

**TECHNOLOGY OF SOY-MILK COMBINED PRODUCT FOR SPECIAL PURPOSE WITH MILK WHEY PROTEIN HYDROLYSATE**

V. Yukalo, K. Datsyshyn

*Ternopil Ivan Pul'uj National Technical University***Key words:***Milk protein allergy**Biologically active**Peptides**Whey protein hydrolysate***Article history:**

Received 02.10.2019

Received in revised form

16.10.2019

Accepted 15.11.2019

**Corresponding author:**

V. Yukalo

**E-mail:**

biotech@tu.edu.te.ua

**ABSTRACT**

Cow's milk protein allergy is a problem that affects adults and children around the world and is a major cause of restriction or refusal to consume from dairy products. Cow's milk contains more than 20 proteins (allergens) that can cause allergic reactions. The problem of milk proteins allergy can be solved by the way of hydrolysis of milk proteins to hypoallergenic low molecular weight peptides. Another way may be the complete replacement of milk proteins with other dietary proteins. In both cases, especially in the second one, many biologically active peptides that have positive effect on the organism are lost. A valuable source of such biologically active peptides is whey protein-precursors. Therefore, the purpose of the work was to develop the technology of soy-milk combined product for special purpose with using the whey protein hydrolysate. Whey protein concentrate was used as a substrate for the production of whey protein hydrolysate. Proteolysis was performed by pancreatin in the conditions of biologically active peptides maximum yield. The degree of hydrolysis was determined as the ratio of proteolysis products soluble of 5% trichloroacetic acid to all whey protein concentrate proteins. The known technology of cheese product from soy bean, which includes acid coagulation of a soy isolate solution at a temperature of 92—95°C, was taken as the basis. We propose to enrich this product with milk whey protein hydrolysate. Hydrolysate was added in an amount corresponding to mass ratio of whey proteins among milk proteins.

Organoleptic and physico-chemical parameters, as well as the content of low molecular weight peptides were determined in the obtained product. It was established that the obtained product is characterized by good organoleptic, and physico-chemical characteristics, which are typical for such products. The results of the gel filtration show an increase of low molecular weight peptide fraction ( $M \leq 1500$  Da) from 5% to 19% in the proposed product. Known natural biologically active peptides from whey proteins are characterized by such molecular masses. Taking into account the composition, results of organoleptic and physico-chemical analysis, the proposed combined soy-milk product may be recommended for the special nutrition of persons with milk proteins allergy.

**DOI:** 10.24263/2225-2924-2019-25-6-26

## ТЕХНОЛОГІЯ СОЄВО-МОЛОЧНОГО КОМБІНОВАНОГО ПРОДУКТУ СПЕЦІАЛЬНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ З ГІДРОЛІЗАТОМ БІЛКІВ СИРОВАТКИ МОЛОКА

В. Г. Юкало, К. Є. Дацишин

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

*Алергія на білки коров'ячого молока вражає дорослих і дітей в усьому світі і є основною причиною обмеження або відмови від вживання молочних продуктів. Коров'яче молоко містить більше 20 білків (алергенів), які можуть викликати алергічні реакції. Вирішити проблему алергії на білки молока можна шляхом гідролізу білків молока до низькоалергенних пептидів з малою молекулярною масою. Ще одним шляхом може бути повна заміна білків молока на інші харчові білки. В обох випадках, особливо у другому, втрачаються численні біологічно активні пептиди, які позитивно впливають на організм. Цінним джерелом таких біологічно активних пептидів є білки-попередники із сироватки молока.*

*У статті розроблено технологію соєво-молочного комбінованого продукту спеціального призначення з використанням гідролізату білків сироватки молока. Як субстрат для отримання гідролізату білків сироватки молока використано концентрат сироваткових білків. Протеоліз проведено панкреатином в умовах максимального виходу біологічно активних пептидів. Ступінь гідролізу визначено як співвідношення продуктів протеолізу, розчинних у 5% трихлороцтовій кислоті, до всіх протеїнів концентрату сироваткових білків. За основу взято відому технологію сирного продукту із сої, яка включає кислотну коагуляцію розчину соєвого ізоляту при температурі 92—95°C. У запропонованій технології передбачається збагачення отриманого продукту гідролізатом білків сироватки молока. Гідролізат білків сироватки молока вносили у кількості, що відповідає їх масовій частці серед білків молока.*

*В отриманому комбінованому соєво-молочному продукті визначено органолептичні та фізико-хімічні показники, а також вміст низькомолекулярних пептидів. Встановлено, що готовий продукт характеризується хорошими органолептичними, а також фізико-хімічними показниками, характерними для такого типу продуктів. Результати проведеної гель-фільтрації показують підвищення в отриманому продукті низькомолекулярної пептидної фракції ( $M \leq 1500$  Да) із 5% до 19%. Саме такими молекулярними масами характеризується більшість природних біологічно активних пептидів з білків сироватки молока. Враховуючи склад, результати органолептичного та фізико-хімічного аналізу, запропонований комбінований соєво-молочний продукт може бути рекомендованим для спеціального харчування осіб з алергією на білки молока.*

**Ключові слова:** алергія на білки молока, біологічно активні пептиди, гідролізат сироваткових білків.

**Постановка проблеми.** В усьому світу сьогодні спостерігається тенденція до росту кількості алергічних захворювань. За даними епідеміологічних досліджень близько 30% населення планети мають різні алергічні реакції і їхня частота постійно зростає. Гіперчутливість до білків коров'ячого молока є однією з основних харчових алергій і вражає в основному дітей. Також вона може зберігатися і в зрілому віці [1]. Коров'яче молоко містить більше 20 білків (алергенів), які можуть викликати алергічні реакції [2]. Повна заміна білків молока на інші неалергенні або низькоалергенні харчові білки може вирішити цю проблему, проте відомо, що протеїни молока є не тільки повноцінним джерелом амінокислот, але й великої кількості (більше 200) біоактивних пептидів (БАП) [3]. Ці природні БАП позитивно впливають на функції організму людини, особливо вони важливі в дитячому віці. Тому актуальним є створення для людей, схильних до алергічних реакцій на білки молока, продуктів, у яких повністю або частково були б збережені природні БАП з молочних білків-попередників.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Вирішення проблеми алергії на білки молока, зокрема  $\alpha$ -лактальбумін та  $\beta$ -лактглобулін найчастіше включає гідроліз білків до низькоалергенних пептидів з малою молекулярною масою [4]. При цьому все-таки залишається певна кількість алергенних пептидів і поліпептидів. Інший шлях полягає у повній заміні протеїнів молока на інші харчові протеїни [5]. В обох випадках, особливо у другому, втрачаються численні БАП, які позитивно впливають на організм. Зокрема, цінним джерелом таких БАП є білки-попередники із сироватки молока [3]. З різних протеїнів сироватки молока можуть утворюватись антигіпертензивні пептиди, антагоністи опіатних рецепторів, регулятори моторики кишківника, імуномодуляторні та антимікробні пептиди. Досліджуються нові види біоактивних пептидів, які проявляють антиканцерогенну й антиоксидантну дію, знижують рівень холестеролу в крові, регулюють апетит, впливають на засвоєння кальцію [6]. До основних попередників БАП із сироватки молока відносяться  $\beta$ -лактглобулін ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -лактальбумін ( $\alpha$ -LA), а також, меншою мірою, альбумін сироватки (BSA) та лактоферин (LF). Більше 50% первинної структури  $\beta$ -LG та більше 40% у  $\alpha$ -LA входить до складу різних видів БАП. З  $\beta$ -LG утворюється багато антигіпертензивних пептидів [3]. Ці пептиди називаються лактокініни і здатні гальмувати активність ангіотензин перетворювального ензиму. Відомо, що висока активність цього ензиму є причиною артеріальної гіпертензії і, відповідно, фактором ризику в розвитку серцево-судинних захворювань. Ряд антигіпертензивних пептидів утворюється з  $\alpha$ -LA. Заслуговують на увагу також опіюїдні пептиди [7]. Вони отримали назву лакторфінів. Лакторфіни впливають на емоційний стан, проявляють анальгетичну дію, гальмують перистальтику кишечника. З  $\alpha$ -LA в основному утворюються імуномодуляторні пептиди [8]. Вони здатні підвищувати імунітет клітин слизової шлунково-кишкового тракту та знижувати алергічні реакції. З LF утворюється багато антимікробних пептидів [9; 10]. Вони вибірково можуть пригнічувати розвиток патогенних мікроорганізмів. Цінним є те, що молочнокислі бактерії стійкі до їх дії.

Всі ці природні БАП утворюються у фізіологічних умовах і за дії протеаз шлунково-кишкового тракту. В той же час при зниженні алергенності протеїнів сироватки молока використовують активні протеази з широкою специфічністю рослинного та мікробіологічного походження [11]. У цьому разі ймовірність утворення природних БАП суттєво знижується. Звичайно, при повній заміні білків молока їх утворення неможливе в принципі. Їх амінокислотні послідовності відсутні у первинній структурі білків-замінників. Враховуючи зазначене вище, перспективним для людей з алергією на білки молока може бути комбінований продукт, який містить повноцінні харчові білки (наприклад, білки сої) як джерело амінокислот і гідролізат білків сироватки молока, що включають широкий спектр природних БАП. Для цього гідролізати білків сироватки (ГБС) необхідно отримувати у фізіологічних умовах, які забезпечують максимальний вихід природних БАП.

**Мета дослідження:** розробка технології комбінованого соєво-молочного продукту спеціального призначення з використанням гідролізату білків сироватки молока.

**Матеріали і методи.** Як основу для виробництва продукту використовували сухий соєвий ізолят фірми «Sinoglogy» (Китай). Для отримання гідролізату використано концентрат сироваткових білків (КСБ), вироблений на ТОВ «Бу-чацький сирзавод» (Україна) згідно з проектом ТУ У 15.5-00419880-XXX:2011 «Концентрат сироваткових білків (КСБ-УФ). Технічні умови» та ферментний препарат панкреатин виробництва ПрАТ «Технолог» (Україна). Фракційний склад протеїнів сироватки визначали експрес-методом, розробленим раніше [12]. Протеолітичну активність ферментного препарату визначали за методом В. Селеменева [13]. Ступінь гідролізу визначали як співвідношення продуктів протеолізу розчинних у 5% трихлороцтовій кислоті до всіх протеїнів сироватки. Концентрацію протеїнів сироватки та продуктів їх протеолізу визначали за поглинанням при  $\lambda=280$  нм на спектофотометрі СФ-46. При цьому використовували коефіцієнт абсорбції ( $D_{1\text{см}}^{1\%}$ ) — 12,3 [14].

Масову частку білка визначали в готовому продукті відповідно до ГОСТ 26889, масову частку жиру — ДСТУ 4941:2008, масову частку вологи — ДСТУ 8552:2015. Активну кислотність визначали за ДСТУ 8550:2015. Вміст низькомолекулярних пептидів у готовому продукті визначали гель-фільтрацією на колонках з набору для рідинної хроматографії фірми «Reanal» (Угорщина). При цьому був використаний сефадекс G-50.

**Результати і обговорення.** Об'єктом нашого дослідження була технологія соєво-молочного комбінованого продукту спеціального призначення з гідролізатом білків сироватки молока. За основу взято технологію сирного продукту із сої, описану раніше [15]. Технологія передбачає коагуляцію розчину соєвого ізоляту сумішшю молочної, оцтової кислот і розчину хлориду натрію, взятих у співвідношенні 4:2:1. Коагуляцію проводили протягом 30—40 хв при температурі розчину 92—95°C. Після завершення коагуляції згусток охолоджують, відділяють сироватку та пакують. В технології, запропонованій авторами цієї статті, передбачається збагачення отриманого, як описано вище, соєвого продукту гідролізатом білків сироватки молока. Такий комбі-

нований соєво-молочний продукт буде містити гідролізат, отриманий в умовах, які забезпечують утворення природних БАП. Технологічна схема виготовлення комбінованого соєво-молочного продукту з ГБС показана на рисунку.

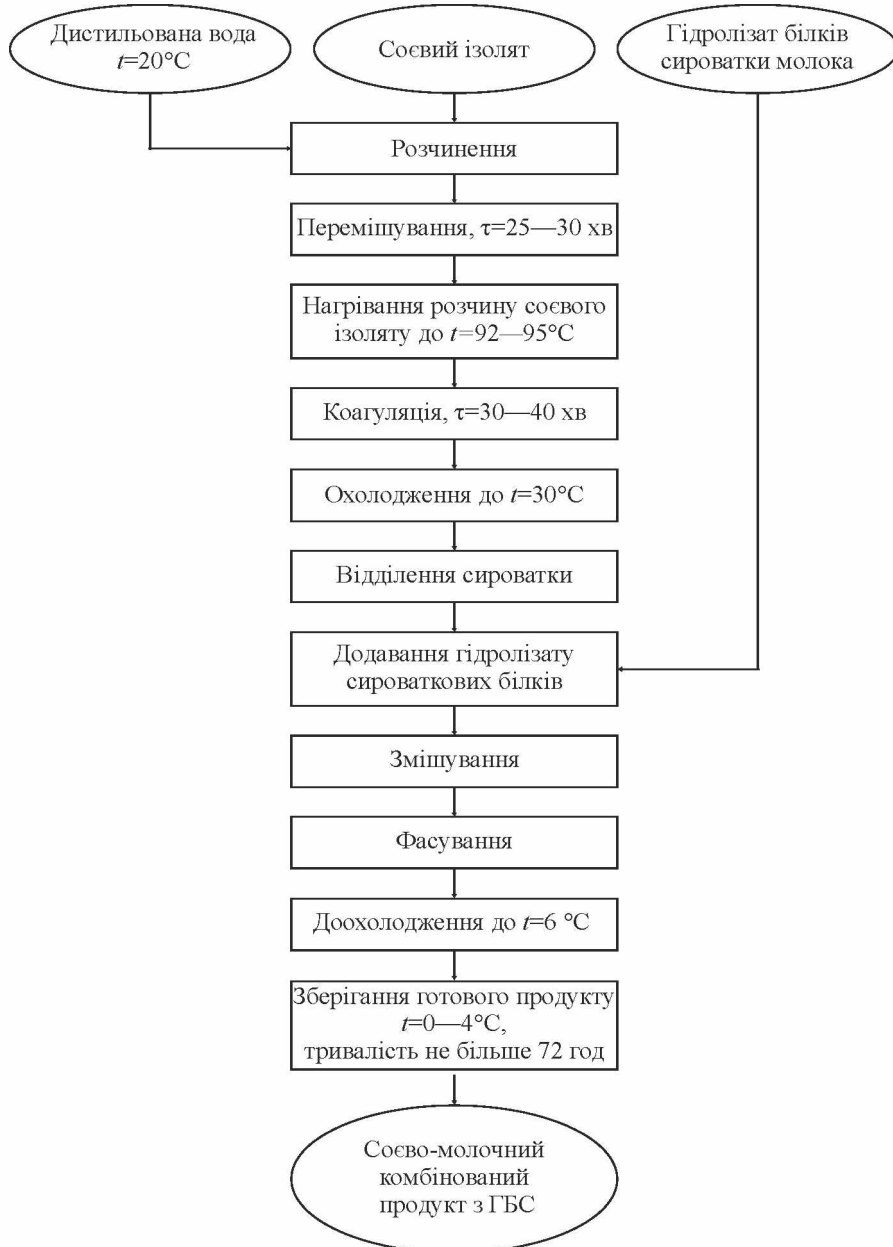


Рис. Технологічна схема отримання соєво-молочного комбінованого продукту з ГБС

Для отримання гідролізату проводили протеоліз 15% розчину КСБ панкреатином при співвідношенні ензим:субстрат — 1:20. Такі співвідношення використовуються при отриманні гідролізатів сироваткових білків [16]. Протеоліз проводили при температурі 37°C і значенні рН 7,9. Саме в таких умовах існує найбільша ймовірність утворення природних БАП [3; 14]. Протеоліз проводили протягом 120 хв. Отриманий гідролізат висушували з допомогою розпилювальної сушарки. Експрес-електрофорез гідролізату показав відсутність у ньому фракцій протеїнів сироватки. Сухий препарат ГБС вносили в охолоджений коагулят після відділення сироватки з подальшим перемішуванням. При розрахунку кількості гідролізату виходили із масової частки білків сироватки, яка становить в середньому 20% від усіх білків молока. Тобто у 100 г продукту додавали 2,3 г ГБС.

Отриманий продукт характеризували за органолептичними показниками. Результати дегустаційної оцінки узагальнені в табл. 1.

**Таблиця 1. Органолептичні показники соєво-молочного комбінованого продукту з гідролізатом білків сироватки молока**

Найменування показника	Характеристика
Зовнішній вигляд і консистенція	Зовнішній вигляд характерний для сирних продуктів, виготовлених із сої. Консистенція м'яка. Спостерігалось незначне виділення вологи
Смак і запах	Чистий, характерний для сирних продуктів, виготовлених із сої, з незначним альбумінним присмаком
Колір	Колір білий

Загалом, органолептичні показники готового продукту є характерними для білкових продуктів, виготовлених на основі соєвої сировини. Характерний для ГБС присмак не погіршує органолептичних показників готового продукту при внесенні у запропонованій кількості.

Також у комбінованому соєво-молочному продукті з ГБС були визначені фізико-хімічні показники (табл. 2). Для порівняння наведені показники контрольного зразку без внесення гідролізату білків сироватки молока.

**Таблиця 2. Фізико-хімічні показники соєво-молочного комбінованого продукту з гідролізатом білків сироватки молока**

Найменування показника	Контрольний зразок	Дослідний зразок
Масова частка білка, %	9,3±0,3	11,3±0,3
Масова частка жиру, %	7,4±0,2	7,2±0,2
Масова частка вологи, %	79±1,5	77±1,5
рН	7,1±0,1	7,2±0,15

За рахунок внесення гідролізату можна відзначити збільшення масової частки білків у готовому продукті і незначне зменшення масової частки жиру та вологи. Загалом фізико-хімічні показники готового продукту відповідають вимогам нормативних документів для соєвих сирних продуктів.

Для визначення вмісту низькомолекулярних пептидів з контрольного соєвого продукту та запропонованого соєво-молочного комбінованого продукту з ГБС відбирали проби і проводили їх диспергування у воді у співвідношенні 1:9.

Після цього осаджували білки в 5% трихлороцетовій кислоті. Отримані зразки аналізували гель-фільтрацією на колонках з сефадексом G-50. У результаті проведеної гель-фільтрації з'ясовано, що кількість низькомолекулярної пептидної фракції ( $M \leq 1500$  Да) збільшилась із 5% до 19%. Саме такими молекулярними масами характеризуються відомі природні БАП з білків сироватки молока [3; 6].

Враховуючи склад, результати органолептичного та фізико-хімічного аналізу, запропонований комбінований соєво-молочний продукт може бути рекомендованим для спеціального харчування осіб з алергією на білки молока.

### **Висновки**

Запропоновано технологію соєво-молочного комбінованого продукту, який містить гідролізат білків сироватки молока, отриманий в умовах максимального виходу біологічно активних пептидів.

Встановлено, що внесення гідролізату білків сироватки молока у кількості, що дорівнює масовій частці сироваткових білків у коров'ячому молоці, практично не впливає на органолептичні показники продукту.

На основі гель-фільтрації встановлено, що готовий комбінований соєво-молочний продукт містить велику кількість низькомолекулярних пептидів ( $M \leq 1500$  Да) за рахунок внесення у нього гідролізату білків сироватки молока.

### **Література**

1. Villa C., Costa J., Oliveira M.B.P.P., Mafra I. Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018. 17 (1). 137—164. doi: 10.1111/1541-4337.12318.
2. Bu G., Luo Y., Chen F., Liu K., Zhu T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science and Technology*. 2013. V. 93. P. 211—223. doi: 10.1007/s13594-013-0113-x.
3. Mann B., Athira S., Sharma R., Kumar R., Sarkar P. Bioactive Peptides from Whey Proteins. *Whey Proteins: From milk to medicine* / Ed. Hilton C. Deeth, Nidhi Bansal. London: Academic Press
4. Duan C. C., Huo G. C., Yang L. J., Ren D. X., Chen J. L. Comparison of sensitization between  $\beta$ -lactoglobulin and its hydrolysates. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2012. V. 30. P. 32—39.
5. Vandenplas Y., Bhatia J., Shamir R., Agostoni C., Turck D., Staiano A., Szajewska H. Hydrolyzed Formulas for Allergy Prevention. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2014. V. 58(5). P. 549—552.
6. Iukalo A. V., Datsyshyn K. Ye., Yukalo V. G. Bioaktyvni peptydy proteiniv syrovatky moloka koriv (Bos Taurus). *Biotechnologia Acta*. 2013. V. 6(5). 49—61. doi: 10.15407/biotech6.05.049.
7. Zhenze Liu, Chibuike C. Udenigwe. Role of food-derived opioid peptides in the central nervous and gastrointestinal systems — A review. *Journal of Food Biochemistry*. 2018. 43:e12629. DOI: 10.1111/jfbc.12629
8. Szwajkowska M., Wolanciuk A., Barłowska J., et al. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influence the consumers' immune system — a review. *Animal Science Papers and Reports*. 2011. V. 29(4). P. 269—280.
9. Mohanty D., Jena R., Choudhury P. K., Pattnaik R., Mohapatra S., Saini M. R. Milk Derived Antimicrobial Bioactive Peptides: A Review. *International Journal of Food Properties*. 2016. V. 19. P. 837—846.

10. Khan M. U., Pirzadeh M., Förster C. Y., Shityakov S., Shariati M. A. Role of Milk-Derived Antibacterial Peptides in Modern Food Biotechnology: Their Synthesis, Applications and Future Perspectives. *Biomolecules*. 2018. V. 8(4). P. 100—116. doi: 10.3390 / biom8040110
11. Храпцов А. Г. Феномен молочной сыворотки. СПб.: Профессия, 2011. 804 с.
12. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. V. 2(11 (98)). P. 37—44. doi: 10.15587/1729-4061.2019.160186.
13. Польшгалына Г. В. Определение активности ферментов. Справочник / Г. В. Польшгалына, В. С. Чередныченко, Л. В. Рымарева. М.: Де Ли принт, 2003. 375 с.
14. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. *Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Edition)*. New York: Springer, 2015. 585 p. doi: 10.1007/978-3-319-14892-2.
15. Спосіб виробництва продукту з сої за типом сиру-тофу: пат. 14257 Україна: МПК А23G 3/00 № u 200509788; заявл. 22.06.2005; опубл. 15.05.2006, Бюл. № 5.
16. Декуша Г. В. Розробка технології сухих сумішей з гідролізованим білком для дитячого харчування: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.16. Одеса, 2009. 157 с.