

## ГИПОАЛЛЕРГЕННЫЙ БЕЛКОВЫЙ КОМПОНЕНТ НА ОСНОВЕ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРОДУКТОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПИТАНИЯ

<sup>1</sup>*Т.Н. Головач, аспирант*

*Научный руководитель* – <sup>2</sup>*В.П. Курченко, к.б.н.*

<sup>1</sup>*РУП «Институт мясо-молочной промышленности»,*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет*

Молочная сыворотка, являясь побочным продуктом производства сыра и казеина, представляет собой ценный источник сывороточных белков:  $\beta$ -лактоглобулина (55-60%) и  $\alpha$ -лактальбумина (15-20%). Минорная составляющая белковой фракции содержит бычий сывороточный альбумин, иммуноглобулины, лактоферрин, фосфолипопротеины, биологически активные факторы и ферменты [1]. Наличие в сыворотке  $\beta$ -лактоглобулина ( $\beta$ -лг) – одна из основных причин ряда аллергических реакций, которые возникают у детей раннего возраста при отсутствии грудного вскармливания. Другие сывороточные белки:  $\alpha$ -лактальбумин ( $\alpha$ -ла), бычий сывороточный альбумин (БСА) – и казеины обладают менее выраженными антигенными свойствами [2].

Основными характеристиками  $\beta$ -лг, обуславливающими его иммунореактивность, являются устойчивость в кислой среде желудка и к протеолитическому расщеплению пепсином, способность пересекать слизистую кишечника и впоследствии проникать в грудное молоко, которое приобретает аллергенный потенциал [3].

Различные технологические процессы: нагревание, химическая обработка, высокое давление, ферментативный гидролиз и др. – могут изменить аллергенный потенциал продуктов питания в результате экспонирования, разрушения или ограничения доступа к антигенным эпитопам через конформационные переходы или изменение перевариваемости белков. Сочетание физического воздействия, в частности термоденатурации, и протеолиза представляется перспективным путем снижения аллергенности белков [4].

Использование ферментативных гидролизатов в пищевой промышленности возрастает, так как они обладают свойствами, которые превращают их в ценный ресурс незаменимых аминокислот для продуктов питания. В настоящее время гидролизаты белков включаются в специальные формулы: геродиетические продукты, высоко энергетические добавки, контролирующие вес и терапевтические диеты, гипоаллергенные формулы для питания детей в связи с их сниженной аллергенностью в сравнении с нативными белками [5].

Целью работы являлось исследование степени протеолиза и антигенных свойств гидролизатов нативных и термизированных сывороточных белков, полученных с применением алкалазы и последующей мембранной фильтрации.

В работе использовали концентрат сывороточных белков (КСБ-УФ-70, ОАО «Щучинский маслосырзавод», ТУ ВУ 100377914.550-2008) с массовой долей белка 72,8%; ферментативный препарат «Алкалаза» (Alcalase<sup>®</sup>FG, активность 2,4 АУ/г, Novozymes A/S, Denmark). Для отделения фракции пептидов  $\leq 10$  кДа применяли фильтры Amicon Ultra-4 (Millipore, USA).

Качественная и количественная оценка антигенных свойств полученных гидролизатов проведена методом двойной радиальной иммунодиффузии (по Ухтерлони) и иммуноферментного анализа соответственно (ИФА) с использованием кроличьих антител против основных сывороточных белков. Степень протеолиза белковых субстратов контролировали методами ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

По литературным данным, при нагревании в молекуле  $\beta$ -лг наблюдаются конформационные переходы [6], которые могут привести к изменению чувствительности модифицированного белка к перевариванию в желудочно-кишечном тракте, а также к изменению аллергенного потенциала [7-8]. В связи с этим была проведена предварительная тепловая обработка раствора КСБ. Так как ферментативный гидролиз белкового компонента направлен на расщепление антигенных детерминант, а также получение продукта с повышенной питательной ценностью, далее осуществляли протеолиз термизированного и нативного КСБ алкалазой.

По результатам ВЭЖХ и ДСН-электрофоретического анализа установлено, что предварительная тепловая обработка КСБ обуславливает увеличение степени протеолиза основных сывороточных белков. Для гидролизата термизированного КСБ показано практически полное расщепление  $\beta$ -лг,  $\alpha$ -ла и БСА на продукты промежуточного гидролиза, что согласуется с литературными дан-

ными о конформационных перестройках сывороточных белков, приводящих к экспонированию ранее недоступных сайтов протеолиза. В то же время, нативный БСА обладал устойчивостью к ферментативному расщеплению. Для полного удаления высокомолекулярной белковой фракции, гидролизаты нативного и термизированного КСБ подвергли фильтрованию через фильтры с пропускающей способностью 10 кДа.

В связи с тем, что протеолиз белковых субстратов, а также предварительная тепловая обработка должны приводить к изменению антигенных свойств сывороточных белков, был осуществлен качественный анализ антигенности полученных гидролизатов методом двойной радиальной иммунодиффузии в агарозном геле. При исследовании фильтратов ферментативных гидролизатов не выявлена способность к формированию иммунных комплексов. Это указывает на получение гипоаллергенной фракции с  $M_r \leq 10$  кДа в результате совместного применения ферментативного гидролиза и мембранных процессов.

В соответствии с данными ИФА установлено, что антигенные свойства термизированного КСБ изменяются незначительно, что составляет 95% в сравнении с нативным белком. Очевидно сохранение иммунореактивности термизированных сывороточных белков, в частности, главного аллергена молока -  $\beta$ -лг. Ферментативное расщепление нативного и термизированного КСБ алкалазой привело к снижению способности продуктов гидролиза связывать антитела против основных белков сыворотки в 2,6 и 3,7 раза соответственно. Антигенный потенциал полученных фильтратов составил около 6-8% от исходного КСБ.

Таким образом, использование предварительной тепловой обработки, ферментативного гидролиза и фильтрации позволяют получить гипоаллергенный гидролизат сывороточных белков для продуктов специализированного питания.

### Список использованных источников

1. Foegeding, E. A. Advances in modifying and understanding whey protein functionality / E. A. Foegeding, J. P. Davis, D. Doucet, M. K. McGuffey // Trends in Food Science and Technology. – 2002. – Vol. 13. – P. 151–159.
2. Goldman, A.S. Milk allergy. I. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children / A.S. Goldman, D.W. Anderson, W.A. Sellers, S. Saperstein, W.T. Kniker, S.T. Halpern // Pediatrics - 1963. – Vol. 32. – P. 425–443.
3. Sorva, R.  $\beta$ -Lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cows' milk allergy / R. Sorva, S. Mäkinen-Kiljunen, K. Juntunen-Backman // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 1994. – Vol. 93. – P. 787–792.
4. Takagi, K. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion / K. Takagi, R. Teshima, H. Okunuki, J. Sawada // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2003. – Vol. 26. – P. 969–973.
5. Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition / A. Clemente // Trends in Food Science and Technology. – 2000. – Vol. 11. – P. 254–262.
6. Davis, P. J. Protein modification by thermal processing / P.J. Davis, S.C. Williams // Allergy. – 1998. – Vol. 53. – № 46. – P. 102–105.
7. Song, C.Y. Epitope mapping of a monoclonal antibody specific to bovine dry milk: involvement of residues 66–76 of strand D in thermal denatured beta-lactoglobulin / C. Y. Song, W. L. Chen, M.C. Yang, J.P. Huang, S.J. Mao // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – № 5. – P. 3574–82.
8. Prabakaran, S. Thermal unfolding of  $\beta$ -lactoglobulin: characterization of initial unfolding events responsible for heat-induced aggregation / S. Prabakaran, S. Damodaran // J. Agric. Food Chem. – 1997. – Vol. 45. – P. 4303–4308.