

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-3-2649>
<https://elibrary.ru/ZYBGME>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Сравнительная эффективность гидролиза куриным и свиным пепсином субстратов молочного и мясного происхождения



Д. С. Мягконосов*, Д. В. Абрамов, О. Г. Кашникова

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, Углич, Россия

Поступила в редакцию: 16.04.2026

Принята после рецензирования: 10.05.2026

Принята к публикации: 07.07.2026

*e-mail: d.myagkonosov@fncps.ru

© Д. С. Мягконосов, Д. В. Абрамов, О. Г. Кашникова, 2026



Аннотация.

С помощью пепсинов могут быть получены гидролизаты, содержащие биологически активные пептиды, которые обладают антиокислительной, антигипертензивной, антимикробной и антиканцерогенной активностью. Важным аспектом производства таких гидролизатов является повышение выхода продуктов из сырья и снижение себестоимости. Цель исследования – определить параметры гидролиза пепсином (происхождение фермента, температура и pH), позволяющие достигнуть максимального выхода продуктов гидролиза на высокоценных в биологическом плане субстратах из пищевых белков (белки молочной сыворотки, казеин, мясные белки).

В качестве субстратов использовали концентрат сывороточных белков КСБ-80 (79,05 % белка), казеинат натрия (93,70 % белка) и сухой мясной порошок из сердец крупного рогатого скота (76,0 % белка). Гидролиз проводили ферментными препаратами свиного и куриного пепсина при температуре 35–50 °С и pH 2–4 ед. в соответствии с центральным композиционным планом эксперимента. Степень гидролиза оценивали спектрофотометрическим методом по содержанию продуктов гидролиза, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой. Статистическую обработку выполняли методом двухфакторного дисперсионного анализа.

Установлено, что в исследованном диапазоне pH от 2 до 4 ед. максимальный выход продуктов гидролиза на субстратах из казеина и мясного белка наблюдался при pH 2,0 ед., для субстрата на основе нативных сывороточных белков – при pH 2,9 ед. для куриного пепсина и при pH 2,3 ед. для свиного. Повышение температуры от 35 до 50 °С увеличивало выход продуктов гидролиза. Гидролиз молочных белков пепсином при pH 2,0 ед., соответствующем максимальной активности ферментов, затруднен из-за компактной структуры сывороточных белков и образования агрегатов казеина.

Пепсины наиболее эффективны для гидролиза мясных белков, поскольку при pH 2,0 ед. их доступность для гидролиза возрастает. Пепсины рекомендуются для гидролиза мясных белков, особенно подвергшихся интенсивной тепловой обработке, сильно денатурированных и агрегированных.

Ключевые слова. Куриный пепсин, свиной пепсин, сывороточные белки, казеины, мясные белки, гидролиз

Финансирование. Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FGUS-2024-0007 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Для цитирования: Мягконосов Д. С., Абрамов Д. В., Кашникова О. Г. Сравнительная эффективность гидролиза куриным и свиным пепсином субстратов молочного и мясного происхождения. Техника и технология пищевых производств. 2026. Т. 56. № 3. С. 450–466. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-3-2649>

Hydrolysis of Dairy and Meat Substrates by Chicken vs. Porcine Pepsin



Dmitry S. Myagkonosov*, Dmitry V. Abramov, Olga G. Kashnikova

All-Russian Scientific Research Institute of Butter and Cheese Making, Uglich, Russia

Received: 16.04.2026
Revised: 10.05.2026
Accepted: 07.07.2026

*e-mail: d.myagkonosov@fncps.ru
© D.S. Myagkonosov, D.V. Abramov, O.G. Kashnikova, 2026



Abstract.

Pepsins are widely used to produce hydrolysates containing antioxidant, antihypertensive, antimicrobial, and anticarcinogenic peptides. Commercial hydrolysis requires maximizing product yields while minimizing operational costs. This article describes the optimal parameters for pepsin-catalyzed hydrolysis (enzyme origin, temperature, and pH) to achieve the highest efficiency using biologically valuable whey, casein, and meat protein substrates.

WPC-80 whey protein concentrate (79.05% protein), sodium caseinate (93.70% protein), and bovine heart powder (76.0% protein) served as substrates. The hydrolysis involved porcine and avian pepsin preparations at temperatures ranging from 35 to 50°C and a pH range of 2.0–4.0. The degree of hydrolysis was spectrophotometrically assessed based on the content of TCA-soluble products. The statistical analysis relied on a two-way analysis of variance (ANOVA).

Within the pH range of 2.0–4.0, the highest yield of casein and meat protein hydrolysates occurred at pH 2.0. For the whey protein substrate, the peak yields were observed at pH 2.9 using avian pepsin and at pH 2.3 using porcine pepsin. Increasing the temperature from 35 to 50°C consistently enhanced the yield of hydrolysis products. Although pH 2.0 corresponded to the highest initial enzyme activity, the hydrolysis of dairy proteins was less effective due to the compact native structure of whey proteins and the formation of casein aggregates at this pH.

Pepsins proved to be highly effective for hydrolyzing meat proteins as substrate accessibility increased significantly at pH 2.0. Consequently, these enzymes can be recommended for the commercial hydrolysis of denatured and aggregated meat proteins subjected to intense thermal treatment.

Keywords. Avian pepsin, porcine pepsin, whey proteins, caseins, meat proteins, hydrolysis

Funding. The research was part of State Assignment FGUS-2024-0007 to the Federal Scientific Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences.

For citation: Myagkonosov DS, Abramov DV, Kashnikova OG. Hydrolysis of Dairy and Meat Substrates by Chicken vs. Pepsin. Food Processing: Techniques and Technology. 2026;56(3):450–466. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-3-2649>

Введение

Пепсин (КФ 3.4.23.1) представляет собой кислую протеазу с оптимумом действия в области pH 2,0–4,0 ед., сохраняющую активность до температуры 60 °С [1]. Данный белок содержит повышенную долю остатков кислых аминокислот (43 из 327), благодаря чему имеет очень низкую изоэлектрическую точку (~ pH 1), при значениях выше пепсин приобретает положительный суммарный заряд. Каталитический центр фермента образован двумя остатками аспарагиновой кислоты: Asp32 и Asp215. Активность пепсина зависит от степени протонирования этих остатков, которая, в свою очередь, определяется pH. Для проявления каталитической активности необходимо, чтобы один из аспартических остатков был протонирован, а другой – депротонирован. Это условие выполняется в диапазоне pH 1–5 ед. В интервале 5–7 ед. pH активность пепсина

существенно снижается вследствие недостаточной ионизации активного центра. При pH выше 7 ед. происходит денатурация пепсина [2, 3].

Уровень pH влияет также на величину сил электростатического взаимодействия пепсина с белковым субстратом. В сильнокислой среде (pH около 1,5–2,5 ед.) пепсин характеризуется суммарным отрицательным зарядом, в то время как для пищевых белков при этом наличие суммарного положительного заряда. Разноименные заряды создают электростатическое притяжение между ферментом и субстратом и способствуют повышению скорости гидролиза [4].

Установлено, что pH-профиль активности пепсина варьируется в зависимости от типа субстрата и его трехмерной структуры. При использовании сывороточного альбумина в качестве субстрата показано, что активность пепсина человека, как и свиного пепсина,

максимальна при pH 2,0 ед. и снижается до незначительного уровня при $\text{pH} \geq 5,0$ ед. [5]. В случае нативного гемоглобина активность свиного пепсина проявляла максимум при pH около 2 ед. и падала при повышении до 4 ед. [3]. Аналогичная зависимость для свиного пепсина отмечалась и на денатурированном гемоглобине, тогда как куриный пепсин на этом субстрате проявлял максимум активности при pH 2,5–3,0 ед. При гидролизе белков растительного происхождения (из пшеницы и гороха) максимальная активность свиного и куриного пепсина зафиксирована при pH 1,5 ед. [6]. Максимум активности пепсина в отношении нативного яичного альбумина и бычьего сывороточного альбумина наблюдался при pH ~ 2 ед. и смещался к более высоким значениям pH (3 и 4 ед. соответственно), если эти белки находились в денатурированной форме. Оптимальный уровень pH для действия пепсина в отношении гемоглобина после денатурации с помощью мочевины сдвигался от 2,0 до ~ 3,5 ед. pH с сохранением активности до 5 ед. pH [5].

Пепсин проявляет специфичность к расщеплению связей между определенными остатками аминокислот. Поскольку активный центр фермента имеет гидрофобные участки, он преимущественно расщепляет связи, образованные гидрофобными аминокислотами, включая фенилаланин, тирозин, триптофан, лейцин, метионин и изолейцин [3, 7]. Специфичность пепсина зависит от уровня pH. При гидролизе миофибриллярных белков наибольшая специфичность пепсина отмечается при pH около 1,3 ед. pH, когда фермент расщепляет только связи, содержащие фенилаланин и лейцин. При $\text{pH} \geq 2$ ед. число вариантов расщепляемых связей увеличивается [3].

Пепсин используют для производства коллагена [8] и выделки кож [9]. Фармацевтическая промышленность выпускает препарат казеина, назначаемый в качестве вспомогательного пищеварительного средства [10]. В пищевой промышленности пепсин применяют для изготовления сыров [11], а ферментативная модификация с его помощью применяется для тендеризации мяса и в технологии изготовления готовых к употреблению продуктов, в частности мясных соусов [12]. Также пепсин задействуют для получения ферментативных гидролизатов пищевых белков животного и растительного происхождения, обладающих различной степенью гидролиза и функциональной активностью [13–15].

Пептические гидролизаты белка рекомендованы в качестве белковой добавки для питания лиц пожилого возраста, у которых с годами снижается секреция пепсина, необходимого для переваривания пищи [16]. Гидролиз используют как метод извлечения пищевого белка из отходов мясной и рыбной промышленности [17, 18]. Это позволяет получить дополнительный белковый продукт из сырья, имеющего низкую стоимость, а также снизить количество отходов, загрязняющих окружающую среду. В целях отделения мясных

белков от негидролизуемой составляющей сырья (кости, содержащие кератин примеси) проводят его предварительную обработку с помощью различных технологических приемов. Применяют нагревание, обработку высоким давлением, воздействие электрических полей и комбинацию этих методов. В результате получают свободные от балластных веществ мясные субстраты в форме суспензий, бульонов или паст [11–20]. Однако происходит обширная денатурация и агрегирование белков мяса, что затрудняет их гидролиз [21]. Пепсин способен гидролизовать мясное сырье, состоящее из агрегированных белков, несмотря на снижение скорости гидролиза [22].

Кроме традиционных путей использования пепсина, в настоящее время растет интерес к получаемым с помощью пепсина продуктам, в состав которых входят биологически активные пептиды, которые положительно влияют на физиологические функции человека [23–25].

Возможность пепсина генерировать биологически активные пептиды связана с его селективностью. Данный фермент нацелен на расщепление связей, содержащих гидрофобные аминокислоты. Высвобождаемые при пептическом гидролизе пептиды имеют гидрофобные аминокислоты в терминальном положении [7]. Такие пептиды обладают более выраженной биологической активностью по сравнению с пептидами, лишенными гидрофобных концевых групп [23]. В зависимости от типа используемого белкового субстрата и условий гидролиза у пептических гидролизатов обнаружены следующие виды активности:

- антиоксидантная активность – защита клеток организма от повреждений путем нейтрализации пероксидов и свободных радикалов [26, 27];
- ингибирование ангиотензинпревращающего фермента и дипептидилпептидазы IV – снижение артериального давления и лечение диабета второго типа [28];
- антигипертензивные свойства – снижение артериального давления [29];
- антимикробная активность – ингибирование жизнедеятельности болезнетворных микроорганизмов [30];
- антиканцерогенная активность – пептиды, вызывающие гибель раковых клеток [31].

С помощью пепсина также могут быть получены продукты, обладающие сочетанием разных форм биологической активности и функциональных свойств, в частности, гидролизаты со сниженной антигенностью [32], а также гидролизаты, которые помимо пониженной аллергенности могут обладать антиоксидантной, антиканцерогенной и иммуномодулирующей активностью [33].

Наряду с получением гидролизатов с желаемыми функциональными свойствами, важен экономический аспект их производства. Выбор оптимальных режимов гидролиза пепсином способствует сокращению длительности процесса, повышению выхода гидролизатов, снижению затрат сырья, трудовых и энергозатрат. Цель исследования – определить параметры гидролиза

пепсином (происхождение фермента, температура и pH), позволяющие достигнуть максимального выхода продуктов гидролиза на высокоценных в биологическом плане субстратах из пищевых белков (белки молочной сыворотки, казеин, мясные белки).

Объекты и методы исследования

В качестве источника сывороточных белков использовали концентрат нативных сывороточных белков КСБ-80, полученный методом ультрафильтрации, с массовой долей белка 79,05 % (ОАО «Молочный мир», Республика Беларусь).

Казеинат натрия с массовой долей белка 93,70 % получали следующим образом. Сырое коровье молоко (ООО «Агроволга», Россия) обезжиривали на сепараторе-сливкоотделителе для получения обезжиренного молока массовой долей жира около 0,05 %. Молоко помещали в емкость с рубашкой и мешалкой, охлаждали до температуры 8 ± 2 °C и при непрерывном перемешивании вносили раствор соляной кислоты с массовой концентрацией 10 % до достижения pH $4,5 \pm 0,1$ ед. Подкисленную смесь нагревали до температуры 50 ± 1 °C при непрерывном перемешивании, после чего оставляли на отстаивание с целью отделения казеинового осадка. Осадок промывали от кислоты, лактозы и растворимых минеральных веществ. Для этого надосадок максимально удаляли сифонированием, далее к осадку приливали деионизированную воду температурой 15 ± 5 °C в количестве $\frac{1}{2}$ от начального объема обезжиренного молока. Кислотность смеси доводили до уровня $4,7 \pm 0,1$ ед. pH добавлением раствора соляной кислоты с массовой концентрацией 10 %, после чего смесь выдерживали не менее 16–18 ч для отделения осадка. Выполняли 7 циклов промываний. После последнего цикла смесь фильтровали через лавсановую ткань, казеиновый надосадок на ткани помещали в форму для прессования сыра и выдерживали для отделения влаги в течение 2 ч. Отделенный от избыточной влаги казеиновый осадок помещали в емкость с мешалкой, вносили деионизированную воду в количестве $\frac{1}{2}$ от начального объема обезжиренного молока и для полного растворения казеиновых частиц доводили активную кислотность раствора на уровне $6,6 \pm 0,1$ ед. pH добавлением раствора NaOH с массовой концентрацией 20 % при непрерывном перемешивании. Нейтрализованную смесь высушивали на распылительной сушилке Niro-Atomizer (Niro A/S, Дания) при температуре воздуха 150 ± 2 °C на входе и 80 ± 2 °C на выходе из сушильной камеры.

Сухой мясной порошок с массовой долей белка 76,0 % получали из охлажденных сердец крупного рогатого скота с массовой долей белка 17,15 % (ООО «Агроволга», Россия). Для этого сырье размалывали на мясорубке, полученный фарш стерилизовали в автоклаве HC-O002 (Guangzhou Happpcare Electronics Co., Ltd., Китай) при 121 ± 1 °C в течение 20 мин и после охлаж-

дения диспергировали на блендере BioloMix A8800 (BioloMix Trading Co., Ltd., Китай). Диспергированный фарш высушивали в сушильном шкафу с тягой при 55 °C в течение 4 ч на лотках из силикона, измельчали высушенный фарш на кофемолке, после чего просеивали через сито с размером пор 24 Mesh для отделения частиц размером более 0,7 мм.

Для проведения гидролиза использовали ферментные препараты пепсинов: свиной пепсин с протеолитической активностью 5734 ед. ПС/г (ООО «ШАКО», Россия); куриный пепсин с протеолитической активностью 5423 ед. ПС/г (ООО «Завод эндокринных ферментов», Россия).

Массовую долю белка определяли в молочных белках и гидролизатах молочных белков в соответствии с ГОСТ 23327-98; в мясных белках и гидролизатах мясных белков – по ГОСТ 25011-2017. Массовую долю белка в образцах вычисляли умножением массовой доли азота на коэффициент пересчета, равный 6,38 (для сывороточных белков и казеина) или 6,25 (для мясных белков).

Общую протеолитическую активность выявляли методом Ансона на субстрате из гемоглобина в модификации, приведенной в ГОСТ 34430-2018, применительно к кислым протеазам (при 3,0 ед. pH и температуре 30 °C).

Растворы белковых субстратов готовили путем смешивания навески белкового сырья с водой в соотношении, которое необходимо для получения раствора с массовой долей белка 2 %. Раствор мясного порошка гомогенизировали на диспергаторе ULTRA-TURRAX T 18 Digital (IKA, Германия) при 15 000 об/мин в течение 1,0–1,5 мин.

Для приготовления растворов белковых субстратов с требуемыми по плану эксперимента уровнями pH использовали буферные растворы на основе цитратного буфера (3 и 4 ед. pH) или лимонной кислоты (2 ед. pH) концентрацией 0,2 моль/дм³ в соответствии с V. S. Stoll *et al.* [34]. Растворы субстратов с массовой долей белка 1 % в буфере с концентрацией 0,1 моль/дм³ готовили путем смешивания в соотношении 1:1 раствора субстрата с массовой долей белка 2 % и буферного раствора с концентрацией 0,2 моль/дм³. Для лучшей гидратации белков полученные растворы субстратов выдерживали в течение 16–18 ч в холодильнике при температуре 4 °C.

Растворы субстратов в объеме 43 см³ помещали в пластиковые пробирки типа Falcon объемом 50 см³ и нагревали до температуры гидролиза на водяной бане. Гидролиз проводили на термостатической установке МТН-100 (Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd., Китай) при частоте встряхивания 400 об/мин (диаметр орбиты 3 мм). Для инициации процесса гидролиза в пробирки, содержащие 40 см³ субстрата (после отбора 3 см³ для измерения бланка), вносили 0,8 см³ раствора фермента концентрацией, обеспечивающей соотношение фермент: субстрат, равное 40 ед. ПС/г белка. Внесение

фермента проводили с интервалом 30 ± 2 с в каждую следующую пробирку. Продолжительность гидролиза составляла 15 мин для субстрата на основе казеина и 90 мин для субстратов на основе сывороточных или мясных белков. Отбор проб из пробирок проводили в той же последовательности, что и внесение фермента, с интервалом 30 ± 2 с. Доза внесения фермента и продолжительность гидролиза подобраны в ходе предварительных исследований с целью получения концентрации продуктов гидролиза, обеспечивающей при оценке описанным далее спектрофотометрическим методом значения в пределах 0,1–1,0 ед. оптической плотности.

Оценку содержания продуктов гидролиза осуществляли с применением спектрофотометрического метода по A. Kondjoyan *et al.* [3] с собственными модификациями в части приготовления разведений и фильтрации образцов.

После достижения в пробирках на шейкере температуры гидролиза для определения уровня бланка из каждой из двух пробирок с одинаковым pH отбирали по 3,0 см³ субстрата. Отобранные пробы переносили в пластиковые центрифужные пробирки типа Falcon объемом 50 см³, содержащие 9 см³ раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ): для субстратов на основе казеина и мясных белков – с концентрацией 6,7 % (для получения конечной концентрации ТХУ 5 %), для субстрата на основе сывороточных белков – с концентрацией 16,1 % (для получения конечной концентрации ТХУ 12 %). Полученную смесь встряхивали на вортексе VX-MT (Xiamen Branch Tongxin Biomedical Technology Co., Ltd., Китай) и для формирования агрегатов негидролизованного белка в целях лучшего его отделения выдерживали в течение 14–16 ч в холодильнике при температуре 4–5 °С. Далее смесь центрифугировали на центрифуге ЦЛн-16 (Changsha Xiangzhi Centrifuge Instr Co., Ltd., Китай) при 10 000 g в течение 10 мин. Надосадок фильтровали на фильтре из нейлона с размером пор 0,45 мкм (Tianjin Jinteng Experiment Equipment Co., Ltd., Китай). В полученном фильтрате определяли содержание продуктов гидролиза (не осаждаемых в растворе ТХУ пептидов и свободных аминокислот) по оптической плотности на длине волны 280 нм за вычетом оптической плотности на длине волны 320 нм. Измерения выполняли на спектрофотометре РВ 2201 (ЗАО «Спектроскопия, оптика и лазеры – авангардные разработки», Республика Беларусь) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Для компенсации влияния фонового поглощения субстрата на результаты измерений из полученных значений вычитали величину поглощения бланка.

Микроскопические исследования белковых субстратов проводили в микропрепаратах «раздавленная капля» методом световой микроскопии в проходящем свете с использованием конденсора темного поля. Фотографии получены с помощью цифровой фотокамеры Canon EOS 600D. Коррекцию изображений про-

изводили с помощью программного пакета Digital Photo Professional software v.4.5 (Canon Inc., Япония). Перед нанесением образца на предметное стекло растворы субстратов предварительно нагревали до температуры гидролиза и выдерживали при этой температуре в течение 30 мин.

Эксперимент выполнен в соответствии с центральным композиционным планом для поверхности отклика [35]. План эксперимента включал два количественных фактора: температуру и pH, варьирующихся на уровнях 35, 40, 45, 50 °С и 2, 3 и 4 ед. pH. Проведено 2 серии экспериментов: с куриным и свиным пепсином. Эксперименты выполняли в течение 2 дней с 2 повторностями внутри одного дня ($n = 4$).

Оценку величины влияния факторов на переменную отклика осуществляли методом двухфакторного дисперсионного анализа по трем статистическим критериям: эффект фактора, критерий Фишера (F) и уровень значимости (p) [35]. Эффект фактора представляет собой величину изменения переменной отклика при изменении влияющего фактора от нижнего до верхнего уровня. Однако оценка при помощи эффекта фактора привязана к абсолютному значению переменной отклика, что не дает возможности сравнивать силу действия факторов на переменную отклика (выход продуктов гидролиза) для разных субстратов и ферментов, использованных в данном исследовании. Поэтому в качестве критерия оценки использовали F -критерий Фишера, отражающий влияние вариации оцениваемого фактора на вариацию переменной отклика, но не зависящий от абсолютных значений переменной отклика. Использование F -критерия позволяет получить сравнимые оценки силы влияния факторов при гидролизе разных субстратов пепсинами разного происхождения. Недостаток критерия Фишера заключается в получении оценки, не учитывающей знак изменения переменной отклика (рост или снижение) под действием вариации влияющего фактора. Исходя из этого, в таблице дисперсионного анализа приведен знак эффекта фактора. Для подтверждения достоверности наличия влияния фактора на переменную отклика в таблице отражен уровень статистической значимости p . Влияние фактора принимается статистически достоверным при значении $p < 0,05$. Статистическая обработка экспериментальных данных проведена в прикладном программном пакете Statistica (StatSoft, США).

Результаты и их обсуждение

Влияние факторов эксперимента на переменную отклика (выход продуктов гидролиза) оценивали с использованием дисперсионного анализа. Для описания связи переменной отклика с факторами эксперимента выбрали модель, включающую линейные и квадратичные эффекты, а также эффекты парных взаимодействий линейных эффектов. Результаты оценки влияния факторов на вариацию переменной отклика приведены в таблице 1.

Таблица 1. Оценка влияния факторов эксперимента на выход продуктов гидролиза по результатам дисперсионного анализа

Table 1. Effect of experimental factors on hydrolysis yield: dispersion analysis

Фактор	Субстрат	Ферментный препарат					
		Куриный пепсин			Свиной пепсин		
		Эффект фактора	F-критерий	p-значение	Эффект фактора	F-критерий	p-значение
Температура при гидролизе ^L (Temp ^L)	Сывороточный белок	+	370,05	***	+	262,79	***
	Казеин	+	678,00	***	+	333,01	***
	Мясные белки	+	476,05	***	+	210,54	***
Температура при гидролизе ^Q (Temp ^Q)	Сывороточный белок	+	3,50	–	+	2,92	–
	Казеин	–	30,18	***	–	1,86	–
	Мясные белки	+	4,54	*	+	0,55	–
pH ^L	Сывороточный белок	–	2,64	–	–	573,18	***
	Казеин	–	695,70	***	–	1580,47	***
	Мясной белок	–	1362,07	***	–	2621,21	***
pH ^Q	Сывороточный белок	–	446,32	***	–	185,24	***
	Казеин	–	8,35	**	+	23,77	***
	Мясной белок	+	34,72	***	+	323,85	***
Temp ^L × pH ^L	Сывороточный белок	–	6,46	*	–	33,93	***
	Казеин	+	20,63	***	+	44,40	***
	Мясной белок	–	77,49	***	–	135,66	***
R ²	Сывороточный белок	0,95			0,96		
	Казеин	0,97			0,98		
	Мясные белки	0,98			0,99		

Примечание: ^L – оценка линейного эффекта фактора; ^Q – оценка квадратичного эффекта фактора; R² – коэффициент детерминации аппроксимирующей модели; «–» – значение статистически недостоверно ($p > 0,05$); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Note: ^L – linear effect; ^Q – quadratic effect; R² – determination factor; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Dash (–) indicates not statistically significant effect ($p > 0.05$).

Таблица 2. Значения температуры и pH, соответствующие максимальному выходу продуктов гидролиза исследуемых белковых субстратов

Table 2. Temperature and pH for the highest hydrolysis yield across the protein substrates

Фактор	Субстрат	Ферментный препарат	
		Куриный пепсин	Свиной пепсин
Температура, °C	Сывороточный белок	50,0	50,0
	Казеин	50,0	50,0
	Мясной белок	50,0	50,0
pH, ед. pH	Сывороточный белок	2,9	2,3
	Казеин	2,0	2,0
	Мясной белок	2,0	2,0

Рассчитаны регрессионные зависимости вида, описывающие зависимость переменной отклика (выход продуктов гидролиза) от факторов (температура и pH):

$$Y = a_1 \times \text{Temp} + a_2 \times \text{Temp}^2 + a_3 \times \text{pH} + a_4 \times \text{pH}^2 + a_5 \times \text{Temp} \times \text{pH} + b$$

где Y – выход продуктов гидролиза, ед. оптической плотности; Temp – уровень фактора температура, °C;

pH – уровень фактора pH, ед. pH; a_i ($i = 1 \dots 5$) – коэффициенты при факторах уравнения; b – константа уравнения.

Значения температуры и pH, соответствующие максимальному выходу продуктов гидролиза (табл. 2), и графики зависимости переменной отклика от показателей (рис. 1) получены по уравнениям регрессии при гидролизе белковых субстратов куриным и свиным пепсинами.

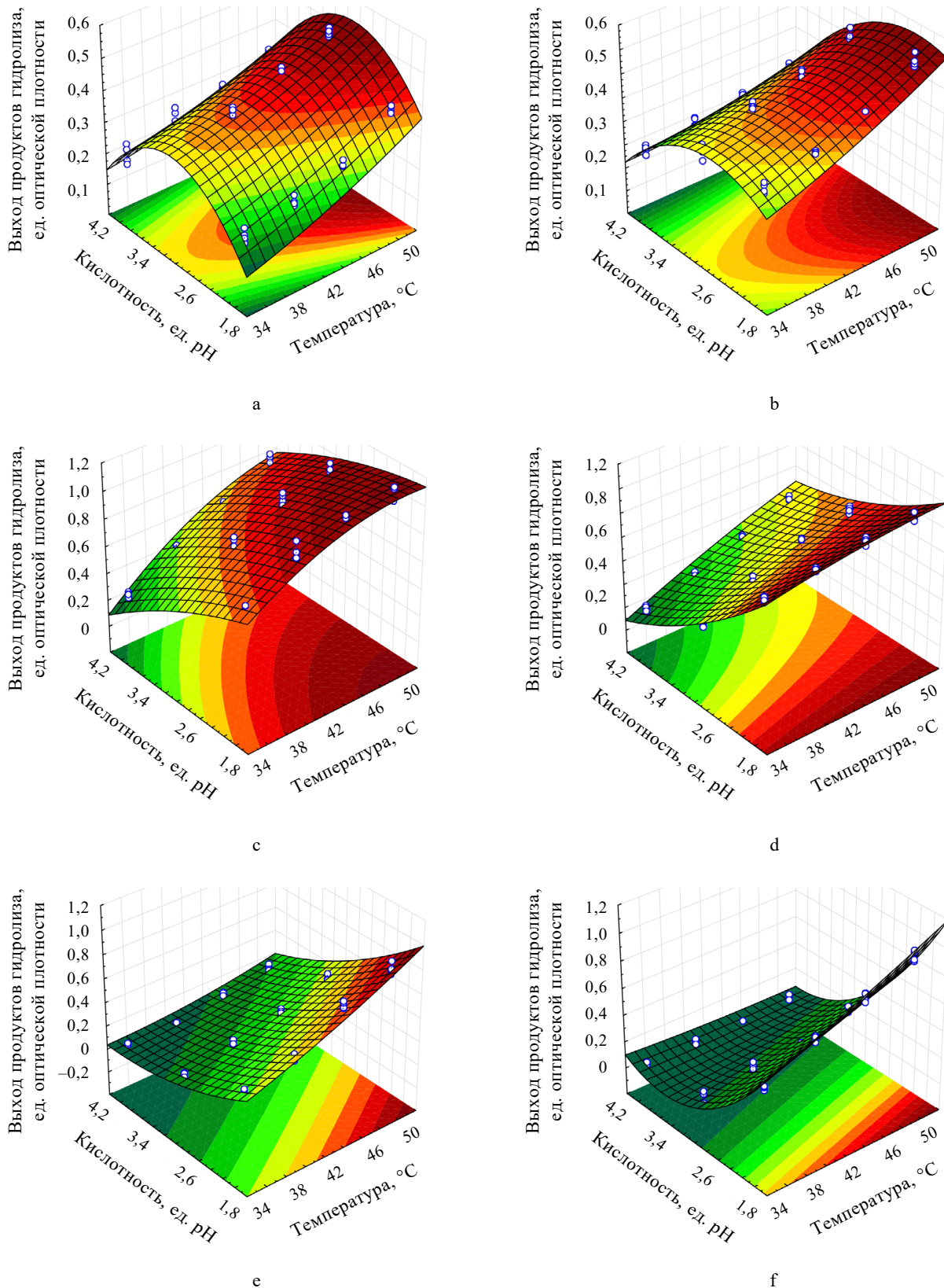


Рисунок 1. Поверхности отклика выхода продуктов гидролиза в зависимости от температуры и pH при гидролизе белковых субстратов: а – сывороточный белок и куриный пепсин; б – сывороточный белок и свиной пепсин; в – казеин и куриный пепсин; г – казеин и свиной пепсин; д – мясной белок и куриный пепсин

Figure 1. Effect of temperature and pH on yield surfaces: а – whey protein and avian pepsin; б – whey protein and porcine pepsin; в – casein and avian pepsin; г – casein and porcine pepsin; д – meat protein and avian pepsin

Выбранная модель для описания связи переменной отклика с факторами эксперимента, включающая линейные и квадратичные эффекты, а также эффекты парных взаимодействий, имеет коэффициент детерминации в диапазоне $0,95 < R^2 < 0,99$, т. е. объясняет 95–99 % вариации переменной отклика.

Для всех типов исследованных субстратов отмечается сильное влияние линейного фактора температура (Temp^L) на выход продуктов гидролиза. Положительный знак эффекта данного фактора свидетельствует о том, что повышение температуры от 35 до 50 °C приводит к увеличению выхода продуктов гидролиза. Сравнение значений F -критерия для Temp^L показывает, что куриный и свиной пепсины по-разному реагируют на изменение температуры и pH. На одном и том же субстрате для куриного пепсина изменение температуры от 35 до 50 °C в большей степени влияет на выход продуктов гидролиза, чем для свиного. Это означает, что куриный пепсин более чувствителен к температуре, и его активность заметно снижается при уменьшении температуры до 35 °C. Активность свиного пепсина в меньшей степени зависит от изменения температуры в диапазоне 35–50 °C.

Для всех исследованных сочетаний субстратов и пепсинов, за исключением варианта с гидролизом сывороточных белков куриным пепсином, отмечается сильное действие линейного эффекта фактора pH (pH^L). Отрицательный знак указывает на то, что повышение активной кислотности от 2 до 4 ед. pH приводит к снижению выхода продуктов пептического гидролиза. Полученный результат подтверждается данными многочисленных исследований, показывающих, что, в независимости от вида гидролизующего субстрата, в диапазоне от 2 до 4 ед. pH активность пепсина снижается при повышении pH [19]. Значения F -критерия для pH^L свидетельствуют о большем влиянии уровня pH на активность свиного пепсина, чем на активность куриного. Повышение активной кислотности от 2 до 4 ед. pH сопровождается большей потерей активности свиным пепсином по сравнению с куриным.

Результаты дисперсионного анализа указывают на наличие специфики влияния факторов на переменную отклика для разных сочетаний субстрат-фермент, что выражается в отличающихся оценках квадратичных эффектов факторов температура (Temp^Q) и pH (pH^Q), а также эффектов парного взаимодействия факторов ($\text{Temp}^L \times \text{pH}^L$).

При гидролизе субстрата на основе сывороточных белков наблюдаются следующие закономерности. Выход продуктов гидролиза сывороточных белков линейно зависит от температуры гидролиза, поскольку квадратичный эффект фактора температура (Temp^Q) статистически недостоверен. Для фактора pH статистически достоверен квадратичный эффект (pH^Q) при отрицательном знаке. Это указывает на то, что в исследованном диапазоне от 2 до 4 ед. pH зависимость переменной отклика от pH имеет форму пере-

вернутой параболы с максимумом в точке перегиба. С повышением pH выход продуктов гидролиза сначала увеличивается, а затем снижается, достигая максимума при определенном pH. Для куриного пепсина отсутствует достоверное ($p > 0,05$) влияние линейного эффекта фактора pH (pH^L) на переменную отклика: ее значения на краях диапазона варьирования фактора (при 2 и 4 ед. pH) статистически достоверно не отличаются. Для свиного пепсина имеется достоверное влияние как линейного (pH^L), так и квадратичного (pH^Q) эффекта фактора pH на переменную отклика с отрицательными знаками этих эффектов. Также как и для куриного пепсина, зависимость переменной отклика от pH имеет форму перевернутой параболы, но значения на краях диапазона pH отличаются: при верхнем уровне фактора pH (4 ед. pH) отмечается меньшее значение переменной отклика, чем при нижнем уровне фактора (2 ед. pH). Имеет место небольшой по абсолютной величине, но статистически достоверный эффект парного взаимодействия факторов температура и pH ($\text{Temp}^L \times \text{pH}^L$) с отрицательным знаком этого эффекта. Можно говорить о взаимно усиливающем действии данных факторов, когда наибольший выход продуктов гидролиза достигается при повышении температуры на фоне более низкого pH.

Результаты научных исследований показывают, что максимум активности пепсинов находится в области 2 ед. pH. При повышении от 2 до 4 ед. pH активность пепсина снижается. Однако уровень pH влияет не только на активность фермента, но и на доступность субстрата для гидролиза. Главным фактором, влияющим на доступность сывороточных белков для гидролиза ферментом (в частности пепсином), является пространственная структура белка. Известно, что β -лактоглобулин приобретает устойчивость к гидролизу пепсином при низком уровне pH (≤ 3 ед. pH), когда усилившиеся внутримолекулярные водородные связи сжимают данный белок в компактную структуру [36, 37]. При этом большинство потенциальных участков расщепления для пепсина, которые содержат гидрофобные аминокислоты, оказываются внутри гидрофобного ядра β -лактоглобулина и становятся труднодоступными для непосредственного контакта с ферментом [36, 38].

Гидролиз β -лактоглобулина высвобождает пептиды с повышенной склонностью к агрегации через межмолекулярные β -листы при pH 2,0 ед. К агрегированию склонны определенные пептиды, в основном содержащие участки, обладающие гидрофобными свойствами, имеющие низкий заряд (при pH 2 ед.) и не содержащие пролина [39].

Доступность α -лактоальбумина для гидролиза пепсином зависит от пространственной структуры белка. В отличие от β -лактоглобулина, при снижении pH ниже 3 ед. третичная пространственная структура α -лактоальбумина не уплотняется, а наоборот пол-

ностью разворачивается, делая открытыми все его полипептидные связи для контакта с ферментом. При повышении pH до 4 ед. α -лактоальбумин возвращает себе компактную трехмерную структуру, препятствующую доступ ферменту к возможным точкам гидролиза [1]. А. Ye *et al.* [37] установили, что при одном и том же уровне pH α -лактоальбумин и БСА гидролизуются пепсином значительно быстрее, чем β -лактоглобулин. В работе К. L. Jakorović *et al.* [1] определили, что в диапазоне кислотности 2,5–3,5 ед. pH β -лактоглобулин практически не гидролизывался пепсином, в то время как α -лактоальбумин активно вовлекался в пептический гидролиз. Через 60 мин гидролиза при 40–45 °C в форме, не затронутой гидролизом, сохранилось 95–100 % β -лактоглобулина и не более 20 % α -лактоальбумина.

Доступность сывороточных белков для гидролиза ферментом также зависит от степени их агрегирования [40]. Поскольку процесс изготовления концентрата сывороточных белков включает этап тепловой обработки (пастеризации), то некоторая часть белков

в его составе денатурирует и приобретает способность к объединению в агрегаты при pH < 4 ед. [41].

В данном исследовании, образование агрегатов сывороточных белков в субстратах изучено методом световой микроскопии. На рисунке 2 приведены микропрепараты белковых субстратов на основе сывороточных белков в буферных растворах с уровнем pH 2, 3 и 4 ед.

В растворах сывороточных белков до гидролиза присутствуют агрегаты, размеры которых зависят от pH. При pH 2 ед. белки сыворотки несут высокий положительный заряд, обуславливающий сильное отталкивание между белковыми частицами и препятствующий их объединению в агрегаты [36]. При повышении уровня pH от 2 до 4 ед. заряд белковых частиц снижается, а вместе с ним – силы электростатического отталкивания. При pH 3 ед. появляются признаки агрегирования частиц (помутнение), при pH 4 ед. в растворе возникают слабые рыхлые агрегаты белков.

После гидролиза в растворах сывороточных белков появляются агрегаты, имеющие большие размер

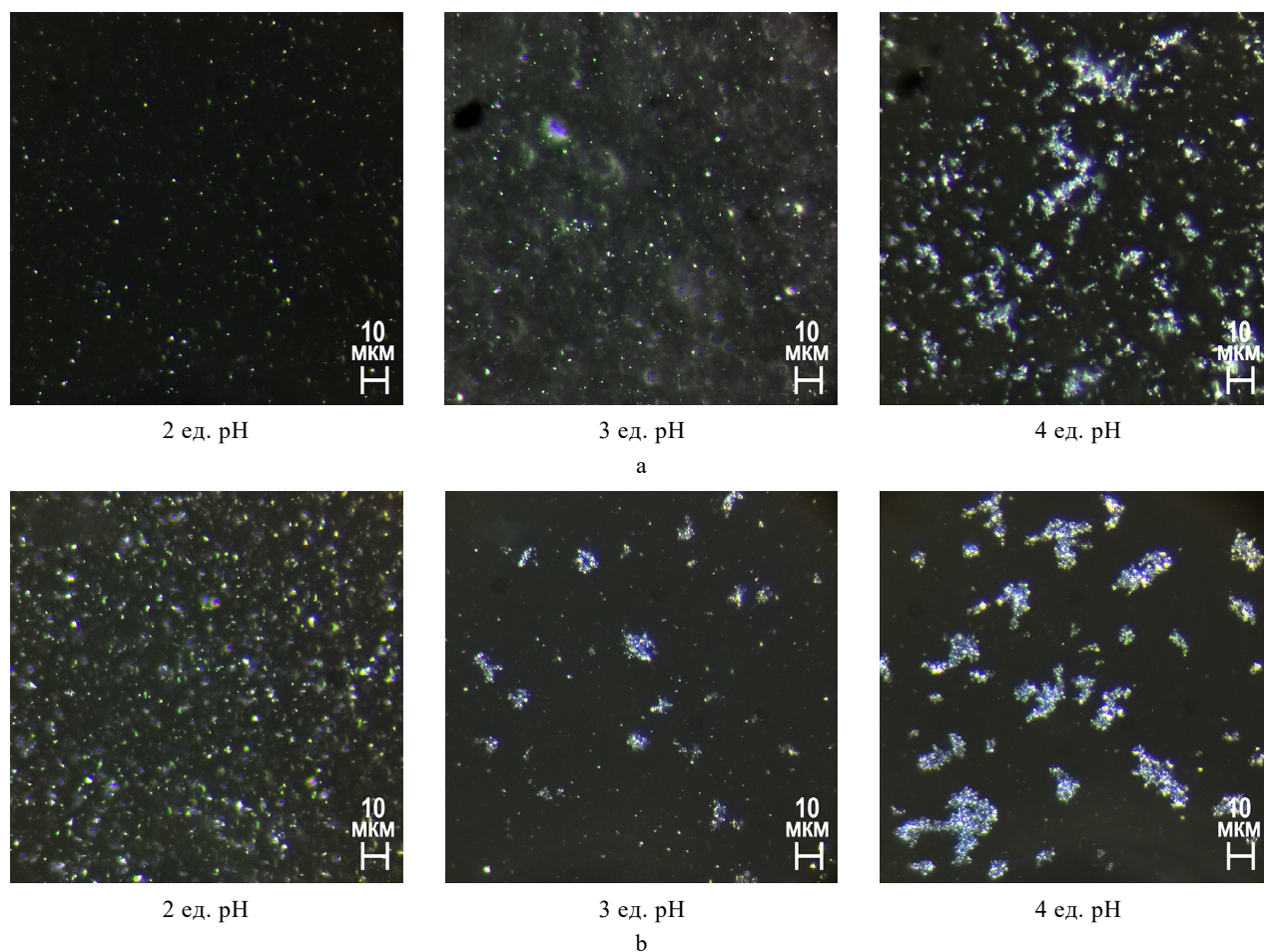


Рисунок 2. Микрофотографии белковых субстратов на основе сывороточных белков до (а) и после (б) гидролиза при температуре 50 °C

Figure 2. Protein substrates based on whey proteins before (a) and after (b) hydrolysis at 50 °C

и плотность по сравнению с агрегатами, присутствовавшими в растворах до гидролиза. Формирование пост-гидролизных агрегатов связано с разворачиванием пространственной структуры сывороточных белков после их ограниченного гидролиза. В результате открываются гидрофобные участки и свободные тиоловые группы, за счет взаимодействия которых происходит объединение белковых молекул в агрегаты [42]. Размер агрегатов гидролизованных белков, также как и размер агрегатов негидролизованных белков, зависит от уровня pH. С приближением pH к 4 ед. поверхностный заряд и пропорциональные ему силы электростатического отталкивания уменьшаются, что способствует формированию более крупных агрегатов (рис. 2). Агрегация белковых частиц снижает скорость гидролиза, поскольку большая часть связей, подходящих для расщепления пепсином, оказывается скрыта внутри агрегатов белковых частиц. Скорость гидролиза тем ниже, чем больше размеры и плотность агрегатов [43].

Максимальный выход продуктов гидролиза сывороточных белков при уровне кислотности между 2 и 3 ед. pH обусловлен тем, что при повышении pH от 2 до 3 ед. одновременно происходит два процесса, противоположно влияющих на гидролиз. С одной стороны снижается активность пепсина, с другой – за счет конформационных изменений повышается доступность для гидролиза основного белка сыворотки β -лактоглобулина. В точке между 2 и 3 ед. pH достигается баланс между этими противодействующими факторами. При дальнейшем повышении pH от 3 до 4 ед. интенсифицируется процесс агрегации белковых частиц, в т. ч. дестабилизированных воздействием гидролиза, что замедляет ферментативный процесс. На это накладывается различающаяся для свиного и куриного пепсина зависимость активности от pH, установленная, в частности, в работе I. Crévieu-Gabriel *et al.* [6]. В результате совокупного действия всех указанных причин максимум активности в отношении белков сыворотки для куриного пепсина наблюдается при 2,9 ед. pH, а для более ацидофильного свиного пепсина – при 2,3 ед. pH.

На основании сравнения форм зависимостей выхода продуктов гидролиза от температуры и pH на разных субстратах можно сделать вывод, что графики зависимостей для казеинов и мясных белков в значительной степени схожи между собой и имеют заметные отличия от графиков зависимостей для сывороточных белков (рис. 1). Об указанных различиях также свидетельствуют полученные по результатам дисперсионного анализа значения F -критериев и знаки эффектов факторов (табл. 1).

Сравнение значений F -критерия для линейных эффектов факторов температура ($Temp^L$) и pH (pH^L) показывает, что изменение фактора pH^L приводит к большему изменению в значении переменной отклика (выход продуктов гидролиза), чем вариация

фактора $Temp^L$. Это свидетельствует о большей зависимости выхода продуктов гидролиза от уровня pH, чем от температуры гидролиза. Отрицательный знак эффекта фактора pH^L указывает на то, что при повышении pH (от 2 до 4 ед. pH) выход продуктов гидролиза снижается. Повышение температуры от 35 до 50 °C приводит к повышению выхода продуктов гидролиза, что подтверждается положительным знаком эффекта фактора $Temp^L$. Значения линейных эффектов факторов температура и pH существенно превышают значения квадратичных эффектов данных факторов, демонстрируя, что процесс пептического гидролиза казеина и мясных белков характеризуется практически пропорциональной зависимостью между выходом продуктов гидролиза и уровнями температуры и pH. Преобладание линейных эффектов факторов температура и pH над квадратичными означает отсутствие экстремума (максимума или минимума) переменной отклика внутри исследованного диапазона температуры и pH. С учетом знаков линейных эффектов факторов («+» для фактора температура и «–» для pH) можно заключить, что выход продуктов гидролиза на субстратах на основе казеинов и мясных белков возрастает и достигает максимального значения при повышении температуры до 50 °C и снижении pH до 2 ед.

Статистически достоверный эффект парного взаимодействия факторов указывает на то, что воздействие одного из них на вариацию переменной отклика зависит от уровня другого. Для переменной отклика (выход продуктов гидролиза) в зависимости от типа гидролизующего субстрата (казеин или мясные белки) эффекты парного взаимодействия факторов температура и pH ($Temp^L \times pH^L$) отличаются по знаку. Для казеина знак эффекта $Temp^L \times pH^L$ положительный. Это означает, что при более высоком уровне pH повышение температуры обеспечивает больший прирост выхода продуктов гидролиза. Для субстрата на основе мясных белков эффект парного взаимодействия $Temp^L \times pH^L$ имеет отрицательный знак. На фоне более низкого уровня pH повышение температуры способствует большему приросту выхода продуктов гидролиза. Абсолютное значение F -критерия для эффекта парного взаимодействия факторов $Temp^L \times pH^L$ существенно меньше, чем для этих факторов в отдельности: парное взаимодействие присутствует, но не вносит существенного вклада в изменение выхода продуктов гидролиза на субстратах из казеина и мясных белков.

Сходство в уровне и направленности действия факторов температура и pH на выход продуктов гидролиза на субстратах на основе казеина и мясных белков, отличающееся от их действия на выход продуктов гидролиза сывороточных белков, связано с различиями в структуре указанных субстратов. Сывороточные белки изначально присутствуют в субстрате в нативной форме, и их агрегирование происходит в результате гидролиза. В то же время в субстратах на основе казеинов и мясных белков белки изначально агреги-

рованы. Микрофотографии препаратов субстратов на основе казеина в буферных растворах с уровнем pH 2, 3 и 4 ед. представлены на рисунке 3.

Наблюдаемые в микропрепаратах различия в размерах и форме частиц казеина связаны со следующими причинами. При pH 4,6 ед. (изоэлектрическая точка казеина) начинается агрегирование мицелл казеина, приводящее к образованию геля. Дальнейшее изменение pH ниже 4 ед., вызывает усиление сил, противоположно действующих на процесс агрегирования. С одной стороны, агрегации способствуют силы гидрофобного взаимодействия, которые дополнительно возрастают при повышении температуры [44], а также активизация процесса агрегирования за счет водородных связей вследствие повышения заряда боковых цепей аминокислот [36]. С другой стороны, возрастающий положительный электрический заряд казеинов препятствует агрегированию, создавая силы электростатического отталкивания. Суммарное действие этих сил потенциально приводит к получению плотного казеинового геля. Однако в условиях действия внешней разрушающей

силы (например при интенсивном перемешивании) вместо связного геля возникает суспензия из мелких частиц. При дальнейшем подкислении среды до значений ниже 3,5 ед. pH растворимость казеиновых частиц возрастает вследствие увеличения положительного заряда и усиления сил электростатического отталкивания. В области около 2 ед. pH происходит перерастворение казеинового геля, в результате чего образуется стабильный раствор [45]. В исследовании L. Salelles *et al.* [5], включавшем приготовление растворов агрегатов казеина в условиях медленного подкисления, установлено, что в диапазоне pH 3–5 ед. формировались агрегаты казеина с рыхлой структурой и пористой поверхностью. Статистически достоверных различий в размерах агрегатов, полученных при pH 3–5 ед., не выявлено, их размеры составляли 133–203 мкм. При pH 1–2 ед. возникали плотные агрегаты с гладкой поверхностью. В среднем размеры агрегатов при pH 2 ед. были в 2 раза меньше, чем размеры агрегатов, образующихся при pH 3–5 ед. В условиях данного эксперимента при приготовлении

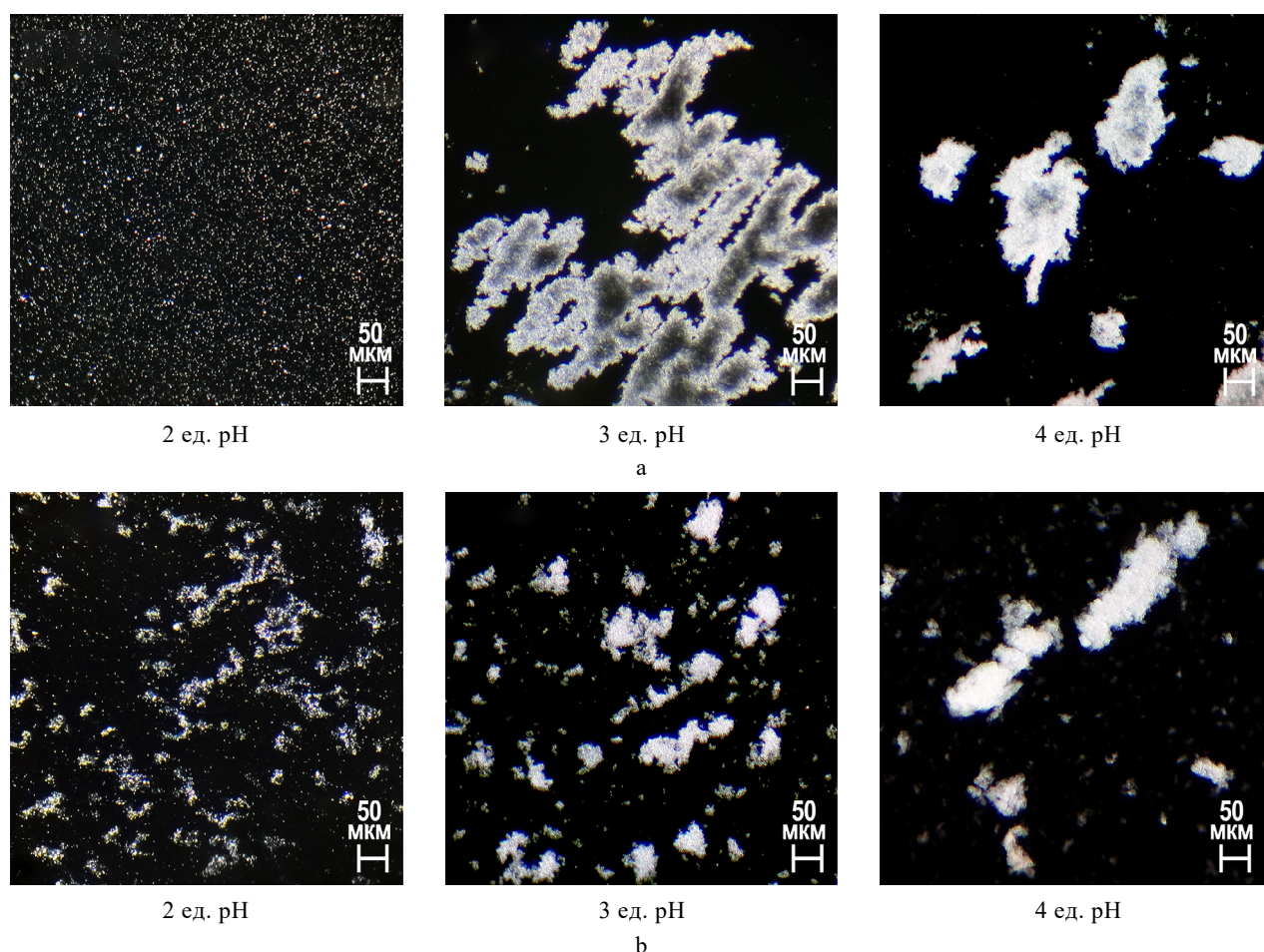


Рисунок 3. Микрофотографии белковых субстратов на основе казеина до (а) и после (б) гидролиза при температуре 50 °С

Figure 3. Protein substrates based on casein before (a) and after (b) hydrolysis at 50 °C

субстрата для гидролиза водный раствор казеина смешивался с раствором кислого буфера при интенсивном перемешивании, что препятствовало структурированию геля. В результате получались суспензии, состоящие из агрегатов разного размера (рис. 3).

В научной литературе приводятся сведения о том, что структура казеинового сгустка в значительной мере влияет на скорость его гидролиза пепсином. В плотных сгустках гидролиз казеина происходит значительно медленнее, чем в рыхлых и содержащих пустоты [46]. Плотная структура казеинового сгустка замедляет скорость его гидролиза, т. к. диффузия пепсина внутрь такого сгустка затруднена, и гидролизу подвергаются только белки на его поверхности [47]. В исследовании G. Somaratne *et al.* [48] показано, что скорость диффузии пепсина выше внутрь более рыхлой белковой гелевой сети белка, чем внутрь более плотного геля. X. He *et al.* [49] установили, что разрыхление казеинового сгустка посредством обработки под высоким давлением (400–600 МПа) позволило повысить скорость его гидролиза пепсином.

Установленный по результатам дисперсионного анализа (табл. 1) эффект парного взаимодействия факторов температура и pH можно объяснить неодинаковой плотностью агрегатов казеина при разных уровнях pH. Этот эффект выражается в тенденции к снижению выхода продуктов гидролиза при повышении температуры от 35 до 50 °С и снижении pH от 4 до 2 ед. В микропрепаратах растворов казеина до начала гидролиза, видно, что агрегаты, полученные при pH 4 ед., имеют менее плотную структуру с менее ровными краями, чем агрегаты, сформировавшиеся при pH 3 ед. (рис. 3). Поэтому менее плотные сгустки, возникшие при pH 4 ед., более доступны для гидролиза, чем более плотные, образовавшиеся при pH 3 ед. Тенденция к замедлению гидролиза при снижении pH до 2 ед. связана с другими причинами.

Высвобожденные в результате гидролиза пептиды в ферментативных гидролизатах казеина способны самоорганизоваться в агрегаты преимущественно за счет гидрофобного взаимодействия и образования водородных связей. Ядра таких агрегатов содержат гидрофобные пептиды, к которым через гидрофобные участки пристыкованы амфифильные пептиды, окружающие ядро. При pH 2,0 ед. гидрофобные взаимодействия, а также усилившееся действие водородных связей и катион–π взаимодействий способствуют дальнейшему объединению агрегатов гидролизованного казеина в развитую трехмерную сеть макроагрегатов [47]. Подобную разветвленную сеть агрегированных белковых частиц можно видеть на микропрепарате казеина после гидролиза при pH 2 ед. (рис. 3).

На основании результатов дисперсионного анализа (табл. 1), форм зависимости выхода продуктов гидролиза от температуры и pH (рис. 1), а также структуры белковых частиц в растворах казеина (рис. 3) можно выдвинуть гипотезу, объясняющую замедление выхода

продуктов гидролиза казеина при повышении температуры на фоне кислотности в районе 2 ед. pH. При таких условиях активность куриного и свиного пепсинов максимальна, а казеин практически не агрегирован и открыт для контакта с ними (рис. 3). В результате происходит быстрый гидролиз казеина с последующим агрегированием высвобожденных пептидов. Часть доступных для гидролиза пепсином связей оказывается скрытой внутри агрегатов и становится недоступной для контакта с ферментом, что приводит к снижению скорости и уменьшению выхода продуктов гидролиза. Такая зависимость отчетливо наблюдается для куриного пепсина: при снижении pH от 4 до pH 2 ед. выход продуктов гидролиза возрастает все слабее (рис. 1). Для свиного пепсина резкое повышение его активности в области pH 2 ед. приводит к увеличению скорости гидролиза, что компенсирует снижение доступности субстрата и в результате обеспечивает ускоренный рост выхода продуктов гидролиза (рис. 1).

Так же, как и субстрат на основе казеина, использованный в данных экспериментах, мясной субстрат содержит белки в агрегированной форме. Микрофотографии препаратов субстратов на основе мясных белков в буферных растворах с уровнем pH 2, 3 и 4 ед. представлены на рисунке 4.

Видимые на микропрепаратах крупные волокнистые частицы идентифицированы как фрагменты фибрилл коллагена на основании сравнения со снимками коллагена, полученными методом электронной микроскопии [48, 51, 52].

Особенность использованного в эксперименте субстрата на основе мясных белков заключается в существенной степени денатурации и агрегации содержащихся в нем белков. Об этом свидетельствуют микропрепараты мясного субстрата, в которых присутствуют многочисленные нерастворимые частицы. Так же, как и в случае казеинового субстрата, агрегирование мясных белков ограничивает их доступность для фермента, что снижает скорость гидролиза.

Уровень pH в субстрате до начала гидролиза не влияет на состояние белковых частиц и, следовательно, на степень их доступности для фермента. Под действием гидролитической активности пепсина происходит разрушение структуры белковых частиц, что делает возможным диффузию фермента вглубь частиц и дополнительно усиливает их гидролиз [39]. При pH 4 ед. практически отсутствуют видимые изменения в структуре частиц коллагена к моменту завершения гидролиза. При более низком pH (в разной степени для pH 3 и 2 ед.) отмечается гидратация и разрушение структуры фибрилл коллагена с распадом их на мелкие частицы. В результате увеличивается площадь поверхности субстрата, доступная для контакта с ферментом. Обширная гидратация улучшает растворимость субстрата и дополнительно усиливает процесс гидролиза. Аналогичные изменения происходят и с другими компо-

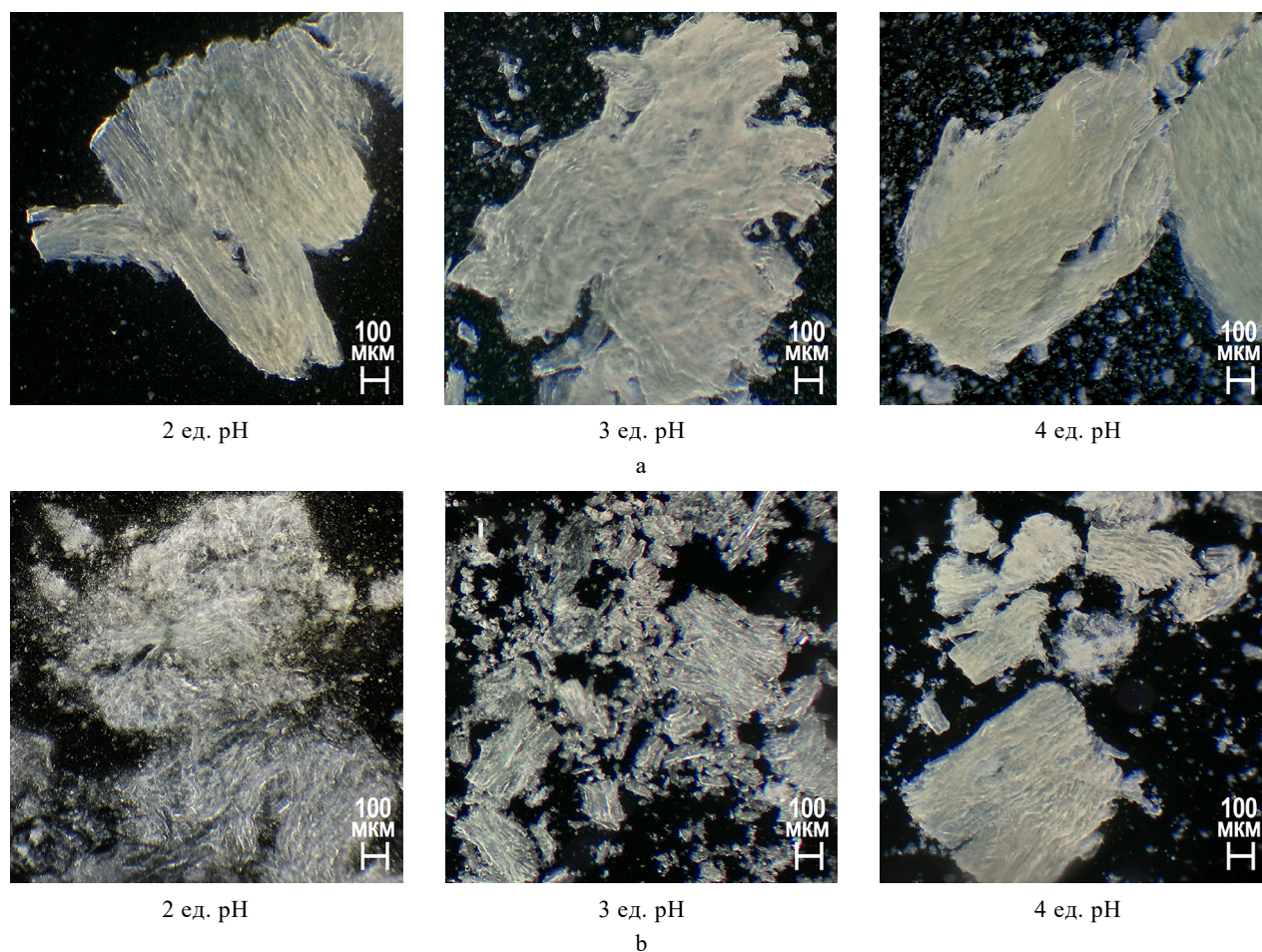


Рисунок 4. Микрофотографии белковых субстратов на основе мясных белков до (а) и после (б) гидролиза при температуре 50 °С

Figure 4. Protein substrates based on meat proteins before (a) and after (b) hydrolysis at 50 °C

нентами субстрата на основе мясных белков, включая агрегаты миофибриллярных и саркоплазматических белков. Малые размеры последних не позволяют наглядно продемонстрировать методом световой микроскопии изменения в их структуре. Однако на их активное расщепление пепсином указывает значительное увеличение выхода продуктов гидролиза на субстрате из мясных белков при снижении pH от 4 до 2 ед. Продукты гидролиза коллагена очень слабо поглощают при длине волны 280 нм и не могут вносить заметного вклада в выход продуктов гидролиза, оцениваемый по интенсивности поглощения при этой длине волны. Поэтому возрастание выхода продуктов гидролиза может быть связано только с образованием продуктов гидролиза миофибриллярных и саркоплазматических белков, содержащих большое количество тирозина и триптофана и интенсивно поглощающих при 280 нм.

Для казеина при снижении pH до 2 ед. отмечается замедление гидролиза, связанное с формированием агрегатов из продуктов гидролиза и снижением доступности субстрата. Для мясных белков, наоборот, при

снижении pH до 2 ед. происходит ускорение гидролиза, обусловленное изменением структуры субстрата и выходом на поверхность большого количества потенциальных точек гидролиза пепсином. Именно этим обусловлен установленный по результатам дисперсионного анализа отрицательный знак эффекта парного взаимодействия $\text{Temp}^L \times \text{pH}^L$ в модели, описывающей выход продуктов гидролиза на субстрате из мясных белков в зависимости от температуры и pH. Следовательно, при повышении температуры и снижении pH, выход продуктов гидролиза на субстрате из мясных белков возрастает.

Выводы

Для свиного и куриного пепсинов практически отсутствуют различия по температурам, при которых достигается максимальный выход продуктов гидролиза на исследованных белковых субстратах на основе нативных сывороточных белков, казеинов и денатурированных мясных белков. В исследованном диапазоне температур от 35 до 50 °С максималь-

ный выход продуктов гидролиза наблюдается при 50 °С. Фактически температура может быть и выше, что соответствует данным научной литературы о сохранении пепсином активности до 60 °С. Сравнение влияния температуры на активность пепсинов показывает, что на одном и том же белковом субстрате при снижении температуры от 50 до 35 °С куриный пепсин теряет активность в большей степени, чем свиной.

В исследованном диапазоне кислотности от 2 до 4 ед. рН максимальный выход продуктов гидролиза на субстратах из казеинов и мясных белков наблюдается при рН 2,0 ед., а для субстрата на основе нативных сывороточных белков – при рН 2,9 ед. для куриного пепсина и рН 2,3 ед. для свиного. Полученные данные свидетельствуют о том, что активность свиного пепсина в большей степени зависит от рН, чем активность куриного. Активность свиного пепсина резко снижается при повышении рН от 2 до 3 ед. даже на фоне оптимальной для активности пепсина температуры гидролиза (50 °С). При тех же условиях, активность куриного пепсина более стабильна.

Температура и рН влияют на скорость гидролиза не только через изменение активности пепсинов, но и косвенно – через изменение структуры субстратов.

При оптимальном для активности пепсина значении рН (~2 ед.) главный белок сыворотки β -лактоглобулин обладает компактной структурой, препятствующей гидролизу ферментом. При повышении рН (от 2 до 4 ед.) доступность β -лактоглобулина для гидролиза возрастает, но параллельно снижается активность пепсина. Баланс между этими разнонаправленными процессами достигается в интервале 2–3 ед. рН, когда скорость пептического гидролиза субстрата из нативных сывороточных белков максимальна.

Для казеинов снижение рН от 4 до 3 ед. вызывает повышение скорости гидролиза как вследствие повышения активности пепсина, так и вследствие разрушения агрегатов казеина. Снижение рН до 2 ед. сопровождается некоторым замедлением гидролиза

из-за формирования вторичных агрегатов, образующихся из продуктов гидролиза казеинов.

Для мясных белков снижение рН от 4 до 2 ед. приводит к ускорению скорости гидролиза благодаря совместному действию двух взаимно усиливающих процессов: повышения активности пепсина и увеличения доступности субстрата для гидролиза.

Пепсины рекомендуются для производства гидролизатов из мясных белков, особенно подвергшихся интенсивной тепловой обработке, сильно денатурированных и агрегированных. Использование пепсинов для гидролиза мясных субстратов позволит получить гидролизаты с высокой биологической ценностью при высокой степени конверсии белка из сырья в продукты гидролиза.

Критерии авторства

Д. С. Мягконов – организация и руководство проведением исследований, анализ литературы и результатов экспериментов, написание статьи. Д. В. Абрамов – проведение экспериментов, обработка результатов, написание статьи. О. Г. Кашникова – проведение экспериментов, участие в написании статьи и анализе результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

D.S. Myagkonosov supervised the research, wrote the review, analyzed the experimental results, and wrote the manuscript. D.V. Abramov performed the experiments, processed the results, and wrote the manuscript. O.G. Kashnikova conducted the experiments, wrote the manuscript, and analyzed the results.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Jakopović KL, Cheison SC, Kulozik U, Božanić R. Comparison of selective hydrolysis of α -lactalbumin by acid Protease A and Protease M as alternative to pepsin: Potential for β -lactoglobulin purification in whey proteins. *Journal of Dairy Research*. 2019;86(1):114–119. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000086>
2. Bayrak M, Han Qi, Greaves TL, Seibt S, Yu H, *et al.* Correlating structure and activity of pepsin enzyme in H₂O and D₂O for the study of gastric digestion. *Food Chemistry Advances*. 2024;4:100638. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100638>
3. Kondjoyan A, Daudin JD, Santé-Lhoutellier V. Modelling of pepsin digestibility of myofibrillar proteins and of variations due to heating. *Food Chemistry*. 2015;172:265–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.110>
4. Maeda N, Dulko D, Macierzanka A, Jungnickel C. Analysis of the factors affecting static *in vitro* pepsinolysis of food proteins. *Molecules*. 2022;27(4):1260. <https://doi.org/10.3390/molecules27041260>
5. Salelles L, Floury J, Le Feunteun S. Pepsin activity as a function of pH and digestion time on caseins and egg white proteins under static *in vitro* conditions. *Food and Function*. 2021;12(24):12468–12478. <https://doi.org/10.1039/D1FO02453A>
6. Crévieu-Gabriel I, Gomez J, Caffin JP, Carré B. Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis. *Reproduction Nutrition Development*. 1999;39(4): 443–454. <https://doi.org/10.1051/rnd:19990404>

7. Suwareh O, Causeur D, Jardin J, Briard-Bion V, Le Feunteun S, et al. Statistical modeling of *in vitro* pepsin specificity. Food Chemistry. 2021;362:130098. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130098>
8. Matinong AME, Chisti Y, Pickering KL, Haverkamp RG. Collagen extraction from animal skin. Biology. 2022;11(6):905. <https://doi.org/10.3390/biology11060905>
9. Hasan MJ, Haque P, Rahman MM. Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. Journal of Cleaner Production. 2022;365:132826. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132826>
10. Park HJ, Lee HJ. Digestive enzyme supplementation in prescription drugs, over-the-counter drugs, and enzyme foods. Journal of Pharmaceutical Investigation. 2023;53(3):343–355. <https://doi.org/10.1007/s40005-022-00605-8>
11. Osuna-Ruiz I, Tiznado-Garzón R, Salazar-Leyva JA, García-Magaña de ML, García IB, et al. Milk-clotting and proteolytic properties of a partially purified pepsin from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) and its potential for cheesemaking. Food and Bioprocess Technology. 2023;16(8):1769–1780. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03030-3>
12. Niamah AK, Al-Sahlany STG, Verma DK, Singh S, Tripath S, et al. Enzymes for meat and meat processing industry: Current trends, technological development, and future prospects. Enzymatic Processes for Food Valorization. 2024;23–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95996-4.00002-2>
13. Соколов Д. В., Болхонов Б. А., Жамсаранова С. Д., Лебедева С. Н., Баженова Б. А. Ферментативный гидролиз соевого белка. Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 1. С. 86–96. [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>
14. Лебедева С. Н., Болхонов Б. А., Жамсаранова С. Д., Баженова Б. А., Лескова С. Ю. Изучение некоторых функциональных характеристик ферментативных гидролизатов пищевых белков. Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 2. С. 412–422. [Lebedeva SN, Bolkhonov BA, Zhamsaranova SD, Bazhenova BA, Leskova SYu. Functional profile of enzymatic hydrolysates in food proteins. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(2):412–422. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2515>
15. Gharaviri M, Aleksanochkin DI, Ahangaran M, Fomenko IA, Kovalev LI, et al. Chickpea protein hydrolysates: Production, bioactivity, functional profile, and technological properties. Foods and Raw Materials. 2026;14(1):198–213. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2026-1-666>
16. Wang C, Zhao F, Bai Y, Li C, Xu X, et al. Effect of gastrointestinal alterations mimicking elderly conditions on *in vitro* digestion of meat and soy proteins. Food Chemistry. 2022;383:132465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132465>
17. Костылева Е. В., Серeda А. С., Великорецкая И. А., Курбатова Е. И., Цурикова Н. В. Использование протеолитических ферментов для получения белковых гидролизатов пищевого назначения из вторичного сырья. Вопросы питания. 2023. Т. 92. № 1. С. 116–132. [Kostyleva EV, Sereda AS, Velikoretskaya IA, Kurbatova EI, Tsurikova NV. Proteases for obtaining of food protein hydrolysates from proteinaceous by-products. Problems of Nutrition. 2023;92(1):116–32. (In Russ.)] <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2023-92-1-116-132>
18. Кучина Ю. А., Колотова Д. С., Толстиков В. В., Василевич В. В., Деркач С. Р. Ферментативные рыбные белковые гидролизаты из отходов переработки атлантической трески: влияние типа и концентрации фермента. Техника и технология пищевых производств. 2026. Т. 56. № 1. С. 1–15. [Kuchina YuA, Kolotova DS, Tolstikov VV, Vasilevich VV, Derkach SR. Effect of enzyme type and concentration on fish protein hydrolysates from *Gadus morhua* processing waste. Food Processing: Techniques and Technology. 2026;56(1):1–15. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-1-2618>
19. Qi L, Qin X, Mao L, Zhang C, Guo Y. Steam explosion assisted enzymolysis for the preparation of low molecular weight osteogenic collagen peptides from bovine bone by-products. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2025;104221. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2025.104221>
20. Dao DT, Hien LT, Thinh NP, Thang N, Ha DV, et al. Recovery of amino acids and peptides from pig bone soup using thermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis. Journal of Food Processing and Preservation. 2022;46(7):e16700. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16700>
21. Chen H, Zhao G, Yu X, Zhang Q, Zhu C, et al. Exploring *in vitro* gastrointestinal digestion of myofibrillar proteins at different heating temperatures. Food Chemistry. 2023;414:135694. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135694>
22. Yang M, Yang Z, Everett DW, Gilbert EP, Singh H, et al. Digestion of food proteins: The role of pepsin. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2025;65:6919–6940. <https://doi.org/10.1080/10408398.2025.2453096>
23. Castañeda-Valbuena D, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Morellon-Sterling R, Tacias-Pascacio VG. Biological activities of peptides obtained by pepsin hydrolysis of fishery products. Process Biochemistry. 2022;120:53–63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.029>
24. Ashaolu TJ, Lee CC, Ashaolu JO, Tarhan O, Pourjafar H, et al. Pepsin: An excellent proteolytic enzyme for the production of bioactive peptides. Food Reviews International. 2024;40(7):1875–1912. <https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2238814>
25. Sosalagere C, Kehinde BA, Sharma P. Isolation and functionalities of bioactive peptides from fruits and vegetables: A reviews. Food chemistry. 2022;366:130494. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130494>

26. Kumari S, Shahidi F. Bioactive peptides as antioxidants and antimicrobials: Fundamentals and applications. *Journal of Food Bioactives*. 2024;25. <https://doi.org/10.31665/JFB.2024.18367>
27. Wang YM, Li X-Y, Wang J, He Y, Chi C-F, *et al.* Antioxidant peptides from protein hydrolysate of skipjack tuna milt: Purification, identification, and cytoprotection on H₂O₂ damaged human umbilical vein endothelial cells. *Process Biochemistry*. 2022;113:258–269. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.008>
28. Gathercole J, Maes E, Thomas A, Wieliczko R, Grosvenor A, *et al.* Unlocking the bioactivity of meat proteins: Comparison of meat and meat hydrolysate via simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Proteomics*. 2023;273:104806. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104806>
29. Baba WN, Baby B, Mudgil P, Gan CY, Vijayan R, *et al.* Pepsin generated camel whey protein hydrolysates with potential antihypertensive properties: Identification and molecular docking of antihypertensive peptides. *LWT*. 2021;143:111135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111135>
30. Sharma P, Kaur J, Sharma G, Kashyap P. Plant derived antimicrobial peptides: Mechanism of target, isolation techniques, sources and pharmaceutical applications. *Journal of Food Biochemistry*. 2022;46(10):e14348. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14348>
31. Cakir B, Tunali-Akbay T. Potential anticarcinogenic effect of goat milk-derived bioactive peptides on HCT-116 human colorectal carcinoma cell line. *Analytical Biochemistry*. 2021;622:114166. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114166>
32. Zhao Q, Mu G, Zheng Y, Du W, Zhao A, *et al.* Targeted hydrolysis of α -lactalbumin to reduce allergenicity based on the synergistic effect of pepsin and papain. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025;311:144016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144016>
33. He W, He K, Sun F, Mu L, Liao S, *et al.* Effect of heat, enzymatic hydrolysis and acid-alkali treatment on the allergenicity of silkworm pupa protein extract. *Food Chemistry*. 2021;343:128461. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128461>
34. Stoll VS, Blanchard JS. Buffers: Principles and practice. In: Burgess RR, Deutscher MP, editors. *Methods in enzymology*. New York; Academic Press. 2009. pp. 43–56. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63006-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63006-8)
35. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. Eighth edition. John Wiley & Sons, Inc.; 2012. 741 p.
36. Belloque J, Chicón R, López-Fandiño R. Unfolding and refolding of β -lactoglobulin subjected to high hydrostatic pressure at different pH values and temperatures and its influence on proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(13):5282–5288. <https://doi.org/10.1021/jf070170w>
37. Ye A, Cui J, Dalgleish D, Singh H. Formation of a structured clot during the gastric digestion of milk: Impact on the rate of protein hydrolysis. *Food Hydrocolloids*. 2016;52:478–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.023>
38. Mouécoucou J, Villaume C, Sanchez C, Méjean L. β -Lactoglobulin/polysaccharide interactions during *in vitro* gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs. 2004;1670(2):105–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2003.10.017>
39. Hoppenreijls LJ, Brune SE, Biedendieck R, Krull R, Boom RM, *et al.* Fibrillation of β -lactoglobulin at pH 2.0: Impact of cysteine substitution and disulfide bond reduction. *Food Hydrocolloids*. 2023;141:108727. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108727>
40. Li S, Ye A, Singh H. Impacts of heat-induced changes on milk protein digestibility: A review. *International Dairy Journal*. 2021;123:105160. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105160>
41. Haas J, Kim JB, Atamer Z, Wu C, Dallas DC. Effects of high-temperature, short-time pasteurization on milk and whey during commercial whey protein concentrate production. *Journal of Dairy Science*. 2025;108(1):257–271. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25493>
42. Li R, Lund P, Nielsen SB, Lund MN. Formation of whey protein aggregates by partial hydrolysis and reduced thermal treatment. *Food Hydrocolloids*. 2022;124:107206. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107206>
43. Luo N, Ye A, Wolber FM, Singh H. Effect of gel structure on the *in vitro* gastrointestinal digestion behaviour of whey protein emulsion gels and the bioaccessibility of capsaicinoids. *Molecules*. 2021;26(5):1379. <https://doi.org/10.3390/molecules26051379>
44. Sun Q, Fu Y, Wang W. Temperature effects on hydrophobic interactions: Implications for protein unfolding. *Chemical Physics*. 2022;559:111550. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2022.111550>
45. Ranadheera CS, Liyanaarachchi WS, Dissanayake M, Chandrapala J, Huppertz T, *et al.* Impact of shear and pH on properties of casein micelles in milk protein concentrate. *LWT*. 2019;108:370–376. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.090>
46. Ye A. Gastric colloidal behaviour of milk protein as a tool for manipulating nutrient digestion in dairy products and protein emulsions. *Food Hydrocolloids*. 2021;115:106599. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106599>
47. Yang M, Ye A, Yang Z, Everett DW, Gilbert EP, *et al.* Effect of ingestion temperature on the pepsin-induced coagulation and the *in vitro* gastric digestion behavior of milk. *Food Hydrocolloids*. 2023;139:108550. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108550>
48. Somaratne G, Nau F, Ferrua MJ, Singh J, Ye A, *et al.* Characterization of egg white gel microstructure and its relationship with pepsin diffusivity. *Food Hydrocolloids*. 2020;98:105258. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105258>

49. He X, Yang M, Yuan F, Singh H, Ye A. High-pressure processing of bovine milk: Effects on the coagulation of protein and fat globules during dynamic *in vitro* gastric digestion. *Current Research in Food Science*. 2022;5:1530–1538. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.09.006>
50. Liu Y, Guo R. Aggregation properties of aqueous casein hydrolysate solutions at different pH. *International Dairy Journal*. 2008;18:1022–1027. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.005>
51. Egorikhina MN, Semenycheva LL, Chasova VO, Bronnikova II, Rubtsova YP, *et al.* Changes in the molecular characteristics of bovine and marine collagen in the presence of proteolytic enzymes as a stage used in scaffold formation. *Marine Drugs*. 2021;19(9):502. <https://doi.org/10.3390/md19090502>
52. Houška M, Landfeld A, Novotná P, Strohalm J, Šupová M, *et al.* Properties of bovine collagen as influenced by high-pressure processing. *Polymers*. 2023;15(11):2472. <https://doi.org/10.3390/polym15112472>

Дополнительная информация об авторах / Additional information about the authors

Мягконосов Дмитрий Сергеевич / Dmitry S. Myagkonosov ORCID 0000-0003-4443-7573; eLIBRARY SPIN 3806-9937
Абрамов Дмитрий Васильевич / Dmitry V. Abramov ORCID 0000-0001-8326-1932; eLIBRARY SPIN 3030-7717
Кашникова Ольга Геннадьевна / Olga G. Kashnikova ORCID 0000-0002-7557-6835; eLIBRARY SPIN 1191-7440