

УДК 613.287.5:[637.14.04/07:57.083.32](083.7)

*Т. Н. ГОЛОВАЧ<sup>1</sup>, Т. Н. ОСИПОВА<sup>2</sup>, В. П. КУРЧЕНКО<sup>1</sup>, В. Г. ЦЫГАНКОВ<sup>2</sup>,  
А. М. БОНДАРУК<sup>2</sup>, С. В. ФЕДОРОВИЧ<sup>2</sup>*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ,  
ПАРАМЕТРОВ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ,  
АНТИГЕННОЙ И СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ  
ГИДРОЛИЗАТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, e-mail: halavachtn@gmail.com*

<sup>2</sup>*Научно-практический центр гигиены, Минск, Беларусь, e-mail: osits@tut.by*

Определен пептидный состав полученного ферментативного гидролизата сывороточных белков молока, оценены параметры его острой токсичности, антигенная и сенсibiliзирующая активность. Изученный образец по физико-химическим, иммунохимическим и органолептическим свойствам соответствует категории частичных гидролизатов для продуктов функционального назначения. Гидролизированный белковый компонент обладает слабой сенсibiliзирующей способностью.

*Ключевые слова:* белки-аллергены молока, гидролизаты белков, пептидный состав, остаточная антигенность, острая токсичность, сенсibiliзирующая активность.

*T. M. HALAVACH<sup>1</sup>, T. N. OSIPOVA<sup>2</sup>, V. P. KURCHENKO<sup>1</sup>, V. G. TSYHANKOU<sup>2</sup>,  
A. M. BONDARUK<sup>2</sup>, S. V. FEDOROVICH<sup>2</sup>*

**DETERMINATION OF MOLECULAR MASS DISTRIBUTION, PARAMETERS OF ACUTE TOXICITY,  
ANTIGENIC AND SENSITIZING ACTIVITY OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATE**

<sup>1</sup>*Belarusian State University, Minsk, Belarus, e-mail: halavachtn@gmail.com*

<sup>2</sup>*Scientific Practical Centre of Hygiene, Minsk, Belarus, e-mail: osits@tut.by*

The peptide composition of obtained enzymatic hydrolysate of whey proteins was determined. Also the parameters of its acute toxicity, antigenic and sensitizing activity were researched. The examined sample according to physicochemical, immunochemical and organoleptic properties corresponds to characteristics of partial hydrolysates for functional food products. Hydrolysed protein component possesses a weak sensitizing capacity.

*Keywords:* allergenic proteins of milk, hydrolysates of proteins, peptide profile, residual antigenicity, acute toxicity, sensitizing capacity.

**Введение.** Молоко и пищевые продукты на его основе – богатый источник витаминов и биологически активных компонентов. Считается, что молоко – «единственная» пища, обеспечивающая потребности в питании новорожденного млекопитающего, его безопасное развитие и рост на первых этапах жизни [1]. Белковый компонент молока представлен казеиновой и сывороточной фракциями. Казеины ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -форма) – преобладающие фосфопротеины молока жвачных животных (80 % от общего белка). Белки молочной сыворотки (20 %) представлены  $\beta$ -лактоглобулином,  $\alpha$ -лактальбумином, иммуноглобулинами, бычьим сывороточным альбумином, лактоферрином, лактопероксидазой и другими минорными составляющими. Нативные белки молока проявляют иммуномодулирующую, антибактериальную, противовирусную и антифунгальную активность [2]. При ферментативном гидролизе белков образуются пептиды различной длины и аминокислоты с низким аллергенным потенциалом, обусловленным расщеплением в белковых макромолекулах областей антигенных детерминант [3].

Казеины и белки сыворотки выступают в качестве предшественников биологически активных пептидов, которые образуются в организме в процессе пищеварения или в результате фер-

ментативного расщепления при технологической обработке пищевых продуктов [3]. В нутрициологии биологически активные пептиды представляют особый интерес, так как они обладают опиоидоподобным, иммуномодулирующим, гипотензивным, противомикробным, противовирусным, антиоксидантным и противоопухолевым действием [2, 4]. Основными контролируемыми характеристиками ферментативных гидролизатов являются молекулярно-массовое распределение пептидной фракции, степень гидролиза субстратов и остаточная антигенность (АГ) – количество нерасщепленного белка, сохраняющего способность взаимодействовать с антителами [5]. Согласно степени гидролиза белков молока, выделяют частичные и глубокие гидролизаты [6, 7]. Частичные гидролизаты, применяемые в смесях профилактического назначения, содержат пептиды различной длины и минимальное количество свободных аминокислот. Глубокие гидролизаты, являющиеся компонентом продуктов лечебного питания, представлены короткоцепочечными пептидами и аминокислотами. При тяжелых случаях пищевой аллергии применяют исключительно аминокислоты, не обладающие антигенными свойствами. Существенным недостатком глубоких гидролизатов и смесей аминокислот является их выраженный горький вкус. Частичные гидролизаты с приемлемыми органолептическими показателями используют в производстве пищевых продуктов детского, лечебного, геродиетического и спортивного питания. В связи с все более широким применением гидролизатов, в том числе и полученного нами образца ферментативного гидролизата сывороточных белков молока, актуальным является исследование параметров их острой токсичности и сенсibiliзирующей активности.

Цель работы – установить качественный и количественный состав пептидов полученного гидролизата сывороточных белков молока, определить параметры его острой токсичности, антигенную и сенсibiliзирующую активность.

**Материалы и методы исследования.** Для ферментативного гидролиза применяли концентрат сывороточных белков (КСБ) с содержанием белка 80 %, полученный методом ультрафильтрации (ТУ ВУ 100377914.550–2008), а также сериновую протеазу (алкалаза, КФ 3.4.21.62, протеаза из *Bacillus licheniformis*, активность 2,64 Е/г; Sigma, США). Для изготовления опытного образца гидролизата получали 8 %-ный раствор КСБ, проводили тепловую обработку белкового субстрата и охлаждали до температуры, оптимальной для гидролиза. В термообработанный раствор КСБ вносили ферментный препарат, гидролиз осуществляли в термостатируемых условиях. По окончании протеолиза фермент инактивировали путем нагревания, полученный жидкий гидролизат отправляли на сушку (методика приведена в работе [8]).

Электрофоретическое разделение белков молока и их ферментативных гидролизатов осуществляли согласно методике, представленной в [9]. ВЭЖХ-анализ продуктов гидролиза проводили на хроматографе Agilent 1100 (Agilent, США) с применением колонки Zorbax 300SB-C8 (4,6×250 мм, 5 мкм; Agilent, США) в соответствии с методикой, описанной в работе [10]. Прибор Bruker Microflex (Bruker, США) использовали для установления молекулярных масс пептидов, а также с целью контроля наличия в образцах гидролизата нерасщепленных сывороточных белков. Уровень остаточной АГ сывороточных белков и их гидролизатов определяли методом конкурентного иммуноферментного анализа согласно методике, приведенной в работе [11], содержание  $\alpha$ -аминного азота (АН) в образцах гидролизата – методом формолового титрования по ГОСТ 13805–76 (п. 3.9), концентрацию общего белка (ТН) – методом Кьельдаля по ГОСТ 30648.2–99. Степень гидролиза рассчитывали как соотношение АН/ТН.

Цель экспериментов на животных заключалась в токсиколого-гигиенической оценке КСБ и ферментативного гидролизата сывороточных белков (ФГСБ). Степень их токсичности определяли в опытах на белых крысах и мышах. Оценено раздражающее действие КСБ и ФГСБ на слизистые оболочки глаз кроликов. Проведено исследование сенсibiliзирующей способности образцов на экспериментальной модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа на белых мышах. Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями ГНПА, а также с применением новых подходов и адаптацией существующих [12–14].

Токсиколого-гигиеническое изучение представленных образцов проведено на лабораторных животных: белых мышах, нелинейных самках и самцах белых крыс (исходная масса 180–220 г) и кроликах-альбиносах (2500–3000 г), полученных из вивария РУП «НПЦ гигиены». Схема, объем

и методы исследований представлены в табл. 1. Условия содержания соответствовали требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» № 1045–73. Рацион животных составлен согласно нормам, утвержденным приказом МЗ СССР от 10 сентября 1983 г. № 11–79.

Экспериментальные группы формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя (разность в массе тела составляла  $\leq 10\%$ ). В ходе проведения экспериментов ежедневно наблюдали за общим состоянием животных, потреблением ими корма и воды. Токсиколого-гигиенические исследования проводили согласно требованиям Инструкции 1.1.11–12–35–2004 [12].

Т а б л и ц а 1. Схема и объем токсиколого-гигиенических исследований

Название эксперимента и схема его проведения	Вид животных	Методы исследований (время наблюдения)
Установление параметров токсичности и опасности препаратов при их однократном внутривенном введении подопытным животным	Крысы ( $n = 18$ )	Учет клинических проявлений интоксикации и выживаемости подопытных животных (14 сут)
Изучение параметров токсичности препаратов при их однократном введении в брюшную полость животного	Мыши ( $n = 24$ )	Учет клинических проявлений интоксикации и выживаемости подопытных животных (14 сут)
Оценка местнораздражающих свойств при однократном 4-х часовом воздействии препаратов в дозе 20 мг/см <sup>2</sup> (площадь нанесения – 16 см <sup>2</sup> ) на кожу спины животного	Крысы ( $n = 12$ )	Наблюдение за клиническими проявлениями интоксикации и состоянием кожных покровов (4 ч, 24 ч, 10 сут). Оценка функционального состояния кожи по выраженности эритемы и величине отека
Изучение влияния препаратов на слизистые оболочки и орган зрения; однократное внесение 20 % препаратов в нижний конъюнктивальный свод «опытного» глаза животного	Кролики ( $n = 6$ )	Визуальное наблюдение за состоянием слизистой и конъюнктивы глаз (14 сут)

Построение графиков и математическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента и *X*-критерия Ван-ден-Вардена.

**Результаты и их обсуждение.** Проведен анализ физико-химических, иммунохимических и органолептических показателей полученного частичного гидролизата (табл. 2). По результатам ДСН-электрофореза в образце установлен практически полный протеолиз  $\beta$ -лактоглобулина,  $\alpha$ -лактальбумина и БСА с образованием пептидной фракции. Согласно данным ВЭЖХ-профилей, подтверждено отсутствие в образце нативных сывороточных белков. Степень гидролиза белкового компонента (AN/TN) в гидролизате составляет 15,5 %; количество фракции с  $m_r \leq 10$  кДа достигает 98 %, а остаточная АГ снижена до  $1,22 \cdot 10^{-3}$  отн. ед. (табл. 2). В соответствии с литературными источниками остаточная АГ частичных гидролизатов, используемых в смесях профилактического назначения, составляет  $\geq 10^{-3}$  отн. ед., тогда как глубоких гидролизатов, являющихся компонентом продуктов лечебного питания, –  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  отн. ед., что в  $10^4$ – $10^6$  раз меньше, чем у нативных белков [15]. Изучение масс-спектров также подтвердило отсутствие высокомолекулярной фракции в полученном гидролизате, среди продуктов протеолиза преобладали пептиды с  $m_r < 5$  кДа.

Комплексный анализ иммунохимических, физико-химических и органолептических свойств показал соответствие опытного образца гидролизата требованиям, предъявляемым к категории частичных гидролизатов сывороточных белков молока, используемых в качестве компонента продуктов функционального питания.

На следующем этапе исследований определены параметры острой токсичности, антигенной и сенсибилизирующей активности разработанного гидролизата.

Оценка параметров острой токсичности (среднесмертельной дозы, ЛД<sub>50</sub>) КСБ и ФГСБ проведена на белых крысах. Каждая группа животных включала по 6 особей. Для оценки острой внутривенной токсичности белым крысам в желудок натошак с помощью иглы-зонда вводили

образцы препаратов в виде 20 %-ных (по белку) водных растворов в максимально возможном объеме (3,0 мл на 200 г массы тела). Животным контрольных групп вводили воду в эквивалентных количествах. Наблюдение за подопытными животными осуществляли в течение 14 сут после начала эксперимента. Введение высоких доз препаратов не вызывало у животных атаксии, адинамии, клинито-тонических судорог, паралича. После введения максимальной дозы препаратов животные не погибали. Установлено, что по параметрам острой внутрижелудочной токсичности КСБ и ФГСБ относятся к малоопасным химическим соединениям (4-й класс опасности согласно ГОСТ 12.1.007–76).

Т а б л и ц а 2. **Органолептические, физико-химические и антигенные свойства ферментативного гидролизата сывороточных белков (ФГСБ)**

Показатель ФГСБ	Значение показателя
Внешний вид и консистенция	Желто-кремовый порошок
Вкус и запах	Свойственный молоку запах, слабо горький молочный вкус
Растворимость	Растворим в воде
Активная кислотность, ед. рН (1 %-ный раствор)	6,7
Массовая доля общего белка, %	80,0
Степень гидролиза, %	15,5
Пептидный профиль: фрагменты с молекулярной массой >10 кДа, %	2*
фрагменты с молекулярной массой ≤10 кДа, %	98*
Нативные сывороточные белки	Не обнаружены**
Остаточная антигенность, отн. ед.	$1,22 \cdot 10^{-3}$

\*Данные по результатам фракционирования гидролизата с применением фильтров Amicon Ultra-4 10K (Millipore, США) с пропускающей способностью 10 кДа.

\*\*Данные по результатам ДСН-электрофореза, ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Изучено раздражающее действие КСБ и ФГСБ на слизистые оболочки глаз подопытных животных. Инстилляцией двух капель 20 %-ных (по белку) растворов КСБ и его гидролизата в нижний конъюнктивальный свод правого «опытного» глаза кроликов (в левый глаз животных, который служил контролем, закапывали в аналогичном объеме дистиллированную воду) сопровождалось усиленным морганием и слезотечением в течение 10–15 мин, а также слабым раздражением слизистой. Через час после инстилляцией раздражение у всех животных полностью исчезало. Следовательно, однократное воздействие изучаемых препаратов в виде 20 %-ных растворов на слизистые оболочки глаз практически не вызывает раздражающего эффекта.

Исследованы параметры острой токсичности КСБ и ФГСБ при однократном их поступлении в брюшную полость белых мышей обоего пола. Для проведения эксперимента были сформированы три группы животных, по 8 особей в каждой. Мышам опытных групп вводили препарат в максимально возможных дозах ЛД<sub>50</sub> (для ФГСБ она составляла  $3784 \pm 17,0$  мг белка/кг, для КСБ –  $3265 \pm 34,3$  мг белка/кг), животным контрольной группы – физиологический раствор. Проявления интоксикации исчезали к исходу первых суток опыта; общее состояние животных, поведение, потребление корма и внешний вид в последующий период 2-недельного наблюдения не отличались от аналогичных показателей у животных контрольной группы. Таким образом, среднесмертельные дозы позволяют классифицировать изученные препараты как относительно безвредные (> 3000 мг/кг при внутрибрюшинном введении).

Изучено раздражающее действие при однократном воздействии КСБ и ФГСБ на неповрежденные кожные покровы подопытных животных. При однократных аппликациях 20 %-ных (по белку) растворов препаратов на выстриженные участки кожи спины белых крыс (по 6 особей в группе) в дозе  $20 \text{ мг/см}^2$  не выявлено видимых признаков интоксикации животных в течение 4 ч и их гибели на протяжении 10 сут. Раздражения и воспаления кожных покровов на местах аппликации не обнаружено.

Проведено сравнительное исследование сенсibilизирующей способности КСБ и ФГСБ (согласно [12, 13]) на экспериментальной модели воспроизведения гиперчувствительности замед-

ленного типа (ГЗТ) на белых мышах. Осуществляли однократное внутрикожное введение микрошприцом в основание хвоста белых мышей препарата КСБ (1-я опытная группа) и препарата ФГСБ (2-я опытная группа) в дозе по 300 мкг (в расчете на белок) в смеси 1:1 с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) в объеме по 0,06 см<sup>3</sup> на животное. Животным контрольной группы аналогично вводили смесь физиологического раствора и ПАФ. Выявление сенсibilизации по ГЗТ осуществляли на 6-е сутки опыта постановкой провокационной пробы – внутрикожного теста опухания лапы (ВТОЛ). Опыт заключался во введении в подушечку (под апоневроз) задней коллатеральной лапы животных опытных и контрольной групп препаратов в дозе по 400 мкг (при объеме 0,04 см<sup>3</sup>). Учет ВТОЛ проводили по разнице результатов измерения толщины тестированной лапы животных обеих опытных и контрольной групп микрометром до и через 24 ч после введения на месте провокационной пробы с точностью измерения до 0,01 мм. Абсолютный показатель ВТОЛ у каждого животного выражали в 10<sup>-2</sup> мм. Для оценки степени выраженности сенсibilизации использовали интегральный показатель ВТОЛ в баллах [14].

Для препарата КСБ показана сильная сенсibilизирующая способность (1-й класс аллергенной активности), так как он вызвал индукцию ГЗТ у более 75 % подопытных животных с достоверными различиями относительных показателей ВТОЛ в опыте и контроле по *X*-критерию ( $p < 0,01$ ) (табл. 3). Слабо выраженная индукция ГЗТ ( $\leq 1$  балла) установлена у 5 из 12 животных, сенсibilизированных ФГСБ. Величина интегрального показателя провокационной пробы превышала результаты контроля в 5,2 раза, но разница между ними имела статистическую тенденцию к возрастанию только по *t*-критерию ( $p < 0,1$ ), на основании чего образец гидролизата отнесен к препаратам со слабой сенсibilизирующей способностью (4-й класс).

Т а б л и ц а 3. Показатели ГЗТ у белых мышей при введении препаратов КСБ и ФГСБ

Показатель	Ед. изм.	Контрольная группа (n = 12)	Опытная группа (n = 12)
ВТОЛ после внутрикожного тестирования КСБ (1-я опытная группа): абсолютные величины относительные величины	10 <sup>-2</sup> мм	6,33 ± 1,41	18,8 ± 1,96*
	<i>t</i> -критерий	–	5,15
	H	1/12	12/12
	Балл	0,08 ± 0,08	1,58 ± 0,19*+
	<i>t</i> -критерий <i>X</i> -критерий	– –	7,14 8,43
ВТОЛ после внутрикожного тестирования ФГСБ (2-я опытная группа): абсолютные величины относительные величины	10 <sup>-2</sup> мм	5,75 ± 1,39	7,67 ± 1,60
	<i>t</i> -критерий	–	0,91
	H	1/12	5/12
	Балл	0,08 ± 0,08	0,42 ± 0,15 <sup>0</sup>
	<i>t</i> -критерий <i>X</i> -критерий	– –	1,96 3,06

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий по сравнению с контролем по *t*-критерию (\* –  $p < 0,001$ ; <sup>0</sup> –  $p < 0,1$ ) и *X*-критерию (+ –  $p < 0,05$ ). Данные о количестве особей с положительными результатами и общем количестве животных в опыте приведены через косую черту.

**Заключение.** Опытный образец частичного гидролизата сывороточных белков молока обладает низкой антигенностью, так как не содержит высокомолекулярную белковую фракцию, и приемлемыми органолептическими свойствами.

Установлено, что исследованный белковый компонент соответствует категории частичных гидролизатов для продуктов функционального назначения.

Предложенный нами способ ферментативного расщепления сывороточных белков молока обеспечивает изготовление гидролизата со слабой сенсibilизирующей способностью, что обуславливает снижение его аллергенной активности по сравнению с таковой у нативных белков практически в 4 раза. Полученный частичный гидролизат сывороточных белков коровьего молока может быть использован в качестве физиологически активного компонента при разработке новых специализированных пищевых продуктов, в том числе функционального назначения.

## Список использованной литературы

1. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health / S. Mills [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2011. – Vol. 21. – P. 377–401.
2. *Shah, H.* Effects of milk-derived bioactives: an overview / H. Shah // *Br. J. Nutr.* – 2000. – Vol. 84. – P. 3–10.
3. *Wal, J. M.* Bovine milk allergenicity / J. M. Wal // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2004. – Vol. 93. – P. 2–11.
4. *Lönnerdal, B.* Nutritional and physiologic significance of human milk proteins / B. Lönnerdal // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003. – Bd. 77. – S. 1537–1543.
5. *Heyman, M.* Evaluation of the impact of food technology on the allergenicity of cow's milk proteins / M. Heyman // *Proc. Nutr. Soc.* – 1999. – Vol. 58, N 3. – P. 587–592.
6. *Mahmoud, M. I.* Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products / M. I. Mahmoud // *Food Technol.* – 1994. – Vol. 48. – P. 89–95.
7. *El-Agamy, E. I.* The challenge of cow milk protein allergy / E. I. El-Agamy // *Small Rumin. Res.* – 2007. – Vol. 68. – P. 64–72.
8. Технология комплексной переработки молочной сыворотки / В. П. Курченко [и др.] // *Молочная индустрия.* – 2013. – № 2. – С. 38–41.
9. *Остерман, Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практ. пособие) / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – С. 37–119.
10. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions / S. B. Kim [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2007. – Vol. 90. – P. 4033–4042.
11. Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity / S. B. Kim [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2007. – Vol. 90. – P. 4043–4050.
12. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ: инструкция № 1.1.11–12–35–2004 / Л. В. Половинкин [и др.]. – Минск: ГУ РЦГЭ-иОЗ МЗ РБ, 2004. – 43 с.
13. Требования к постановке токсиколого-аллергологических исследований при гигиеническом нормировании белоксодержащих аэрозолей в воздухе рабочей зоны: метод. указания № 11–11–10–2002 / В. В. Шевляков [и др.] // Сб. офиц. документов по медицине труда и производств. санитарии. – Минск: М-во здравоохран. Респ. Беларусь, 2004. – Ч. XIV. – С. 4–49.
14. Классификация и перечень алергоопасных для человека промышленных веществ, основные меры профилактики: руководство Р 11–11–11 РБ 02 // Сб. офиц. документов по медицине труда и производств. санитарии. – Минск: РЦГЭ и ОЗ, 2003. – Ч. XI. – С. 94–126.
15. Special formulas in infant nutrition: a review / J. Maldonado [et al.] // *Early Hum. Dev.* – 1998. – Vol. 53, N 1. – P. 23–32.

*Поступила в редакцию 22.05.2015*