ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ /
APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY. 2026. Т. 62. № 5. С. 823–839

DOI: 10.7868/S3034574X26050128

Оригинальная статья

УДК 664.38

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ СПОСОБНОСТИ КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТЕАЗ

М. В. Семенова[1], Е. А. Рубцова[1], С. А. Курзеев[2], В. М. Касумова[3], А. Д. Сатрутдинов[1], А. М. Рожкова[1,*], Е.Г. Кондратьева[1], Н. В. Цурикова[4], А. П. Синицын[1,2]

[1]Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН), Москва, Российская Федерация

[2]Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

[3]Биотехнологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

[4]Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Российская Федерация

**E-mail: amrojkova@yahoo.com*

Аннотация. В работе исследована способность ряда коммерчески доступных на Российском рынке ферментных препаратов протеиназ гидролизовать растительные белки. По оптимальным условиям их действия на белки жмыха амаранта, соевого шрота и соевого изолята исследуемые препараты были разделены на три группы: гидролизующие субстраты при кислых pH (Агропрот ПЕП, Протозим КП-С), одинаково эффективные в диапазоне pH 5.0-7.6 (Протосубтилин, Протеаза В, Протеаза С) и предпочитающие нейтральные или слабо щелочные pH 7.0-7,6 (Протозим 200-С, Протозим 6-С). При оптимальном для гидролиза pH, одинаковой дозировке препарата (2.5% от массы субстрата) и времени воздействия (3 ч) активность всех исследуемых препаратов была выше на белках амаранта, по сравнению с соевыми белками, что выражалось в более высоких величинах выхода растворимого белка и меньшей величине молекулярной массы основного продукта гидролиза. Максимальная глубина гидролиза белков жмыха амаранта была получена при использовании препаратов Агропрот ПЕП, Протеаза С или Протозим 6-С и составила 80-81% от общего содержания белка в субстрате (молекулярная масса основного продукта 3-6 кДа). Предельная глубина гидролиза соевых белков была получена при воздействии на шрот препаратами Протосубтилин или Протеаза В – 58-62% от общего содержания белка в шроте (молекулярная масса продукта 4-16 кДа). При воздействии на изолят препаратами Протосубтилин или Протозим 200-С предельная глубина - 70-71% от общего содержания белка в изоляте, а масса основного продукта 4-8 кДа.

Ключевые слова: растительный белок, протеиназа, белковый гидролизат

Финансирование. Работа выполнена в рамках реализации Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

© М. В. Семенова, Е. А. Рубцова, С. А. Курзеев, В. М. Касумова, А. Д. Сатрутдинов, А. М. Рожкова, Е.Г. Кондратьева, Н. В. Цурикова, А. П. Синицын, 2026

PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA /
APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY, 2026, vol. 62, no. 5, pp. 823–839

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка цитирования: Семенова М.В., Рубцова Е.А., Курзеев С.А., Касумова В.М., Сатрутдинов А.Д., Рожкова А.М., Кондратьева Е.Г., Цурикова Н.В., Синицын А.П. Получение ферментативных гидролизатов растительных белков. Сравнительный анализ гидролитической способности коммерческих препаратов протеаз. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology.* 2026. Т. 62. № 5. С. 823–839. https://doi.org/10.7868/S3034574X26050128

DOI: 10.7868/S3034574X26050128

Original Article

OBTAINING ENZYMATIC HYDROLYSATES OF PLANT PROTEINS. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE HYDROLYTIC CAPACITY OF COMMERCIAL PROTEASE PREPARATIONS

M. V. Semenova[1], E. A. Rubtsova[1], S. A. Kurzeev[2], V. M. Kasumova[3], A. D. Satrutdinov[1], A. M. Rozhkova[1*], E. G. Kondrat`eva[1], N. V. Tsurikova[4], A. P. Sinitsyn[1,2]

[1]Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[2]Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russian Federation

[3]Lomonosov Moscow State University, Department of Biotechnology, Moscow, Russian Federation

[4]All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – a branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

**E-mail: amrojkova@yahoo.com*

Abstract. This study considered the ability of several commercially available Russian proteinase enzyme preparations to hydrolyze plant proteins. Based on the optimal conditions for their action on proteins from amaranth cake, soybean meal, and soybean isolate, the studied preparations were divided into three groups: those that hydrolyze substrates at acidic pH (Agroprot PEP, Protozyme KP-S), those that are equally effective in the pH range of 5.0-7.6 (Protosubtilin, Protease B, Protease C), and those that prefer neutral or slightly alkaline pH (7.0-7.6) (Protozyme 200-S, Protozyme 6-S). At the optimal pH for hydrolysis, the same dosage of the preparation (2.5% of the substrate weight) and exposure time (3 h), the activity of all the studied preparations was higher on amaranth proteins, compared to soybean proteins, which was reflected in higher yields of soluble protein and a lower molecular weight of the main hydrolysis product. The maximum depth of hydrolysis of amaranth cake proteins was obtained using Agroprot PEP, Protease C or Protozyme 6-C and estimated to 80-81% of the total protein content in the substrate (molecular weight of the main product is 3-6 kDa). The maximum depth of hydrolysis of soybean proteins was obtained when treating the meal with Protosubtilin or Protease B - 58-62% of the total protein content in the meal (molecular weight of the product is 4-16 kDa). When the isolate is exposed to Protosubtilin or Protozyme 200-C, the maximum depth is 70-71% of the total protein content in the isolate, and the mass of the main product is 4-8 kDa.

Keywords: plant proteins, proteinases, protein hydrolysate

© M. V. Semenova, E. A. Rubtsova, S. A. Kurzeev, V. M. Kasumova, A. D. Satrutdinov, A. M. Rozhkova, E. G. Kondrat`eva, N. V. Tsurikova, A. P. Sinitsyn, 2026

Funding. The work was carried out within the framework of the State Assignment of Lomonosov Moscow State University, registration number 121041500039-8.

Ethics declarations. This article does not contain any studies involving humans or animals as subjects.

Conflict of interests. The authors of the work declare that they have no conflict of interest.

Authors contribution. All authors made a significant contribution to the development of the concept, conduct of the study and preparation of the article.

For citation: Semenova M.V., Rubtsova E.A., Kurzeev S.A., Kasumova V.M., Satrutdinov A.D., Rozhkova A.M., Kondrat'eva E.G., Tsurikova N.V., Sinitsyn A.P. Obtaining Enzymatic Hydrolysates of Plant Proteins. Comparative Analysis of the Hydrolytic Capacity of Commercial Protease Preparations. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology.* 2026;62(5):823–839. (In Russ.)
https://doi.org/10.7868/S3034574X26050128

ВВЕДЕНИЕ

К актуальным направлениям биотехнологии относится ферментативная обработка белоксодержащего сырья с получением белковых гидролизатов, которые характеризуются высокой питательной ценностью и обладают рядом функциональных свойств, необходимых для применения в пищевой промышленности при разработке рационов для детей, спортсменов, пожилых людей, в производстве пищевых продуктов, вкусовых добавок, бульонов, напитков и др. В качестве сырья для получения белковых гидролизатов используют отходы и вторичные продукты животноводства и птицеводства, молочной и рыбной промышленности, зерновые и бобовые культуры, продукты микробиологической промышленности и т. д. [20].

Амарант (*Amaranthus*) – широко распространенный род преимущественно однолетних травянистых растений семейства Амарантовых (*Amaranthaceae*). Амарант, так же как киноа и гречиха, является одной из наиболее широко используемых в питании псевдозерновых культур [14]. Зерна амаранта содержат больше белков, липидов и минералов, чем многие другие злаки [1, 7, 21, 32]. Основным компонентом семян амаранта является крахмал (60–72% в пересчете на сухое вещество), за ним следуют белок 14–20%, липиды 7–8%, пищевые волокна 8–16% и минеральные вещества 3–5%. Крахмальная фракция отличается высоким содержанием амилопектина; белковая фракция обладает высокой усвояемостью (~90%) и биологической ценностью (86%); липидная фракция содержит ненасыщенные жирные кислоты (25:75 насыщенные: ненасыщенные), неомыляемые токоферолы и фракцию, богатую скваленом; фракция клетчатки богата ксилоглюканами и пектиновыми полисахаридами.

Белки зерна амаранта состоят из водорастворимых альбуминов (20-52% от общего белка), растворимых в солевом растворе глобулинов (16-38%), растворимых в водно-спиртовом растворе проламинов (2–13%) и растворимых в кислотном или щелочном растворе глютелинов (21–36%) [46]. Биологическая ценность белка зерна амаранта определяется сбалансированностью его аминокислотного состава, существенно превышающего таковую у зерновых культур (пшеница, ячмень, кукуруза) [6, 30]. Большинство зерновых культур, как правило, имеют дефицит незаменимой аминокислоты лизина 1.9-3.8 г в 100 г белка и содержат избыток лейцина, изолейцина и валина, в то время как амарант богат лизином 5.2-6.1 г в 100 г белка и, следовательно, имеет хорошо сбалансированный состав аминокислот. Также в амаранте выше содержание серосодержащих аминокислот 2.6-5.5 г в 100 г белка, чем в большинстве бобовых (1.4 г в 100 г белка) [14, 43].

Зерна амаранта служат источником масла. Жмых амаранта, образующийся после выделения масла, характеризуется высокой долей сырого протеина (22-36% от общей массы), углеводов (50-60%, в основном крахмала), доля сырой клетчатки составляет 6-10%, сырой золы – 5-8%, а количество сухих веществ – 92-96%. При исследовании фракционного состава белков жмыха амаранта было установлено, что в нем превалирует солерастворимая фракция (около 60% от общего белка) в сочетании с водорастворимой (около 40%); содержание щелочерастворимых белков крайне невелико (менее 1%) [27, 34].

Зерно сои (*Glycine*) характеризуется уникальным составом ценных питательных веществ. Соя богата фосфатидами, в том числе и лецитином (2-3.5%), а также является одним из основных источников полноценных растительных белков. Белки сои лишь немного уступают по питательности белкам говядины и эквивалентны молочным [38]. В зерне сои содержится 31-50% сырого протеина, 26-29% переваримого протеина, 13-19% сырого жира, 7% сырой клетчатки, 26-30% безазотистых экстрактивных веществ, 4% сахара, 0.035% витаминов [22,

29]. Белок зерна сои имеет уникальный аминокислотный состав, так как обладает повышенным содержанием незаменимых аминокислот – лизина и триптофана. Усредненный аминокислотный состав белка соевого зерна выглядит следующим образом: аргинин – 10.3-11.3%; глутаминовая кислота – 14.8-18.1%; лейцин + изолейцин – 13.6-14.4%; лизин – 2.1-6.4%; метионин – 0.46-1.7%; треонин – 3.6-4.5%; триптофан – 0.36-1.8% [28, 39]. Некоторые сорта сои обладают повышенным содержанием растительных жиров, доходящим до 20.5-21.5%. В них содержится порядка 95% глицеридов жирных кислот, из которых 80-90% составляют ненасыщенные (глицериды линоленовой кислоты – 42.8-64%, олеиновой – 15-36%, пальминовой – 2.4-14%, линоленовой – 2-14%, стеариновой – 2-5%) [39]. Содержание углеводов в зерне сои составляет 22-35% от сухой массы, в том числе моносахаров – 0.07-2.2%, сахарозы – 3.31-13.5%, раффинозы – 1.13%, стахиозы – 3.25%, пентозанов – 7.6-9.3%, клетчатки – 3.0-7.0%, декстрина и крахмала 3.1-8.97% [13, 39].

Два основных запасных белка – β-конглицинин (7S) и глицинин (11S) – составляют 80–90% общего белка в сое [42]. β-Конглицинин состоит из α'-, α- и β-субъединиц, тогда как глицинин состоит из кислых (A) и основных (B) субъединиц: A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A3B4 и A5A4B3 [20]. Второстепенные белки в сое включают запасные белки 2S, 9S и 15S, лектин и ингибиторы протеаз Кунитца и Боумана–Бирка [45]. Считается, что соевые белки с различным соотношением β-конглицинина и глицинина обладают различными питательными и физиологическими свойствами [5, 36]. Биоактивные пептиды неактивны, когда они являются частью последовательности нативного белка, но активируются при высвобождении в результате ферментативной обработки, желудочно-кишечного пищеварения, обработки пищевых продуктов или ферментации [36].

Проблема использования сои заключается в том, что белки сои неоднородны по структуре и функциям. В них есть вещества, которые принято считать антипитательными компонентами пищи. Это ингибиторы протеолитических ферментов, уреаза, липоксигеназа и др. Ингибиторы протеаз составляют 5–10% общего количества белка в семенах сои. Взаимодействуя с ферментами, предназначенными для расщепления белков, они образуют устойчивые соединения, лишенные как ингибиторной, так и ферментативной активности. Результат такой блокады – снижение усвояемости белковых веществ. К антипитательным веществам сои также относятся гемагглютины (лектины), обладающие аллергенными свойствами, способные агглютинировать эритроциты, что проявляется в виде различных токсических эффектов и ингибирования роста экспериментальных животных [24].

Существуют многочисленные методы влаготепловой и химической обработки семян сои с целью инактивации антипитательных веществ, используемые в процессе переработки [9]. Среди перспективных методов очистки соевого белка от антипитательных факторов следует выделить использование ферментов. Преимущество этого подхода заключается в специфичности ферментативного воздействия и, соответственно, в отсутствии нежелательных побочных реакций. В работе [3] приведены результаты исследования 12 различных методов обработки сои и их эффективность с точки зрения удаления антипитательных факторов (фитина, уреазы и ингибиторов пищеварительных ферментов): автоклавирование, термическая обработка, обработка УФ, ультразвуком, СВЧ, экстракция метанолом, ферментативный гидролиз и обработка ионообменной смолой. Выявлены наиболее эффективные методы: экстракция метанолом, ферментативный гидролиз под действием протеаз, обработка ионообменной смолой, термообработка.

В большинстве процессов переработки растительного, животного или микробного белка в основном применяют бактериальные сериновые эндопротеиназы, отличающиеся широкой субстратной специфичностью и способностью расщеплять трудногидролизуемые связи. Изучение процесса гидролиза белков соевой муки препаратами бактериальных протеиназ – Multifect® Neutral, Multifect® P-3000 и Protex™ 6L ("Genencor", США) – показало, что за 3 ч обработки все исследуемые препараты эффективно гидролизовали липоксигеназу и β-конглицинин, а субъединицы глицинина были более устойчивыми к протеолизу. Наиболее эффективным оказался препарат сериновой протеиназы Protex 6L, который обеспечил полное исчезновение кислой субъединицы глицинина и значительное снижение интенсивности полосы основного полипептида глицинина на электрофореграммах обработанных белков [16]. При гидролизе изолята соевого белка Нейтраза (нейтральная металло-эндопротеиназа *Bacillus amyloliquefaciens*, компания "Novozymes") способствовала более глубокому гидролизу соевых белков по сравнению с Бирзимом П7 – эндопептидазой *B. subtilis* ("ERBSLOH", Германия) и Флавозимом [25]. Алкалаза обеспечивала наиболее полный гидролиз основных белков сои, но при этом существенно увеличивала горечь гидролизатов, снизить которую удавалось, используя папаин и Флавозим [23, 41]. В работе [18] исследована возможность использования растительных протеаз (бромелаина, фицина и папаина) для гидролиза белков сои и показана их большая эффективность в данном процессе по сравнению с пепсином. Под действием наиболее активного папаина уже после 1 ч обработки полностью исчезали полосы β-конглицинина и глицинина, а наибольшее значение степени кон-

версии соевых белков (26,9%) было получено при использовании бромелаина.

В отношении белков амаранта использование протеиназ позволяет более полно провести экстракцию этих белков, а также увеличить их растворимость в водной среде. В работах [31, 33] для гидролиза белков амаранта использовали препараты Алкалазу (щелочная сериновая эндопротеиназа *B. licheniformis*, "Novozymes"), Нейтразу и кислую эндопротеиназу Prolive PAC 30L (из *Aspergillus niger,* компания "EnzymeBioProduct Ltd."). Наибольшую активность проявляла Алкалаза, далее следовала Нейтраза и кислая протеиназа. Во всех случаях с наибольшей скоростью гидролизовались альбумины, а проламины и глютенины гидролизовались медленнее.

Извлечение белка амаранта и получение его гидролизатов обычно сопровождается переходом в растворимое состояние (извлечением) других компонентов, в первую очередь крахмала и его производных. Следует отметить, что в научной литературе, как правило, приводится информация о получении ферментативных гидролизатов белка амаранта, но встречается крайне мало сведений о белковых гидролизатах жмыха амаранта.

Растительные белки широко используются в качестве функциональных добавок и пищевых белоксодержащих ингредиентов. Селективный гидролиз протеазами с определенной специфичностью позволяет получать требуемые функциональные свойства – эмульгирующие, геле- и пенообразующие, растворимость, взбиваемость, необходимые при замене некоторых белков животного происхождения (мясных, яичных и др.) [12]. Соевые белки служат источником биоактивных пептидов, обладающих антиоксидантными свойствами, снижающих уровень холестерина, оказывающих гипотоническое действие и препятствующих тромбообразованию [4, 17]. В работах [2, 10, 26] белки амаранта рассматривались как природный источник пептидов – ингибиторов АПФ (ангиотензинпревращающего фермента). Соевые гидролизаты используют в качестве усилителей вкуса в составе приправ, соусов, концентрированных супов. Гипоаллергенные гидролизаты соевого и амарантового белка с высоким содержанием низкомолекулярной фракции используют в детских смесях, в лечебном питании, гериатрических продуктах [34, 40], описаны технологии получения кисломолочных напитков геронтологического назначения с повышенным содержанием белка [19, 35].

Целью наших исследований являлось определение эффективности коммерчески доступных в настоящее время на рынке РФ ферментных препаратов (**ФП**) протеиназ в процессе гидролиза белков шрота (жмыха) амаранта, шрота и изолята соевых белков, а также определение оптимальных условий гидролиза (доза ФП, pH, температура, время), а также исследование качественного и количественного состава продуктов гидролиза белков.

МЕТОДИКА

Реагенты

В работе использовали обезжиренный на фреонах жмых амаранта, выращенный в Воронежской области, с содержанием белка 30% (в пересчете на сухое вещество), крахмала – 41%, клетчатки – 12% и остаточного жира – 2%. В качестве источника соевых белков использовали коммерческие продукты: шрот соевый пищевой "Белый лепесток" (ГК "Содружество", Россия) с содержанием белка 55%, углеводов – 5-10%, клетчатки – 5-10%, остаточного жира – 2-3% и соевый изолят "Экстрапротеин" (КНР) с содержанием белка 90%. Влажность всех используемых субстратов составляла 8-10%. Перед использованием субстраты не прогревали; концентрация субстратов в реакционной смеси составляла 100 или 200 г/л в пересчете на сухое вещество (а.с.в.).

В качестве субстратов для определения активностей использовали гемоглобин и казеинат Na ("Sigma", США), растворимый картофельный крахмал («НПО по крахмалопродуктам», Россия), Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (**КМЦ**) и ксилан бука ("Sigma", США). Для приготовления буферных смесей и солевых растворов использовали реактивы фирм "Bio-Rad Laboratories" (США), "Panreac" (Германия), "Helicon" и "Реахим" (РФ). Для определения молекулярной массы в качестве белков-маркеров использовали наборы Protein Molecular Weight Markers, MW Range 6.5 – 200 kDa ("Protea Biosciences Inc.", США) и Unstained Protein Molecular Weight Marker, MW Range 14.4 to 116 kDa ("Thermo Scientific", США).

Методы определения ферментативной активности

Протеолитическую активность (**ПС**) при pH 5.0 определяли с использованием гемоглобина в качестве субстрата, при pH 7.0 – казеината Na, амилолитическую (**АС**) и глюкоамилазную активности (**ГлА**), используя растворимый картофельный крахмал, а при анализе целлюлозолитической (**ЦлА**) и ксиланазной активностей (**КсА**) субстратами были, соответственно, КМЦ и ксилан бука. ПС определяли согласно ГОСТ 20264.4-88, АС и ГлА – по ГОСТ 20264.4-89 ", ЦлА – по ГОСТ 31662-2012, КсА – по ГОСТ 31488-2012. За 1 ед. активности ПС принимали количество фермента, которое за 1 мин при температуре 30°C катализирует переход в неосаждаемое ТХУ состояние такое количество гемоглобина (pH 5.0) или казеината Na (pH 7.0), которое содержит 1 микромоль тирозина (1 мкмоль тирозина ра-

вен 0.181 мг). За 1 ед. АС принимали количество фермента, которое при 30°С и pH 5.0 или 7.0 в течение 10 мин катализирует превращение до мальтодекстринов 30% от 1 г крахмала. За 1 ед. ГлА принимали такое количество фермента, которое при 30°С и pH 5.0 или 7.0 катализирует образование 1 мкмоль глюкозы за 1 мин из картофельного крахмала. Глюкозу определяли с помощью набора "Глюкоза-АГАТ" (ООО "АГАТ", Россия). За 1 ед. активности ЦлА и КсА принимали такое количество фермента, которое при 50°С и pH 5.0 или 7.0 катализирует образование 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (**ВС**) за 1 мин из соответствующих субстратов. ВС определяли методом Нельсона-Шомоди [37].

Содержание белка в ФП, а также гидролизатах соевого сырья и жмыха амаранта определяли методом Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Обработка растительного сырья

Обработку проводили с помощью протеолитических ФП в следующих условиях. При использовании жмыха амаранта концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 200 г/л, концентрация ФП – 1, 5 или 25 г/л (0.5, 2.5 или 12.5% по сухому весу от массы субстрата). Гидролиз проводили в течение 3 или 24 ч в термостатируемых сосудах в объеме реакционной смеси 10 мл, при pH 5.0 (0.5 М Na-ацетатный буфер) или 7.0 (0.5 М фосфатный буфер), температуре 30°С и постоянном перемешивании (1000 об./мин).

При гидролизе соевого сырья концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л, концентрация ФП – 2.5 г/л (2.5% по сухому весу от массы субстрата). Гидролиз проводили в течение 3 или 24 ч в термостатируемых сосудах, объем реакционной смеси – 10 мл, при естественном значении pH (pH 6.3 в случае соевого шрота, pH 7.6 в случае соевого изолята), температуре 50°С и постоянном перемешивании (1000 об./мин).

После завершения процесса протеолиза проводили инактивацию ферментов путем выдерживания реакционной смеси при 95°С в течение 10 мин. Далее реакционную смесь центрифугировали в течение 10 мин (13000 об./мин), в надосадочной жидкости определяли концентрацию белка и анализировали состав белковых гидролизатов методами ДДС-ПААГ-электрофореза и гель-фильтрации. При расчете концентрации белка в гидролизатах учитывали (вычитали) то количество белка, которое вносили в реакционную смесь с ФП. ДДС-ПААГ-электрофорез проводили в 15%-ном полиакриламидном геле в 25 мМ Трис-глициновом буфере, pH 8.3 с ДДС-Na в концентрации 1 мг/мл в ячейке для электрофореза в соответствии с руководством к прибору ("Mini Protein Cell system "Bio-Rad", США). Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим G-250 ("Amresco", США). Состав белковых продуктов анализировали с помощью жидкостной хроматографической системы NGC Chromatography Systems ("Bio-Rad", США) с ультрафиолетовым детектором при λ 215 и 280 нм, используя колонку для гель-фильтрации Superose 12 ("Bio-Rad", США) и 50 мМ Na-ацетатный буфер с 0.1 М NaCl в качестве элюента со скоростью элюции 0.5 мл/мин. В качестве стандартов использовали L-триптофан (204 Да), бацитрацин (1.45 кДа), цитохром С (13 кДа), химотрипсиноген А (24 кДа), БСА (66 кДа).

Эксперимент проводился в трех повторностях. Выход белка рассчитывали как отношение концентрации белка после протеолиза к исходной концентрации субстрата (100 или 200 г/л), умноженной на долю белка в исходном сырье и выражали в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе были использованы коммерчески доступные сухие ФП протеиназ: Агропрот ПЕП (пенициллопепсин – кислая грибная карбоксильная эндопротеиназа, продуцент *Penicillium verruculosum*, ООО "Агрофермент"), Протозим КП-С (аспергиллопепсин – кислая грибная карбоксильная эндопротеиназа, продуцент *A. niger,* ГК "Фермент"), Протосубтилин (нейтральная бактериальная субтилизин-подобная сериновая эндопротеиназа, продуцент *B. subtilis*, ПО "Сиббиофарм"), Протеаза 6-С (нейтральная бактериальная субтилизин-подобная сериновая эндопротеиназа, продуцент *B. subtilis,* ГК "Фермент"), Протеаза В (нейтрально-щелочная бактериальная субтилизин-подобная сериновая эндопротеиназа, продуцент *B. licheniformis*, ТД "Биопрепарат"), Протеаза С (нейтрально-щелочная грибная субтилизин-подобная сериновая протеиназа, продуцент *Acremonium chrysogenum*. ТД "Биопрепарат"), Протозим 200-С (нейтрально-щелочная бактериальная субтилизин-подобная сериновая эндопротеиназа, продуцент *B. licheniformis*, ГК "Фермент"). На рис. 1 приведены электрофореграммы белков используемых ФП, в табл. 1 – протеолитическая, а также сопутствующие активности, определенные при pH 5.0 и 7.0. Несмотря на то, что некоторые используемые в работе протеиназы эффективны при щелочных значениях pH (⩾9), их действие на белковые субстраты не исследовали при этом pH, так как в этих условиях возможно образование горечи [23, 31, 33, 41].

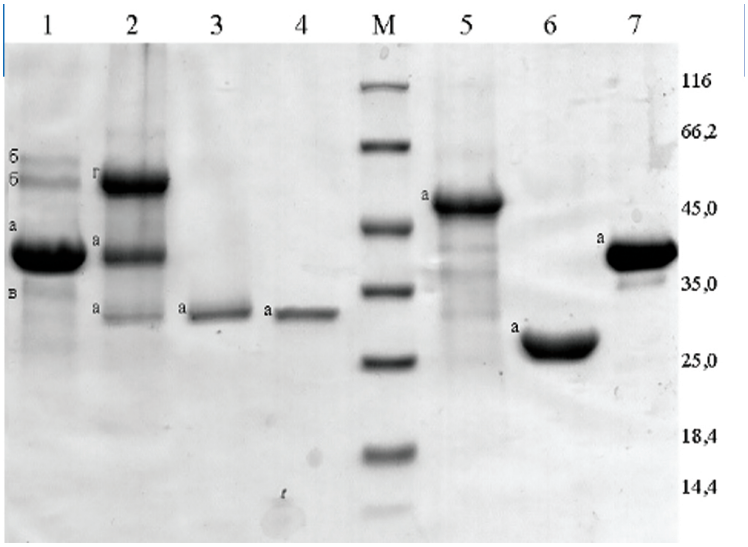

Рис. 1. Электрофореграмма используемых ФП: 1 – Агропрот ПЕП, 2 – Протосубтилин, 3 – Протеаза В, 4 – Протеаза С, 5 – Протозим КП-С, 6 – Протозим 200-С, 7 – Протозим 6-С. М – маркеры, указана масса в кДа. Основные ферменты: а – протеазы, б – целлобиогидролазы, в – ксиланаза, г – α-амилаза
Fig. 1. SDS-PAGE of the used EP: 1 – Agroprot PEP, 2 – Protosubtilin, 3 – Protease B, 4 – Protease C, 5 – Protozyme KP-C, 6 – Protozyme 200-C, 7 – Protozyme 6-C. M – markers, mass in kDa. Main enzymes: a – proteases, б – cellobiohydrolases, в – xylanase, г – α-amylase

Таблица 1. Концентрация белка и активности ФП (ед./г) по отношению к различным специфическим субстратам при разных значениях pH и 30°C для ПС, АС, ГлС или 50°C для ЦлА и КсА

Table 1. Protein concentration and EP activity (units/g) in relation to various specific substrates at different pH values and 30°C for PS, AS, GLA or 50°C for ClA and XA

ФП*	Белок, мг/г	pH	ПС	АС	ГлА	ЦлА	КсА
Агропрот ПЕП	177±9	5.0	990±90	0	3.2±0,3	165±9	160±10
		7.0	4.9±0,4	0	1.1±0,1	4.0±0,3	3.2±0,3
Протосубтилин	64±5	5.0	210±20	97±9	3.3±0,3	0	11±1
		7.0	450±40	280±20	4.2±0,4	0	0
Протеаза В	160±10	5.0	31±3	0	0	0	0
		7.0	60±5	0	0	0	0
Протеаза С	43±4	5.0	15±1	0	0	0	0
		7.0	38±3	0	0	0	0
Протозим КП-С	26±2	5.0	118±9	0	0	0	0
		7.0	3.1±0,2	0	0	0	0
Протозим 200-С	33±2	5.0	13±1	0	0	0	0
		7.0	40±4	0	0	0	0
Протозим 6-С	18±2	5.0	1.0±0,1	0	0	0	0
		7.0	22±2	0	0	0	0

*ПС – протеаза, АС – α-амилаза, ГлА – глюкоамилаза, ЦлА – целлюлаза (КМЦ-аза), КсА – ксиланаза

*PS – protease, AS – α-amylase, GLA – glucoamylase, ClA – cellulase (CMC-ase), XA – xylanase

Обработку жмыха амаранта протеолитическими ФП проводили при его концентрации в реакционной смеси 200 г/л, так как использование высококонцентрированных растворов приводит к снижению капитальных затрат, эксплуатационных расходов, потребности в энергии и увеличению концентрации сахаров в реакционной смеси после окончания процесса. При такой концентрации жмыха в водной суспензии содержание экстрагируемого белка (в отсутствии протеиназ) практически не зависело от значения pH (5.0 или 7.0) и составляло 13-15 г/л (6.5-7.5% от массы жмыха или около 23% от всего содержащегося в жмыхе протеина). Электрофоретический анализ белков, экстрагируемых в отсутствии протеиназ (рис. 2), показал наличие двух полос с молекулярной массой (ММ) около 50 и 40 кДа (по данным литературы они относятся к основному глобулярному белку амарантину [8]), а также кластера белков с ММ менее 25 кДа (относятся к альбумину-1 амаранта, как и минорная полоса 34 кДа [15]), причем состав экстрагируемых белков не зависел от значения pH. Температура обработки жмыха амаранта - 30°С во избежание растворения крахмала и увеличения вязкости реакционной смеси, так как при температурах 55-95°С проявляется высокая растворимость крахмала в воде [11]. Дозировка ФП составляла 1, 5 или 25 г/л в реакционной смеси, что соответствовало 0.5, 2.5 или 12.5% от массы жмыха. Ферментативную обработку жмыха проводили в течение 3 ч как наиболее вероятной длительности процесса в производственных условиях, а также в течение 24 ч для определения максимально возможной (предельной) глубины гидролиза. На рис. 2 представлены ДДС-ПААГ-электрофореграммы белковых гидролизатов, полученных при действии ФП при их концентрации в реакционной смеси 5 г/л (2.5% от массы субстрата) течение 3 ч. Зависимость концентрации белка в гидролизатах от времени протеолиза и дозы ФП представлена на рис. 3.

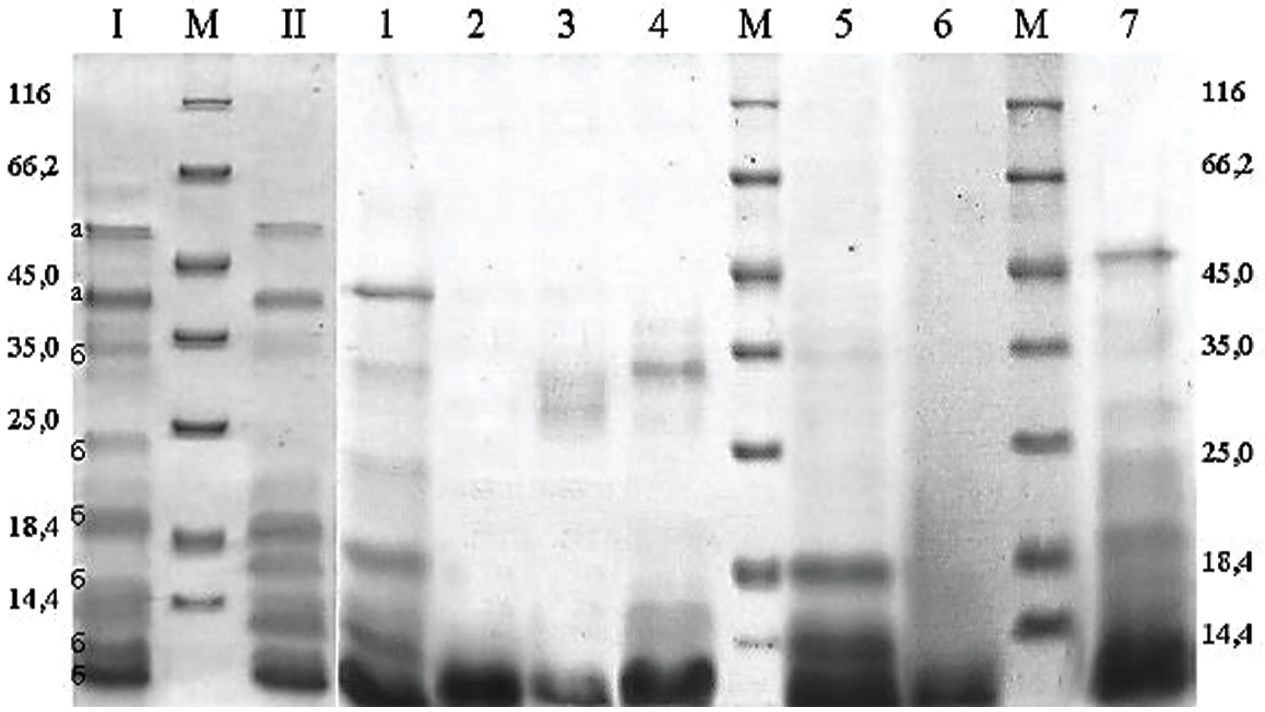

Рис. 2. Электрофореграмма белков, экстрагируемых из жмыха амаранта (200 г/л) при pH 5.0 (I) и 7.0 (II) в отсутствии протеолитических ФП и после 3 ч протеолиза (1-7, 30°С, pH оптимальный) под действием ФП (5 г/л или 2.5% от массы субстрата): 1 – Агропрот ПЕП, 2 – Протосубтилин, 3 – Протеаза В, 4 – Протеаза С, 5 – Протозим КП-С, 6 – Протозим 200-С, 7 – Протозим 6-С. М – маркеры, кДа. Белки амаранта: а – глобулины (50 и 40 кДа), б – альбумины (34 и кластер ниже 25 кДа)

Fig. 2. SDS-PAGE of proteins extracted from amaranth cake (200 g/l) at pH 5.0 (I) and 7.0 (II) in the absence of proteolytic EP and after 3 h of proteolysis (1-7, 30°C, optimal pH) under the action of EP (5 g/l or 2.5% of the substrate weight): 1 - Agroprot PEP, 2 - Protosubtilin, 3 - Protease B, 4 - Protease C, 5 - Protozyme KP-C, 6 - Protozyme 200-C, 7 - Protozyme 6-C. M - markers, kDa. Amaranth proteins: a - globulins (50 and 40 kDa), b - albumins (34 and a cluster below 25 kDa)

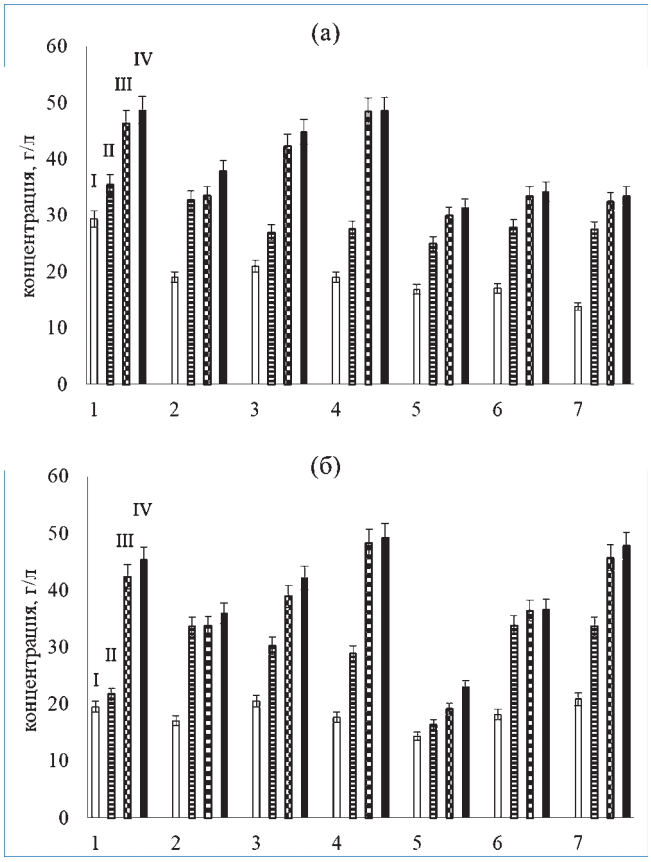

Рис. 3. Зависимость концентрации белка (г/л) в гидролизатах жмыха амаранта от времени протеолиза, дозы ФП и pH среды 5.0 (а)или pH 7.0(б) при 30°С. I – обработка при 1 г/л ФП (0.5% от массы субстрата) 3 ч, II – обработка при 5 г/л ФП (2.5% от массы субстрата) 3 ч, III – при 25 г/л ФП (12.5% от массы субстрата) 3 ч, IV – при 25 г/л (12.5% от массы субстрата) 24 ч (предельная глубина гидролиза). ФП: 1 – Агропрот ПЕП, 2 – Протосубтилин, 3 – Протеаза В, 4 – Протеаза С, 5 – Протозим КП-С, 6 – Протозим 200-С, 7 – Протозим 6-С
Fig. 3. The dependence of protein concentration (g/l) in amaranth cake hydrolysates on the proteolysis time, FP dose, and medium pH 5.0 (a) or pH 7.0 (b) at 30°C. I - treatment at 1 g/l FP (0.5% of the substrate weight) for 3 h, II - treatment at 5 g/l FP (2.5% of the substrate weight) for 3 h, III - at 25 g/l FP (12.5% of the substrate weight) for 3 h, IV - at 25 g/l (12.5% of the substrate weight) for 24 h (maximum hydrolysis depth). FP: 1 – Agroprot PEP, 2 – Protosubtilin, 3 – Protease B, 4 – Protease C, 5 – Protozyme KP-C, 6 – Protozyme 200-C, 7 – Protozyme 6-C

За исключением ФП Агропрот ПЕП и Протозим КП-С – кислых протеиназ, существенно более активных при pH 5,0 – результаты действия на жмых амаранта большинства ФП протеиназ были примерно одинаковым при pH 5.0 и 7.0. Значение pH экстракта жмыха амаранта в воде составляло 6.8, поэтому результаты эксперимента, полученные при pH 7.0 можно считать полученными при естественном pH. Наибольшая (предельная) концентрация белка в гидролизатах наблюдалась в случае действия ФП Протеаза С, Протозим 6-С (оба при pH 7.0) и Агропрот ПЕП (при pH 5.0) и составила 48-49 г/л (24% от массы субстрата или около 80% от всего содержащегося в жмыхе амаранта белка). Для всех ФП наблюдалась зависимость концентрации белка в гидролизатах после 3 ч обработки от дозы ФП в выбранном диапазоне (1-25 г/л). При оптимальной дозировке ФП 5 г/л (2.5% от массы субстрата) лучший результат обеспечивали ФП Протосубтилин, Протозим 200-С, Протозим 6-С (все при pH 7.0) и Агропрот ПЕП (при pH 5.0). Концентрация белка в гидролизатах составила 34-35 г/л, что составляло 70% от максимально возможной (предельной) концентрации, то есть эти ФП в первые 3 ч гидролиза обеспечивали 2/3 от максимального выхода белка.

Следует отметить, что после 3 ч протеолиза даже при минимальной из используемых дозировок ФП 1 г/л (0,5% от массы субстрата) на электрофореграммах белковых гидролизатов исчезали полосы основных высокомолекулярных белков амаранта (34, 40 и 50 кДа), наблюдаемые белковые полосы

имели ММ менее 20 кДа. При дозировке ФП 5 г/л (рис. 2) в большинстве случаев продукты протеолиза были представлены белками с ММ менее 14 кДа. По данным эксклюзионного хроматографического анализа основная белковая фракция всех гидролизатов соответствовала диапазону ММ 5-20 кДа и 3-6 кДа после 24 ч протеолиза (табл. 2). Таким образом, белки амаранта как глобулярные, так и альбумины легко гидролизовались под действием исследуемых ФП.

Таблица 2. Результаты обработки жмыха амаранта, соевого шрота и соевого изолята протеолитическими ФП при дозировке 2.5% от массы субстрата после 3 и 24 (в скобках) ч протеолиза

Table 2. Results of treatment of amaranth cake, soybean meal and soybean isolate with proteolytic EPs at a dosage of 2.5% of the substrate weight after 3 and 24 (in brackets) hours of proteolysis

Субстрат	Жмых амаранта		Соевый шрот		Соевый изолят	
Условия*	pH оптимальный, 30°C		pH естественный, 50°C		pH естественный, 50°C	
Параметр	выход белка**	ММ продукта	выход белка**	ММ продукта	выход белка**	ММ продукта
ФП:						
Агропрот ПЕП	59±3 (81±4)	10-20 (3-5)	33±3 (55±3)	10-25 (5-15)	20±2 (21±2)	15-20 (6-20)
Протосубтилин	56±3 (59±3)	5-10 (4-6)	24±2 (58±3)	7-15 (4-10)	50±5 (70±6)	7-10 (4-8)
Протеаза В	50±3 (75±4)	5-10 (4-6)	23±2 (62±3)	10-20 (7-15)	42±4 (59±5)	7-10 (5-8)
Протеаза С	47±2 (82±4)	7-12 (4-5)	23±2 (51±3)	10-20 (7-15)	37±4 (52±5)	7-10 (5-8)
Протозим КП-С	42±2 (52±3)	20-10 (6-8)	40±4 (54±3)	7-20 (5-10)	17±2 (18±2)	15-20 (8-15)
Протозим 200-С	56±3 (61±3)	5-10 (4-6)	35±3 (51±3)	10-25 (5-10)	49±5 (71±6)	7-10 (5-8)
Протозим 6-С	55±3 (80±4)	7-12 (5-6)	34±3 (52±2)	7-20 (5-10)	47±5 (60±5)	7-10 (5-8)

*При обработке жмыха амаранта при pH 5.0 использовали 0.5 М Na-ацетатный буфер (ФП Агропрот ПЕП и Протозим КП-С), при pH 7.0 – 0.5 М фосфатный буфер для остальных ФП; обработку соевого шрота и соевого изолята проводили в дистиллированной воде, исходный pH имел значение pH 6.3 и 7.6, в ходе протеолиза pH снижался до 5.1 и 6.9 соответственно.

**Выход белка (%) расчитывали как отношение концентрации белка в гидролизате к исходной концентрации субстрата, умноженной на долю белка в исходном сырье; для определения ММ (кДа) основного пула продуктов ориентировались на результаты гель-фильтрации.

* 0.5 M Na-acetate buffer (EP Agroprot PEP and Protozyme KP-S) was used for amaranth cake processing at pH 5.0, and a 0.5 M phosphate buffer for the other EPs at pH 7.0. Soybean meal and soybean isolate were processed in distilled water; the initial pH was 6.3 and 7.6, decreasing to 5.1 and 6.9, respectively, during proteolysis.

**Protein yield (%) was calculated as the ratio of protein concentration in the hydrolysate to the initial substrate concentration, multiplied by the protein content of the original raw material; gel filtration results were used to determine the MW (kDa) of the main product pool.

В отличие от шрота амаранта обработку соевого шрота и соевого изолята проводили при их концентрации в реакционной смеси 100 г/л, так как при большей концентрации субстрата в обоих случаях возникали проблемы массопереноса. В этом случае в водной суспензии содержание экстрагируемого белка (в отсутствии протеиназ) составляло 11 и 23 г/л, что соответствовало доле растворимого белка в соевом шроте 20от общего белка и в соевом изоляте – 26% соответственно. Электрофоретический анализ экстрагируемых белков в отсутствии протеиназ (рис. 4) показал полную идентичность экстрактов соевого шрота и соевого изолята, электрофореграмма соответствовала типичному пептидному профилю соевых белков: три мажорные субъединицы β-конглицинина с ММ около 48, 68 и 80 кДа, кислая и основная субъединицы глицинина с ММ около 38 и 20 кДа соответственно. Среди минорных полос трудноразличимы высокомолекулярная липоксигеназа 100 кДа, лектины с ММ 25-30 кДа и более низкомолекулярные ингибиторы Кунитца 21.5 кДа и Боумана-Бирка 7.8 кДа [16].

Обработку ферментами проводили в следующих условиях: концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л, концентрация ФП – 2.5 г/л (2.5 вес. % от массы субстрата), что соответствовало оптимальному значению, полученному в предыдущем эксперименте. Гидролиз проводили при “естественном” значении pH, которое в случае соевого шрота составляло 6.3 (в ходе протеолиза оно снижалось до 5.1), соевого изолята – 7.6 (снижалось до 6.9). Поскольку в отличие от жмыха амаранта в соевом сырье крахмал либо отсутствовал (в изоляте), либо содержался в количестве, не создающем вязкую реакционную среду (в шроте), темпе-

ратура протеолиза составляла 50°C для увеличения эффективности действия ФП. Ферментативную обработку вели также в течение 3 и 24 ч. На рис. 4 представлены ДДС-ПААГ-электрофореграммы белковых гидролизатов, полученных при действии ФП в течение 3 ч. Зависимость концентрации белка в гидролизатах от времени протеолиза представлена на рис. 5.

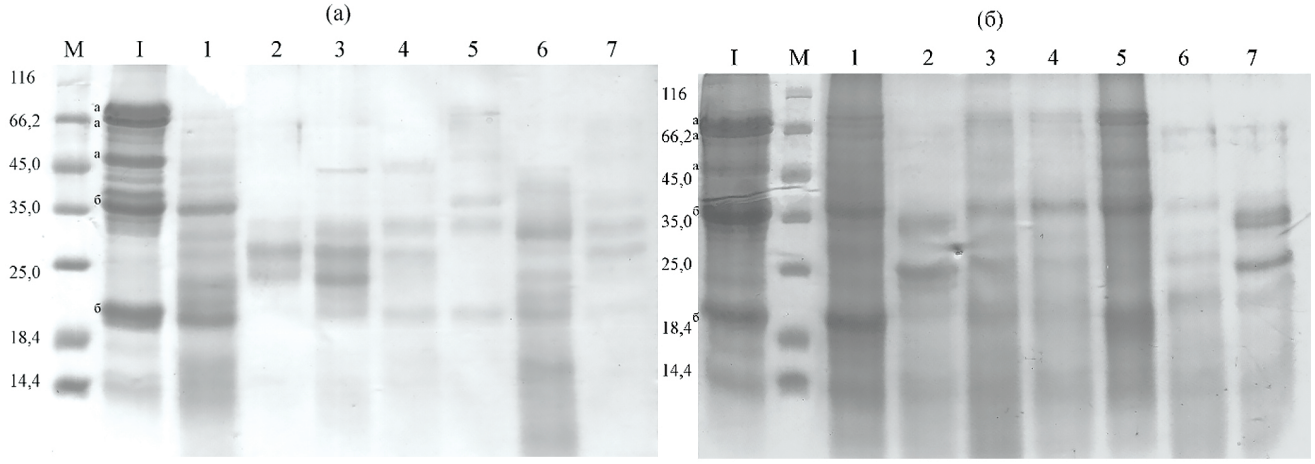

Рис. 4. Электрофореграмма белков, экстрагируемых из соевого шрота пищевого (а) и соевого изолята (б) (концентрация субстрата 100 г/л) в отсутствии протеолитических ФП (I), а также после 3 ч протеолиза (50°C, pH естественный) под действием ФП (2.5 г/л или 2.5% от массы субстрата): 1 – Агропрот ПЕП, 2 – Протосубтилин, 3 – Протеаза В, 4 – Протеаза С, 5 – Протозим КП-С, 6 – Протозим 200-С, 7 – Протозим 6-С. М – маркеры, кДа. Белки сои: а – β-конглицинин (80, 68 и 48 кДа), б – глицинин (38 и 20 кДа)

Fig. 4. SDS-PAGE of proteins extracted from food grade soybean meal (a) and soybean isolate (b) (substrate concentration 100 g/L) in the absence of proteolytic EPs (I), and after 3 h of proteolysis (50°C, natural pH) under the action of EPs (2.5 g/L or 2.5% of the substrate weight): 1 – Agroprot PEP, 2 – Protosubtilin, 3 – Protease B, 4 – Protease C, 5 – Protozyme KP-C, 6 – Protozyme 200-C, 7 – Protozyme 6-C. M – markers, kDa. Soybean proteins: a – β-conglycinin (80, 68, and 48 kDa), b – glycinin (38 and 20 kDa)

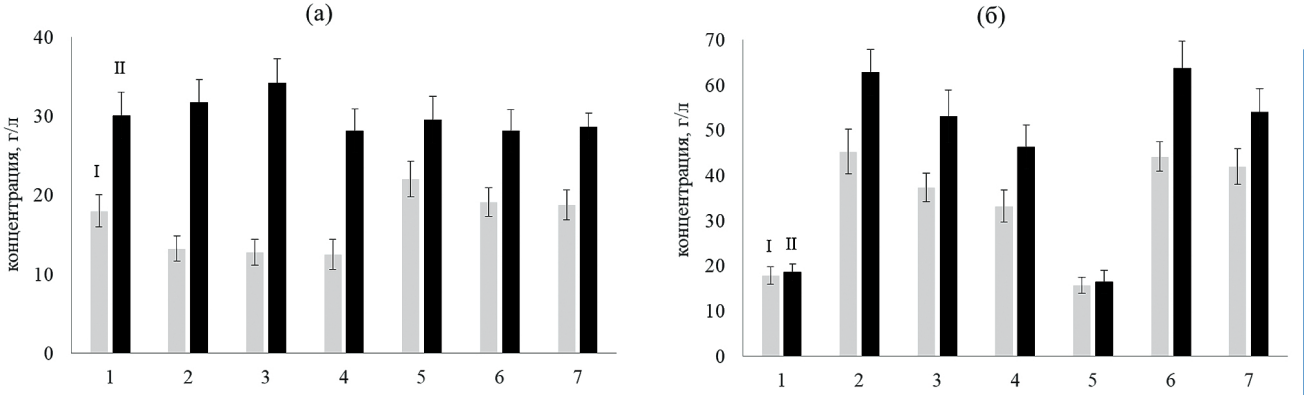

Рис. 5. Зависимость концентрации белка (г/л) в гидролизатах соевого шрота (а) и соевого изолята (б) (100 г/л) от времени протеолиза (доза ФП 2.5 г/л или 2.5% от массы субстрата, pH естественный, 50°C): I– обработка в течение 3 ч, II – в течение 24 ч (предельная глубина гидролиза). ФП: 1 – Агропрот ПЕП, 2 – Протосубтилин, 3 – Протеаза В, 4 – Протеаза С, 5 – Протозим КП-С, 6 – Протозим 200-С, 7 – Протозим 6-С

Fig. 5. Dependence of protein concentration (g/l) in hydrolysates of soybean meal (a) and soybean isolate (b) (100 g/l) on the proteolysis time (FP dose 2.5 g/l or 2.5% of the substrate weight, natural pH, 50°C): I – treatment for 3 hours, II – for 24 hours (maximum depth of hydrolysis). FP: 1 – Agroprot PEP, 2 – Protosubtilin, 3 – Protease B, 4 – Protease C, 5 – Protozyme KP-C, 6 – Protozyme 200-C, 7 – Protozyme 6-C

После 3 ч протеолиза соевого шрота лучший результат обеспечивал Протозим КП-С (концентрация белка в гидролизатах составила 22 г/л)При этом наибольшая (предельная) концентрация белка в гидролизатах для всех ФП лежала в диапазоне 28-34 г/л (или 51-62% от общего белка в шроте), небольшое преимущество наблюдалось при применении ФП Протеаза В. При протеолизе соевого изолята ФП кислых протеиназ Агропрот ПЕП и Протозим КП-С были наименее эффективны; наибольшая (предельная) концентрация белка в гидролизатах наблюдалась при использовании ФП Протосубтилин и Протозим 200-С и составила 63-64 г/л (или 70-71% от общего белка в изоляте), а после 3 ч протеолиза лучший результат обеспечивали те же ФП и ФП Протозим 6-С. Кконцентрация белка в гидролизатах составила 42-45 г/л, что соответствовало 68% от максимально возможной (предельной) концентрации, то есть ФП в первые 3 ч гидролиза обеспечивали 2/3 от максимального выхода белка.

По данным ДДС-электрофореза (рис. 4) соевый белок β-конглицинин в целом гидролизовался лучше, чем глицинин. После 3 ч протеолиза полосы β-конглицинина 80, 68 и 48 кДа полностью исчезали с электрофореграмм гидролизатов обоих соевых субстратов, полученных при действии всех исследуемых ФП, за исключением гидролизатов соевого изолята при действии ФП Агропрот ПЕП и Протозим КП-С. Полосы глицинина 38 и 20 кДа после 3 ч протеолиза сохранялись не только при действии ФП Агропрот ПЕП и Протозим КП-С на оба соевого субстрата, но также при действии ФП Протеаза В и Протеаза С на соевый изолят. По данным эксклюзионного хроматографического исследования основная белковая фракция всех гидролизатов соответствовала диапазону ММ 7-25 кДа (4-20 кДа после 24 ч).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Агропрот ПЕП и Протосубтилин представляют собой многокомпонентные ФП – помимо протеиназной они обладали целлюлазной (КМЦ-азной), ксиланазной и глюкоамилазной активностью (Агропрот ПЕП), а также α-амилазной и ксиланазной активностью (Протосубтилин), см. табл. 1. Эти ФП характеризовались наличием нескольких белковых полос на электрофореграмме (рис. 1). Другие ФП были практически монокомпонентными и не имели сопутствующих активностей. Максимальное значение ПС имел Агропрот ПЕП, далее по уровню ПС следовали Протосубтилин, Протозим КП-С. Протеаза В. Протеаза С и Протозим 200-С обладали близкой протеиназной активностью; наименьшаяПС была у ФП Протозим 6-С. Агропрот ПЕП и Протозим КП-С обладали более высокой ПС при pH 5.0, остальные ФП характеризовались более высокой ПС при pH 7.0.

Результаты гидролиза растительного белкового сырья под действием ФП протеиназ представлены в табл. 2.

Агропрот ПЕП проявлял более высокую активность по отношению к жмыху амаранта и к соевым субстратам при pH 5.0, чем при pH 7.0, что было связано со строго кислым pH-оптимумом действия протеиназы, входящей в состав этого ФП. В оптимальных условиях проведения протеолиза (дозировка ФП 2.5% от массы субстрата, длительность 3 ч) выход растворимого белка из жмыха амаранта составил 59% от общего содержания белка в жмыхе. Предельная глубина гидролиза белка жмыха амаранта составила 77-81% от его общего содержания и была достигнута при увеличении времени обработки до 24 ч или при использовании более высокой дозировки ФП (12.5% от массы субстрата) в течение 3 ч. При гидролизе соевого изолята и соевого шрота под действием Агропрот ПЕП в оптимальных условиях (дозировка ФП 2.5% от массы субстрата, 3 ч) при естественном значении pH выход растворимого белка был ниже и составлял 33 и 20% соответственно. При увеличении времени обработки до 24 ч глубина гидролиза белка в случае соевого шрота составила 55% от общего содержания, а в случае соевого изолята не изменялась. Основная часть пептидов в получаемых гидролизатах белков жмыха амаранта имела молекулярную массу 3-5 кДа, соевых субстратов – от 5 до 20 кДа, также присутствовали минорные количества более высокомолекулярных продуктов.

Протосубтилин был одинаково эффективен в процессе гидролиза белков жмыха амаранта при pH 5.0 или 7.0 с небольшим предпочтением нейтральных pH. Действие этого ФП приводило примерно к одинаковым результатам в случае гидролиза жмыха амаранта и соевого изолята: в оптимальных условиях (дозировка ФП 2.5% от массы субстрата, 3 ч) выход растворимого белка составил 56 и 50% соответственно. В случае соевого изолята предельная глубина гидролиза белка была достигнута при увеличении времени обработки до 24 ч и составила 70% от общего содержания, а в случае жмыха амаранта существенного увеличения выхода растворимого белка в аналогичных условиях не наблюдалось. Следует отметить, что Протосубтилин был одинаково эффективен по отношению к альбуминам и глобулинам амаранта, а также β-конглицинину и глицинину сои.

Протеаза В была одинаково эффективна в процессе гидролиза белков жмыха амаранта при pH 5.0 или 7.0, несмотря на то, что ФП имел более высокое значение ПС при pH 7.0 (табл. 1). Данный ФП в оптимальных условиях обеспе-

чивал 50% выход растворимого белка из жмыха амаранта, а предельная глубина гидролиза белка (75% от общего содержания) была достигнута при использовании высокой дозировки ФП 12,5% от массы субстрата и увеличения времени гидролиза до 24 ч. Соевые белки Протеаза В, в целом гидролизовала хуже, чем белки амаранта: выход растворимого белка при гидролизе соевого шрота и соевого изолята в оптимальных условиях (дозировка ФП 2.5% от массы субстрата, 3 ч) составил 23 и 42% от общего содержания в этих субстратах соответственно. Предельная глубина гидролиза белка обоих соевых субстратов, достигнутая при увеличении времени обработки до 24 ч и сохранении дозировки ФП 2.5% от массы субстрата, была близкой и составила 62 и 59% соответственно.

Как и Протеаза В, Протеаза С была одинаково эффективна в процессе гидролиза белков жмыха амаранта при pH 5.0 или 7.0, несмотря на то, что имела более высокое значение ПС при pH 7.0 (табл. 1). Выход растворимого белка при гидролизе белков жмыха амаранта, соевого шрота и соевого изолята в оптимальных условиях протеолиза (дозировка ФП 2.5% от массы субстрата, 3 ч) составил 47, 23 и 37% соответственно, а предельная глубина гидролиза этих субстратов достигалась при увеличении времени обработки до 24 ч при той же дозировки ФП и составляла 82% в случае жмыха амаранта и 51-52% в случае соевых белков.

Протозим КП-С, являясь, как и Агропрот ПЕП, кислой эндопротеиназой, проявлял более высокую активность по отношению к белкам жмыха амаранта при pH 5.0, а среди соевых субстратов предпочтительно гидролизовал белки соевого шрота, для которого характерно более кислый естественный pH. Выход растворимого белка в оптимальных условиях протеолиза этих субстратов (дозировка ФП 2.5% от массы субстрата, 3 ч) составлял 40-42%, а предельная глубина гидролиза белка не превышала 52-54% и достигалась при увеличении времени обработки до 24 ч при той же дозировке ФП. В случае соевого изолята выход растворимого белка в оптимальных условиях гидролиза составил 17%, что соответствовало и предельному значению глубины гидролиза. Основная часть пептидов в полученных гидролизатах имела молекулярную массу 6-14 кДа, в гидролизатах соевого изолята также присутствовали минорные количества более высокомолекулярных продуктов.

Протозим 200-С имел более высокую протеолитическую активность(ПС) при pH 7.0 (табл. 1) и был более активен при этом pH по отношению к исследуемым видам белкового сырья. В оптимальных условиях протеолиза (дозировка ФП 2.5% от массы субстрата, 3 ч) выход растворимого белка из жмыха амаранта и соевого изолята составил 56 и 49% соответственно, из соевого шрота – 35%. Предельная глубина гидролиза составила 61, 71 и 51% соответственно и достигалась при увеличении времени протеолиза до 24 ч при той же дозировке ФП. Основная часть пептидов в гидролизатах имела молекулярную массу 4-10 кДа.

Протозим 6-С, как и Протозим 200-С, был более активен при нейтральном pH по отношению к исследуемым видам белкового сырья. В оптимальных условиях протеолиза (дозировка ФП 2.5% от массы субстрата, 3 ч) выход растворимого белка из жмыха амаранта и соевого изолята составил 55 и 47% соответственно, из соевого шрота – 34%. Предельная глубина гидролиза белков жмыха амаранта, соевого изолята и соевого шрота составила 80, 60 и 52% от общего содержания в сырье соответственно и достигалась при увеличении времени обработки до 24 ч при той же дозировке ФП. Основная часть пептидов в гидролизатах имела молекулярную массу 5-10 кДа.

В целом при использовании всех исследуемых ФП протеиназ гидролизаты жмыха амаранта характеризовались более высоким выходом растворимого белка по сравнению гидролизатами соевых субстратов. В большинстве случаев, а именно, при использовании ФП нейтральных и нейтрально-щелочных протеиназ, выход белка из соевого изолята превышал таковой для соевого шрота. Только в случае использования ФП кислых протеиназ выход растворимого белка из соевого шрота был выше, чем из изолята. Наибольший выход растворимого белка из жмыха амаранта в оптимальных условиях гидролиза (дозировка ФП 2,5% от массы субстрата, 3 ч) обеспечивали ФП Агропрот ПЕП (59%), Протосубтилин (56%) и Протозим 200-С (56%); из соевого изолята – Протосубтилин (50%) и Протозим 200-С (49%); из соевого шрота – Протозим КП-С (40%) и Протозим 200-С (35%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты, а именно высокий выход растворимого белка и молекулярная масса основных продуктов ниже 10 кДа при невысоком расходе ФП и небольшом времени протеолиза, свидетельствуют о конкурентноспособности коммерчески доступных протеиназ в процессах гидролиза растительных белков. Применение белковых гидролизатов, полученных на основе белоксодержащих растительных отходов, имеет большой потенциал в различных областях пищевой промышленности, а также при производстве специализированных пищевых продуктов для диетического питания, поскольку, как сообщалось ранее, короткие пептиды 0.5-3 кДа обладают антиоксидантной, антигипертензивной, и антиаллергенная биологической активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Alvarez-Jubete L., Arendt E.K., Gallagher E. Nutrirtive value of preudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends Food Sci. Technol*, 2010, vol., 21, P. 106–113. http://doi.org/org/10.1016/j.tifs.2009.10.014
2. Ayala-Niño A., Rodríguez-Serrano G., González-Olivares L., Contreras-López E., Regal-López P., Cepeda-Saez A. Sequence Identification of Bioactive Peptides from Amaranth Seed Proteins (*Amaranthus hypochondriacus* spp.). *Molecules*, 2019, vol., 24, P. 1–14. http://doi.org/10.3390/molecules24173033
3. Chachina S., Shadrin M., Denisova E. Development of a method for reducing antinutritional factors and digestive enzyme inhibitors in soy protein. *Vestnik PNIPU*, 2024, no 3, P. 5–29. http://doi.org/10.15593/2224-9400/2024.3.01
4. Chatterjee C., Gleddie S., Xiao C. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients,* 2018, vol., 10, no 9,. P. 1211. http://doi.org/10.3390/nu10091211
5. Clarke E., Wiseman J. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans I. Protein and amino acid content. *J. Agric. Sci.,* 2000, vol., 134, P. 111–124. http://doi.org/10.1017/S0021859699007431
6. Constantino A., Garcia-Rojas E. Proteins from pseudocereal seeds: solubility, extraction, and modifications of the physicochemical and techno-functional properties. *J. Sci. Food Agric,* 2022, vol., 102, no. 7, P. 2630–2639. http://doi.org/10.1002/jsfa.11750
7. D'Amico S., Schoenlechner R. *Amaranth: Its Unique Nutritional and Health-Promoting Attribute in* Gluten-Free Ancient Grains. Ed. J. R.N. Taylor, J.M. Awika. Woodhead Publishing, 2017, P. 131-159. http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100866-9.00006-6
8. Drzewiecki J., Delgado-Licon E., Haruenkit R., et al. Identification and Differences of Total Proteins and Their Soluble Fractions in Some Pseudocereals Based on Electrophoretic Patterns. *J. Agric. Food Chem*., 2003, vol., 51, no. 26, P. 7798–7804. http://doi.org/10.1021/jf030322x
9. Evdokimov N., Sakharova E., Malyi O., et al. Effect of fermentation on the functional properties of soybean husk cellulose. *Vestnik PNIPU*, 2023, no 4. P. 19–33. http://doi.org/10.15593/2224-9400/2023.4.02
10. Fritz M., Vecchi B., Rinaldi G., Anon, M. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chem*., 2011, vol., 126, P. 878–884. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.065
11. Gonzalez R., Carrara C., Tosi E., et al. Amaranth starch-rich fraction properties modified by extrusion and fluidized bed heating. *LWT-Food Sci. Technol*., 2007, vol., 40, P. 136–43. http://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.003
12. Islam M., Huang Y., Islam S., Fan B., Tong L., Wang F. Influence of the Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Activity of Enzymatic Soybean Protein Hydrolysates. *Molecules*, 2022, vol., 27, P. 6110. http://doi.org/10.3390/molecules27186110
13. Ivanitsky S., Nazarenko S., Kharchenko V. *Soy protein fortifier in food products. Food industry*, 1997, no. 2, pp. 30-31. (In Russ.)
14. Joshi D.C., Sood S., Hosahatti R., et al. From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth breeding. *Theor. Appl. Genet,* 2018, vol., 131, P. 1807–1823. http://doi.org/10.1007/s00122-018-3138-y
15. Juan R., Pastor J., Alaíz Barragán M., Megías C., Vioque J. Seed protein characterisation of eleven species of amaranthus. *Grasas y Aceites*, 2007, vol. 58. no. 1, P. 49–55.
16. Jung S., Roussel-Philippe C., Briggs J.L., et al. Limited hydrolysis of soy proteins with endo-and exoproteases. *J Amer Oil Chem Soc*., 2004, vol., 81, P. 953–960. http://doi.org/10.1007/s11746-004-1007-3
17. Kim I., Yang W., Kim C. Beneficial Effects of Soybean-Derived Bioactive Peptides. *Int. J. Mol. Sci.,* 2021, vol., 22, no. 16, P. 8570. http://doi.org/10.3390/ij ms22168570
18. Kiss A., Elhawat N., Kovacs Z., et al. Optimizing mung bean and soybean hydrolysis for the generation of bioactive peptides of potential functional food applications. *Food Chem.: X*., 2025, vol., 30. 102925. http://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102925
19. Kolpakova V., Tichomirova N., Gaivoronskaya I., Lukin N. Fermented Dairy Product For Gerontological Appointments Based On Amaranth Processed Products. *Food systems*, 2018, vol. 1, no. 1. P. 35-45. http://doi.org/10.21323/2618-9771-2018-1-1-35-45
20. Kostyleva E., Sereda A., Velikoretskaya I., Kurbatova E., Tsurikova N. Proteases for obtaining of food protein hydrolysates from proteinaceous by-products. *Vopr. Pitan*, 2023, vol., 92, no. 1, P. 116–132. http://doi.org/10.33029/0042-8833-2023-92-1-116-132
21. Lamothe L. M., Srichuwong S., Reuhs B. L., Hamaker B. R. Quinoa (Chenopodium quinoa W.) and amaranth (Amaranthus caudatus L.) provide dietary fibres high in pectic substances and xyloglucans. *Food Chem,* 2015, vol., 167, P. 490–496. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.022

22. Martynov S. Factors limiting the use of soy in animal diets and ways to eliminate them. *Sel'skoe khozyaistvo za rubezhom*, 1984, no. 9, pp. 41-45. (In Russ.)

23. Meinlschmidt P., Sussmann D., Schweiggert-Weisz U., Eisner P. /Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Sci. Nutr.*, 2015, vol., 4, no. 1, P. 11-23. http://doi.org/10.1002/fsn3.253

24. Mendelson G. The importance of soy protein products in human nutrition. *Food industry,* 2004, no 6, pp. 90–91. (In Russ.)

25. Miloradova E., Ivanushkin P, Anan`ev A. et al. Comparative study of enzymatic hydrolysates of isolated soy protein and soy flour by SE-HPLC. Vestnik MITKhT, 2010, vol. 5, no. 2, pp. 82-87. (In Russ.)

26. Nardo A., Suárez S., Quiroga A., Anon M. Amaranth as a Source of Antihypertensive Peptides. *Front. Plant Sci*., 2020, vol., 11, P. 578631. http://doi.org/10.3389/fpls.2020.578631

27. Pivovarov V., Pyshnaya O., Gurkina L. Vegetables - products and raw materials for functional nutrition. *Vopr. Pitan*, 2017, vol. 86, no. 3, pp. 121–127. (In Russ.) http://doi.org/10.24411/0042–8833–2017–00054

28. *Plant protein*. Mikulovich T. Agropromizdat, M., 1991, pp. 347-405. (In Russ.)

29. *Production of compound feed*. Miochinsky P., Kozharova L. Agropromizdat, M., 1991, pp. 23-100. (In Russ.)

30. *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. World Health Organ Tech. Rep. Ser., 2007, no. 935, P. 1-265.

31. Ramírez-Torres G., Ontiveros N., Lopez-Teros V et al. Amaranth Protein Hydrolysates Efficiently Reduce Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules*, 2017, vol., 22, no 11, P. 1905. http://doi.org/10.3390/molecules22111905

32. Rastogi A., Shukla S. Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 2013, vol., 53, P. 109–125. http://doi.org/10.1080/10408398.2010.517876

33. Sharipov P., Khasanov Kh. Complex processing of amaranth seeds using hydrolytic enzymes. *Universum: technical sciences*, 2021, vol. 1, no. 82, P. 44-48. http://doi.org/10.32743/UniTech.2021.82.1-2

34. Shentsova E., Lytkina L., Vostroilov A., Kurchaeva E. Technological properties of amaranth cake as a component of mixed fodders. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*, 2018, vol. 80, no. 2, pp. 182-188. (In Russ.) https://doi.org/10.20914/2310-1202-2018-2-182-188

35. Shinde N.W., Kartikeyan S., Agrawal A.K., Goel B.K., Choudhary K.K., Punita K. Selection of suitable form of amaranth (Amaranthus cruentus) for development of amaranth incorporated composite fermented milk drink. *Int. J. Chem. Stud.,* 2020, vol., 8, no. 2, P. 352-357. http://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2f.8793

36. Singh B., Vij S., Hati S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 2014, vol., 54, P. 171–179. http://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022

37. Somogyi M. Notes on sugar determination. *JBC,* 1952, vol. 195, P. 19–23

38. *Soybeans*. Arabadzhaev S., Vatashki K., Goranova K. Kolos, M., 1981, 200 p. (In Russ.)

39. *Soybeans*. Lavrinenko G., Babich A., Kuzin V., Gubanov P. Rosselkhozizdat, M., 1978, pp. 12-17. (In Russ.)

40. Sun X. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.,* 2011, vol., 46, no. 12, P. 2447–2459. http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02785.x

41. Tavano O., Berenguer-Murcia A., Secundo F., Fernandez-Lafuente R. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.,* 2018, vol., 17, no. 2, P. 412-436. http://doi.org/10.1111/1541-4337.12326

42. Velasquez M., Bhathena S. Role of dietary soy protein in obesity. *Int. J. Med. Sci*, 2007, vol., 4, P. 72-82. http://doi.org/10.7150/ijms.4.72

43. Venskutonis P., Kraujalis P. Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. Compr. Rev. Food *Sci. Food Saf*, 2013, vol., 12, P. 381–412. http://doi.org/10.1111/1541-4337.12021

44. Xiao C. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *J. Nutr.*, 2008, vol., 138, P. 1244–1249. http://doi.org/10.1093/jn/138.6.1244S

45. Zarkadas C., Gagnon C., Poysa V., et al. Protein quality and identification of the storage protein subunits of tofu and null soybean genotypes, using amino acid analysis, one- and two-dimensional gel electrophoresis. *Food Res. Int.,* 2007, vol., 40, no. 1, P. 111-128. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.08.005

46. Zheleznov A., Solonenko L. Zheleznova N. Seed proteins of wild and the cultivated Amaranthus species. *Euphytica*, 1997, vol., 97, P. 177–182. http://doi.org/10.1023/A:1003073804203

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Семенова Маргарита Викторовна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биотехнологии ферментов, Федеральный исследовательский центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: margs@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-8656-0540

Рубцова Екатерина Александровна – кандидат химических наук, научный сотрудник Лаборатории биотехнологии ферментов, Федеральный исследовательский центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
e-mail: katefedo@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-1312-3005

Курзеев Сергей Анатольевич – кандидат химических наук, научный сотрудник Лаборатории физико-химии ферментативной трансформации полимеров, кафедра химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация
E-mail: kurzeev@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-0016-8036

Касумова Виктория Михайловна – студент химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация
e-mail: victoriakas2005@gmail.com

Сатрутдинов Айдар Дамирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биотехнологии ферментов, Федеральный исследовательский центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: sat-aidar@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-4711-6786

Рожкова Александра Михайловна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биотехнологии ферментов, Федеральный исследовательский центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: amrojkova@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-4901-4705

Кондратьева Елена Геннадьевна – кандидат физико-математических наук, ведущий инженер Лаборатории биотехнологии ферментов, Федеральный исследовательский центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: elgenkon@inbox.ru

AUTHOR INFORMATION

Semenova, Margarita V. – PhD (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Enzyme Biotechnology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: margs@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-8656-0540

Rubtsova, Ekaterina A. – PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Enzyme Biotechnology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: katefedo@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-1312-3005

Kurzeev, Sergey A. – PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Physical Chemistry of Enzymatic Transformation of Polymers, Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation
E-mail: kurzeev@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-0016-8036

Kasumova, Victoria M. – student at the Chemistry Department of Moscow State University named after M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation
E-mail: victoriakas2005@gmail.com

Satrutdinov, Aidar D. – PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Enzyme Biotechnology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: sat-aidar@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-4711-6786

Rozhkova, Aleksandra M. – PhD (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Enzyme Biotechnology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: amrojkova@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-4901-4705

Kondratieva, Elena G. – PhD (Physics and Mathematics), Leading Engineer, Laboratory Enzyme Biotechnology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: elgenkon@inbox.ru

Цурикова Нина Васильевна – кандидат технических наук, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Российская Федерация
E-mail: nina.tsurikova@gmail.com

Синицын Аркадий Пантелеймонович – доктор химических наук, заведующий Лабораторией биотехнологии ферментов, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук и заведущий Лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров, кафедра химической энзимологии химического факультета Московскогогосударственногоуниверситетаимени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация
E-mail: apsinitsyn@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-6429-8254

Поступила в редакцию 03.04.2026
После доработки 14.05.2026
Принята к публикации 11.07.2026

Tsurikova, Nina V. – PhD (Engineering), All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation
E-mail: nina.tsurikova@gmail.com

Sinitsyn, Arkady P. – Doctor of Chemical Sciences, Head of the Laboratory of Enzyme Biotechnology, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences and Head of the Laboratory of Physical Chemistry of Enzymatic Transformation of Polymers, Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation
E-mail: apsinitsyn@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-6429-8254

Received April 03, 2026
Revised May 14, 2026
Accepted July 11, 2026