

КОМПЛЕКСЫ СУКЦИНИЛИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С ПЕПТИДАМИ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА

Т.Н. Головач¹, В.П. Курченко¹, Р.В. Романович¹, М.П. Бондаренко¹, Е.И. Тарун²

¹ Белорусский государственный университет (БГУ), Минск, Беларусь

² Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь

Введение. Коровье молоко представляет собой уникальную поликомпонентную белковую систему. Пищевая и биологическая ценность белков казеиновой и сывороточной фракций обусловлена специфичностью аминокислотного состава, высокой усвояемостью в желудочно-кишечном тракте человека [1–3]. Вместе с тем, коровье молоко содержит ряд белков, обладающих высоким аллергенным потенциалом (β -лактоглобулин, казеин). Для снижения аллергенных свойств и повышения питательной ценности белков молока применяют ряд технологических приемов: гидролиз ферментными препаратами, термоденатурацию, микроволновое воздействие и др. [4, 5].

Белковый компонент молока относят к перспективным источникам получения гидролизатов с глубокой степенью гидролиза. Однако глубокие ферментативные гидролизаты имеют выраженный горький вкус, что ограничивает их применение в пищевой промышленности [6–8].

Увеличение производства молочных продуктов приводит к росту количества отходов переработки, в частности объема получаемой молочной сыворотки. Для наиболее полного и рационального использования сыворотки молока применимы технологии, основанные на выделении белка с использованием анионных и катионных полисахаридов [9, 10]. Поликатионный характер хитозана обуславливает его активное применение для разделения молока на белковую и безбелковую фракции, а также для фракционирования белков сыворотки молока [11].

Связывание двух биополимеров «белки молока – хитозан» обусловлено взаимодействием разноименных зарядов макромолекул. Процесс образования электростатических комплексов представляется как последовательное присоединение лигандов (макроионы белков сыворотки молока и казеина) к ядру комплекса (макроион хитозана). После присоединения лигандов заряд комплекса понижается, что впоследствии приводит к формированию электронейтрального биокомпозита, состоящего из хитозана и белков молока [10, 12].

Актуальность исследования связана с установлением влияния комплексообразования с хитозаном и его производными на физико-химические, органолептические и биологически активные свойства пептидов молока.

Цель работы – изучить физико-химические и органолептические показатели, антиоксидантное действие комплексов сукцинированного хитозана с пептидами сыворотки молока.

Материалы и методы. В работе использовали сукцинированный хитозан (СХТ) производства ЗАО «Биопрогресс» (степень ацетилирования 98 %, степень замещения – 75,1 %); гидролизат сывороточных белков (ГСБ) Peptigen IF 3080 WPH с массовой долей белка 80 % (Arla Foods Ingredients Group, Дания).

В эксперименте 1 к 0,1 % раствору СХТ (50 мл) добавляли 15 % раствор ГСБ в количестве 250 мкл и интенсивно перемешивали. Всего произвели 20 циклов внесения гидролизата, что в итоге составило 5 мл раствора ГСБ. После каждого добавления определяли активную кислотность и оптическую плотность растворов СХТ–ГСБ.

В эксперименте 2 готовили растворы, содержащие 0,25 % ГСБ и 0,005–0,1 % СХТ (20 образцов с растворами СХТ–ГСБ). Полученные образцы тщательно перемешивали, затем определяли pH и оптическую плотность ($\lambda = 640$ нм) растворов СХТ–ГСБ.

Оценку органолептических свойств полученных жидких образцов проводили согласно методике, описанной в работе [13]. В качестве контроля при дегустации использовали растворы гидролизата сывороточных белков и сукцинированного хитозана.

Для определения антиоксидантной активности (АОА) опытных образцов применяли флуориметрический метод, основанный на измерении уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ) при его связывании с кислородными радикалами [14]. Строили графики зависимости интенсивности флуоресценции от содержания сухого вещества и белка в анализируемых образцах.

Согласно полученному уравнению рассчитывали концентрацию пробы IC_{50} , соответствующую 50 % ингибированию флуоресценции. Результаты независимых экспериментов представлены как среднее арифметическое значение $\pm$ доверительный интервал.

Результаты и их обсуждение

Для получения комплексов с сукцинилированным хитозаном использовали глубокий гидролизат сывороточных белков молока Peptigen IF 3080 WPH с выраженным горьким вкусом, что обусловлено высокой степенью расщепления белковых субстратов, коррелирующей с образованием специфических «горьких» пептидов.

Изучен процесс взаимодействия сукцинилированного хитозана с различным количеством гидролизата. При увеличении доли пептидов в растворе 0,1 % СХТ установлено снижение активной кислотности среды с 7,5 до 6,75 ед. рН, что отражено на рисунке 1. По данным рН-метрии точка эквивалентности СХТ достигается при содержании гидролизата 0,22–0,29 %. Вместе с тем, оптическая плотность образцов практически не изменялась.

На следующем этапе охарактеризован процесс взаимодействия гидролизата с различным количеством сукцинилированного хитозана. При возрастании концентрации СХТ в диапазоне 0,005–0,1 % в растворе 0,25 % ГСБ установлено снижение активной кислотности среды на 0,2 ед. рН, наряду с отсутствием изменений оптической плотности, как показано на рисунке 2.

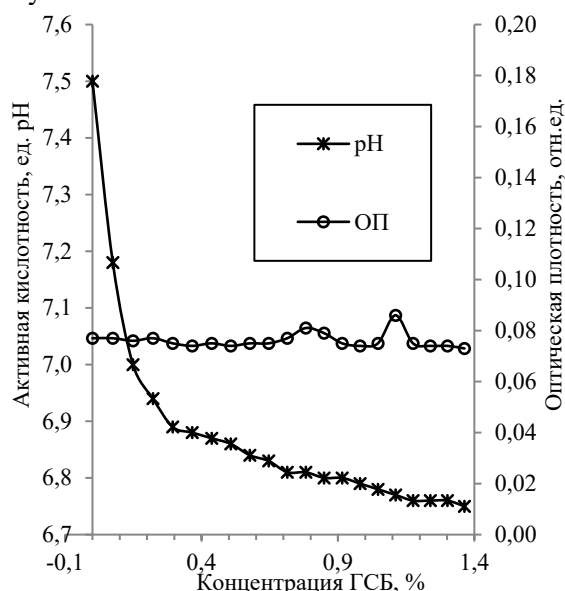


Рисунок 1 – Зависимость активной кислотности и оптической плотности раствора СХТ (0,1 %) от концентрации ГСБ (0,08–1,4 %)

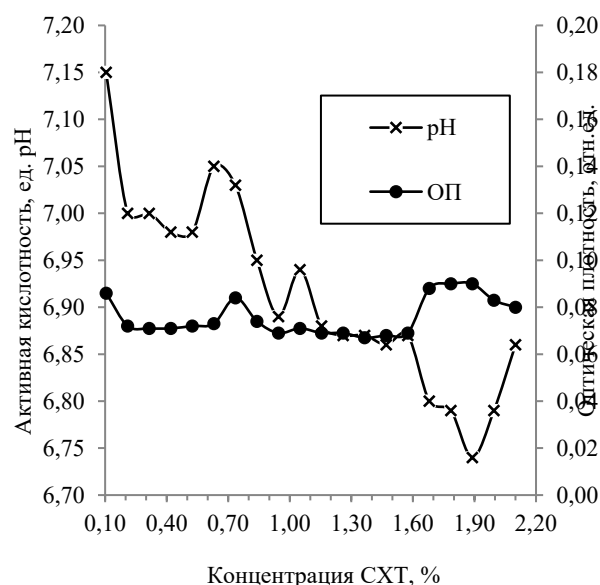


Рисунок 2 – Зависимость активной кислотности и оптической плотности раствора ГСБ (0,25 %) от концентрации СХТ (0,005–0,1 %)

В целом, образование комплексов сукцинилированного хитозана и гидролизатом сопровождается выходом в среду протонов, что определяет снижение активной кислотности смеси. Наряду с этим, не выявлены изменения оптических свойств растворов. Это обусловлено образованием наноструктур СХТ–ГСБ, не способных к коагуляции по причине сохранения одноименных зарядов на поверхности комплексов.

Проанализированы органолептические свойства глубокого гидролизата, сукцинилированного хитозана и комплексов СХТ–ГСБ. Результаты испытаний представлены в таблице 1. По итогам эксперимента специфическим горьким вкусом обладают как глубокий гидролизат сывороточных белков, так и сукцинилированный хитозан. Интенсивность ощущения горечи определяется концентрацией компонентов в растворе.

Таблица 1 – Органолептические свойства ГСБ и комплексов СХТ–ГСБ

Описание образца	Характеристика вкуса	Горечь (0–10 баллов)
ГСБ 5 %	Ярко выраженный горький вкус	10
ГСБ 0,25 %	Безвкусный	0
СХТ 0,1 %	Слабо выраженный горький вкус	5
ГСБ 1,4 % + СХТ 0,1 %	Выраженный горький вкус	9
ГСБ 0,25 % + СХТ 0,1 %	Слабо выраженный горький вкус	4
ГСБ 0,25 % + СХТ 0,005 %	Безвкусный	2

Определена антиоксидантная активность комплексов сукцинированного хитозана с пептидами сыворотки молока. Получены зависимости интенсивности флуоресценции ФЛ от концентрации гидролизата, его комплексов с полисахаридом. Исследования проведены в диапазоне концентраций тестируемых соединений 0,005–0,5 мг сухого вещества/мл. Экспериментальные образцы восстанавливали флуоресценцию ФЛ до 78–91 %. Графически определены показатели IC_{50} – концентрации образцов, соответствующие 50 % ингибированию активных форм кислорода, что отражено на рисунке 3.

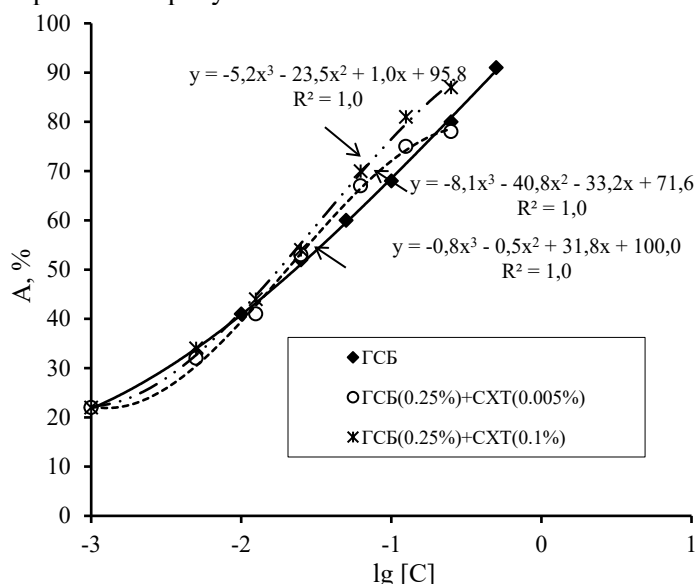


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции (A, %) от концентрации сухого вещества (C, мкг/мл) в образце гидролизата (ГСБ) и его комплексов с сукцинированным хитозаном (СХТ)

По итогам расчета значений IC_{50} на содержание сухого вещества и белка гидролизат сывороточных белков молока обладает достаточно высоким антиоксидантным потенциалом – $22,0 \pm 1,6$ и $17,6 \pm 1,3$ мкг/мл соответственно.

Таблица 2 – Показатели АОА гидролизата сывороточных белков молока, комплексов сукцинированного хитозана с гидролизатом

Наименование образца	IC_{50} , мкг (сухого вещества)/мл	IC_{50} , мкг(белка)/мл
Гидролизат сывороточных белков (ГСБ)	$22,0 \pm 1,6$	$17,6 \pm 1,3$
Сукцинированный хитозан (СХТ)	н/о	н/о
Комплекс ГСБ (0,25 %) + СХТ (0,005 %)	$20,9 \pm 1,5$	$16,7 \pm 1,2$
Комплекс ГСБ (0,25 %) + СХТ (0,1 %)	$18,5 \pm 1,4$	$14,8 \pm 1,1$

При изучении образца комплекса с содержанием СХТ 0,005 % не установлено достоверное изменение уровня АОА. Вместе с тем, после увеличения концентрации СХТ до 0,1 % показано возрастание радикал-восстанавливающих свойств пептидов сыворотки молока в 1,2 раза.

Возрастание антиоксидантных свойств полученных биоконпозитов может быть обусловлено увеличением растворимости пептидной фракции в составе комплексов с сукцинилизированным хитозаном. Планируется продолжение исследований радикал-восстанавливающих свойств различных производных хитозана, а также их комплексов с пептидами молока.

Заключение. По итогам экспериментальной работы получены комплексы сукцинилизированного хитозана с глубоким гидролизатом сывороточных белков молока. Согласно данным рН-метрического и спектрофотометрического методов определены параметры взаимодействия полисахарида с пептидами. Оценены органолептические свойства опытных образцов комплексов.

По результатам флуориметрических исследований глубокий гидролизат сывороточных белков молока обладает достаточно высоким антиоксидантным действием. Так показатель IC_{50} гидролизата составляет $22,0 \pm 1,6$ и $17,6 \pm 1,3$ мкг/мл при расчете на содержание сухого вещества и белка соответственно. При взаимодействии пептидов (0,25 %) с сукцинилизированным хитозаном (0,1 %) показано возрастание радикал-восстанавливающего эффекта в 1,2 раза.

Перспективным представляется использование биологически активных комплексов хитозана и его производных с пептидами молока в качестве технологического и функционального компонента молочных продуктов питания.

Литература

- Park, Y.W. Bioactive peptides in milk and dairy products: a review / Y.W. Park, M.S. Nam // Korean J. Food Sci. Anim. Res. – 2015. – Vol. 35, № 6. – P. 831–840.
- Milk derived bioactive peptides and their impact on human health: a review / D.P. Mohanty [et al.] // Saudi J. Biol. Sci. – 2016. – Vol. 23. – P. 577–583.
- Bhat, M.Y. Casein proteins: structural and functional aspects / M.Y. Bhat, T.A. Dar, L.R. Singh // Milk Proteins – From Structure to Biological Properties and Health Aspects – InTech, 2016. – P. 3–18.
- Tsabouri, S. Cow's milk allergenicity / S. Tsabouri, K. Douros, K.N. Priftis // Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 16–26.
- Cheese whey catalytic conversion for obtaining a bioactive hydrolysate with reduced antigenicity / A. Torkova [et al.] // Curr. Res. Nutr. Food Sci. – 2016. – Vol. 4, SI.2. – P. 182–196.
- Drake, M.A. Sensory properties of dairy proteins / M.A. Drake, R.E. Miracle, J.M. Wright // Milk Proteins / M.A. Drake. – Academic press, 2008. – Ch. 15. – P. 429–448.
- Sensory directed flavour analysis of off-flavour compounds in infant formula with deeply hydrolyzed milk protein and their possible sources / P. Yang [et al.] // LWT–Food Sci. Technol. – 2020. – Vol. 119. – e108861.
- Kim, H.O. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides / H.O. Kim, E.C. Lichan // J. Agric. Food Chem. – 2006. – Vol. 54. – 10102e10111.
- Characterization of casein micelle precipitation by chitosans / S.F. Ausar [et al.] // J. Dairy Sci. – 2001. – Vol. 84, Vol. 2. – P. 361–369.
- Influence of molecular weight of chitosan on interaction with casein / V.P. Kurchenko [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. – 2018. – Vol. 54, № 5. – P. 501–504.
- Use of chitosan for selective removal of β -lactoglobulin from whey / E. Casal [et al.] // J. Dairy Sci. – 2006. – Vol. 89, № 5. – P. 1384–1389.
- Использование хитозана для выделения β -лактоглобулина из смеси белков молочной сыворотки / А.В. Бакулин [и др.] // Биотехнология. – 2011. – № 1. – С. 34–41.
- The use of 2D NMR to study β -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides / G.A. Linde [et al.] // Food Res. Int. – 2010. – Vol. 43. – P. 187–192.
- Ou, B. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe / B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R.L. Prior // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49, № 10. – P. 4619–4626.