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

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418
https://elibrary.ru/DHXSAX

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Ферментативный гидролиз соевого белка

Д. В. Соколов, Б. А. Болхонов, С. Д. Жамсаранова, С. Н. Лебедева*, Б. А. Баженова

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

Поступила в редакцию: 13.01.2023
Принята после рецензирования: 31.01.2023
Принята к публикации: 07.02.2023

**С. Н. Лебедева: lebedeva1959@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-5664-6028*
Д. В. Соколов: https://orcid.org/0000-0002-1499-5841
Б. А. Болхонов: https://orcid.org/0000-0002-1822-4980
С. Д. Жамсаранова: https://orcid.org/0000-0002-0574-1575
Б. А. Баженова: https://orcid.org/0000-0001-7380-5959

© Д. В. Соколов, Б. А. Болхонов, С. Д. Жамсаранова, С. Н. Лебедева, Б. А. Баженова, 2023

Аннотация.
Соя занимает одно из первых мест среди источников растительного белка. Структурно модифицированные белки сои и продукты их переработки применяются при создании специализированных продуктов питания. Получение ферментативных гидролизатов пищевых белков, обладающих разной степенью гидролиза и функциональной активностью, является актуальным. Целью исследования стало определение оптимальных показателей двухстадийного процесса ферментативной конверсии соевого белка на основе математических методов планирования эксперимента, а также оценка антиоксидантной активности гидролизата.
Провели серию двухфакторных экспериментов в отношении максимального значения степени гидролиза соевого белкового изолята в присутствии ферментов (пепсина и трипсина). Изучили два параметра ферментативной конверсии соевого белка – время гидролиза и фермент-субстратное соотношение. Провели оптимизацию результатов с применением методологии поверхности отклика в профессиональной программе MathCad 15. Суммарная антиоксидантная активность гидролизата в процессе гидролиза была определена на хроматографе Цвет-Яуза-01-АА амперометрическим методом.
Установили оптимальные технологические параметры одностадийного гидролиза: при обработке пепсином – время 7 ч и соотношение фермент:субстрат 1:22, при обработке трипсином – время 7 ч и соотношение фермент-субстрат 1:30. В результате использования математических методов планирования эксперимента определили оптимальные параметры двухстадийного процесса ферментативного гидролиза соевого белка: первая стадия – гидролиз пепсином в течение 5 ч при соотношении фермент-субстрат 1:20, вторая стадия – гидролиз трипсином в течение 3 ч при соотношении фермент-субстрат 1:19. Получили гидролизат со степенью гидролиза 88 %. Наибольшая суммарная антиоксидантная активность отмечена через 5 ч гидролиза и составила около 250 мг/100 мл.
Полученный ферментативный гидролизат соевого белка может быть использован как компонент продуктов питания или кормовая добавка антиоксидантного действия. Полученные пептиды могут стать матрицей для иммобилизации эссенциальных микроэлементов (Zn, I и Se) и разработки поливалентного комплекса. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение остаточной антигенности гидролизата и других показателей его функциональной активности.

Ключевые слова. Соя, протеин, пепсин, трипсин, гидролизат, степень гидролиза, пептиды, антиоксидантная активность

Финансирование. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (РНФ) № 23-26-00058.

Для цитирования: Ферментативный гидролиз соевого белка / Д. В. Соколов [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 1. С. 86–96. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418
https://elibrary.ru/DHXSAX

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

Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein

Dmitry V. Sokolov, Bulat A. Bolkhonov, Sesegma D. Zhamsaranova, Svetlana N. Lebedeva*, Bayana A. Bazhenova

East Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia

Received: 13.01.2023
Revised: 31.01.2023
Accepted: 07.02.2023

**Svetlana N. Lebedeva: lebedeva1959@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-5664-6028*
Dmitry V. Sokolov: https://orcid.org/0000-0002-1499-5841
Bulat A. Bolkhonov: https://orcid.org/0000-0002-1822-4980
Sesegma D. Zhamsaranova: https://orcid.org/0000-0002-0574-1575
Bayana A. Bazhenova: https://orcid.org/0000-0001-7380-5959

© D.V. Sokolov, B.A. Bolkhonov, S.D. Zhamsaranova, S.N. Lebedeva, B.A. Bazhenova, 2023

Abstract.
Soy continues to be one of the top sources of vegetable protein. Structurally modified soy proteins and processed products are used as part of functional foods. Enzymatic hydrolysates of food proteins have different degrees of hydrolysis and functional profiles, hence the constant search for the optimal hydrolysis parameters. The present research objective was to design a two-stage enzymatic conversion process of soy protein using mathematical methods, as well as to evaluate the antioxidant properties of the hydrolysate in laboratory conditions.
Soy protein isolate was tested to define the maximal value of the hydrolysis degree. It underwent a series of two-factor experiments in the presence of pepsin and trypsin. The study focused on the hydrolysis time and the enzyme-substrate ratio. The results were optimized using the response surface methodology in MathCad 15. The total antioxidant activity of the hydrolysate during hydrolysis was determined on a Tsvet-Yauza-01-AA chromatograph using the amperometric method.
For the pepsin test, the processing time was 7 h and the enzyme-to-substrate ratio was 1:22. For the trypsin test, the time was 7 h and the ratio was 1:30. The mathematical modeling revealed the following optimal parameters. The first stage involved hydrolysis with pepsin for 5 h at an enzyme-to-substrate ratio of 1:20; the second stage involved hydrolysis with trypsin for 3 h at an enzyme-to-substrate ratio of 1:19. The resulting hydrolysate demonstrated 88% hydrolysis. The highest summary antioxidant activity was registered after 5 h of hydrolysis and amounted to about 250 mg/100 mL.
The resulting enzymatic hydrolysate of soy protein can be used as a food component or an antioxidant feed additive. The obtained peptides can immobilize essential microelements, e.g., Zn, I, and Se, as well as produce polyvalent complexes. Further studies will be aimed at the residual antigenicity of the hydrolysate and other functional indicators.

Keywords. Soy, protein, pepsin, trypsin, hydrolysate, degree of hydrolysis, peptides, antioxidant activity

Funding. The research was supported by the grant of the Russian Science Foundation (RSF) No. 23-26-00058.

For citation: Sokolov DV, Bolkhonov BA, Zhamsaranova SD, Lebedeva SN, Bazhenova BA. Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(1):86–96. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418

Введение

Актуальной проблемой для здоровья современного человека является развитие нарушений обмена веществ, т. н. метаболический синдром. Метаболический синдром формирует кластер метаболических нарушений, включая резистентность к инсулину, атерогенную дислипидемию, центральное ожирение и артериальную гипертензию, а также связан с нарушениями углеводного, липидного и пуринового обменов. Метаболический синдром способствует повышенному риску развития диабета и сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Наряду с использованием фармакологических средств в профилактике и терапии метаболического синдрома особая роль принадлежит изменению образа жизни, особенно диетических привычек [2]. Эффективность методов лечения и профилактики метаболического синдрома может быть повышена включением в персонализированную диетотерапию пищевых

продуктов, целенаправленно корригирующих те или иные нарушения за счет использования функциональных пищевых ингредиентов и биологически активных добавок различной природы, отвечающих современным требованиям безопасности и эффективности. Такие пищевые продукты относятся к категории специализированной пищевой продукции диетического профилактического и диетического лечебного питания [3, 4].

Среди растительных белков для целей диетической коррекции и профилактики широко используются белки сои. Соевые изоляты содержат более 80 % белка, отличаются высокой усвояемостью и оказывают гипохолестеринемическое и антиатерогенное действие. Из-за высокого содержания белка и универсальности соевые белки являются основным источником белков растительного происхождения и широко потребляются различными группами населения во всем мире. Соевый белок содержит хорошо сбалансированный аминокислотный состав (за исключением серосодержащих, таких как метионин), что делает его похожим на животный белок [5–7].

Актуальной является разработка продуктов питания специализированного назначения, включающих источник полноценного белка, которые не вызывают пищевую непереносимость, являются легкоусвояемыми и обладают хорошими органолептическими показателями. Исследования последних лет направлены на получение ферментативных гидролизатов пищевых белков, которые обладают разной степенью гидролиза и функциональной активностью [8]. По сравнению с кислотным и щелочным гидролизом ферментативный гидролиз предпочтителен, т. к. протекает в «щадящих» для белков условиях и с высокой скоростью [9]. В результате ферментативного гидролиза сохраняется максимально возможная питательная ценность и получается продукт с требуемой степенью гидролиза. Стоит учитывать, что ферменты обладают высокой избирательной способностью, поэтому необходим их предварительный подбор для осуществления направленного гидролитического воздействия на определенные химические связи в молекулах белка [10]. Ферментативный гидролиз белков такими протеазами, как пепсин, трипсин и химотрипсин повторяет естественный процесс их расщепления в организме при пищеварении [11]. Аминокислотный состав в гидролизате, полученном методом ферментативного гидролиза, идентичен аминокислотному составу исходного белка. По сравнению с нативными белками гидролизаты обладают такими преимуществами, как быстрое усваивание организмом, доступность для питания людей с различными нарушениями и заболеваниями органов пищеварения и отсутствие нативных белков, которые способны вызвать аллергенные реакции. Кроме того, гидролиз белков способствует модификации их функциональных свойств: растворимости, вязкости, пенообразования и эмульгирования, а также повышает их биологическую ценность [12].

Большое количество научных работ и патентных разработок посвящено получению ферментативных гидролизатов на основе белков коровьего молока (казеина, сывороточных белков и цельного белка), поскольку они обладают хорошей растворимостью в воде, сбалансированным составом аминокислот, хорошими органолептическими показателями и являются незаменимыми компонентами продуктов питания специализированного назначения. Большой интерес для исследований вызывают коммерчески доступные яичные белки и белки сои. Для яичных белков характерен сбалансированный аминокислотный состав, а для белков сои – гипоаллергенные, антиоксидантные и гипохолестеринемические свойства. На основании ряда исследований соевые гидролизаты рекомендованы для коррекции и профилактики нарушений липидного обмена и сердечно-сосудистых заболеваний, ожирения и т. д. [8, 13–17].

Актуальность приобретают разработки технологий получения ферментативных гидролизатов (ферментолизатов) белков с применением различных источников пищевого сырья. Эти технологии должны быть простыми в плане аппаратурного обеспечения и использовать коммерчески доступные и распространенные белковые субстраты и ферменты. Также они должны обеспечивать возможность изменения белковых субстратов для получения гидролизатов, которые будут обладать необходимыми специальными функциями (изготовление профилактических продуктов антиоксидантной, гипоаллергенной или иммуномодулирующей направленности), а также предназначены для питания лиц с проблемами функционирования желудочно-кишечного тракта, которые не связаны с аллергическими или другими заболеваниями [18].

Пептиды с короткой цепочкой абсорбируются в пищеварительном тракте быстрее и полнее, чем смеси свободных аминокислот [19]. Пептидные смеси, получаемые в процессе протеолиза, имеют преимущества, по сравнению со смесями свободных аминокислот: меньшую осмолярность, способность проявлять различную полезную биологическую активность при приеме с пищей или напитками, стимулировать активность ферментов пищеварения и увеличивать усвоение некоторых эссенциальных минеральных веществ [20]. Исследованиями установлено, что через энтероцитарный барьер кишечной стенки вместе с отдельными аминокислотами могут проходить и некоторые корот-

коцепочечные пептиды. При попадании в кровь последние могут проявлять различную биологическую активность [21]. В ряде исследований показано, что эффективность усвоения аминокислот из гидролизатов пептидов была более высокой, чем всасывание их аналогов из смесей свободных аминокислот [22]. Эти данные повышают интерес исследователей и производителей к технологиям получения белковых гидролизатов и их использования.

По результатам проведенных исследований одной из причин тяжелых хронических заболеваний человека называют окислительный стресс, в основе которого лежат накопление активных форм кислорода и дисбаланс между их образованием и нейтрализацией. Заболевания и расстройства, вызванные окислительным стрессом, включают сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, хроническую обструктивную болезнь легких, хроническую болезнь почек, рак и др. [23]. Окислительный стресс является основной причиной индукции клеточного апоптоза, повреждения тканей и патологических изменений в организме [24].

Вредное воздействие свободных радикалов, образующихся в результате окислительного стресса, можно снизить путем систематического употребления пищевых продуктов, напитков и БАД, обладающих высокой антиоксидантной активностью. Антиоксидантная способность пептидов, полученных из пищевых белков, в том числе растительных, путем ферментативной модификации, была описана в большом количестве исследований. Именно растительные белки рассматриваются как новый источник антиоксидантных пептидов, которые улучшают лечение заболеваний, связанных с окислительными процессами [9, 25, 26].

Клеточные исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что антиоксидантные биоактивные пептиды обладают клеточной антиоксидантной активностью, снижают биомаркеры окислительного стресса (например, перекисное окисление липидов, внутриклеточные уровни активных форм кислорода, апоптоз), повышают активность различных антиоксидантных ферментов и модулируют уровни антиоксидантных молекул [27]. Антиоксидантные пептиды действуют путем инактивации активных форм кислорода, поглощения свободных радикалов, хелатирования прооксидантных переходных металлов и стимулирования активности внутриклеточных антиоксидантных ферментов. Эти пептиды модулируют физиологические функции организма в зависимости от их первичной структуры, состава и последовательности аминокислот [28]. Большинство биоактивных пептидов, полученных из пищевых белков, имеют от 2 до 20 аминокислотных остатков, хотя описаны некоторые более длинные пептиды [29]. Антиоксидантные пептиды часто содержат гидрофобные остатки, такие как Leu или Val, некоторые остатки ароматических аминокислот (Phe, Try и Tyr) и имидазольные кольца His. Эти структуры считаются основой сильной антиоксидантной способности пептидов [30].

Интерес исследователей направлен на изучение антиоксидантной активности и отдельных аминокислот. Установлено, что серосодержащие аминокислоты, например, цистеин, метионин и таурин, обладают антиоксидантным действием [31]. В исследовании J. Liu и др. было изучено антиоксидантное действие 20 аминокислот. Высокие показатели отмечены для Tyr, Trp, Cys, Lys, His, Arg, Val, Phe и Met. Между аминокислотами был отмечен антиоксидантный синергетический эффект, который можно использовать для подавления окислительного стресса [32].

Несмотря на достигнутый успех в выделении и идентификации биоактивных пептидов, доступная информация связана с лабораторными данными и наличием ограниченного количества клинических испытаний для обоснования их производства и использования в качестве нутрицевтиков или функциональных пищевых компонентов. Будущие исследования должны быть сосредоточены на крупномасштабном коммерческом производстве антиоксидантных пептидов, полученных из различных белков, изучении взаимосвязи их структуры и активности, глубоком понимании антиоксидантного механизма и проверке их эффективности для здоровья человека в естественных условиях [25].

Таким образом, получение экзогенных средств антиоксидантной направленности (в том числе гидролизатов различных белковых субстратов) является актуальным. Антиоксиданты в организме способствуют снижению уровня повреждения тканей, ускорению процесса выздоровления и противостоянию различным заболеваниям, а также увеличивают продолжительность жизни.

В работе С. Д. Жамсарановой и др. представлено получение ферментативного гидролизата соевого белка и проведено его хроматографирование методом гель-фильтрации, а также определена суммарная антиоксидантная активность полученных трех основных фракций (высоко-, средне- и низкомолекулярной) [33].

Целью настоящего исследования стало определение оптимальных показателей двухстадийного процесса ферментативной конверсии соевого белка на основе математических методов планирования эксперимента и антиоксидантной активности гидролизата в процессе гидролиза.

Объекты и методы исследования

Объектом для получения пептидов стал протеин соевый (изолят, Китай). Для проведения ферментативной конверсии соевого белка были

использованы ферментные препараты: пепсин говяжий из слизистых оболочек желудка свиней (ТУ 9219-564-00419779-2000) и трипсин из поджелудочной железы крупного рогатого скота (Spofa, Чехия).

Гидролиз соевого белка пепсином проводили в 0,1 М HCl (pH = 1,6). При проведении 2-ой стадии гидролиза (гидролиз трипсином) изменяли pH реакционной смеси до 7,8 добавлением 10 % NaOH.

Содержание аминного азота в негидролизованном сырье и белковом гидролизате определяли методом формольного титрования (метод Серенса) (ОФС.1.2.3.0022.15). Сущность метода состоит в защите формальдегидом свободных аминогрупп (образование оснований Шиффа) и алкалиметрическом титровании эквивалентного количества карбоксильных групп.

Концентрацию общего азота определяли с реактивом Несслера по ОФС. 1.7.2.0027.15. Метод основан на способности реактива Несслера давать цветную реакцию с ионами аммония, которые образуются после минерализации белковых продуктов.

Протеолитическую активность ферментных препаратов определяли по ГОСТ 34430-2018. Количество белка, превращенного в низкомолекулярные пептиды и аминокислоты, определяли по реакции свободных аминокислот с реактивом Фолина и измерению оптической плотности на фотоэлектроколориметре при длине световой волны λ = 670 нм.

Степень гидролиза (СГ) белка определяли по формуле:

$$\text{СГ} = \frac{\left(N_{\text{АА}} - N_{\text{АА}_{\text{о}}}\right)}{\left(N_{\text{ОА}} - N_{\text{АА}_{\text{о}}}\right)} \times 100\ \% \qquad (1)$$

где $N_{\text{ОА}}$ – содержание общего азота, %; $N_{\text{АА}_{\text{о}}}$ – содержание азота в негидролизованном сырье, %; $N_{\text{АА}}$ – содержание аминного азота в гидролизате после гидролиза в течение некоторого периода времени, %.

Обработку результатов экспериментов по оптимизации параметров ферментативного гидролиза осуществляли с использованием стандартных программ MS Excel и Mathcad 15. Математическое планирование эксперимента проводили в соответствии с композиционным планом двухфакторного эксперимента на трех уровнях [34]. Для получения коэффициентов уравнения регрессии применили профессиональную программу обработки данных Statistica 10. На основании полученных регрессионных уравнений строились графические зависимости параметров отклика от исследуемых факторов. Значения функции желательности рассчитывали по значениям функции отклика с использованием формулы Харрингтона [35].

Суммарную антиоксидантную активность гидролизата оценивали на хроматографе Цвет-Яуза-01-АА (НПО «Химавтоматика», Москва) амперометрическим методом [36]. Массовую концентрацию антиоксидантов определяли с использованием градуировочного графика зависимости выходного сигнала от концентрации кверцетина. Сущность данного метода заключается в измерении силы тока, который возникает при окислении антиоксидантных молекул на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале, преобразующегося в цифровой сигнал после усиления.

Экспериментальные данные обрабатывали с применением расчета средних значений (M), стандартной ошибки среднего (m) и параметрического критерия оценки (t-критерия Стьюдента). Результаты считали достоверными при достижении уровня значимости различий ($p \leq 0{,}05$).

Результаты и их обсуждение

Для исследования выбрали ферментные препараты пепсин и трипсин, поскольку они являются доступными на российском рынке и относительно не дорогими. Еще одним фактором в пользу их выбора послужило то, что они повторяют естественный процесс расщепления в организме при пищеварении. По своей субстратной специфичности они являются протеазами (эндопептидазами), катализирующими гидролиз внутренних пептидных связей (пепсин – в желудке, трипсин – в кишечнике).

Чтобы оптимизировать процесс ферментативного гидролиза соевого белка, необходимо было получить экспериментальные данные и определить протеолитическую активность выбранных ферментных препаратов (ед/г): пепсин – 198,3, трипсин – 1150.

Для оценки эффективности ферментов степень гидролиза протеина определяли по динамике накопления аминного азота. Гидролиз пепсином проводили в следующих условиях: pH = 1,6 и t = 39 °C с разным фермент-субстратным соотношением: 1:30, 1:20 и 1:10. Продолжительность гидролиза составила от 1 до 5 ч. Гидролиз трипсином проводили в следующих условиях: pH = 7,8 и t = 39 °C с разным фермент-субстратным соотношением: 1:30, 1:20 и 1:10. Продолжительность гидролиза составила от 1 до 5 ч.

Полученные экспериментальные данные, отражающие степень гидролиза белка сои ферментами пепсин и трипсин, представлены в таблице 1.

Как следует из представленных данных, во всех трех вариантах гидролиза соевого белка пепсином наблюдалось достоверное увеличение степени его гидролиза. Наибольшее значение получено для второго варианта (фермент-субстратное соотношение 1:20) при продолжительности процесса 5 ч.

Во всех трех вариантах гидролиза соевого белка трипсином наблюдалось достоверное уве-

Таблица 1. Динамика степени гидролиза соевого белка пепсином и трипсином (M ± m)

Table 1. Soy protein hydrolysis with pepsin and trypsin (M ± m)

Время гидролиза, ч	Степень гидролиза, %					
	пепсином			трипсином		
	1 вариант (1:30)	2 вариант (1:20)	3 вариант (1:10)	1 вариант (1:30)	2 вариант (1:20)	3 вариант (1:10)
1	24,22 ± 0,10	27,85 ± 0,15	31,48 ± 0,18	24,22 ± 0,31	31,48 ± 0,39	15,74 ± 0,36
3	36,33 ± 0,46*1	43,59 ± 0,28*1	43,59 ± 0,45*1	31,48 ± 0,47*1	36,33 ± 0,50*1	39,96 ± 0,44*1
5	55,70 ± 0,53*1,3	60,50 ± 0,90*1,3	54,49 ± 0,71*1,3	55,70 ± 0,58*1,3	48,44 ± 0,71*1,3	48,44 ± 0,75*1,3

*1, *1,3 – различия достоверны относительно 1-го или 3-х часового процесса гидролиза соответственно ($p \leq 0,05$).

*1, *1,3 – differences are significant relative to the one- or three-hour hydrolysis process, respectively ($p \leq 0.05$).

Таблица 2. Динамика степени гидролиза трипсином при двухстадийном процессе (M ± m)

Table 2. Two-stage soy protein hydrolysis by trypsin (M ± m)

Время, ч	Степень гидролиза, %		
	1 вариант (1:30)	2 вариант (1:20)	3 вариант (1:10)
1	68,06 ± 0,55	70,56 ± 0,78	65,23 ± 0,75
2	79,18 ± 0,68*1	84,96 ± 0,81*1	74,58 ± 0,82*1
3	82,64 ± 0,76*1,2	88,22 ± 0,85*1,2	80,74 ± 0,85*1,2

*1, *1,2 – различия достоверны относительно 1-го или 2-х часового процесса гидролиза соответственно ($p \leq 0,05$).

*1, *1,2 – differences are significant relative to the one- or two-hour hydrolysis process, respectively ($p \leq 0.05$).

Таблица 3. Уровни изучаемых факторов

Table 3. Factor levels

Фактор	Уровень		
	1	2	3
X_1, Продолжительность гидролиза, ч	1	3	5
X_2, Фермент-субстратное соотношение	1:10	1:20	1:30

Таблица 4. Уровни изучаемых факторов при двухстадийном гидролизе сначала пепсином 5 ч (при фермент-субстратном соотношении 1:20), а затем трипсином 3 ч

Table 4. Factor levels during two-stage hydrolysis: with pepsin for 5 h at an enzyme-substrate ratio of 1:20 and with trypsin for 3 h

Фактор	Уровень		
	1	2	3
X_1, Продолжительность гидролиза трипсином, ч	1	2	3
X_2, Фермент-субстратное соотношение	1:10	1:20	1:30

личение степени его гидролиза. Наибольшее значение отмечено для первого варианта гидролиза (фермент-субстратное соотношение 1:30) при продолжительности процесса 5 ч.

С целью увеличения степени гидролиза и разработки двухстадийного процесса было проведено последовательное внесение выбранных ферментов: сначала вносили пепсин, потом – трипсин при соотношении фермент-субстрат 1:30, 1:20 и 1:10. Одновременный вариант внесения ферментов не рассматривался, т. к. условия оптимальной активности данных протеаз (значения pH) разные [37].

При двухстадийном процессе гидролиз соевого протеина сначала проводили пепсином в течение 5 ч при фермент-субстратном соотношении 1:20 (табл. 1), затем – трипсином в течение 3-х ч. Полученные данные двухстадийного процесса гидролиза представлены в таблице 2.

Как следует из данных, представленных в таблице 3, использование двухстадийного процесса гидролиза способствовало достоверному увеличению его степени до максимального значения (88,22 %) во втором варианте: при последовательном внесении пепсина (фермент-субстратное соотношение 1:20) в течение 5 ч, а затем трипсина (фермент-субстратное соотношение 1:20) в течение 3 ч.

На основании полученных данных для оптимизации ферментативного гидролиза соевого белка использовали факторные эксперименты с применением математических методов.

Основными параметрами оптимизации явились время гидролиза и соотношение фермент: субстрат.

Результаты двухфакторного эксперимента. На основании запланированных уровней изучаемых факторов (табл. 3 и 4) была разработана матрица для двухфакторного эксперимента, с использованием которой было проведено 9 опытов. При составлении данной структуры матрицы было учтено, что при выполнении экспериментов каждый уровень любого фактора встречается с каждым уровнем всех остальных факторов только один раз.

Результаты регрессионного анализа функции отклика. С целью получения функции отклика была проведена множественная нелинейная регрессия с

помощью полинома второго порядка в программе Statistica 10 и получены уравнения 2–4.

Функция отклика, характеризующая степень гидролиза пепсином:

$$Y(X_1, X_2) = 0,301X_1^2 - 301,167X_2^2 + \\ + 5,457X_1 + 700,617X_2 - 382,96 \quad (2)$$

Функция отклика, характеризующая степень гидролиза трипсином:

$$Y(X_1, X_2) = 0,353X_1^2 - 282,667X_2^2 + \\ + 4,62X_1 + 690,5X_2 - 400,857 \quad (3)$$

Функция отклика, характеризующая степень гидролиза пепсином и трипсином:

$$Y(X_1, X_2) = -3,655X_1^2 - 617,5X_2^2 + \\ + 22,618X_1 + 1497,55X_2 - 854,747 \quad (4)$$

Оценка качества уравнений регрессии представлена в таблице 6.

Из показателей, приведенных в таблице 6, следует, что полученные уравнения регрессии обладают высокой точностью и статистически надежны.

На рисунке 1 представлено сравнение наблюдаемых и предсказанных значений, из которого следует их высокая корреляция.

Результаты решения экстремальной задачи. Для нахождения максимального значения функции отклика и соответствующих ему значений факторов была выполнена стандартная процедура нахождения максимума функции двух переменных при условиях ограниченной области определения. В процессе решения экстремальной задачи были получены данные, представленные в таблице 7.

Влияние технологических параметров на степень гидролиза ферментными препаратами можно оценить при использовании контуров «желательности» в зависимости от значений этих факторов. Значения функции желательности рассчитывали по значениям функции отклика с использованием формулы Харрингтона [35]. В основе построения этой обобщенной функции лежит идея преобразования натуральных значений частных откликов в безразмерную шкалу желательности или предпочтительности. Назначение шкалы желательности – это установление соответствия между числовыми параметрами и их оценкой. Под числовыми параметрами понимаются возможные отклики, характеризующие функционирование исследуемого объекта, а под их оценкой – субъективные оценки экспериментатора желательности (предпочтительности) того иного значения отклика (табл. 8). Значение d = 0,37 используется в качестве границы допустимых значений.

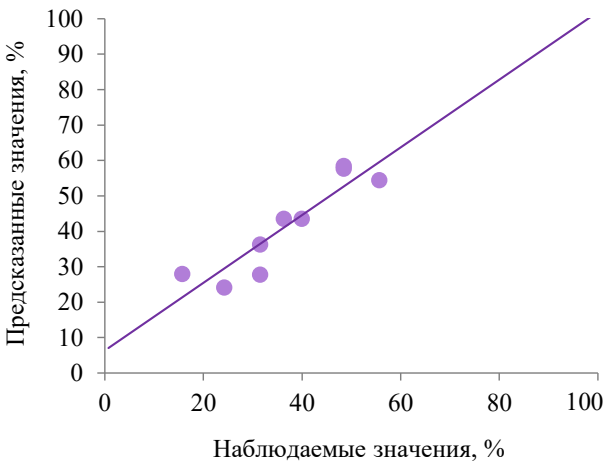

Рисунок 1. Сравнение наблюдаемых и предсказанных значений (степень гидролиза, %)

Figure 1. Experimental vs. predicted values (hydrolysis degree, %)

Полученные контуры желательности процессов гидролиза пепсином и трипсином, а также двухстадийный гидролиз, в зависимости от продолжительности гидролиза и фермент-субстратного соотношения, представлены на рисунках 2–4. Как следует из данных рисунков, максимальный уровень показателей находится в допустимом и достаточном уровне желательности. Чем больше значение y функции желательности, тем выше степень гидролиза соевого белка (значение функции отклика *Y* в точке максимума, табл. 7).

На основании полученных экспериментальных и расчетных данных следует, что с использованием математических методов планирования эксперимента

Таблица 6. Оценка качества уровней регрессии

Table 6. Quality of regression levels

Показатели качества уравнения регрессии	Гидролиз пепсином	Гидролиз трипсином	Двухстадийный гидролиз
Индекс множественной корреляции	$R = 0,987$	$R = 0,967$	$R = 0,9922$
Коэффициент детерминации	$R^2 = 0,974$	$R^2 = 0,935$	$R^2 = 0,984$
Критерий Фишера	$F = 38,67$ $p < 0,002$	$F = 30,12$ $p < 0,002$	$F = 63,88$ $p < 0,001$

Таблица 7. Результаты решения экстремальных задач

Table 7. Extremum problems

Ферменты	Значение факторов в точке максимума	Значение функции отклика в точке максимума, %
Пепсин	X_1 = 7 ч, X_2 = 1:22	Y = 77,631
Трипсин	X_1 = 7 ч, X_2 = 1:30	Y = 79,92
Пепсин (5 ч, фермент-субстратное соотношение 1:20) + трипсин	X_1 = 3 ч, X_2 = 1:19	Y = 88,275

Таблица 8. Числовые интервалы шкалы Харрингтона

Table 8. Numerical intervals of the Harrington scale

Лингвистическая оценка	Интервалы значений функции желательности d(x)	Практическая характеристика уровня
Очень хорошо	1,00–0,80	Допустимый и превосходный уровень
Хорошо	0,80–0,63	Допустимый и хороший уровень
Удовлетворительно	0,63–0,37	Допустимый и достаточный уровень
Плохо	0,37–0,20	Недопустимый уровень
Очень плохо	0,20–0,00	Недопустимый уровень

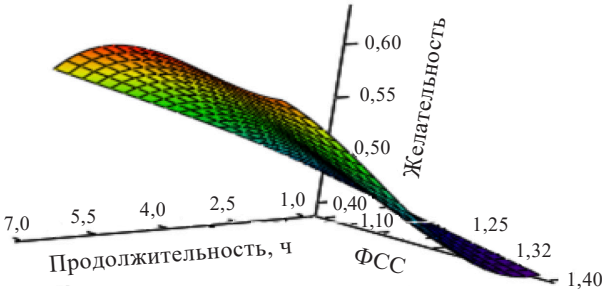

Рисунок 2. Контур желательности степени гидролиза пепсином в зависимости от продолжительности процесса и фермент-субстратного соотношения (ФСС)

Figure 2. Effect of processing time and enzyme-to-substrate ratio on hydrolysis with pepsin: desirability loop

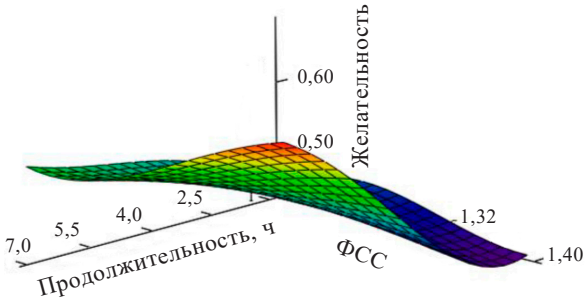

Рисунок 3. Контур желательности степени гидролиза трипсином в зависимости от продолжительности процесса и фермент-субстратного соотношения (ФСС)

Figure 3. Effect of processing time and enzyme-to-substrate ratio on hydrolysis with trypsin: desirability loop

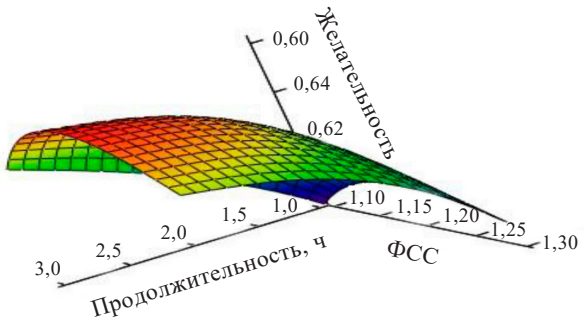

Рисунок 4. Контур желательности степени двухстадийного гидролиза сначала пепсином и затем трипсином в зависимости от продолжительности процесса и фермент-субстратного соотношения (ФСС)

Figure 4. Effect of processing time and enzyme-to-substrate ratio on two-stage hydrolysis with pepsin and trypsin

были определены оптимальные показатели двухстадийного процесса ферментативной конверсии соевого белка с высокой степенью гидролиза субстрата. Сначала осуществляли гидролиз пепсином продолжительностью 5 ч при соотношении фермент-субстрат 1:20, а затем трипсином продолжительностью 3 ч при фермент-субстратном соотношении 1:19.

Как было отмечено ранее, гидролизаты пищевых белков обладают целым спектром биологических активностей, в том числе антиоксидантными свойствами [18]. Была определена динамика изменения суммарной антиоксидантной активность гидролизата в процессе двухстадийного гидролиза. Полученные данные представлены на рисунке 5.

Как следует из рисунка 5, показатели суммарной антиоксидантной активности носили нелинейный характер. Наибольшая антиоксидантная активность

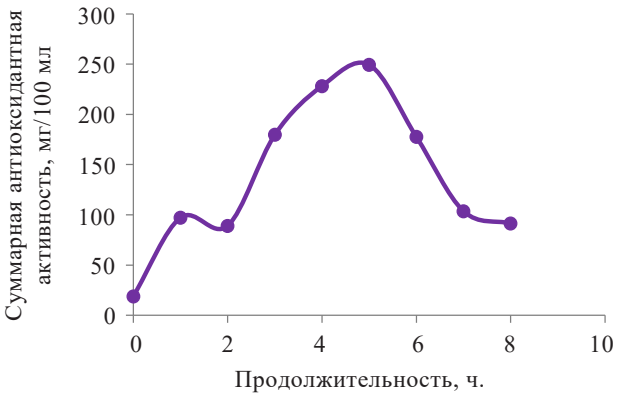

Рисунок 5. Динамика суммарной антиоксидантной активности соевого гидролизата в процессе двухстадийного гидролиза

Figure 5. Total antioxidant activity of soy hydrolyzate in the process of two-stage hydrolysis

была отмечена через 5 ч процесса ферментативного гидролиза и составила около 250 мг/100 мл.

Таким образом, использование оптимизированного двухстадийного ферментолиза позволило получить гидролизат с высокой степенью гидролиза белка (88 %), т. н. «глубокий гидролизат» [13].

Как следует из литературных данных, для получения ферментативных гидролизатов применяется целый ряд ферментов и коммерческих препаратов различного происхождения (животного, микробного или грибкового) [12–14]. Они позволяют получить гидролизаты разной степени гидролиза (в среднем от 40 до 80 %). Выбранные в исследовании протеазы пепсин и трипсин и двухстадийный процесс ферментолиза, повторяющий «естественный» процесс переваривания белка в организме человека, позволил получить гидролизат с высокой степенью гидролиза, который обладает антиоксидантной активностью.

Полученный гидролизат может быть использован в различных направлениях. Если целью будет являться получение ингредиента (компонент продукта или кормовая добавка) антиоксидантной направленности, то гидролиз может быть ограничен только 5 ч (практически – только гидролиз пепсином). Для получения гидролизата с высокой степенью гидролиза белка наиболее приемлем апробированный авторами двухстадийный процесс. Полученные пептиды также могут стать матрицей для иммобилизации эссенциальных микроэлементов (Zn, I и Se) и разработки поливалентного комплекса.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение других показателей функциональной активности полученного гидролизата, а именно его остаточной антигенности. Такой гидролизат будет перспективен в качестве пищевого ингредиента функциональных продуктов питания гипоаллергенной и антиоксидантной направленности.

Выводы

В ходе проведенных экспериментов и обработки данных выявили факторы, способствующие интенсификации ферментативной конверсии соевого белка, и выбрали оптимальные параметры процесса. При одностадийном процессе в условиях гидролиза пепсином оптимальная продолжительность процесса составила 7 ч, фермент-субстратное соотношение – 1:22. При гидролизе трипсином оптимальная продолжительность составила 7 ч, фермент-субстратное соотношение – 1:30.

Для двухстадийного процесса ферментолиза оптимальными параметрами стали: сначала гидролиз пепсином продолжительностью 5 ч при соотношении фермент-субстрат 1:20, а затем трипсином продолжительностью 3 ч при фермент-субстратном соотношении 1:19.

Использование оптимизированного двухстадийного ферментолиза позволило получить гидролизат с высокой степенью гидролиза белка (88 %).

Изменение показателей суммарной антиоксидантной активности в процессе гидролиза носило нелинейный характер. Наибольшая антиоксидантная активность отмечена через 5 ч процесса гидролиза и составила около 250 мг/100 мл.

Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Идея и анализ принадлежат С. Д. Жамсарановой. С. Н. Лебедева, Б. А. Баженова, Д. В. Соколов и Б. А. Болхонов собрали данные, провели анализ и написали статью.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в связи с публикацией этой статьи.

Contribution

All authors participated in the work in a substantial way and are prepared to take public responsibility for the work and manuscript contents. S.D. Zhamsaranova designed the research and analysis. S.N. Lebedeva, B.A. Bazhenova, D.V. Sokolov, and B.A. Bolkhonov collected the data, analyzed the results, and wrote the manuscript.

Conflict of interest

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

References/Список литературы

1. Fahed G, Aoun L, Zerdan MB, Allam S, Zerdan MB, Bouferraa Y, *et al.* Metabolic syndrome: Updates on pathophysiology and management in 2021. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(2). https://doi.org/10.3390/ijms23020786

2. Castro-Barquero S, Ruiz-León AM, Sierra-Pérez M, Estruch R, Casas R. Dietary strategies for metabolic syndrome: A comprehensive review. Nutrients. 2020;12(10). https://doi.org/10.3390/nu12102983

3. Vorobyeva VM, Vorobyeva IS, Kochetkova AA, Mazo VK, Zorin SN, Sharafetdinov KhKh. Specialised hypocholesteremic foods: Ingredients, technology, effects. Foods and Raw Materials. 2020;8(1):20–29. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-20-29

4. Sadovoy VV, Shchedrina TV, Trubina IA, Morgunova AV, Franko EP. Cooked sausage enriched with essential nutrients for the gastrointestinal diet. Foods and Raw Materials. 2021;9(2):345–353. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-345-353.

5. Sui X, Zhang T, Jiang L. Soy protein: Molecular structure revisited and recent advances in processing technologies. Annual Review of Food Science and Technology. 2021;12:119–147. https://doi.org/10.1146/annurev-food-062220-104405

6. Zhang T, Dou W, Zhang X, Zhao Y, Zhang Y, Jiang L, *et al.* The development history and recent updates on soy protein-based meat alternatives. Trends in Food Science and Technology. 2021;109:702–710. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.060

7. Qin P, Wang T, Luo Y. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. Journal of Agriculture and Food Research. 2022;7. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265

8. Wu Y-HS, Chen Y-C. Trends and applications of food protein-origin hydrolysates and bioactive peptides. Journal of Food and Drug Analysis. 2022;30(2):172–184. https://doi.org/10.38212/2224-6614.3408

9. Ewert J, Eisele T, Stressler T. Enzymatic production and analysis of antioxidative protein hydrolysates. European Food Research and Technology. 2022;248:2167–2184. https://doi.org/10.1007/s00217-022-04022-x

10. Agarkova EYu, Kruchinin AG. Enzymatic conversion as a method of producing biologically active peptides. Vestnik of MSTU. Scientific Journal of Murmansk State Technical University. 2018;21(3):412–419. https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419

11. Cruz-Casas DE, Aguilar CN, Ascacio-Valdés JA, Rodríguez-Herrera R, Chávez-González ML, Flores-Gallegos AC. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. Food Chemistry: Molecular Sciences. 2021;3. https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047

12. Sviridenko YuYa, Myagkonosov DS, Abramov DV, Ovchinnikova EG. Theoretical and practical aspects of development technology of manufacturing protein hydrolyzates for special nutrition use. Part 1. Technology of production and technical characteristics of hydrolysates. Food Industry. 2017;(5):48–51. (In Russ.). [Научно-методические подходы к развитию технологии белковых гидролизатов для специального питания. Часть 1. Технология производства и технические характеристики гидролизатов / Ю. Я. Свириденко [и др.] // Пищевая промышленность. 2017. № 5. С. 48–51.].

13. Zorin SN. Enzymatic hydrolysates of food proteins for specialized foods for therapeutic and prophylactic nutrition. Problems of Nutrition. 2019;88(3):23–31. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10026

14. Sidorova YuS, Mazo VK, Kochetkova AA. Experimental evaluation of hypolipidemic properties of soy and rice proteins and their enzyme hydrolysates. Problems of Nutrition. 2018;87(2):77–84. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10021

15. Grishin DV, Podobed OV, Gladilina YuA, Pokrovskaya MV, Aleksandrova SS, Pokrovsky VS, *et al.* Bioactive proteins and peptides: Current state and new trends of practical application in the food industry and feed production. Problems of Nutrition. 2017;86(3):19–31. (In Russ.). [Биоактивные белки и пептиды: современное состояние и новые тенденции практического применения в пищевой промышленности и кормопроизводстве / Д. В. Гришин [и др.] // Вопросы питания. 2017. Т. 86. № 3. С. 19–31.].

16. Caponio GR, Wang DQ-H, Di Ciaula A, De Angelis M, Portincasa P. Regulation of cholesterol metabolism by bioactive components of soy proteins: Novel translational evidence. International Journal of Molecular Sciences. 2020;22(1). https://doi.org/10.3390/ijms22010227

17. Ashaolu TJ. Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: A review. International Journal of Food Science and Technology. 2020;55(2):421–428. https://doi.org/10.1111/ijfs.14380

18. Nasri M. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A Review. Advances in Food and Nutrition Research. 2017;81:109–159. https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003

19. Morgan PT, Breen L. The role of protein hydrolysates for expertise-induced skeletal muscle recovery and adaptation: A current perspective. Nutrition and Metabolism. 2021;18(44). https://doi.org/10.1186/s12986-021-00574-z

20. Kim M-S, Kim B, Park H, Ji Y, Holzapfel W, Kim D-Y, *et al.* Longterm fermented soybean paste improves metabolic parameters associated with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018;495(2):1744–1751. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.003

21. Tutelian VA, Khavinson VKh, Ryzhak GA, Linkova NS. Short peptides as components of nutrition: Molecular bases of gomeostasis regulation. Uspekhi Sovremennoi Biologii. 2014;134(3):227–235. (In Russ.). [Короткие пептиды как компоненты питания: молекулярные основы регуляции гомеостаза / В. А. Тутельян [и др.] // Успехи современной биологии. 2014. Т. 134. №3. С. 227–235.].

22. Yu YM, Fukagawa NK. Protein and amino acid. In: Marriott BP, Birt DF, Stallings VA, Yates AA, editors. Present knowledge in nutrition. Volume 1: Basic nutrition and metabolism. Academic Press; 2020. pp. 15–35. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-66162-1.00002-0

23. Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, *et al.* Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives. Cells. 2022;11(3). https://doi.org/10.3390/cells11030552

24. Lv R, Dong Y, Bao Z, Zhang S, Lin S, Sun N. Advances in the activity evaluation and cellular regulation pathways of food-derived antioxidant peptides. Trends in Food Science and Technology. 2022;122:171–186. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.026

25. Wen C, Zhang J, Zhang H, Duan Y, Ma H. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. Trends in Food Science and Technology. 2020;105:308–322. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019

26. Montesano D, Gallo M, Blasi F, Cossignani L. Biopeptides from vegetable proteins: New scientific evidences. Current Opinion in Food Science. 2020;31:31–37. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.008

27. Aguilar-Toalá JE, Liceaga AM. Cellular antioxidant effect of bioactive peptides and molecular mechanisms underlying: Beyond chemical properties. International Journal of Food Science and Technology. 2020;56(5):2193–2204. https://doi.org/10.1111/ijfs.14855

28. Elam E, Feng J, Lv Y-M, Ni Z-J, Sun P, Thakur K, *et al.* Recent advances on bioactive food derived anti-diabetic hydrolysates and peptides from natural resources. Journal of Functional Foods. 2021;86. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104674

29. Daroit DJ, Brandelli A. In vivo bioactivities of food protein-derived peptides – a current review. Current Opinion in Food Science. 2021;39:120–129. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.002

30. Nwachukwu ID, Aluko RE. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. Journal of Food Biochemistry. 2019;43(1). https://doi.org/10.1111/jfbc.12761

31. Kim J-H, Jang H-J, Cho W-Y, Yeon S-J, Lee C-H. In vitro antioxidant actions of sulfur-containing amino acids. Arabian Journal of Chemistry. 2020;13(1):1678–1684. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.12.036

32. Liu J, Zhang D, Zhu Y, Wang Y, He S, Zhang T. Enhancing the *in vitro* Antioxidant Capacities via the interaction of amino acids. Emirates Journal of Food and Agriculture. 2018;30(3):224–231. https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i3.1641

33. Zhamsaranova SD, Lebedeva SN, Bolkhonov BA, Sokolov DV. Enzymatic food protein conversion and assessment of antioxidant activity of peptides. Bulletin of ESSTUM. 2021;83(4):5–14. (In Russ.). https://doi.org/ 10.53980/24131997_2021_4_5

34. Babin AV, Rakipov DF. Organization and mathematical planning of the experiment. Ekaterinburg: Ural Federal University; 2014. 113 p. (In Russ.). [Бабин А. В., Ракипов Д. Ф. Организация и математическое планирование эксперимента. Екатеринбург: УрФУ, 2014. 113 с.].

35. Dorovskikh VI, Milushev RK, Shulaev GM, Zharikov VS. Using a generic function the Harrington's desirability in the evaluation of quality of feed additives. Science in the Central Russia. 2020;45(3):79–85. (In Russ.). https://doi.org/10.35887/2305-2538-2020-3-79-85

36. Yashin AYa, Yashin YaI, Chernousova NI, Pakhomov VP. TsvetYauza-01AA: A new device for the determination of antioxidants in medicines, dietary supplements, foods, and drinks. Moscow: NPO "Khimavtomatika": 2005. 100 p. (In Russ.). [Новый прибор для определения антиоксидантов в лекарственных препаратах, биологически активных добавках, пищевых продуктах и напитках ЦветЯуза-01АА / А. Я. Яшин [и др.]. М.: НПО «Химавтоматика», 2005. 100 с.].

37. Milentyeva IS, Davydenko NI, Rasshchepkin AN. Casein proteolysis in bioactive peptide production: Optimal operating parameters. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(4):726–735. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-726-735