



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A23J 3/34 (2024.08); A23J 3/30 (2024.08); A23J 1/20 (2024.08); A23J 3/08 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2024125672, 02.09.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
02.09.2024Дата регистрации:  
18.11.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.09.2024

(45) Опубликовано: 18.11.2024 Бюл. № 32

Адрес для переписки:

117593, Москва, ул. Соловьинный пр-д, 14, кв.  
352, Попова Анна Олеговна

(72) Автор(ы):

Кан Ильян Чанхович (RU),  
Черепков Дмитрий Анатольевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Кан Ильян Чанхович (RU),  
Черепков Дмитрий Анатольевич (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: ВУ 23425 С1, 30.06.2021. MD 139 Z,  
30.09.2010. SU 1722383 А1, 30.03.1992.ВУТКАРЕВА И.И. Влияние ферментации  
концентрированной молочной сыворотки на  
выделение органических кислот при  
электрообработке, Электронная обработка  
материалов, 2021, N 2(57), с. 48-53. RU 2065703  
С1, 27.08.1996.

(54) Способ получения низкомолекулярных гидролизных пептидов из молочной сыворотки

(57) Реферат:

Изобретение относится к области переработки молочной сыворотки. Раскрыт способ получения низкомолекулярных гидролизных пептидов из молочной сыворотки, характеризующийся тем, что пропускают раствор изолята сывороточного белка с протеолитическим ферментом Бромелайн в течение 8 часов через катодную камеру

аппарата для электрохимического гидролиза при температуре 35,5°C, со скоростью потока 5 л/мин, плотностью тока в катодной камере 600 мА/см<sup>2</sup>, окислительно-восстановительным потенциалом -980 мВ и рН 8,5. Изобретение позволяет получить низкомолекулярные гидролизные пептиды из молочной сыворотки. 1 ил., 4 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A23J 3/34* (2006.01)  
*A23J 3/30* (2006.01)  
*A23J 1/20* (2006.01)  
*A23J 3/08* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A23J 3/34 (2024.08); A23J 3/30 (2024.08); A23J 1/20 (2024.08); A23J 3/08 (2024.08)*

(21)(22) Application: **2024125672, 02.09.2024**

(24) Effective date for property rights:  
**02.09.2024**

Registration date:  
**18.11.2024**

Priority:

(22) Date of filing: **02.09.2024**

(45) Date of publication: **18.11.2024 Bull. № 32**

Mail address:

**117593, Moskva, ul. Solovinyj pr-d, 14, kv. 352,  
Popova Anna Olegovna**

(72) Inventor(s):

**Kan Ilian Chankhovich (RU),  
Cherepkov Dmitrii Anatolevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Kan Ilian Chankhovich (RU),  
Cherepkov Dmitrii Anatolevich (RU)**

(54) **METHOD OF PRODUCING LOW-MOLECULAR HYDROLYTIC PEPTIDES FROM MILK WHEY**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to milk whey processing. Disclosed is a method of producing low-molecular hydrolysis peptides from milk whey, characterized by passing a solution of whey protein isolate with proteolytic enzyme Bromelain for 8 hours through a cathode chamber of an electrochemical

hydrolysis apparatus at temperature of 35.5 °C, with a flow rate of 5 l/min, current density in cathode chamber 600 mA/cm<sup>2</sup>, redox potential of -980 mV and pH 8.5.

EFFECT: invention enables to obtain low-molecular hydrolysis peptides from milk whey.

1 cl, 1 dwg, 4 tbl, 3 ex

**RU 2 830 309 C 1**

**RU 2 830 309 C 1**

Изобретение относится к области переработки молочной сыворотки. Белки, содержащиеся в молочной сыворотке и концентратах сывороточных белков, обладают ценными биологическими свойствами. Наибольшее практическое значение имеют  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактоальбумин, доля которых в сывороточных белках составляет 70-80%. Аминокислотный состав этих белков наиболее близок к аминокислотному составу мышечной ткани человека, а по содержанию незаменимых аминокислот (лизина, триптофана, метионина, треонина) и аминокислот с разветвленной цепью (валина, лейцина и изолейцина) они превосходят все остальные белки животного и растительного происхождения.

Гидролиз сывороточных белков может быть осуществлен при действии химических агентов (щелочь, кислота) или ферментных препаратов.

Наибольший интерес вызывает именно ферментативный гидролиз, позволяющий получить гидролизаты с заданными свойствами.

Известно, что белки молочной сыворотки:  $\beta$ -лактоглобулин,  $\alpha$ -лактальбумин - являются основными аллергенами молока. Для снижения аллергенных свойств проводят ферментативный гидролиз сывороточных белков. Осуществлен сравнительный анализ гидролизатов белков молока, представленных на мировом рынке, для сопоставления пептидного и аминокислотного профиля продуктов аналогов с учетом специфики применения гидролизатов. Рассмотрены гидролизаты сывороточных белков фирмы Ingredia (Франция) и Nilmar (США) согласно информации, предоставленной производителями. По результатам анализа продуктов аналогов зарубежного производства установлено, что 1) основными характеристиками гидролизатов являются: степень гидролиза белка, пептидный и аминокислотный профили; 2) использование гидролизата как компонента детского и специализированного питания предполагает глубокий гидролиз молочного белка (степень гидролиза преимущественно составляет 22-29%), 99% пептидной фракции должны быть представлены короткоцепочечными пептидами с молекулярной массой менее 10 кДа с отсутствием высокомолекулярной фракции (>20 кДа), а также сбалансированный аминокислотный состав.

В качестве наиболее близкого аналога был выбран патент США US 5356637 А, из которого известен ферментативный гидролизат, богатый ди- и трипептидами, получаемый путем ферментативного протеолиза смеси белков, предварительно подвергнутых термической обработке. Богатый ди- и трипептидами гидролизат извлекается путем разделения жидкости и твердого вещества с последующей ультрафильтрацией, а затем стерилизуется и сушится.

Разработанный способ получения низкомолекулярных гидролизных пептидов из молочной сыворотки основан на гибридном ферментно-электрохимическом гидролизе, при котором раствор концентрата сывороточных белков смешивают с ферментом и пропускают через катодную камеру в электролизере проточного типа.

Электролизер проточного типа с полупроницаемой мембраной - является аппаратом для электрохимического гидролиза (ЭХГ).

Пример 1. Базовый метод

Перед внесением ферментов начальное значение рН доводят путем добавления водного 5% раствора щелочи гидроксида натрия (калия). Раствор белка получают из концентрата сывороточного белка, а гидролиз ведут при температуре 50°C в течение 8 часов, с начальным рН 8,5 ед., ультрафильтрацию гидролизата осуществляют на мембранах с пропускной способностью 10 кДа (до массовой доли сухих веществ в концентрате 20-22%, после чего полученный концентрат пастеризуют при температуре (70-80)°С в течение 30 с и сушат на распылительной сушилке. При этом методе степень

гидролиза сывороточных белков составляет не более 31% при применении протеолитических фермента бромелайн в течение 8 часов.

Пример 2. Экспериментальный метод, вариант 1

Раствор изолята сывороточного белка пропускается через катодную камеру электролизера,  $t(p-pa) = 21,5^{\circ}C$ , со скоростью потока 5 л/мин, плотность тока в катодной камере  $600 mA/cm^2$ , окислительно-восстановительный потенциал  $= -980$  мВ,  $pH=8,5$ . При этом методе степень гидролиза сывороточных белков составляет не более 35% при применении протеолитических фермента бромелайн в течение 8 часов.

Пример 3. Экспериментальный метод, вариант 2

Раствор изолята сывороточного белка пропускается через катодную камеру аппарата для электрохимического гидролиза (ЭХГ),  $t(p-pa) = 35,5^{\circ}C$ , со скоростью потока 5 л/мин, плотность тока в катодной камере  $600 mA/cm^2$ , окислительно-восстановительный потенциал  $= -980$  мВ,  $pH=8,5$ . При этом методе степень гидролиза сывороточных белков составляет не более 53% при применении протеолитических фермента бромелайн в течение 8 часов.

Таблица 1 (степень гидролиза)

Степень гидролиза, %	Продолжительность гидролиза, ч	
	4 часа	8 часов
Бромелайн, $pH=8,5$ , $t=50,0^{\circ}C$	19,51±0,9	30,92±1,7
Бромелайн, ЭХГ плотность тока $600 mA/cm^2$ , $t=21,5^{\circ}C$	20,77±0,8	34,19±0,9
Бромелайн, ЭХГ плотность тока $600 mA/cm^2$ , $t=35,5^{\circ}C$	36,44±0,5	52,22±0,6

Согласно приведенным в Табл. 2 результатам можно сделать вывод о том, что гибридный метод практически полностью гидролизует  $\beta$ -лактоглобулиновую фракцию, остальные белковые компоненты фракций сывороточных белков подвергаются биохимической трансформации. В большей степени биоизменениям подверглась фракция  $\alpha$ -лактальбумин и иммуноглобулинов, массовая доля азота за период ферментации снизилась в 4,5 раза, снижение массовой доли азота фракции сывороточного альбумина почти в 3,0 раза, а массовая доля азота фракции протеозо-пептонов снизилась почти в 2 раза. Установленная закономерность связана с отщеплением от фракций сывороточных белков аминокислотных остатков и пептидов с различной молекулярной массой.

Таблица 2 (фракционный состав)

Образец	Массовая доля азота во фракциях, %					
	Общее содержание	$\beta$ -лактоглобулин	$\alpha$ -лактальбумин	Сывороточный альбумин	иммуноглобулины	протеозопептоны
До ферментации	8,75±0,51	4,16±0,13	1,66±0,08	0,54±0,02	1,38±0,08	1,01±0,05
Бромелайн, $pH=8,5$ , $t=50,0^{\circ}C$	2,79±0,13	1,53±0,04	0,29±0,06	0,31±0,01	0,84±0,05	0,69±0,01
Бромелайн, ЭХГ плотность тока $600 mA/cm^2$ , $t=21,5^{\circ}C$	1,82±0,12	0,55±0,02	0,25±0,06	0,23±0,02	0,51±0,05	0,72±0,05
Бромелайн, ЭХГ плотность тока $600 mA/cm^2$ , $t=35,5^{\circ}C$	1,62±0,12	0,49±0,02	0,18±0,03	0,13±0,02	0,30±0,05	0,52±0,05

В Табл. 3 приведены данные фракционного состава концентрата сывороточных белков до и после ферментативного гидролиза, полученных при применении различных ферментных препаратов.

Таблица 3 Фракционный состав концентрата сывороточных белков до и после ферментативного и гибридного гидролиза (n=5)

Наименование фракции	Массовая доля азота во фракциях, %			
	До гидролиза	Бромелайн, pH=8,5, t=50,0°C	Бромелайн, ЭХГ плотность тока 600 мА/см <sup>2</sup> , t=21,5°C	Бромелайн, ЭХГ плотность тока 600 мА/см <sup>2</sup> , t=35,5°C
β-лактоглобулин (β-Лг)	4,16±0,13	1,44±0,02	1,39±0,08	1,32±0,05
α-Лактальбумин (α-Ла)	1,66±0,08	0,57±0,03	0,55±0,02	0,52±0,02
Сывороточный альбумин сыворотки (СА)	0,54±0,02	0,18±0,01	0,18±0,18	0,17±0,06
Иммуноглобулины, в т.ч.	1,38±0,08	0,48±0,02	0,46±0,02	0,44±0,02
иммуноглобулин G1 (Ig G1)	0,58±0,05	0,20±0,01	0,19±0,01	0,18±0,008
иммуноглобулин G2 (Ig G2)	0,27±0,01	0,09±0,003	0,09±0,01	0,08±0,005
иммуноглобулин A (Ig A)	0,29±0,01	0,10±0,006	0,09±0,01	0,09±0,003
иммуноглобулин M (Ig M)	0,24±0,01	0,08±0,003	0,08±0,01	0,07±0,003
протеозо-пептоны	1,01±0,05	0,35±0,01	0,34±0,01	0,31±0,02
ВСЕГО:	8,75±0,51	3,033±0,15	2,93±0,14	2,77±0,13

В процессе ферментативного гидролиза сывороточных белков бромелайном массовая доля β-лактоглобулина, α-лактальбумина, сывороточного альбумина и иммуноглобулинов сократилась в 3,0 раза. Также изменению подверглись протеозо-пептоны - в процессе гидролиза термолизинном они сократились в 2,9 раза.

При гидролизе бромелайном с ЭХГ плотностью тока 600 мА/см<sup>2</sup>, t=21,5°C наблюдаются схожие значения изменений фракций белков: остаточное количество β-лактоглобулина, α-лактальбумина, сывороточного альбумина и иммуноглобулинов уменьшилось в 3,2 раза.

В случае гидролиза сывороточных белков бромелайном с ЭХГ плотность тока 600 мА/см<sup>2</sup>, t=35,5°C массовая доля вышеуказанных фракций уменьшилась в 2,9 раза.

Увеличение концентрации аминного азота в гидролизате, и, соответственно, степени гидролиза хорошо коррелирует с изменением других параметров, например, его молекулярно-массового состава. В связи с чем были проведены исследования молекулярно-массового распределения белковых фракций, образующихся под действием протеолитических ферментов. Анализ белкового и пептидного профиля представлен на фигуре.

Анализ представленных результатов электрофоретического разделения позволяет сделать вывод о том, что в ходе ферментативного гидролиза сывороточных белков происходит перераспределение фракций, при этом соотношение отдельных фракций зависит от вида используемого ферментного препарата (Табл. 4).

Таблица 4 Молекулярно-массовое распределение белков и пептидов в результате ферментативного гидролиза (n=5)

Молекулярная масса, кДа	Массовая доля фракций, %		
	Бромелайн, pH=8,5, t=50,0°C	Бромелайн, ЭХГ плотность тока 600мА/см <sup>2</sup> , t=21,5°C	Бромелайн, ЭХГ плотность тока 600мА/см <sup>2</sup> , t=35,5°C
Более 50	12,53±0,6	10,77±0,53	10,21±0,3
50-30	23,9±0,7	13,26±0,66	13,42±0,7
29-11	18,0±0,4	9,97±0,49	10,7±0,6
10-5	21,0±1,5	21,12±1,05	29,15±0,46
Менее 5	24,12±1,7	33,88±0,7	34,5±0,73

Данные, представленные в Табл. 4, показывают, что гидролизаты, подвергаемые электрофорезу, представляет собой смесь соединений белковой природы, молекулярная масса которых находится в пределах от 5 до 50 кДа.

На фигуре представлена электрофореграмма гидролизатов сывороточных белков:

1 - маркер молекулярных масс;

2 - ГСБ при использовании Бромелайн, рН=8,5, t=50,0°C;

3 - ГСБ при использовании Бромелайн с ЭХГ плотность тока 600 мА/см<sup>2</sup>, t=21,5°C;

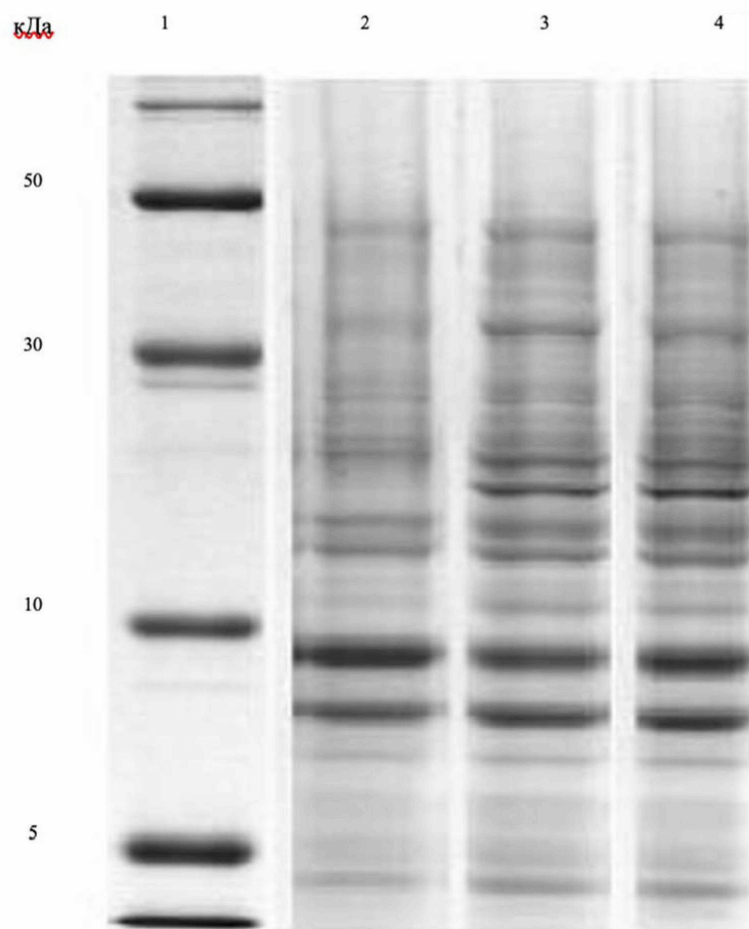
4 - ГСБ при использовании Бромелайн с ЭХГ плотность тока 600 мА/см<sup>2</sup>, t=35,5°C.

Гидролитическое расщепление белков начинается через небольшой промежуток после внесения ферментных препаратов, поэтому уже после 10-15 минут гидролиза часть белковых веществ переходит частично в растворимое состояние, и на электрофореграмме (фигура) наблюдается изменение фракционного состава.

Большая часть фракций приходится на белки с низкой молекулярной массой - 10-5 кДа составило 21-29%, менее 5 кДа составило 33-35%. Суммарно 55-65%. При гидролизе в течение 8 ч массовая доля фракций с молекулярным весом более 50 кДа заметно сокращается, и изменения составляют от 10,21 до 12,46% (в зависимости от метода).

(57) Формула изобретения

Способ получения низкомолекулярных гидролизных пептидов из молочной сыворотки, заключающийся в пропускании раствора изолята сывороточного белка с протеолитическим ферментом Бромелайн в течение 8 часов через катодную камеру аппарата для электрохимического гидролиза при температуре 35,5°C, со скоростью потока 5 л/мин, плотностью тока в катодной камере 600 мА/см<sup>2</sup>, окислительно-восстановительным потенциалом -980 мВ и рН 8,5.



Фиг.1