ± 40 <sup>ab</sup> |
| Пермеат ГСБ             | 18 ± 7 <sup>f</sup>   | 1795 ± 133 <sup>ef</sup>  | 16 ± 4 <sup>c</sup>    | 248 ± 27 <sup>c</sup> | 64 ± 7 <sup>e</sup>    |
| Ретентат ГСБ ДФ-1       | 1008 ± 97 <sup>ab</sup>   | 3359 ± 249 <sup>cd</sup>  | 159 ± 20 <sup>ab</sup> | 430 ± 38 <sup>b</sup> | 692 ± 38 <sup>e</sup>  |
| Пермеат ГСБ ДФ-1        | 35 ± 8 <sup>e</sup>   | 1249 ± 94 <sup>g</sup>    | 13 ± 3 <sup>cd</sup>   | 148 ± 18 <sup>d</sup> | 56 ± 6 <sup>ef</sup>   |
| Ретентат ГСБ ДФ-2       | 937 ± 96 <sup>abc</sup>   | 2116 ± 164 <sup>e</sup>   | 118 ± 17 <sup>b</sup>  | 266 ± 27 <sup>c</sup> | 556 ± 33 <sup>cd</sup> |
| Пермеат ГСБ ДФ-2        | 25 ± 7 <sup>ef</sup>  | 980 ± 66 <sup>gh</sup>    | 9 ± 3 <sup>cd</sup>    | 96 ± 9 <sup>e</sup>   | 46 ± 6 <sup>f</sup>    |

Примечание: Данные в таблице представлены как среднее значение ± SD ( $n=3$ ). Надстрочные буквы (a–g) в пределах одного столбца отражают значительные различия между группами, по данным дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки ( $p < 0,05$ ).

со степенью гидролиза и молекулярно-массовым распределением белково-пептидных фракций в гидролизатах и в целом соответствует переходу в пермеат свободных аминокислот, ди- и трипептидов, а также небелковых азотистых соединений.

Из данных Таблицы 2 видно, что при использовании нанодиафильтрации деминерализация гидролизатов сывороточных белков CHW (RC) и CHW (RC) HD обеспечивается в большей степени за счет удаления одновалентных ионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) и в меньшей степени — двухвалентных ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) или многовалентных ионов. Так, отмечено, что при выбранной схеме нанодиафильтрации гидролизатов сывороточных белков уровень деминерализации по  $\text{K}^+$  составляет в среднем 67 %, по  $\text{Na}^+$  — 61 %, по  $\text{Mg}^{2+}$  — 40 %, по  $\text{Ca}^{2+}$  — 22 %, что в целом сопоставимо с результатами [60,61]. Фосфор (P) преимущественно задерживается в ретентате из-за его химической связи с кальцием и магнием (коллоидные фосфаты), что снижает его миграцию через мембранный слой в пермеат при нанодиафильтрации. Таким образом, трехступенчатая нанодиафильтрация обеспечивает селективное разделение минеральных веществ за счет различий в их химической природе. В результате из-за низкой молекулярной массы большая часть одновалентных ионов ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ), добавленных при рН-стабилизации гидролиза, перешла в пермеат, а наиболее важные для функционирования и жизнедеятельности организма двухвалентные

ионы кальция и магния (в т.ч. химически связанные с фосфором) в большей части сохранились в ретентате.

### 3.3. Исследование аминокислотного состава и биологической ценности гидролизатов сывороточных белков

Потенциальная ценность гидролизатов сывороточных белков заключается не только в проявлении биофункциональных свойств, но и в сбалансированности аминокислотного профиля, способного обеспечить метаболические потребности организма в незаменимых аминокислотах [62–64]. Первоначально интактные белки молочной сыворотки содержат полный спектр незаменимых (валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин) и условно незаменимых (аргинин и гистидин) аминокислот, а также высокую концентрацию аминокислот с разветвленной цепью (BCAA), которые являются важными факторами роста и восстановления тканей [65]. Однако доказано, что под действием технологических факторов процесса таргетированной биоконверсии аминокислотный профиль гидролизованных белков может претерпевать некоторые изменения [30]. Таким образом, дальнейшие исследования были направлены на оценку сбалансированности аминокислотного профиля гидролизованных сывороточных белков в сравнительном аспекте с концентратами нативных и термоденатурированных сывороточных белков (Рисунок 3).

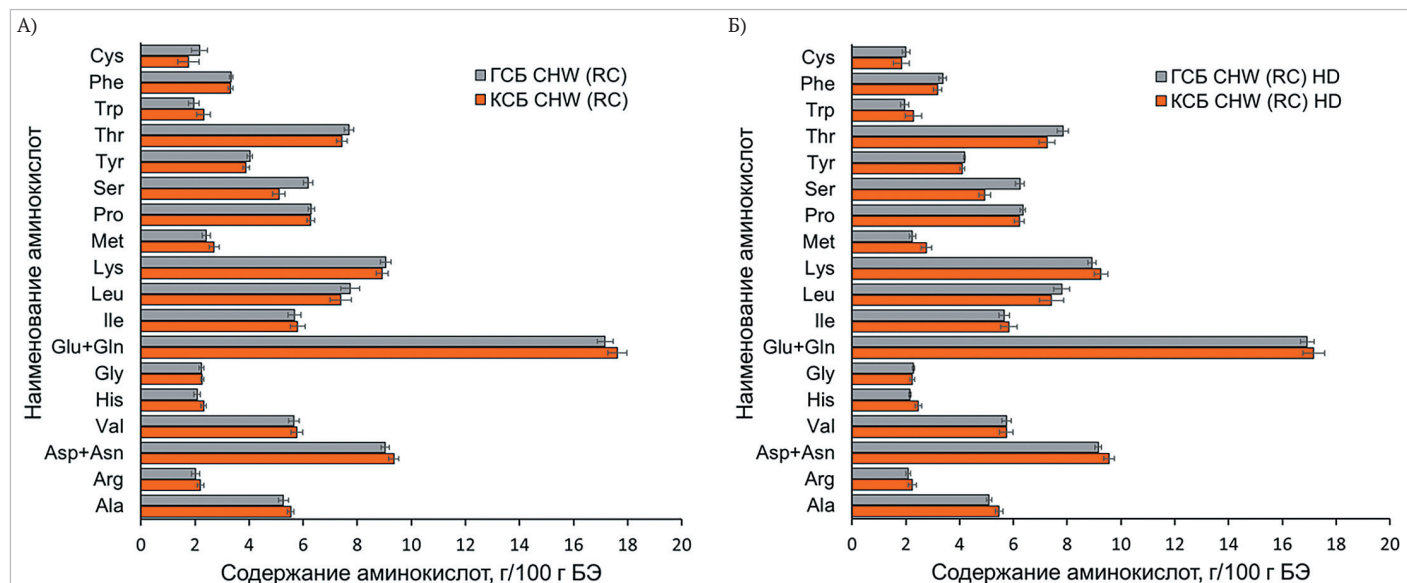


Рисунок 3. Исследование общего содержания аминокислот в сухих концентратах и гидролизатах нативных (А) и термоденатурированных сывороточных белков (Б)

Figure 3. Study of the total amino acid content in dry concentrates and hydrolysates of native (A) and heat-denatured (B) whey proteins

Проведенный анализ аминокислотного состава нативных и термоденатурированных белков молочной сыворотки, а также их гидролизатов после мембранной очистки демонстрирует высокую стабильность белково-пептидной матрицы к применяемым технологическим воздействиям. Сравнение нативного (CHW (RC)) и термоденатурированного (CHW (RC) HD) КСБ выявило отсутствие статистически значимых изменений в содержании подавляющего большинства аминокислот. Данный результат подтверждает, что предварительная термическая обработка, необходимая для денатурации белка, не индуцирует масштабного разрушения ковалентных пептидных связей или боковых радикалов аминокислот и не изменяет аминокислотный профиль сывороточных белков. Основным следствием термоденатурации является изменение конформационной структуры белка, заключающееся в разрывании полипептидных цепей с последующей их агрегацией, что подтверждается современными и ретроспективными исследованиями [66–68]. Наиболее выраженные изменения аминокислотного профиля наблюдались для предварительно денатурированного субстрата после ферментативного гидролиза и мембранного фракционирования. В гидролизате CHW (RC) HD по сравнению с термоденатурированным белком отмечено значимое снижение метионина (на 18,8%), триптофана (на 14,5%), аланина (на 6,9%), аспаргина и аспаргиновой кислоты (на 4,2%). Наблюдаемое снижение концентрации триптофана и метионина при ферментативном гидролизе термоденатурированных белков, в отличие от других образцов, вероятно, является следствием их окислительной модификации на стадии предварительной термической обработки. В нативном состоянии многие чувствительные остатки метионина и триптофана расположены внутри гидрофобных участков белковой молекулы, что обеспечивает стерическую защиту от окисления [69,70]. В то же время сообщалось [66], что остатки цистеина могут нейтрализовать большую часть активных окислителей. Вследствие этого они подвергаются окислительно-опосредованной перегруппировке и образованию дисульфидных связей, участвующих в агрегации белка, которая, в свою очередь, обеспечивает физическую защиту от окисления. Наблюдаемое снижение содержания аланина, аспаргина и аспаргиновой кислоты при ферментативном гидролизе термоденатурированных белков в условиях щелочного pH с высокой вероятностью связано с их участием в реакции Майяра, где α-аминогруппа этих аминокислот может напрямую взаимодействовать с карбонильными группами редуцирующих сахаров и вступать в неферментативное гликозилирование. Процесс сопровождается образованием меланоидиновых соединений, устойчивых к кислотному гидролизу (при пробоподготовке) [71]. Установленное статистически значимое увеличение массовой доли серина в ферментативных гидролизатах CHW (RC) и CHW (RC) HD может отражать селективное удержание серина (в т.ч. в составе короткоцепочечных пептидов) в ретентате, обусловленное его специфической сорбцией на полимерной мембране через образование слабых водородных связей между гидроксильной группой аминокислоты и полярными функ-

циональными группами мембраны. Оно также может отражать совокупную систематическую погрешность анализа, возникающую из-за дифференциальной деградации серина при кислотном гидролизе интактного белка и пептидов, матрикс-зависимых вариаций эффективности дериватизации и электрофоретического поведения в капиллярном электрофорезе. Выявленный феномен статистически значимого увеличения содержания серина в гидролизатах требует проведения дополнительных глубоких исследований для установления достоверных механизмов, лежащих в основе наблюдаемого явления.

На следующем этапе работ было изучено содержание аминокислот в свободной форме в дегидратированных образцах концентратов и гидролизатов сывороточных белков (Рисунок 4).

Данные Рисунок 4 свидетельствуют о том, что на долю свободных аминокислот КСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD приходится 0,41–0,47 % от общего содержания аминокислот, в то время как для соответствующих гидролизатов данный показатель составляет 2,44–2,59 %. Гидролиз нативных и термоденатурированных сывороточных белков привел к значительному увеличению концентраций фенилаланина, тирозина, пролина, метионина и в меньшей степени триптофана, лейцина, изолейцина, серина и аланина. Наблюдаемое значимое увеличение содержания свободных аминокислот коррелирует с научными данными о субстратной специфичности используемых ферментов. Согласно данным [72–75], химотрипсин проявляет высокую специфичность к гидролизу пептидных связей по С-концевым ароматическим аминокислотам (фенилаланин, тирозин, триптофан), а также умеренную специфичность к гидролизу связей после гидрофобных остатков (лейцин, пролин и метионин). Субтилизин, напротив, демонстрирует более широкую специфичность, эффективно гидролизует пептидные связи после ароматических и алифатических гидрофобных остатков (лейцин, фенилаланин, триптофан, метионин, валин) [72–74]. При этом следует отметить, что содержание горьких свободных аминокислот (триптофан, изолейцин, лейцин, валин, фенилаланин и лизин [76]) в гидролизатах CHW (RC) и CHW (RC) HD составляет в среднем 1,2 %, что частично обуславливает интенсивность горького привкуса. Несмотря на это, относительно низкое содержание свободных аминокислот в гидролизатах сывороточных белков обусловлено, с одной стороны, специфичностью ферментов и рациональными режимами протеолиза, а с другой — применением селективной мембранной очистки гидролизатов.

По усредненным данным аминокислотного профиля проведено исследование биологической ценности концентратов и гидролизатов сывороточных белков (Таблица 3).

В целом установленные вариации аминокислот не отразились на отношениях НАК/ЗАК (0,77–0,78) и НАК/ОАК (0,44). Содержание аминокислот с разветвленными боковыми цепями для всех образцов также находилось на высоком уровне (18,95–19,20 г/100 г белка). Анализ аминокислотного состава сухих концентратов и гидролизатов сывороточных белков в сравнении с «идеальным» белком по шкале ФАО/ВОЗ [77], принятой в 2013 г., показал, что величины

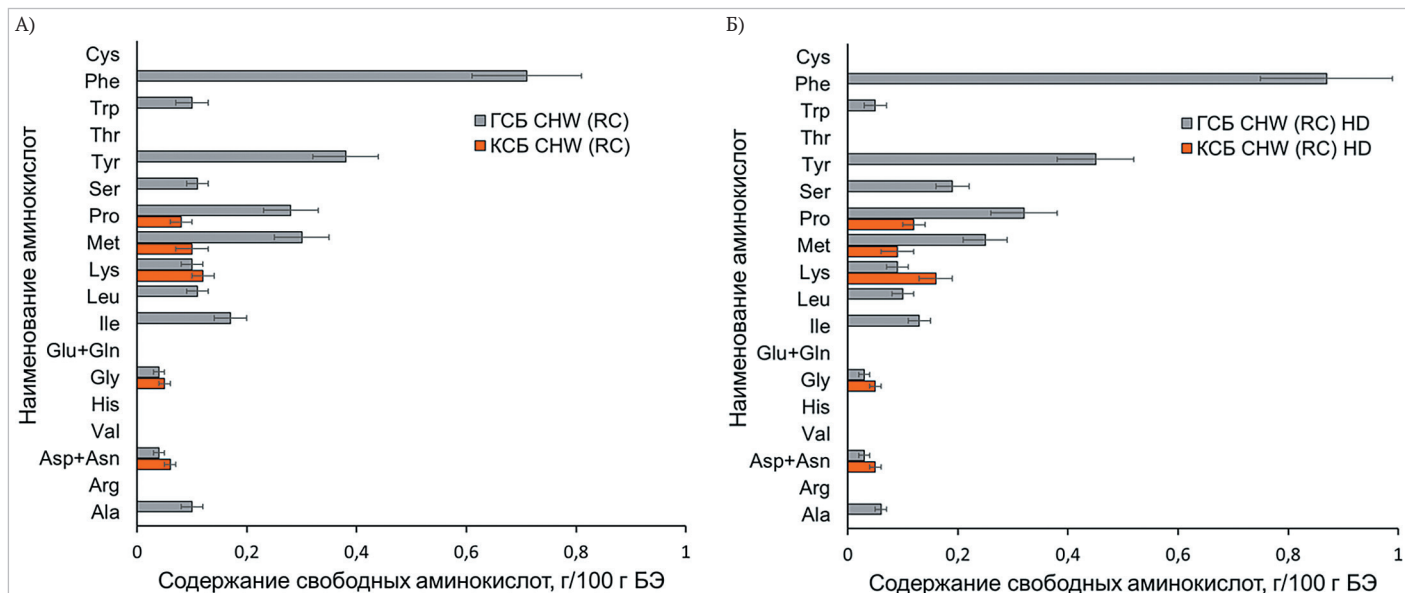


Рисунок 4. Исследование содержания свободных аминокислот в сухих концентратах и гидролизатах нативных (А) и термоденатурированных сывороточных белков (Б)

Figure 4. Study of the free amino acid content in dry concentrates and hydrolysates of native (A) and heat-denatured (B) whey proteins

Таблица 3. Биологическая ценность сухих концентратов и гидролизатов сывороточных белков

Table 3. Biological value of dry concentrates and hydrolysates of whey proteins

| Наименование аминокислоты                                 | Сухой КСБ<br>CHW (RC) | Сухой ГСБ<br>CHW (RC) | Сухой КСБ<br>CHW (RC) HD | Сухой ГСБ<br>CHW (RC) HD |
|---|-----------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Сумма незаменимых аминокислот (НАК)                       | 43,65                 | 43,51                 | 43,74                    | 43,52                    |
| Сумма заменимых аминокислот (ЗАК)                         | 56,35                 | 56,49                 | 56,26                    | 56,48                    |
| Сумма аминокислот с разветвленными боковыми цепями (ВСАА) | 18,95                 | 19,07                 | 19,00                    | 19,20                    |
| Отношение НАК/ЗАК   | 0,78                  | 0,77                  | 0,78                     | 0,77                     |
| Отношение НАК/ОАК   | 0,44                  | 0,44                  | 0,44                     | 0,44                     |
| Аминокислотный скор, %                                    |                       |                       |                          |                          |
| Валин   | 144,0                 | 141,3                 | 143,6                    | 143,6                    |
| Изолейцин   | 193,5                 | 189,4                 | 194,4                    | 188,6                    |
| Лейцин  | 121,1                 | 126,8                 | 121,7                    | 127,8                    |
| Лизин   | 185,9                 | 188,5                 | 193,0                    | 185,8                    |
| Метионин+ Цистеин   | 194,4                 | 199,2                 | 200,8                    | 185,3                    |
| Треонин   | 297,0                 | 307,5                 | 290,0                    | 313,4                    |
| Гистидин  | 144,8                 | 130,2                 | 154,0                    | 134,4                    |
| Триптофан   | 351,1                 | 296,7                 | 344,9                    | 296,1                    |
| Фенилаланин + Тирозин                                     | 176,1                 | 179,5                 | 177,5                    | 184,1                    |
| Лимитирующая аминокислота                                 | -                     | -                     | -                        | -                        |
| Коэффициент утилитарности                                 | 0,68                  | 0,71                  | 0,69                     | 0,72                     |
| Избыточность незаменимых аминокислот, г/100 г белка       | 16,42                 | 14,95                 | 16,79                    | 14,72                    |
| Сопоставимая избыточность, аминокислот г/100 г белка      | 13,56                 | 11,79                 | 13,80                    | 11,51                    |
| Индекс незаменимых аминокислот (ИНАК)                     | 1,49                  | 1,49                  | 1,49                     | 1,49                     |

химических и скорректированных на общую переваримость скоров для всех незаменимых аминокислот превышают 100%. Рассчитанные коэффициенты утилитарности, отражающие общее количество НАК, которые могут быть утилизированы организмом человека, для гидролизатов CHW (RC) и CHW (RC) HD находились на схожем уровне (0,71–0,72) и превышали показатели соответствующих концентратов (0,68–0,69). Количество незаменимых аминокислот, гипотетически не пошедших на анаболические нужды организма, для гидролизатов CHW (RC) и CHW (RC) HD составляло 14,95 и 14,72 г/100 г белка, в то время как для интактных сывороточных белков данный показатель находился на уровне 16,42 и 16,79 г/100 г белка. Показатель сопоставимой избыточности для гидролизованных белков составлял в среднем 11,79–11,51 г/100 г белка, а для концентратов – 13,56–13,80 г/100 г белка при схожем индексе незаменимых аминокислот. Таким образом, по результатам исследований установлено, что гидролизаты сывороточных белков обладают высокой биологической ценностью и сбалансированностью по незаменимым аминокислотам,

а также являются естественным источником аминокислот с разветвленной боковой цепью. В перспективе это может стать одним из инструментов для решения ряда актуальных проблем современной нутрициологии.

#### 3.4. Оценка перевариваемости гидролизатов сывороточных белков

Оценка перевариваемости белковых ингредиентов *in vitro* является критически важным этапом для их характеристики с точки зрения усвояемости. Исследование деградации концентратов сывороточных белков и их гидролизатов в процессе пищеварения проводили с использованием статической модели переваривания INFOGEST 2.0, включающей пероральную (Р. с.), желудочную (Ж. с.) и кишечную (К. с.) фазы пищеварения, с учетом физиологических данных о составе сред взрослого человека (электролиты, ферменты, желчь, степень разбавления, pH и время пищеварения и пр.). Динамика гидролиза белка отслеживалась методом электрофореза в полиакриламидном геле на каждой стадии пищеварения (Рисунок 5).

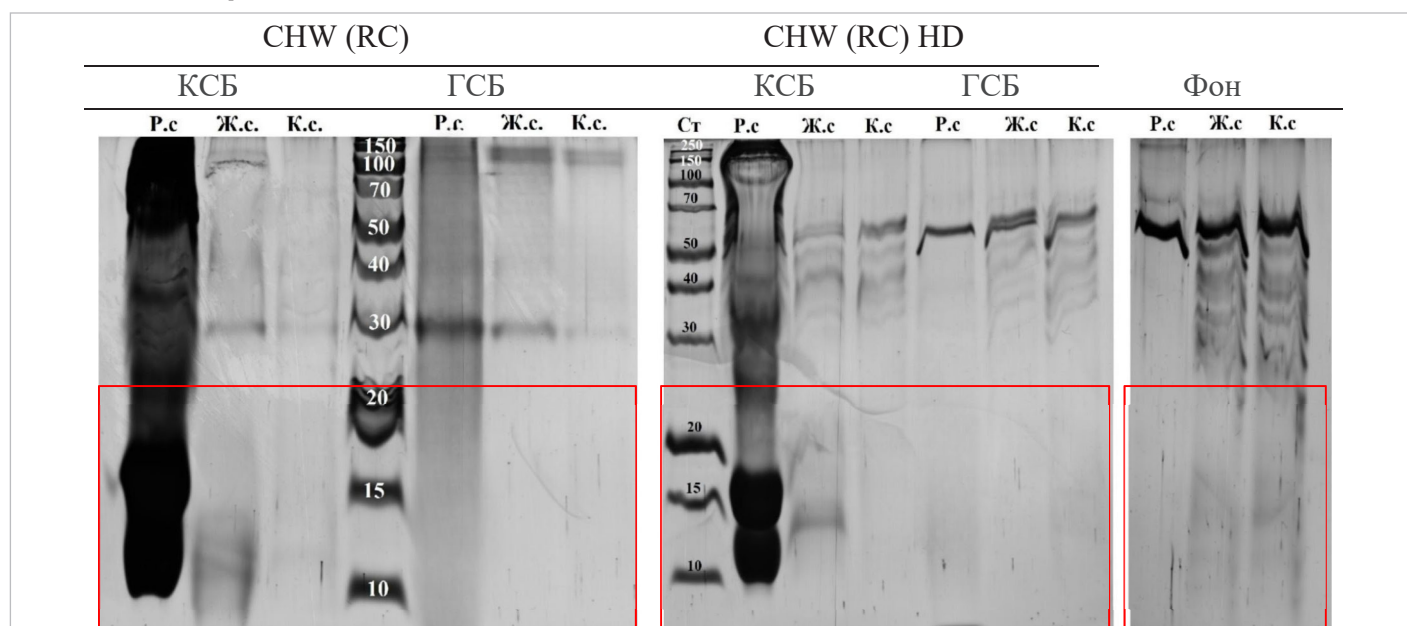


Рисунок 5. Электрофореграмма продуктов деградации концентратов и гидролизатов сывороточных белков на стадиях перорального (Р. с.), желудочного (Ж. с.) и кишечного (К. с.) переваривания

Figure 5. Electropherogram of degradation products of whey protein concentrates and hydrolysates at the stages of oral (P. c.), gastric (Ж. c.), and intestinal (K. c.) digestion

Анализ данных Рисунка 5 показал отсутствие на пероральной фазе переваривания протеолитической деградации нативных и термоденатурированных сывороточных белковых структур, что подтверждается сохранением четких и интенсивных полос, соответствующих основным сывороточным белкам —  $\beta$ -лактоглобулину (18 кДа) и  $\alpha$ -лактальбумину (14 кДа). Отсутствие видимых изменений в белковом профиле на данной стадии является следствием того, что фермент  $\alpha$ -амилаза, используемый для имитации пероральной фазы, не обладает протеолитической активностью и, преимущественно, гидролизует  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи в крахмале и гликогене. Электрофореграммы гидролизованных белков характеризуются отсутствием полос в зоне, характерной для основных интактных белков, что подтверждает деградацию белковых структур на этапе ферментативного протеолиза и удаление высокомолекулярных соединений на стадии каскадно-селективной фильтрации гидролизатов. После инкубации с пепсином в условиях желудочной фазы отмечено практически полное исчезновение полос  $\beta$ -лактоглобулина и частичное  $\alpha$ -лактальбумина, что свидетельствует об эффективном протеолизе под действием пепсина. Сформированный диффузный спектр полос в области молекулярных масс менее 15 кДа может свидетельствовать как о сохранении незначительных концентраций негидролизованного  $\alpha$ -лактальбумина, так и об образовании гетерогенной смеси пептидов с различной молекулярной массой, что также подчеркивается в работе [78]. Таким образом, пепсин, являясь эндопептидазой, осуществляет первичный гидролиз белковых субстратов на среднемoleкулярные и короткие пептиды. Последующая обработка панкреатином на кишечной фазе переваривания приводила к полному исчезновению пептидных и белковых полос. Это свидетельствует о глубоком гидролизе пептидов, полученных после желудочной стадии с образованием коротких олигопептидов и свободных аминокислот под действием комплекса панкреатических протеаз (трипсина, химотрипсина, карбоксипептидаз). Важно отметить, что существенных изменений в профилях гидролизатов нативных и сывороточных белков не наблюдалось уже на этапе пероральной фазы переваривания. Таким образом, для углубленного изучения деградации белковых соединений в желудочно-кишечном тракте *in vitro* были исследованы показатели коэффициента перевариваемости (Рисунок 6А) и образования свободных аминокислот (Рисунок 6Б).

Результаты исследования демонстрируют выраженное влияние предварительной обработки на перевариваемость сывороточных белков *in vitro*. Гидролизаты нативных и термоденатурированных сывороточных белков обладали высокой биодоступностью уже на стадии перорального пищеварения, что объясняется предварительным расщеплением пептидных связей в результате протеолиза ферментами. Дальнейшее переваривание в желудочно-кишечном тракте обеспечило практически полное расщепление данных образцов на желудочной (98,0% и 98,4%) и кишечной стадиях (99,0% и 99,1%) с образованием короткоцепочечных пептидов, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой, и свободных аминокислот. В отличие от гидролизатов, нативная форма сывороточных белков показала классическую трехстадийную динамику

переваривания, где основные процессы деградации происходили при имитации желудочной (73,3%) и кишечной фаз (89,9%). Предварительная термоденатурация ускоряла процесс деградации белка при имитации желудочной (82,0%) и кишечной фаз (96,3%), что объясняется повышенной доступностью аминокислотных сайтов для расщепления пищеварительными ферментами посредством изменения конформации белка. Полученные данные полностью согласуются с результатами работ [79,80], где также показано, что нативная глобулярная структура  $\beta$ -лактоглобулина, характеризующаяся наличием  $\beta$ -барреля с гидрофобным ядром и стабилизированная дисульфидными мостиками (Cys<sup>66</sup>-Cys<sup>160</sup>, Cys<sup>106</sup>-Cys<sup>119</sup>), существенно ограничивает доступ протеаз к пептидным связям. Данный факт объясняет неполный протеолиз нативной белковой молекулы пищеварительными ферментами. Как и в указанных исследованиях, нами было подтверждено, что термоденатурация белка значительно повышает доступность пептидных связей для действия пепсина и последующих панкреатических протеаз. Это является следствием необратимого изменения конформации белковой молекулы, включающего развертывание полипептидной глобулы, экспозицию гидрофобных участков, ранее скрытых внутри молекулы, и разрыв дисульфидных связей, стабилизирующих нативную структуру. Анализ высвобождения свободных аминокислот при имитации гастроинтестинального переваривания *in vitro* позволил выявить статистически значимые различия в кинетике переваривания между исследуемыми формами сывороточных белков. Гидролизаты нативных и термоденатурированных сывороточных белков в силу предварительного протеолиза демонстрировали наивысшую концентрацию свободных аминокислот на желудочной фазе (20,4 и 21,7 мМ экв. пролина) и кишечной фазе переваривания (55,3 и 57,5 мМ экв. пролина) по сравнению с соответствующими интактными белками на завершающем этапе процесса (35,6 и 49,1 мМ экв. пролина). Ключевым наблюдением являлось снижение коэффициента эффективности высвобождения свободных аминокислот (САК<sub>ж.с./САК<sub>к.с.</sub></sub>) у гидролизованных форм до 2,7 против 5,4 для нативных белков и 6,5 для термоденатурированных белков, что может объясняться образованием протеазо-резистентных пептидных фракций. Проведенный анализ подтверждает, что *in vitro* переваривание сывороточных белков не приводит к их полному гидролизу до свободных аминокислот. Значительная часть протеолиза на кишечной фазе завершается образованием короткоцепочечных пептидов (в т.ч. биоактивных), способных к кишечной абсорбции через мембранные транспортеры либо к последующему гидролизу ферментами щеточной каймы энтероцитов и микробиоты. Таким образом, совокупность полученных данных убедительно доказывает, что гидролизованные белки обладают ускоренной кинетикой переваривания по сравнению с нативными формами. Однако требуется проведение дополнительных исследований на лабораторных моделях животных *in vivo*. Такие работы необходимы для подтверждения устойчивости антиоксидантных и АПФ-ингибирующих пептидов к системной деградации в результате переваривания в желудочно-кишечном тракте, количественной оценки их транспителяльного транспорта и доказательства биологических эффектов.

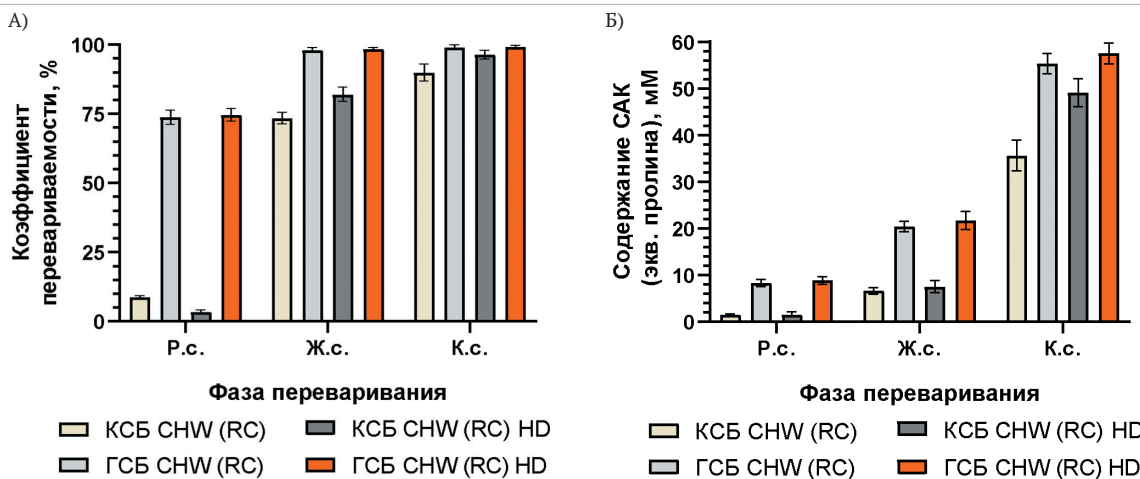


Рисунок 6. Коэффициент перевариваемости (А) и содержание свободных аминокислот (Б) концентратов и гидролизатов сывороточных белков на стадиях перорального (Р. с.), желудочного (Ж. с.) и кишечного (К. с.) переваривания  
 Figure 6. Digestibility coefficient (A) and free amino acid content (B) of whey protein concentrates and hydrolysates at the stages of oral (P. c.), gastric (Ж. с.), and intestinal (К. с.) digestion

#### 4. Выводы

Реализованная в работе стратегия каскадно-селективной мембранной фильтрации (ультрафильтрация с последующей нанофильтрацией) представляет комплексное решение для очистки гидролизатов сывороточных белков от балластных соединений (негидролизованные высокомолекулярные белковые соединения, протеазы и частично свободные аминокислоты) и для фракционирования пептидов с прогнозируемой биологической активностью. Доказано, что предложенная технология обеспечивает селективное удаление до 67 % ионов калия и 61 % натрия при сохранении в продукте физиологически значимых уровней кальция, магния и фосфора. Ключевым результатом исследований является сохранение в гидролизате сывороточных белков пептидных фракций (0,4–5 кДа), обладающих максимальной антиоксидантной (до 1280 мкМ ТЭ/г) и АПФ-ингибирующей (IC<sub>50</sub>=0,10–0,19 мг/мл) активностями. Комплексный анализ аминокислотного состава подтвердил, что мембранная обработка не приводит к значительному изменению аминокислотного состава гидролизатов сывороточных белков. Гидролизаты характеризуются сбалансированным профилем незаменимых аминокислот (соотношение НАК/ЗАК 0,77–0,78), высоким содержанием ВСАА (19,07–

19,20 г/100 г белка), повышенным коэффициентом утилитарности (0,71–0,72) и пониженным показателем сопоставимой избыточности НАК (11,79–11,51 г/100 г белка) по сравнению с нативными термоденатурированными концентратами сывороточных белков. При этом на долю свободных аминокислот приходится 2,44–2,59% от общего содержания аминокислот. Оценка перевариваемости с использованием статической модели переваривания INFOGEST 2.0 подтвердила более быстрое и полное переваривание, а также максимальное высвобождение свободных аминокислот из фракционированных гидролизатов по сравнению с концентратами интактных белков, что может способствовать ускорению процессов метаболизма и восстановлению организма после интенсивных физических нагрузок.

Полученные результаты открывают перспективы промышленного масштабирования технологии производства гидролизатов сывороточных белков и их использования в качестве функциональных ингредиентов для создания продуктов функционального и специализированного питания, включая протеиновые формулы для спортивного питания, нутритивной поддержки при метаболическом синдроме и возрастной саркопении, для коррекции хронического оксидативного стресса и профилактики гипертонии.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Meganaharshini, M., Sudhakar, V., Dhivya Bharathi, N., Deepak, S. (2023). Review on recent trends in the application of protein concentrates and isolates — A food industry perspective. *Food and Humanity*, 1, 308–325. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.05.022>
- Lagrange, V., Whitsett, D., Burris, C. (2015). Global market for dairy proteins. *Journal of Food Science*, 80(1), A16–A22. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12801>
- Smithers, G. W. (2015). Whey-ing up the options — Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
- Dullius, A., Goettert, M. I., de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods — Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>
- Pan, D., Zhang, Z., Liu, N., Ashaolu, T. J. (2025). Whey protein nutrition in sports: Action mechanisms and gaps in research. *Current Nutrition Reports*, 14(1), Article 84. <https://doi.org/10.1007/s13668-025-00673-w>
- González-Weller, D., Paz-Montelongo, S., Bethencourt-Barbuzano, E., Niebla-Canelo, D., Alejandro-Vega, S., Gutiérrez, Á. J. et al. (2023). Proteins and minerals in whey protein supplements. *Foods*, 12(11), Article 2238. <https://doi.org/10.3390/foods12112238>
- Lam, F. C., Bukhsh, A., Rehman, H., Waqas, M. K., Shahid, N., Khaliel, A. M. et al. (2019). Efficacy and safety of whey protein supplements on vital sign and physical performance among athletes: A network meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 10, Article 317. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00317>
- Martinez Galan, B. S., Giolo De Carvalho, F., Carvalho, S. C., Cunha Brandao, C. F., Morhy Terrazas, S. I., Abud, G. F. et al. (2021). Casein and whey protein in the breast milk ratio: Could it promote protein metabolism enhancement in physically active adults? *Nutrients*, 13(7), Article 2153. <https://doi.org/10.3390/nu13072153>
- Zhao, C., Chen, N., Ashaolu, T. J. (2022). Whey proteins and peptides in health-promoting functions—A review. *International Dairy Journal*, 126, Article 105269. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105269>
- Camargo, L.R., Donedá, D., Oliveira, V. R. (2020). Whey protein ingestion in elderly diet and the association with physical, performance and clinical outcomes. *Experimental Gerontology*, 137, Article 110936. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110936>
- Polberger, S., Riihã, N. C., Juvenon, P., Moro, G. E., Minoli, I., Warm, A. (1999). Individualized protein fortification of human milk for preterm infants: Comparison of ultrafiltered human milk protein and a bovine whey fortifier. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 29(3), 332–338. <https://doi.org/10.1002/j.1536-4801.1999.tb02424.x>
- de Figueiredo Furtado, G., da Silva Carvalho, A. G., Hubinger, M. D. (2021). Model infant formulas: Influence of types of whey proteins and oil composition on emulsion and powder properties. *Journal of Food Engineering*, 292, Article 110256. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110256>
- Chen, Y., Callanan, M., Shanahan, C., Tobin, J., Gamon, L. F., Davies, M. J. et al. (2021). The use of membrane filtration to increase native whey proteins in infant formula. *Dairy*, 2(4), 515–529. <https://doi.org/10.3390/dairy2040041>
- Chitti, W., Insin, P., Prueksaritanond, N. (2025). Effect of whey protein supplementation on postoperative outcomes after gynecological cancer surgery: A randomized controlled trial. *World Journal of Oncology*, 16(1), 70–82. <https://doi.org/10.14740/wjon1990>
- Khaloofefard, R., Oraee-Yazdani, S., Keikhaee, M., Shariatpanahi, Z. V. (2022). Protein supplement and enhanced recovery after posterior spine fusion surgery: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Spine Surgery*, 35(3), E356–E362. <https://doi.org/10.1097/BSD.0000000000001222>
- Niitsu, M., Ichinohe, D., Hirooka, T., Mitsutomi, K., Morimoto, Y., Sarukawa, J. et al. (2016). Effects of combination of whey protein intake and rehabilitation on muscle strength and daily movements in patients with hip fracture in the early postoperative period. *Clinical Nutrition*, 35(4), 943–949. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.07.006>
- Kleekayai, T., O'Neill, A., Clarke, S., Holmes, N., O'Sullivan, B., FitzGerald, R. J. (2022). Contribution of hydrolysis and drying conditions to whey protein hydrolysate characteristics and in vitro antioxidant properties. *Antioxidants*, 11(2), Article 399. <https://doi.org/10.3390/antiox11020399>
- Pang, L., Huang, Z., Li, R., Su, Y., Shi, J., Yang, X. et al. (2025). Reducing the allergenicity of whey proteins while improving their functional properties and bioactivity using combined enzymes. *Food Chemistry*, 481, Article 144052. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144052>
- Kruchinin, A., Barkovskaya, I., Illarionova, E., Bolshakova, E., Turovskaya, S., Galstyan, A. (2025). Effect of enzymatic degradation of proteins on technological properties of whey powdered products. *International Journal of Dairy Technology*, 78(2), Article e70005. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.70005>
- Cui, Q., Li, Y., Li, T., Yu, J., Shen, G., Sun, X. et al. (2024). Characterization of peptide profiles and the hypoallergenic and high antioxidant activity of whey protein hydrolysate prepared using different hydrolysis modes. *Foods*, 13(18), Article 2978. <https://doi.org/10.3390/foods13182978>
- Espindola, J. S., Taccola, M. F., da Silva, V. S. N., Dos Santos, L. D., Rossini, B. C., Mendonca, B. C. et al. (2023). Digestion-resistant whey peptides promote antioxidant effect on Caco-2 cells. *Food Research International*, 173, Article 115291. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.115291>
- Cui, L., Yang, G., Lu, S., Zeng, X., He, J., Guo, Y. et al. (2022). Antioxidant peptides derived from hydrolyzed milk proteins by *Lactobacillus* strains: A BIOPEP-UWM database-based analysis. *Food Research International*, 156, Article 111339. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111339>
- Jiang, S., Mo, F., Li, W., Yang, S., Li, C., Jiang, L. (2024). Deep learning-driven optimization of antihypertensive properties from whey protein hydrolysates: A multienzyme approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(2), 1375–1388. <https://doi.org/10.1016/j.jafc.2024.1021>
- Dou, P., Li, X., Zou, X., Wang, K., Yao, L., Sun, Z. et al. (2024). Antihypertensive effects of whey protein hydrolysate involve reshaping the gut microbiome in spontaneously hypertensive rats. *Food Science and Human Wellness*, 13(4), 1974–1986. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250164>
- Mansinbhai, C. H., Sakure, A., Liu, Z., Maurya, R., Das, S., Basaiawmoit, B. et al. (2023). Anti-inflammatory, ACE inhibitory, antioxidative activities and release of novel antihypertensive and antioxidative peptides from whey protein hydrolysate with molecular interactions. *Journal of the American Nutrition Association*, 42(4), 371–385. <https://doi.org/10.1080/07315724.2022.2052201>
- Tovar-Jiménez, X., Téllez-Jurado, A., Gómez-Aldapa, C. A., Mercado-Flores, Y., Arana-Cuenca, A. (2021). Antioxidant and antihypertensive activity of bovine whey protein concentrate enzymatic hydrolysates. *Biocercia*, 23(1), 161–169. <https://doi.org/10.18633/biocercia.v23i1.1321>
- Alvarez-Chávez, S. I., Reyes-Ramírez, I., González-Olivares, L. G., Pérez-Flores, J. G., Contreras-López, E., Olvera-Rosales, L. B. et al. (2025). Hydrolysates from a whey protein concentrate are a promising functional ingredient for diabetes control via DPP-IV inhibition. *Biology and Life Sciences Forum*, 40(1), Article 10. <https://doi.org/10.3390/blsf2024040010>
- Bunsroem, K., Prinyawiwatkul, W., Thaidum, S. (2022). The influence of whey protein heating parameters on their susceptibility to digestive enzymes and the antidiabetic activity of hydrolysates. *Foods*, 11(6), Article 829. <https://doi.org/10.3390/foods11060829>
- Vadher, K. R., Sakure, A. A., Mankad, P. M., Rawat, A., Bishnoi, M., Kondepudi, K. K. et al. (2025). A comparative study on antidiabetic and anti-inflammatory activities of fermented whey and soy protein isolates and the release of biofunctional peptides: An in vitro and in silico studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 105(7), 3826–3842. <https://doi.org/10.1002/jsfa.14154>
- Li, Y., Fan, Y., Liu, J., Meng, Z., Huang, A., Xu, F. et al. (2023). Identification, characterization and in vitro activity of hypoglycemic peptides in whey hydrolysates from rubbing cheese by-product. *Food Research International*, 164, Article 112382. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112382>
- Singh, A., Duche, R. T., Wandhare, A. G., Sian, J. K., Singh, B. P., Sihag, M. K. et al. (2023). Milk-derived antimicrobial peptides: Overview, applications, and future perspectives. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(1), 44–62. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-10004-y>
- Innocente, N., Calligaris, S., Di Filippo, G., Melchior, S., Marino, M., Nicoli, M. C. (2023). Process design for the production of peptides from whey protein isolate with targeted antimicrobial functionality. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(5), 2505–2517. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16393>

33. Dalaka, E., Stefos, G. C., Politis, I., Theodorou, G. (2025). Immunomodulatory properties of sweet whey-derived peptides in THP-1 macrophages. *Molecules*, 30(6), Article 1261. <https://doi.org/10.3390/molecules30061261>
34. Kiewiet, M. B., Dekkers, R., Ulfman, L. H., Groeneveld, A., de Vos, P., Faas, M. M. (2018). Immunomodulating protein aggregates in soy and whey hydrolysates and their resistance to digestion in an in vitro infant gastrointestinal model: New insights in the mechanism of immunomodulatory hydrolysates. *Food Function*, 9(1), 604–613. <https://doi.org/10.1039/C7FO01537B>
35. Reyes-Díaz, A., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B. (2018). Immunomodulation by hydrolysates and peptides derived from milk proteins. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1471-0507.12421>
36. Mora, L., Toldrá, F. (2023). Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides. *Current Opinion in Food Science*, 49, Article 100973. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100973>
37. Martínez-Araiza, G., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S. L., Regalado-González, C., Martínez-Vera, C., Ozimek, L. (2012). Modeling of enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2596–2601. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0624-5>
38. Morifuji, M., Ishizaka, M., Baba, S., Fukuda, K., Matsumoto, H., Koga, J. et al. (2010). Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary protein: Effect on plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8788–8797. <https://doi.org/10.1021/jf101912n>
39. Boza, J. J., Moennoz, D., Vuichoud, J., Jarret, A. R., Gaudard-de-Weck, D., Balleve, O. (2000). Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *European Journal of Nutrition*, 39(6), 237–243. <https://doi.org/10.1007/s003940070001>
40. Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: Progress and prospects. *Annals of Occupational Hygiene*, 47(3), 187–200. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meg032>
41. Yike, I. (2011). Fungal proteases and their pathophysiological effects. *Mycopathologia*, 171(5), 299–323. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9386-2>
42. Henriques, M., Gomes, D., Pereira, C. (2017). Liquid whey protein concentrates produced by ultrafiltration as primary raw materials for thermal dairy gels. *Food Technology and Biotechnology*, 55(4), Article 454. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.04.17.5248>
43. Курченко, В. П., Симоненко, Е. С., Сушинская, Н. В., Головач, Т. Н., Петров, А. Н., Симоненко, С. В. (2021). Идентификация кобыльего молока и его смеси с коровьим молоком методом ВЭЖХ-анализа. *Техника и технология пищевых производств*, 51(2), 402–412. [Kurchenko, V. P., Simonenko, E. S., Sushynskaya, N. V., Halavach, T. N., Petrov, A. N., Simonenko, S. V. (2021). HPLC identification of mare's milk and its mix with cow's milk. *Food Processing: Techniques and Technology*, 51(2), 402–412. (In Russian)] <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-402-412>
44. Spellman, D., McEvoy, E., O'cuinn, G., FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)
45. Acid, T. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1257–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
46. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
47. Hernández-Ledesma, B., Martín-Álvarez, P. J., Pueyo, E. (2003). Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: Influence of the inhibition type. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4175–4179. <https://doi.org/10.1021/jf034148o>
48. Araujo, M. C., Melo, R. L., Cesari, M. H., Juliano, M. A., Juliano, L., Carmona, A. K. (2000). Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry*, 39(29), 8519–8525. <https://doi.org/10.1021/bi9928905>
49. Vafin, R. R., Radaeva, I. A., Kruchinin, A. G., Illarionova, E. E., Bigaeva, A. V., Turovskaya, S. N. et al. (2021).  $\kappa$ -casein polymorphism effect on technological properties of dried milk. *Foods and Raw Materials*, 9(1), 95–105. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-1-95-105>
50. Brodtkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S. et al. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
51. Чернуха, И. М., Васильевская, Е. Р., Арюзина, М. А., Кусай, А., Полищук, Е. К. (2023). Комплексная модель *in vitro* и *ex vivo* для изучения трансформации белков в процессе пищеварения. *Все о мясе*, 4, 40–45. [Chernukha, I. M., Vasilevskaya, E. R., Aruzina, M. A., Qusay, A., Polishchuk, E. K. (2023). Complex in vitro and ex vivo model to study protein transformation during digestion. *Vsyo o Myase*, 4, 40–45. (In Russian)] <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2023-4-10-10>
52. Neelima, Sharma, R., Rajput, Y. S., Mann, B. (2013). Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: A review. *Dairy Science Technology*, 93(1), 21–43. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0095-0>
53. Feeney, S., Joshi, L., Hickey, R. M. (2018). Biological roles and production technologies associated with bovine glycomacropeptide. Chapter in a book: *Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals and Agriculture: Sources, Applications and Advances*. Wiley-Blackwell, 2018. <https://doi.org/10.1002/9781119385352.ch1>
54. Kolar, C. W., Brunner, J. R. (1970). Proteose-peptone fraction of bovine milk: Lactate serum components 5 and 8-casein-associated glycoproteins. *Journal of Dairy Science*, 53(8), 997–1008. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86335-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86335-4)
55. Karamoko, G., Anihouvi, P., Blecker, C. (2015). The development of knowledge regarding the characteristics of the proteose peptone fraction of milk: Technological and biological properties. A review. *Biotechnology, Agronomy, and Society and Environment*, 17(2), 373–382.
56. Alavi, F., Ciftci, O. N. (2023). Purification and fractionation of bioactive peptides through membrane filtration: A critical and application review. *Trends in Food Science Technology*, 131, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.024>
57. Yang, G., Xing, W., Xu, N. (2003). Concentration polarization in spiral-wound nanofiltration membrane elements. *Desalination*, 154(1), 89–99. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(03\)00210-8](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(03)00210-8)
58. Suwal, S., Roblet, C., Doyen, A., Amiot, J., Beaulieu, L., Legault, J. et al. (2014). Electrodialytic separation of peptides from snow crab by-product hydrolysate: Effect of cell configuration on peptide selectivity and local electric field. *Separation and Purification Technology*, 127, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.02.018>
59. Poulin, J.-F., Amiot, J., Bazinet, L. (2006). Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electrodialysis with ultrafiltration membrane. *Journal of Biotechnology*, 123(3), 314–328. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.016>
60. Pramanik, B. K., Thangavadivel, K., Shu, L., Jegatheesan, V. (2016). A critical review of membrane crystallization for the purification of water and recovery of minerals. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 15(3), 411–439. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9403-0>
61. Soral-Smietana, M., Zduńczyk, Z., Wronkowska, M., Juskiewicz, J., Zander, L. (2013). Mineral composition and bioavailability of calcium and phosphorus from acid whey concentrated by various membrane processes. *Journal of Elementology*, 18(1), 115–125. <https://doi.org/10.5601/JELEM.2013.18.1.10>
62. Price, D., Jackson, K. G., Lovegrove, J. A., Givens, D. I. (2022). The effects of whey proteins, their peptides and amino acids on vascular function. *Nutrition Bulletin*, 47(1), 9–26. <https://doi.org/10.1111/nbu.12543>
63. Simonson, M., Boirie, Y., Guillet, C. (2020). Protein, amino acids and obesity treatment. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 21(3), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09574-5>
64. Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9(2), 136–156.
65. Melnik, V., Ryabinina, E., Rodionova, K., Nalivayko, L., Khimych, M. (2023). Chemical composition and amino acid profile of goose meat (Ukrainian large gray and large white breeds) in semi-intensive system of growing. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 12(6), Article e9828. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.9828>
66. Li, C., Nielsen, S. B., Engholm-Keller, K., Lund, M. N. (2022). Oxidation of whey proteins during thermal treatment characterized by a site-specific LC-MS/MS-based proteomic approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(14), 4391–4406. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07946>
67. Halabi, A., Croguennec, T., Bouhallab, S., Dupont, D., Deglaire, A. (2020). Modification of protein structures by altering the whey protein profile and heat treatment affects in vitro static digestion of model infant milk formulas. *Food Function*, 11(8), 6933–6945. <https://doi.org/10.1039/D0FO01362E>
68. deWit, J. N., Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2701–2710. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81628-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81628-8)
69. Hensel, M., Steurer, R., Fichtl, J., Elger, C., Wedekind, F., Petzold, A. et al. (2011). Identification of potential sites for tryptophan oxidation in recombinant antibodies using tert-butylhydroperoxide and quantitative LC-MS. *PLoS One*, 6(3), Article e17708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017708>
70. Aledo, J. C., Cantón, F. R., Veredas, F. J. (2015). Sulphur atoms from methionines interacting with aromatic residues are less prone to oxidation. *Scientific Reports*, 5(1), Article 16955. <https://doi.org/10.1038/srep16955>
71. Xiao, Q., Woo, M. W., Hu, J., Xiong, H., Zhao, Q. (2021). The role of heating time on the characteristics, functional properties and antioxidant activity of enzyme-hydrolyzed rice proteins-glucose Maillard reaction products. *Food Bioscience*, 43, Article 101225. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101225>
72. Nagashima, T., Watanabe, A., Kise, H. (1992). Peptide synthesis by proteases in organic solvents: Medium effect on substrate specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(10), 842–847. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90102-T](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90102-T)
73. Peters, K., Pauli, D., Hache, H., Boteva, R. N., Genov, N. C., Fittkau, S. (1989). Subtilisin DY – kinetic characterization and comparison with related proteinases. *Current Microbiology*, 18(3), 171–177. <https://doi.org/10.1007/BF01569566>
74. Pattabiraman, T. N., Lawson, W. B. (1972). Comparative studies of the specificities of  $\alpha$ -chymotrypsin and subtilisin BPN'. *Studies with flexible substrates. Biochemical Journal*, 126(3), 645–657. <https://doi.org/10.1042/bj1260645>
75. Yamawaki, Y., Yufu, T., Kato, T. (2021). The effect of a peptide substrate containing an unnatural branched amino acid on chymotrypsin activity. *Processes*, 9(2), Article 242. <https://doi.org/10.3390/pr9020242>
76. Shuai, X., Gao, L., Geng, Q., Li, T., He, X., Chen, J. et al. (2022). Effects of moderate enzymatic hydrolysis on structure and functional properties of pea protein. *Foods*, 11(15), Article 2368. <https://doi.org/10.3390/foods11152368>
77. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Rome). (2013). *Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Report of an FAO Expert Consultation*, 31 March–2 April, 2011, Auckland, New Zealand. Retrieved from <https://www.fao.org/3/i3124e/i3124e.pdf>. Accessed October 2, 2022
78. Melchior, S., Moretton, M., Alongi, M., Calligaris, S., Nicoli, M. C., Anese, M. (2023). Comparison of protein *in vitro* digestibility under adult and elderly conditions: The case study of wheat, pea, rice, and whey proteins. *Food Research International*, 163, Article 112147. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112147>
79. Broersen, K. (2020). Milk processing affects structure, bioavailability and immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin. *Foods*, 9(7), Article 874. <https://doi.org/10.3390/foods9070874>
80. Peram, M. R., Loveday, S. M., Ye, A., Singh, H. (2013). *In vitro* gastric digestion of heat-induced aggregates of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 63–74. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5896>

| СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ   | AUTHOR INFORMATION   |
|---|--|
| <b>Принадлежность к организации</b>   | <b>Affiliation</b>   |
| <p><b>Кручинин Александр Геннадьевич</b> — доктор технических наук, старший научный сотрудник, экспериментальная клиника — лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова<br/>109316, Москва, ул. Талалихина, 26<br/>E-mail: a.kruchinin@fncps.ru<br/>ORCID: <a href="http://orcid.org/0000-0002-3227-8133">http://orcid.org/0000-0002-3227-8133</a><br/>* автор для контактов</p>                               | <p><b>Aleksandr G. Kruchinin</b>, Doctor of Technical Sciences, Senior Researcher, Experimental Clinic-Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems<br/>26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia<br/>E-mail: a.kruchinin@fncps.ru<br/>ORCID: <a href="http://orcid.org/0000-0002-3227-8133">http://orcid.org/0000-0002-3227-8133</a><br/>* corresponding author</p>  |
| <p><b>Спирина Мария Евгеньевна</b> — инженер-исследователь, экспериментальная клиника — лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова<br/>109316, Москва, ул. Талалихина, 26<br/>E-mail: m.spirina@fncps.ru<br/>ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-4544-4433">https://orcid.org/0000-0003-4544-4433</a></p>  | <p><b>Maria E. Spirina</b>, Research Engineer, Experimental Clinic-Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems<br/>26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia<br/>E-mail: m.spirina@fncps.ru<br/>ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-4544-4433">https://orcid.org/0000-0003-4544-4433</a></p>   |
| <b>Критерии авторства</b>   | <b>Contribution</b>  |
| <p>Концептуализация — <b>Кручинин А. Г.</b>;<br/>Обработка данных — <b>Кручинин А. Г., Спирина М. Е.</b>;<br/>Формальный анализ — <b>Кручинин А. Г.</b>;<br/>Исследование — <b>Кручинин А. Г., Спирина М. Е.</b>;<br/>Методология — <b>Кручинин А. Г.</b>;<br/>Администрирование проекта — <b>Кручинин А. Г.</b>;<br/>Ресурсы — <b>Кручинин А. Г.</b>;<br/>Визуализация — <b>Кручинин А. Г., Спирина М. Е.</b>;<br/>Написание, рецензирование и редактирование текста — <b>Кручинин А. Г.</b></p> | <p>Conceptualization — <b>Kruchinin A. G.</b>;<br/>Data curation — <b>Kruchinin A. G., Spirina M. E.</b>;<br/>Formal analysis — <b>Kruchinin A. G.</b>;<br/>Investigation — <b>Kruchinin A. G., Spirina M. E.</b>;<br/>Methodology — <b>Kruchinin A. G.</b>;<br/>Project administration — <b>Kruchinin A. G.</b>;<br/>Resources — <b>Kruchinin A. G.</b>;<br/>Visualization — <b>Kruchinin A. G., Spirina M. E.</b>;<br/>Writing — original draft, review &amp; editing — <b>Kruchinin A. G.</b></p> |
| <b>Конфликт интересов</b>   | <b>Conflict of interest</b>  |
| <p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.</p>   | <p>The authors declare no conflict of interest</p>   |