

УДК 613.287.5:[637.344:543.645.6]:379.83

**В. Г. Цыганков<sup>1</sup>, Т. Н. Головач<sup>2</sup>, В. П. Курченко<sup>2</sup>, А. М. Бондарук<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный технологический университет

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет

<sup>3</sup>Научно-практический центр гигиены Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь

### **ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДНОГО СОСТАВА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗАТА КОНЦЕНТРАТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ КОРОВЬЕГО МОЛОКА С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ТУРИСТИЧЕСКО-ОЗДОРОВИТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

Установлены оптимальные условия предварительной обработки очищенных сывороточных белков коровьего молока и их гидролиза протеазами различного класса, получены ферментативным гидролизом сывороточных белков коровьего молока пептидные фракции, определен качественный и количественный состав пептидов. Алкалаза (сериновой протеазы) по сравнению с нейтразой и папаином (металло- и цистеиновой протеазой) обеспечивает наиболее эффективный гидролиз основных белков-аллергенов молочной сыворотки:  $\beta$ -лг и  $\alpha$ -ла. Удаление BSA достигается ультрафильтрацией или предварительной тепловой обработкой субстрата.

Оптимальными условиями для получения гидролизата смеси сывороточных белков является предварительная тепловая обработка субстратов при 80°C в течение 10 мин (pH 8,0) с последующим расщеплением алкалазой продолжительностью 120 мин, что приводит к снижению антигенности в 20–25 раз. Определено молекулярно-массовое распределение пептидов сывороточных белков. Установлено, что опытный образец гидролизованного белкового компонента обладает приемлемыми органолептическими свойствами, низкой антигенностью и не содержит высокомолекулярных белков.

**Ключевые слова:** туристическо-оздоровительная деятельность, концентрат сывороточных белков, ферментативный гидролизат, пептиды, антигенность.

**V. G. Tsyhankou<sup>1</sup>, T. N. Halavach<sup>2</sup>, V. P. Kurchenko<sup>2</sup>, A. M. Bondaruk<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Belarusian State Technological University

<sup>2</sup>Belarusian State University

<sup>3</sup>Scientific and Practical Center of Hygiene

### **STUDY OF THE PEPTIDE ENZYMATIC HYDROLYSATES OF WHEY PROTEIN CONCENTRATE COW'S MILK TO DEVELOP FOODS FOR TOURISM AND RECREATION**

The optimal conditions for pretreatment protein substrates (mixture of cow's milk whey proteins) and their hydrolysis by proteases of various classes for the target peptide fractions were determined.

Were obtained by enzymatic hydrolysis of the whey protein of cow's milk peptide fraction; qualitative and quantitative composition of the peptides were defined. Alcalase (a serine protease) in comparison with papain and neutrase (metal and cysteine protease) provides the most efficient hydrolysis of the major protein allergens whey:  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactoalbumin. BSA removal is achieved by ultrafiltration or pre-heat treatment of the substrate. Optimum conditions for obtaining whey protein hydrolyzate is a mixture of pre-heat treatment of the substrates at 80°C for 10 min (pH 8.0), and subsequent cleavage of alkalas duration 120 min. At the same time there is a reduction in antigenicity of 20–25 times. It was established the absence in heat-treated hydrolysates bivalent antigenic determinants. Assessed the sensitizing effect of whey protein concentrate and milk enzymatic hydrolyzate.

**Key words:** tourism and recreation, whey protein concentrate, enzymatic hydrolyzate, peptides, antigenicity.

**Введение.** В Республике Беларусь большое значение придается развитию туристическо-оздоровительной деятельности. Одним из важнейших аспектов туристическо-оздоровительной

деятельности является сбалансированное, рациональное питание, которое обязательно должно включать молочные продукты. На основе молока и молочных продуктов разработано множе-

ство диетических и специализированных пищевых продуктов, в том числе для лиц, занимающихся оздоровлением [1].

В течение последних двух десятилетий установлено, что молочные белки являются источником биологически активных пептидов [2, 3]. Молочные протеины также модифицируют широкий спектр физиологических реакций [4].

Однако нативные белки молока обладают значительной антигенностью, связанной с их третичной структурой, что приводит к аллергизации организма, в первую очередь детей, и является фактором риска для развития таких заболеваний, как атопический дерматит и бронхиальная астма [5].

В связи с этим задача снижения аллергенности молочных протеинов является актуальной.

Различные технологические процессы переработки молочного сырья: нагревание, высокое давление, ферментативный гидролиз и другие – могут изменить аллергенный потенциал пищевых продуктов [6, 7].

Нами изучена возможность снижения антигенных свойств молочных протеинов, входящих в состав концентрата сывороточных белков (КСБ) сочетанием их термообработки и протеолиза.

**Основная часть.** В качестве источника основных белков-аллергенов использовали КСБ.

Для гидролиза применяли белковые субстраты:  $\beta$ -лактоглобулин ( $\beta$ -лг),  $\alpha$ -лактоальбумин ( $\alpha$ -ла), бычий сывороточный альбумин (БСА), а также сериновую протеазу (алкалаза, КФ 3.4.21.62, протеаза из *Bacillus licheniformis*, активность 2,64 Е/г); аспарагиновую протеазу (папаин, КФ 3.4.22.2, выделен из *Papaya latex*, активность 20 Е/мг); металлопротеазу (нейтраза, КФ 3.4.24.28, протеаза из *Bacillus amyloliquefaciens*, активность 0,9 Е/г) производства Sigma (США); КСБ, полученный методом ультрафильтрации (КСБ-УФ-80, ТУ ВУ 100377914.550–2008).

За основу электрофоретического разделения белков молока и их ферментативных гидролизатов принята методика, представленная в работе [8].

Исследование молекулярно-массового распределения пептидов осуществляли с использованием прибора Bruker Microflex (Bruker, США). Анализ проводили в диапазоне 1–66 кДа.

Построение графиков и математическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США) [9]. Достоверность различий между выборками экспериментальных данных определяли при помощи U-критерия Манна – Уитни при уровне значимости  $p < 0,05$  [10, 11].

## Результаты и их обсуждение

Получены экспериментальные данные о субстратных свойствах основных сывороточных белков при гидролизе различными протеазами: алкалазой, папаином и нейтрозой.

**Папаин** (КФ 3.4.22.2) – гидролитический фермент класса цистеиновых протеаз, выделенный из папайи (*Carica papaya*).

Установлено, что по окончании ферментативного процесса на промежуточные пептиды расщепляются около 60%  $\beta$ -лг и лишь 30%  $\alpha$ -ла, тогда как БСА сохраняется во всех образцах гидролизатов.

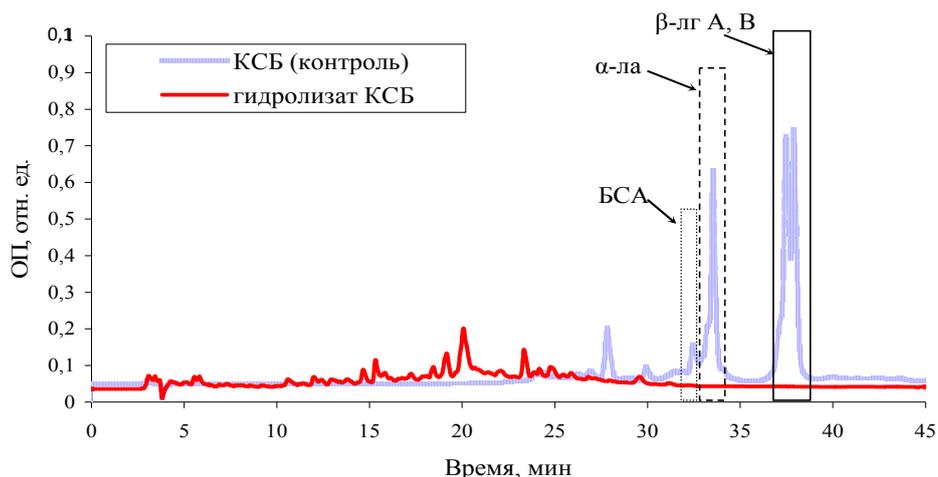
**Нейтраза** (КФ 3.4.24.28) – протеолитический фермент класса металлопротеаз, продуцентом которого является *Bacillus amyloliquefaciens*. Представлен способ получения гидролизата сывороточных белков, предполагающий применение нейтрозы. Согласно результатам электрофоретического анализа нативных сывороточных белков, по окончании 2 ч протеолиза на промежуточные продукты расщепляются около 80%  $\beta$ -лг, 30%  $\alpha$ -ла, тогда как БСА устойчив к гидролизу нейтрозой. В связи с этим эффективность протеолиза белков молочной сыворотки нейтрозой уменьшается в ряду  $\beta$ -лг  $\rightarrow$   $\alpha$ -ла  $\rightarrow$  БСА. Количество фракции с  $mr \leq 10$  кДа в полученном гидролизате составляет  $48,0 \pm 1,9$  %.

**Алкалаза** (сериновая эндопептидаза, КФ 3.4.21.62, или субтилизин), является протеолитическим ферментом, впервые полученным из *Bacillus subtilis*. Показано, что в течение 90 мин гидролизу подвергаются практически весь  $\beta$ -лг и  $\alpha$ -ла, а после 120 мин ферментативной реакции обнаруживаются лишь следовые количества преобладающих сывороточных белков и нативный БСА.

Степень протеолиза БСА достоверно не изменяется, что указывает на низкую эффективность гидролиза данного субстрата алкалазой. Анализ пептидного состава гидролизата КСБ алкалазой показал образование дискретной пептидной фракции с  $mr < 6,5$  кДа, количество которой существенно уменьшается с 90-й по 120-ю мин протеолиза. Кроме того, доля гидролизованной фракции с  $mr \leq 10$  кДа достигает  $93,0 \pm 0,6$  %.

Модификация гидролизата КСБ алкалазой с предварительным прогреванием образцов до 80°C в течение 10 мин при рН 8,0 позволило получить гидролизат с практически полным протеолизом  $\beta$ -лг,  $\alpha$ -ла и БСА на промежуточные пептиды (рисунок).

Изучение профиля пептидов, полученного высокоэффективной жидкостной хроматографией, позволило установить, что в нем не содержатся сывороточные белки (рисунок).



ВЭЖХ-профиль ферментативного гидролизата сывороточных белков молока:  
β-лг А, В – генетические варианты β-лг

**Заключение.** Разработана система ферментативного гидролиза КСБ с применением алкалазы и предварительного нагревания проб, что позволило получить гидролизат с практически полным расщеплением сывороточных белков БСА, α-лактоальбумина и β-лактоглобулина, являющихся высокоаллергенными про-

теинами. Проведенные исследования подтверждают значительное снижение антигенности полученного гидролизата, что в перспективе может быть использовано для разработки новых функциональных гипоаллергенных пищевых продуктов, в том числе и оздоровительной направленности.

#### Литература

1. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health / S. Mills [et al.] // *Int Dairy J.* 2011. No. 21. P. 377–401.
2. Shah H. Effects of milk-derived bioactives: an overview // *British Journal of Nutrition.* 2000. No. 84. P. 3–10.
3. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins // *Am. J. Clin. Nutr.* 2003. No. 77. P. 1537–1543.
4. Lopez-Exposito I., Recio I. Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2008. No. 606. P. 271–293.
5. The antigenic response of β-lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation / N. Kleber [et al.] // *Eur. Food Res. Technol.* 2004. No. 219. P. 105–110.
6. Paschke A., Besler M. Stability of bovine allergens during food processing // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002. No. 89. P. 16–20.
7. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion / K. Takagi [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* 2003. Vol. 26, No. 7. P. 969–973.
8. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование: практ. пособие. М.: Наука, 1981. 288 с.
9. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes / B. Gjesing [et al.] // *Allergy.* 1986. Vol. 41, No. 1. P. 51–56.
10. Mann H. B., Whitney D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // *Ann. Stat.* 1947. No. 18. P. 50–60.
11. Лакин Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. Гл. 5. С. 130–131.

#### References

1. Mills S., Ross R. P., Hill C., Fitzgerald G. F., Stanton C. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int Dairy J.*, 2011, no. 21, pp. 377–401.
2. Shah H. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 2000, no. 84, pp. 3–10.
3. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, no. 77, pp. 1537–1543.

4. Lopez-Exposito I., Recio I. Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, no. 606, pp. 271–293.
5. Kleber N., Krause I., Illgner S., Hinricks J. The antigenic response of  $\beta$ -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, no. 219, pp. 105–110.
6. Paschke A., Besler M. Stability of bovine allergens during food processing. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2002, no. 89, pp. 16–20.
7. Takagi K., Teshima R., Okunuki H., Sawada J. Comparative study of *in vitro* digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol. Pharm. Bull.*, 2003, vol. 26, no. 7, pp. 969–973.
8. Osterman L. A. *Metody issledovaniya belkov i nukleinovykh kislot. Elektroforez i ul'tracentrifugirovanie: prakt. posobie* [Methods to study proteins and nucleic acids. Electrophoresis and ultracentrifugation: a practical guide]. Moscow, Nauka Publ., 1981. 288 p.
9. Gjesing B., Osterballe O., Schwartz B., Wahn U., Lowenstein H. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes. *Allergy*, 1986, vol. 41, no. 1, pp. 51–56.
10. Mann H. B., Whitney D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Stat.*, 1947, no. 18, pp. 50–60.
11. Lakin G. F. *Biometrija: ucheb. posobie* [Biometrics: tutorial]. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1990, pp. 130–131.

### Информация об авторах

**Цыганков Василий Георгиевич** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры туризма и природопользования. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: vgz@tut.by

**Головач Татьяна Николаевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ прикладных проблем биологии. Белорусский государственный университет (220050, г. Минск, ул. Ленинградская, 14, Республика Беларусь). E-mail: halavachtn@gmail.com

**Курченко Владимир Петрович** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ прикладных проблем биологии. Белорусский государственный университет (220050, г. Минск, ул. Ленинградская, 14, Республика Беларусь). E-mail: kurchenko@tut.by

**Бондарук Алла Михайловна** – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией комплексных проблем гигиены пищевых продуктов. Научно-практический центр гигиены (220012, г. Минск, ул. Академическая, 8, Республика Беларусь). E-mail: bam-1962@tut.by

### Information about the authors

**Tsyhankou Vasily Georgiyevich** – Ph. D. Medicine, assistant professor, Department of Tourism and Natural Management. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vgz@tut.by

**Halavach Tat'yana Nikolaevna** – Ph. D. Biology, senior research fellow, Research Laboratories of Applied Problems of Biology. Belarusian State University (14, Leningradskaya str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: halavachtn@gmail.com

**Kurchenko Vladimir Petrovich** – Ph. D. Biology leader research fellow, Research Laboratories of Applied Problems of Biology. Belarusian State University (14, Leningradskaya str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kurchenko@tut.by

**Bondaruk Alla Mikhaylovna** – Ph. D. Medicine, head of the Laboratory of Complex Problems of Hygiene of Foodstuff. Scientific and Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bam-1962@tut.by

Поступила 17.02.2015