

УДК 551.48 : 591.146 : 612.017.3

Н.В. ПОНОМАРЕВА, Е.И. МЕЛЬНИКОВА, Е.В. БОГДАНОВА\*

\*ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, 394036

e-mail: ek-v-b@yandex.ru

## Биоконверсия молочных белков для снижения остаточной антигенности

В работе изучена возможность снижения остаточной антигенности  $\beta$ -лактоглобулина — основного белка молочной сыворотки — путем его гидролиза с применением различных систем пищеварительных протеаз. По результатам проведенных исследований подобрана смесь ферментных препаратов (Flavorpro F766 MDP (3%) + Pro-mod P439L (1,5%)), обеспечивающая наиболее эффективный гидролиз  $\beta$ -лактоглобулина в ультрафильтрационном концентрате подсырной сыворотки, тем самым снижая ее аллергенность, по данным, полученным *in silico*, более чем на 66%.

*Ключевые слова:* аллергенность  $\beta$ -лактоглобулина, остаточная антигенность, ферментативный гидролиз белков молочной сыворотки.

Высокоэффективные ресурсосберегающие технологии в молочной отрасли связаны прежде всего с переработкой вторичного сырьевого ресурса — молочной сыворотки, объемы которой ежегодно растут. Самый ценный ее компонент — сывороточные белки, содержащие все незаменимые аминокислоты, которые используются организмом для структурного обмена, обеспечивают синтез белков печени, образование гемоглобина и плазмы крови. Наиболее высокой биологической ценностью характеризуются  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактоальбумин, доля которых составляет 70—80 % от содержания сывороточных белков [1]. Их аминокислотный состав близок к составу белков мышечной ткани человека. По содержанию незаменимых аминокислот (лизина, триптофана, метионина, треонина) и аминокислот с разветвленной

цепью (валина, лейцина и изолейцина) они превосходят все белки животного и растительного происхождения [2].

Сдерживающим фактором в применении сывороточных белков в пищевых технологиях является их аллергенность. По данным Международного союза иммунологического общества, к известным пищевым аллергенам в молочных продуктах относятся казеины, иммуноглобулины,  $\beta$ -лактоглобулины,  $\alpha$ -лактоальбумины и бычий сывороточный альбумин [3]. Согласно базам данных IUIS, BiPep, AllergenOnline и AllerMatch, наиболее аллергенная фракция сыворотки —  $\beta$ -лактоглобулин [4].

Основной функцией иммунной системы человека и животных является распознавание антигенов по принципу «свой — чужой». Это происхо-

Пономарева Неля Валерьевна, Мельникова Елена Ивановна, Богданова Екатерина Викторовна.

*Список сокращений:* а.о. — аминокислотный остаток; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; УФ — ультрафильтрационный.

\* Автор для переписки.

дит за счет активности растворимых и фиксированных на поверхности клеток молекул иммуноглобулинов и молекул Т-клеточных рецепторов. Иммуноглобулинам для взаимодействия с пищевыми антигенами не требуется дополнительный процессинг. Кроме того, иммуноглобулины связываются как с линейными, так и с конформационными антигенными детерминантами, что определяет отсутствие строгих ограничений по размеру В-клеточных эпитопов. При связывании с Т-клеточными рецепторами антиген подвергается процессингу, в результате которого на поверхности образуется комплекс гистосовместимости 2-го типа [5]. Это накладывает ограничения на размер Т-клеточных эпитопов (10—20 а.о.), а также определяет их исключительно линейный характер. Таким образом, потенциальными аллергенами могут быть пептиды размером не менее 5 а.о.

Существующие технологии уменьшения аллергенности молочных белков предусматривают их биоконверсию, которая позволяет добиться снижения количества или полного удаления антигенных детерминант из их структуры [6]. Известны исследования по применению различных пищевых протеаз для снижения аллергенности молочных продуктов [7,8]. Однако они были в основном посвящены гидролизу крупных фракций белков молока ферментами широкой специфичности. В настоящей работе объектом обработки служил УФ-концентрат подсырной сыворотки, а гидролиз осуществляли с использованием ферментных препаратов, специфичных к сывороточным белкам коровьего молока.

Целью данной работы были изучение возможности снижения остаточной антигенности β-лактоглобулина за счет его биоконверсии с применением различных систем пищеварительных протеаз (КФ 3.4.21).

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

При выборе ферментной системы для биоконверсии β-лактоглобулина в качестве модельного сырья использовали ультрафильтрационный (УФ) концентрат белков подсырной сыворотки с массовой долей белка 3,0 %. рН УФ-концентрата (100 см<sup>3</sup>) нормализовали до 6,75 М гидроксидом натрия. Гидролиз осуществляли в течение 6 ч в вибрационном инкубаторе при 50° и частоте вращения 175 об/мин. Характеристика исследованных ферментных препаратов приведена в табл. 1.

Выбор ферментных препаратов обусловлен высоким содержанием в них экзопротеаз, использующих в качестве субстрата β-лактоглобулин молочной сыворотки. Их концентрацию по отношению к содержанию белка в субстрате подбирали с учетом диапазона, рекомендованного производителем [9].

Полученные гидролизаты проанализированы на содержание в смеси β-лактоглобулина в различные периоды инкубации (через 2, 4 и 6 ч) методом эксклюзионной хроматографии в системе ВЭЖХ. Перед экспериментом образцы разводили до концентрации сухих веществ 1 мг/см<sup>3</sup>. Хроматографию проводили с применением колонки TSKgel G2000SWXL (Tosoh Bioscience, Япония). Предварительно колонку калибровали по времени удерживания стандартных глобулярных водорастворимых белков известной молекулярной массы. В качестве элюента применяли 0,2 М раствор хлорида натрия, скорость элюции составляла 0,2 см<sup>3</sup>/мин. Общее время анализа для каждого образца было равно 35 мин.

Степень гидролиза β-лактоглобулина в модельных системах определяли как отношение суммарной площади пика β-лактоглобулина в гидролизате к суммарной площади пика β-лактоглобули-

Таблица 1

### Характеристика ферментных препаратов

Препарат (Vyocatalysts, Великобритания)	Происхождение	Температура каталитической активности, °С
Promod P523MDP	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	45—60
Flavorpro F750MDP	<i>Aspergillus</i> spp.	45—55
Promod P439L	<i>Bacillus licheniformis</i>	45—60
Flavorpro F766MDP	Смешанная культура	45—55

на в контрольном образце УФ-концентрата подсырной сыворотки.

Для проведения биоинформационных *in silico* исследований остаточной антигенности продуктов гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина во всех образцах создана имитационная модель, реализованная на платформе Java 9. Анализ базировался на сопоставлении последовательностей пептидов, образующихся при взаимодействии аллергенов с различными протеазами, и данных их эпитопного картирования, полученных методом непрямого конкурентного иммуферментативного анализа [10]. Если протяженность совпадения последовательностей пептида и эпитопа составляла менее 5 а.о., данный пептид относился к потенциально неаллергенным, поскольку короткие олигопептиды (2—4 а.о.) теряют способность специфически связываться с иммуноглобулинами и Т-клеточными рецепторами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Максимальная степень гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина достигалась при использовании смеси ферментных препаратов, состоящей из F766MDP (3%) и P439L (1,5%) (см. табл. 1), в течение 6 ч (рН = 6,7; 50°) (рис. 1). После указанного времени процесс гидролиза замедляется и в гидролизате накапливаются мезофильно аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы, снижающие срок годности продукта. Поэтому мы ограничились проведением гидролиза в течение 6 ч.

В процессе ферментативного гидролиза происходит высвобождение пептидов и свободных аминокислот (рис. 2), которые изменяют вкусовые характеристики получаемого продукта. Основная технологическая проблема в этом случае — возникновение у белковых гидролизатов горького привкуса или послевкуса. При разработке условий биоконверсии  $\beta$ -лактоглобулина одним из параметров оптимизации является содержание свободных аминокислот, которое необходимо минимизировать. Помимо отрицательного влияния на органолептические свойства высокое содержание аминокислот приводит к увеличению осмотичности гидролизатов и снижению их биологической ценности, поскольку скорость всасывания свободных аминокислот в тонком кишечнике человека существенно ниже по сравнению с олигопептидами [11].

Наименьшее количество оставшихся нерасщепленными эпитопов  $\beta$ -лактоглобулина, по данным анализа *in silico*, наблюдается при использовании ферментного препарата F750MDP (табл. 2), однако полученный гидролизат имеет очень высокое содержание свободных аминокислот. Следова-

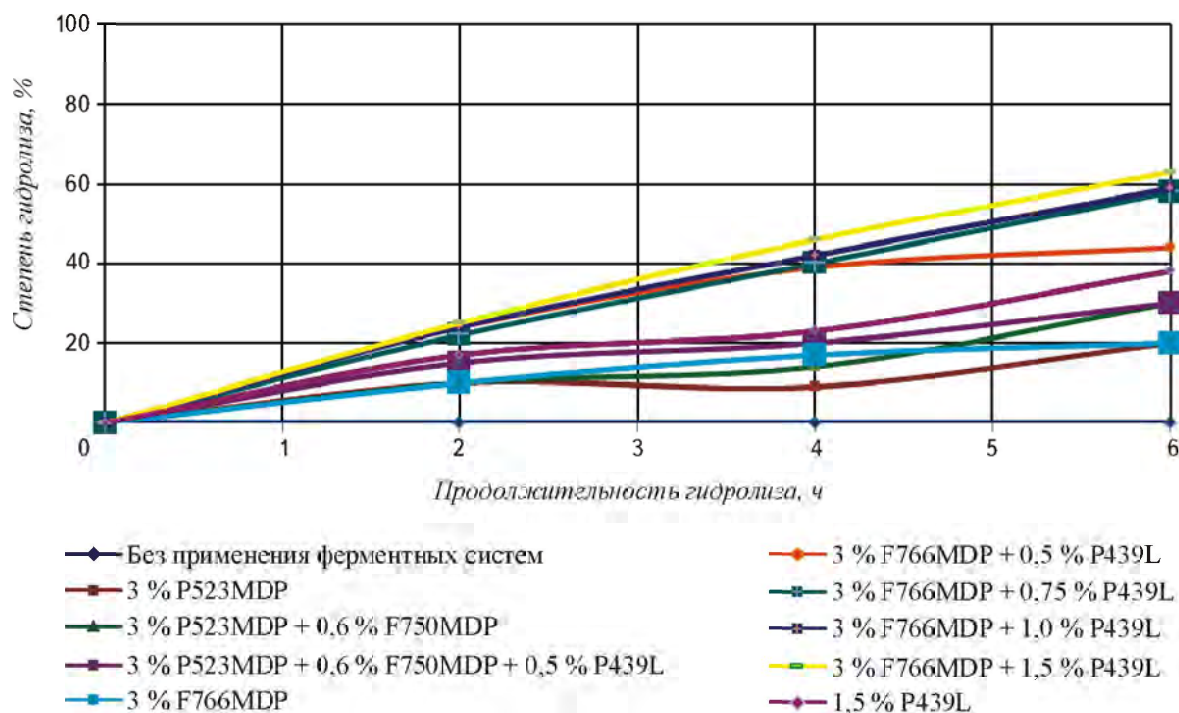
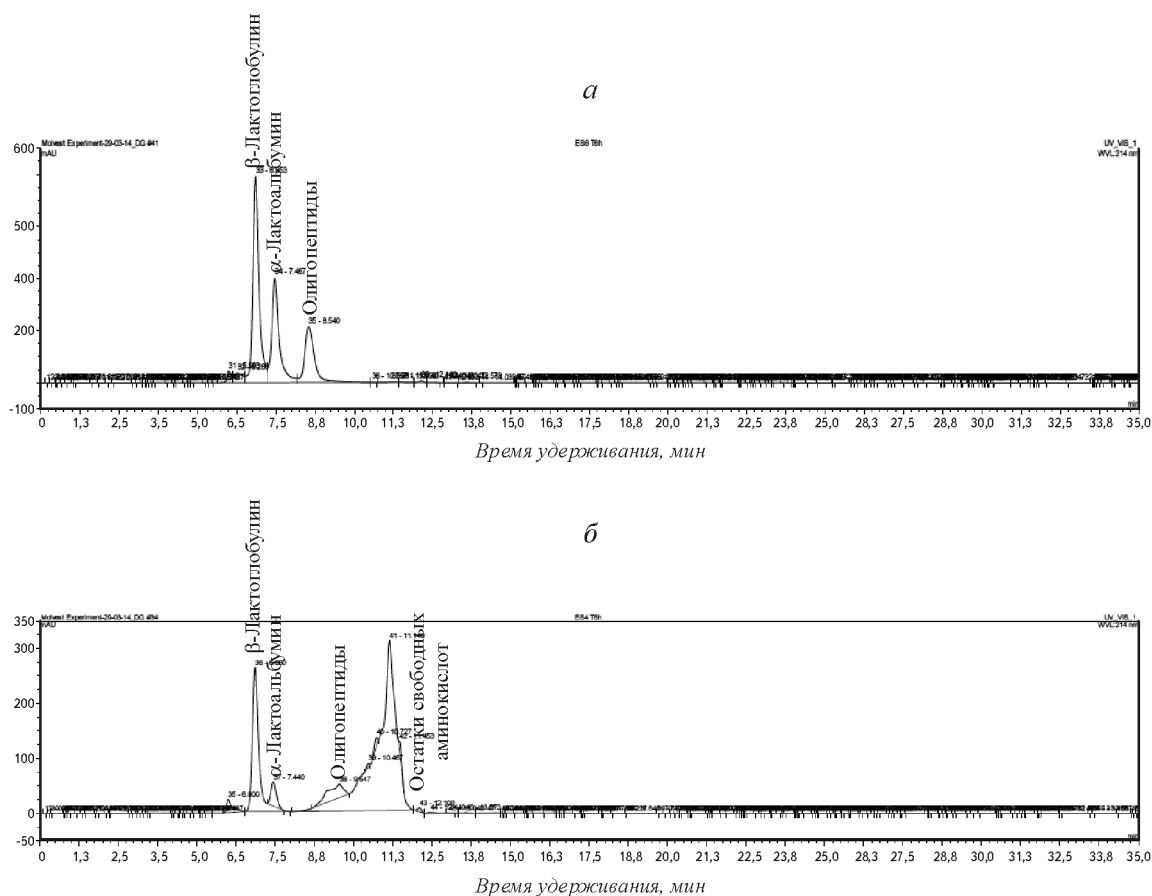


Рис. 1. Динамика гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина с применением различных протеазных систем (продолжительность 6 ч; рН = 6,7; t = 50°)



**Рис. 2.** Эксклюзионная ВЭЖХ исследованных образцов: *а* — без применения ферментных систем; *б* — с использованием смеси 3 % F766MDP и 1,5 % P439L (продолжительность 6 ч; pH = 6,7; t = 50 °)

тельно, более перспективно применение ферментных препаратов F766MDP и P439L.

После инактивации ферментных препаратов при температуре 85° в течение 5 мин минимальное количество белкового осадка образовывалось при применении протеаз F766MDP и P439L, (данные не приведены), что являлось дополни-

тельным свидетельством более полного гидролиза, осуществляемого этими ферментами.

Выполненные эксперименты позволяют заключить, что смесь ферментных препаратов, содержащая 3 % F766MDP и 1,5 % P439L, является протеазной системой, осуществляющей наиболее активный гидролиз  $\beta$ -лактоглобулина и тем самым

Таблица 2

**Анализ *in silico* остаточной антигенности продуктов гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина различными протеазами**

Vos taurus (аллерген коровьего молока)	Исходный УФ-концентрат	Количество оставшихся эпитопов/число образовавшихся свободных аминокислотных остатков			
		Фракции, обработанные ферментным препаратом			
		P523L	F766MDP	P439L	F750MDP
$\beta$ -Лактоглобулин	25/11	13/30	11/17	11/17	1/36

обеспечивающей снижение его аллергенности, что обуславливает его последующее применение в технологии функциональных молочных продуктов. Предлагаемый метод гидролиза позволит получать продукт для использования в производстве кисломолочных напитков, в которых горький привкус гидролизата нивелируется в смеси с другими компонентами.

Использованная модель для решения задач исследования была оценена по целевым свойствам: адекватности (критерий Фишера), устойчивости (критерий Уилкоксона) и чувствительности (калибровка по результатам непрямого конкурентного иммуноферментного анализа). Статистическая значимость (достоверность) полученных результатов составила  $\pm 8\%$ .

Работа осуществлялась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы», государственный контракт № 14.512.11.0037.

Получено 25.12.14

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Просеков А.Ю.* Получение ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с использованием протеолитических ферментов / А.Ю. Просеков, Е.В. Ульрих, С.Ю. Носкова, В.Г. Будрик, С.Г. Ботина, Е.Ю. Агаркова, Е.И. Мельникова // *Фундаментальные исслед.* — 2013. — №. — Ч. 5. — С. 1089.
2. *Максимюк Н.Н.* О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов / Н.Н. Максимюк, Ю.В. Марьяновская // *Фундаментальные исслед.* — 2009. — № 1. — С. 34—35.
3. *Головач Т.Н.* Антигенные свойства нативных и термообработанных сывороточных белков и их ферментативных частичных гидролизатов / Т.Н. Головач, В.П. Курченко, Л.И. Сурвило // *Труды БГУ.* — 2011. — Т. 6. — Ч. 5 — С. 91.
4. *Головач Т.Н.* Физико-химическая и иммунохимическая характеристика частичного гидролизата сывороточных белков / Т.Н. Головач, Е.М. Червяковский, В.П. Курченко // *Пищевая промышленность: наука и технологии.* — 2011. — № 1. — С. 28.
5. *Хаитов Р.М., Ильина Н.И.* Аллергология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 228 с.
6. *Курченко В.П.* Снижение аллергенных свойств белков молока. Технологические подходы / В.П. Курченко, В.И. Круглик, Т.Н. Головач, В.Д. Харитонов, Е.Ю. Агаркова // *Молочная промышленность.* — 2012. — № 4. — С. 73.
7. *Данилов И.М.* Получение низкомолекулярных пептидов молока и исследование их иммуностимулирующей активности // *Научный журнал КубГАУ.* — 2011. — № 70(06). — С. 1—9.
8. *Круглик В.И.* Теоретическое обоснование и практическая реализация технологий гидролизатов молочных белков и специализированных продуктов с их использованием. Автореф. дисс. ... докт. техн. наук. — Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой пром-ти РАСХН, 2008. — 24 с.
9. Спецификации на ферментные препараты Promod и Flavorpro [Электронный ресурс] / <http://www.biocatalysts.com/products/sector-product-choice>
10. *Зверева Е.А.* Разработка методики определения бета-лактоглобулина в молоке и молочных продуктах с применением метода иммуноферментативного анализа / Е.А. Зверева, Н.И. Смирнова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев, Е.А. Юрова, Е.Ю. Денисович, Н.А. Жижин, В.Д. Харитонов, Е.Ю. Агаркова, С.Г. Ботина, Н.В. Пономарева, Е.И. Мельникова // *Современные проблемы науки и образования.* — 2013. — № 5. — С. 1069—1079.
11. *Токаев Э.С.* Современный опыт и перспективы использования препаратов сывороточных белков в производстве функциональных напитков / Э.С. Токаев, Е.Н. Баженова, Р.Ю. Мироедов // *Молочная промышленность.* — 2007. — № 10. — С. 55—56.

N.V. PONOMAREVA, E.I. MEL'NIKOVA,  
and E.V. BOGDANOVA\*

The Voronezh State University for Engineering Technologies,  
394036, Voronezh Russia

e-mail: ek-v-b@yandex.ru

## Bioconversion of Milk Proteins in order to Reduce Residual Antigenicity

The possibility of reducing the residual antigenicity of whey  $\beta$ -lactoglobulin, the main milk protein, using various mixtures of food proteases has been studied. A mixture of enzyme preparations that provides to most effective hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin in whey ultrafiltration concentrate was selected (Flavorpro F766 MDP (3%) + Promod P439L (1,5%)). This system, as was shown by the *in silico* analysis, was also the most efficient in the decrease (by more than 66%) in the  $\beta$ -lactoglobulin allergenicity.

*Key words:* enzymatic hydrolysis of whey proteins,  $\beta$ -lactoglobulin allergenicity, residual antigenicity.

\* Author for correspondence.