

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ БЕЛКОВ КОРОВЬЕГО И КОЗЬЕГО МОЛОКА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИХ УСВОЯЕМОСТИ И СНИЖЕНИЯ АЛЛЕРГЕННЫХ СВОЙСТВ

С.В. Симоненко, Т.Н. Головач¹, Н.В. Гавриленко², Е.М. Червяковский², В.П. Курченко²

*НИИ детского питания Россельхозакадемии, Истра, Российская Федерация,
¹РУП «Институт мясо-молочной промышленности»,*

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Известно, что более 20 белков коровьего молока способны вызвать аллергическую реакцию у человека [1-2]. Основными белковыми компонентами молока являются казеин и сывороточные белки, что составляет 20% и 80% общего белка соответственно. Казеиновая фракция представлена α -, β - и κ -казеинами, а сывороточная – β -лактоглобулином (β -лг), α -лактальбумином (α -ла), бычьим сывороточным альбумином (БСА). Казеин и β -лг являются основными аллергенами коровьего молока, причем иммунореактивность убывает в ряду β -лг > казеин > α -ла > БСА [3-4]. β -лг составляет 55% от общего количества сывороточных белков, тогда как α -ла и БСА 20% и 7% соответственно. Данные белки в различном соотношении присутствуют в человеческом, козьем, овечьем, коровьем, верблюжьем, буйволовом молоке [5]. Человеческое и верблюжье молоко не содержат основной аллерген коровьего молока - β -лг [6], однако он преобладает в сыворотке коровьего, козьего, буйволового, овечьего молока [5]. β -казеин является основным белком казеиновой фракции козьего молока (70%), тогда как α -казеин - минорной составляющей (30%). Данное соотношение обуславливает подобие состава казеиновой фракции человеческого и козьего молока и объясняет их лучшую усвояемость [7].

Для основных аллергенных белков коровьего и козьего молока определена степень гомологии аминокислотных последовательностей: фракции казеинов – 85-90%, β -лг – 96%, α -ла – 95% [8]. Вследствие этого высокая перекрестная IgE реактивность к белкам козьего молока выявлена у пациентов с аллергией к коровьему молоку [5]. Перекрестная иммунореактивность установлена для сывороточных белков козьего молока с использованием кроличьих IgG против бычьего β -лг, α -ла и БСА [9].

Различные технологические процессы: нагревание, высокое гидростатическое давление, ферментативный гидролиз [10-11] и др. – могут изменить аллергенный потенциал белкового компонента. Однако термоденатурация способна приводить как к разрушению областей антигенных детерминант, так и агрегации белковых молекул, экспонированию ранее скрытых антигенных детерминант [12]. Ферментативный гидролиз, направленный на фрагментацию белковых молекул, в значительной степени снижает их антигенность. Однако некоторые белки молока, обладают устойчивостью к расщеплению ферментами пищеварительного тракта. В частности, основной аллерген β -лг, в отличие от казеина, не подвергается протеолизу пепсином [13-14]. В связи с этим перспективным представляется комплексное использование предварительной тепловой обработки и ферментативного гидролиза для эффективного снижения иммунореактивности основных аллергенов молока.

В настоящее время ферментативные гидролизаты белков молока включаются в специальные формулы: геродиетические продукты, высоко энергетические добавки, контролируемые вес и терапевтические диеты, гипоаллергенные формулы для питания детей в связи с их сниженной аллергенностью в сравнении с нативными белками. Известен ряд зарубежных фирм-производителей гидролизатов белков молока: Ingredia (Франция), Peptogen (Дания), Nilmar (США). В Республике Беларусь их отсутствие

компенсируется импортной продукцией. В настоящее время осуществляется разработка отечественных гипоаллергенных продуктов для детского питания на основе гидролизатов сывороточных белков коровьего молока. В сложившейся ситуации создание технологии получения гипоаллергенного белкового компонента на основе козьего и коровьего молока является актуальной.

Целью данной работы является исследование влияния тепловой обработки на антигенные свойства сывороточных белков коровьего и козьего молока и степень их протеолиза пепсином, трипсином и алкалазой.

Методы исследования

В работе использовали концентрат сывороточных белков коровьего молока, полученный методом ультрафильтрации (КСБ-УФ-70, ОАО «Щучинский маслосырзавод», ТУ ВУ 100377914.550-2008) с массовой долей белка 72,8% (концентрацию белка измеряли методом Лоури [15]); цельное козье молоко.

Для гидролиза сывороточных белков применяли ферменты: пепсин (Пепсин А из слизистых оболочек желудка свиньи, Марка А, активность 2631, НПО «Биолар», Олайнский завод химреактивов), трипсин (ГОСТ 9002-07-7, «Реахим», Россия), алкалазу (Alcalase[®]FG, активность 2,4 АУ/г, Novozymes A/S, Denmark);

Получение сыворотки козьего молока. Свежее цельное козье молоко охлаждали до 5°C и центрифугировали при 10 т об/мин в течение 30 мин. Отделяли верхнюю фракцию липидов и осадок. Обезжиренное молоко фильтровали через капроновый фильтр. Активная кислотность (рН) обезжиренного молока по сравнению с рН цельного молока изменялась незначительно и составила 6,5-6,6. В обезжиренное козье молоко, нагретое до 37°C, постепенно вносили 50% раствор HCl до достижения рН 4,5, когда происходит коагуляция казеина. Спустя 30 мин свернувшееся молоко охлаждали до комнатной температуры и отделяли осадок казеина центрифугированием при 5 т об/мин в течение 10 мин. Внесением к полученной сыворотке 1 М раствора NaOH доводили рН до 6,5. С целью удаления солей и углеводов проводили диализ нейтрализованной сыворотки. Для отделения выпавшего осадка казеина диализованную сыворотку фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента); рН очищенной сыворотки составила 6,7.

Тепловая обработка сыворотки коровьего и козьего молока. Пробирки, содержащие 1% раствор сывороточных белков, помещали в водяной термостат и инкубировали в течение 10 мин при температуре 50, 60, 70, 80, 90°C для сыворотки козьего молока и 60, 70, 80, 90, 100°C в случае обработки сыворотки коровьего молока. Затем пробы охлаждали при комнатной температуре. В случае образования осадка проводили его гомогенизацию и суспендирование. Полученные образцы подвергали дальнейшему анализу.

Гидролиз сывороточных белков козьего молока пепсином и трипсином. В случае гидролиза пепсином для доведения рН реакционной смеси до 2,0 в 1 мл полученной сыворотки вносили 30 мкл 2 М HCl. Гидролиз проводили при температуре 37°C, концентрации фермента 0,15% (соотношении фермент : субстрат) в течение 3 ч. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1,5 М Трис-HCl буфера (рН 8,8). Гидролиз сыворотки козьего молока трипсином осуществляли в 1,5 М Трис-HCl буфере (рН 8,0) при 37°C, концентрации фермента (соотношении фермент : субстрат) 2% в течение 3 ч. Гидролиз останавливали внесением в образцы фенолметансульфонилфторида (Phenylmethanesulfonyl fluoride, Sigma, USA) в концентрации 0,1 мМ, после чего пробы использовали для дальнейшего анализа; хранение образцов осуществляли при -20°C.

Гидролиз сывороточных белков коровьего молока пепсином и алкалазой. Протеолиз 2% раствора КСБ-УФ-70 пепсином проводили при 37°C, рН 2,0, концентрации фермента (соотношении протеаза/субстрат) 0,5% в течение 2 ч. рН раствора сывороточных белков доводили с использованием 2Н HCl. Фермент инактивировали внесением 0,1 М раствора ингибитора пепсина (Pepstatin, Sigma, USA). При гидролизе алкалазой в качестве субстрата использовали 1% раствор КСБ-УФ-70 в фосфатно-щелочном буфере (рН 8,0). Ферментативное расщепление КСБ алкалазой проводили при

соотношении фермент/субстрат 0,25% (концентрации алкалазы $0,12 \times 10^{-3}$ ЕА/мл), 50°C, рН 8,0 в течение 1 ч. Протеазу инактивировали с использованием фенолметансульфонилфторида в концентрации 0,1 мМ, после чего пробы использовали для дальнейшего анализа; хранение образцов осуществляли при -20°C.

Анализ фракционного состава белков сыворотки коровьего и козьего молока. Образцы сыворотки и ферментативные гидролизаты анализировали методом нативного и денатурирующего электрофореза в 16% полиакриламидном геле (рН 8,8); рН электродного буфера – 8,3 [16]. В качестве стандартов для нативного и ДСН-электрофореза использовали бычий сывороточный альбумин, β -лактоглобулин и α -лактальбумин (Sigma, USA). Количественную обработку электрофореграмм проводили с использованием специализированного программного обеспечения ImageQuant 5.1. Степень протеолиза определяли как относительное количество расщепленного белка, выраженное в %.

Анализ иммунореактивности белков коровьего, козьего молока и продуктов их протеолиза. Получение поликлональных антител против белков сыворотки коровьего молока проводили с использованием β -лактоглобулина (варианты А и В; Sigma, USA), α -лактальбумина (Sigma, USA). Кроликов иммунизировали с интервалом в одну неделю в течение 2,5 месяцев. Для инъекции использовали 1 мл раствора белка в концентрации 1 мг/мл в смеси с полным адьювантом (Freund's adjuvant; Calbiochem-Behring Corp., USA). Забор крови осуществляли с интервалом в одну неделю в количестве 20-40 мл. Специфичность сыворотки определяли методом двойной радиальной иммунодиффузии в агарозном геле (по Ухтерлони) [17]. Полученные сыворотки использовали для оценки аллергенных свойств белков коровьего и козьего молока.

Результаты и обсуждение

1 Изменение антигенных свойств сывороточных белков козьего и коровьего молока в результате термоденатурации.

Известно, что сохранение третичной структуры является неотъемлемым фактором иммунореактивности белковых макромолекул [18]. В связи с тем, что термоденатурация при водит к конформационным изменениям нативной белковой глобулы, на первом этапе исследований изучены изменения антигенных свойств подвергнутых тепловой обработке сывороточных белков коровьего и козьего молока.

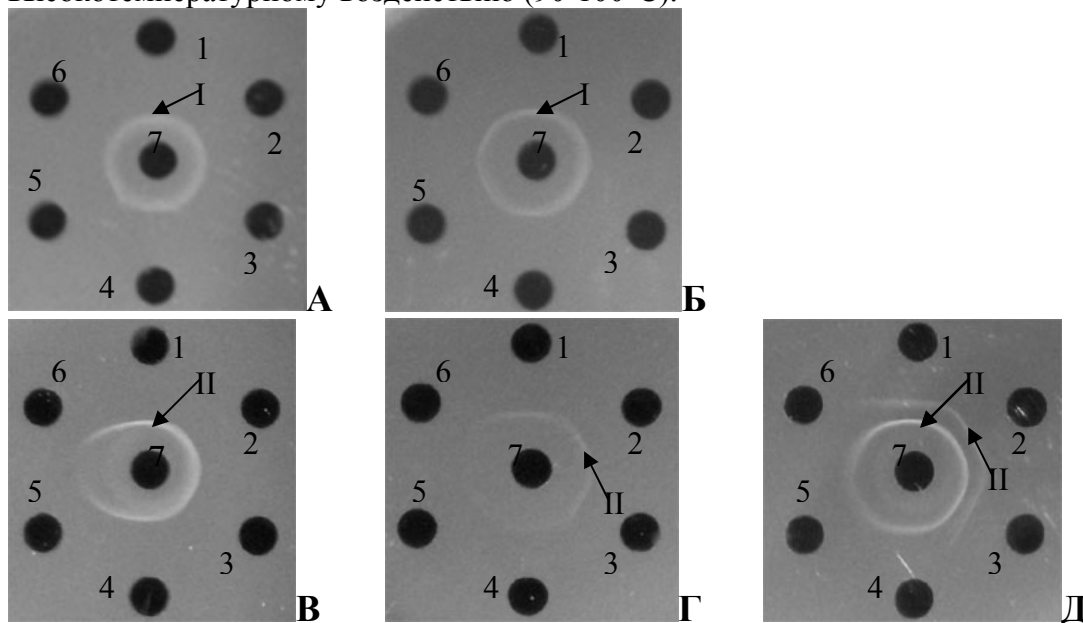
Для качественной характеристики иммунореактивности белков использовали метод двойной радиальной иммунодиффузии в агарозном геле (по Ухтерлони). Метод основан на образовании гетеромерных комплексов -[антиген-Антитело(Ат)]-, формирующих характерный преципитат в геле в результате встречной диффузии компонентов раствора белка, анализируемого на содержание бивалентных антигенов, и антисыворотки. Уменьшение количества преципитата и смещение линии преципитации от центральной лунки свидетельствует о снижении антигенных свойств анализируемых растворов сывороточных белков.

На рисунке 1 представлены результаты исследования антигенного потенциала нативных и термизированных в температурном диапазоне 60-100°C сывороточных белков коровьего молока: β -лг, α -ла и БСА, - а также их комплекса в составе КСБ.

Установлено, что иммунореактивность β -лг коровьего молока практически не изменяется в исследуемом диапазоне (рисунок 1А, 1-6), тогда как в составе концентрата сывороточных белков при температуре >70°C наблюдается некоторое смещение линии преципитации комплекса -[β -лг-Ат]- и уменьшение его количества (рисунок 1Б, 5-6), что указывает на незначительное снижение антигенных свойств в указанных условиях. Полученные данные, вероятно, обусловлены сложными агрегационными процессами, приводящими к образованию гомо- и гетеромерных комплексов сывороточных белков в составе поликомпонентной системы молочной сыворотки [19].

Исследование антигенных свойств нативного и термизированного α -ла показало существенное снижение иммунореактивности термоденатурированного при 90 и 100°C

белка (рисунок 1В, 5-6). Однако в растворе концентрата сывороточных белков преципитирующие комплексы $-\alpha\text{-ла-Ат}$ - сохраняются на всем исследуемом диапазоне; уменьшение их количества и смещение линии преципитации инициируется при температуре предварительной обработки выше 60°C (рисунок 1Д, 5-6). Как и в случае использования раствора $\alpha\text{-ла}$, существенное снижение способности связывать антитела обнаружено в пробах белка, обработанных при 90 и 100°C . Согласно экспериментальным данным, в составе поликомпонентной системы $\alpha\text{-ла}$ оказался более устойчив к высокотемпературному воздействию ($90\text{-}100^{\circ}\text{C}$).



1 – сывороточные белки, контроль; 2 – термоденатурация при 60°C ; 3 - 70°C ; 4 - 80°C ; 5 - 90 ; 6 - 100°C ; 7 – антисыворотка; I – линия преципитации комплекса $-\beta\text{-лг-Ат}$ -, II – комплекса $-\alpha\text{-ла-Ат}$ -, III – комплекса $-\text{БСА-Ат}$ -

Рисунок 1 - Двойная радиальная иммунодиффузия (по Ухтерлони) в агарозном геле термизированных сывороточных белков коровьего молока: $\beta\text{-лг}$ (А), $\alpha\text{-ла}$ (В), БСА (Г), КСБ (Б и Д) с использованием антисыворотки против $\beta\text{-лг}$ (А-Б) и сывороточных альбуминов (В-Д)

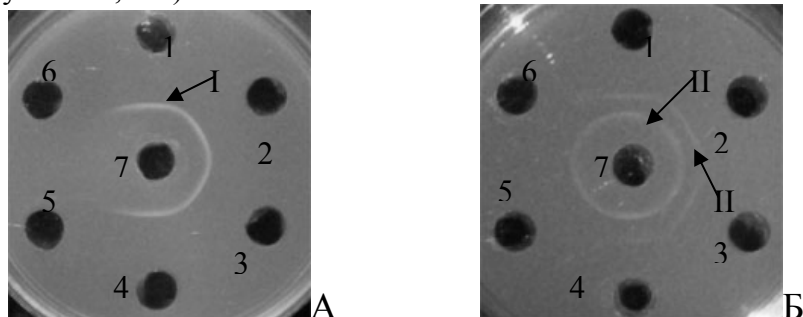
В случае БСА как в моно-, так и в поликомпонентной белковой системе наблюдается существенное снижение иммунореактивности при температуре $>70^{\circ}\text{C}$ (рисунок 1 Г-Д). В случае термизированного при $80\text{-}100^{\circ}\text{C}$ БСА и КСБ преципитат комплекса $-\text{БСА-Ат}$ - практически не выявляется (рисунок 1 Г-Д, 3-6).

Таким образом, существенное снижение антигенного потенциала $\alpha\text{-ла}$ наблюдается при температурной обработке $>80^{\circ}\text{C}$, а БСА - 70°C . Если для $\beta\text{-лг}$ практически не выявлено снижение антигенного потенциала в указанном температурном диапазоне, то в составе молочной сыворотки лишь частичная потеря иммунореактивности наблюдается при температуре $>70^{\circ}\text{C}$. Очевидно, что устойчивость белков-антигенов коровьего молока к термоденатурации уменьшается в ряду $\beta\text{-лг} \rightarrow \alpha\text{-ла} \rightarrow \text{БСА}$.

Согласно литературным данным, критическое конформационное изменение в молекуле $\beta\text{-лг}$ наступает при 63°C , когда на 19% уменьшается содержание β -складчатых слоев [20], а при 80°C под действием температуры происходит практически полное разворачивание молекулы [21]. Лактальбумин денатурирует уже при $\sim 63^{\circ}\text{C}$, однако он является термостабильным белком, ренатурирующим при охлаждении [22]. В случае БСА при повышении температуры $>65^{\circ}\text{C}$, происходит необратимое разворачивание белковой глобулы, которое сопровождается межмолекулярной полимеризацией свободных сульфгидрильных групп [23]. Полученные экспериментальные данные указывают на необходимость применения тепловой обработки в условиях, которые предполагают необратимые конформационные изменения белков-антигенов.

На следующем этапе исследовали изменения антигенных свойств термоденатурированных сывороточных белков козьего молока в поликомпонентной системе молочной сыворотки (рисунок 2).

Показано, что антигенные свойства β -лг не претерпевают существенных изменений при тепловой обработке 50-70°C (рисунок А, 1-4), тогда как в результате термоденатурации козьей сыворотки при 80 и 90°C преципитат практически не выявляется (рисунок 2А, 5-6).



1 – сыворотка козьего молока, контроль; 2 – термоденатурация при 50°C; 3 - 60°C; 4 - 70°C; 5 - 80; 6 - 90°C; 7 – антисыворотка; I – линия преципитации комплекса $-\beta$ -лг-Ат]-, II – комплекса $-\alpha$ -ла-Ат]-, III – комплекса $-\text{КСА-Ат]-}$

Рисунок 2 - Двойная радиальная иммунодиффузия (по Ухтерлони) в агарозном геле термизированных сывороточных белков козьего молока с использованием антисыворотки против β -лг (А) и α -ла (Б)

В случае α -ла, наблюдается некоторое смещение линии преципитации при температуре $>70^\circ\text{C}$ (рисунок 2Б, 1-6), что свидетельствует об уменьшении количества антигенных детерминант, способных взаимодействовать с антителами. Однако преципитат сохраняется в исследуемом температурном диапазоне.

Для КСА (козьего сывороточного альбумина), подвергнутого термоденатурации при 50-70°C, выявлена способность связывать антитела (рисунок 2Б, 1-4), но дальнейшее повышение температуры до 80°C приводит к значительному уменьшению антигенного потенциала данного белка (рис. 1Б, 5-6).

Таким образом, при температуре $>70^\circ\text{C}$ β -лг и КСА претерпевают существенные конформационные изменения, затрагивающие области антигенных детерминант. Также установлено, что α -ла является наиболее термостабильным компонентом козьей сыворотки. Согласно полученным данным устойчивость сывороточных белков козьего молока к термоденатурации, исследованная методом Ухтерлони посредством сохранности областей антигенных детерминант, уменьшается в ряду α -ла \rightarrow β -лг \rightarrow БСА.

Сравнительный анализ антигенных свойств сывороточных белков коровьего и козьего молока, подвергнутых предварительной термоденатурации, показал существенное снижение антигенного потенциала белков α -ла и β -лг сыворотки козьего молока при 80 и 90°C, тогда как α -ла коровьего молока – 90 и 100°C. Сывороточный альбумин коровьего и козьего молока утрачивает антигенные свойства при температурной обработке $>70^\circ\text{C}$. В связи с этим наиболее устойчивым к термоденатурации компонентом сыворотки козьего молока является α -ла, тогда как сыворотки коровьего молока - β -лг.

Таким образом, согласно результатам реакции иммунопреципитации (по Ухтерлони) для сывороточных белков коровьего молока наиболее целесообразной является тепловая обработка при температуре $\geq 90^\circ\text{C}$, а сывороточных белков козьего молока – $\geq 80^\circ\text{C}$.

Согласно исследованиям S. S. Alexander and C. N. Pace [24] для козьего β -лг была показана значительно меньшая стабильность в отличие от коровьего, что связывается со структурными отличиями, обусловленными 6 аминокислотными заменами, а также сходная иммунореактивности с использованием техники фиксации микрокомплемента [25].

Однако тепловая обработка сыворотки коровьего молока в оптимальных условиях не приводит к существенному снижению иммунореактивности основного аллергена молока и преобладающего белка молочной сыворотки – β -лг, а также частично уменьшает антигенный потенциал другого белкового аллергена - α -ла. В случае термоденатурации белков сыворотки козьего молока установлено сохранение антигенных свойств α -ла, кроме того, обработка в высокотемпературном режиме приводит к образованию преципитирующих высокомолекулярных агрегатов.

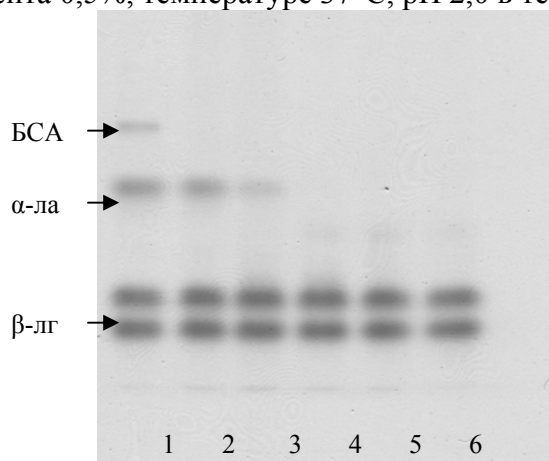
2 Гидролиз белков коровьего и козьего молока:

2.1 Гидролиз сывороточных белков коровьего молока пепсином

Известно, что наличие в сыворотке коровьего молока β -лактоглобулина (β -лг) - одна из основных причин ряда аллергических реакций, которые возникают у детей раннего возраста при отсутствии грудного вскармливания [26]. Другие сывороточные белки: α -лактальбумин (α -ла), бычий сывороточный альбумин (БСА) - и казеины обладают менее выраженными антигенными свойствами [3-4]. Основными характеристиками β -лг, обуславливающими его иммунореактивность, являются устойчивость в кислой среде желудка и протеолитическому расщеплению пепсином, способность пересекать слизистую кишечника и впоследствии проникать в грудное молоко, которое приобретает аллергенный потенциал [27-28].

Пепсин (ЕС 3.4.23.1) - протеолитический фермент класса гидролаз с молекулярной массой около 34,5 кДа. Пепсин устойчив в кислой среде и максимально активен при рН 1,0-2,0. В каталитическом центре фермента содержится аспарагиновая кислота, которая определяет специфичность пепсина к положительно заряженным субстратам и осуществляет нуклеофильную атаку карбоксильной группы аминокислот. С наибольшей скоростью фермент гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами - тирозином и фенилаланином, однако строгой специфичностью не обладает [29].

Для выявления особенностей протеолиза сывороточных белков коровьего молока пепсином ферментативное расщепление проводили при концентрации белковых субстратов 2%, фермента 0,5%, температуре 37°C, рН 2,0 в течение 2 ч.



дорожка 1 – контроль (КСБ без пепсина), 2 – гидролиз 15 мин, 3 – 30 мин, 4 – 60 мин, 5 – 90 мин, 6 – 120 мин

Рисунок 3 - Зависимость степени протеолиза КСБ пепсином от времени:

Результаты эксперимента представлены на электрофореграмме продуктов гидролиза КСБ пепсином (рисунок 3). Установлено, что уже в первые 15 мин протеолиза пепсином на пептиды расщепляется практически весь БСА (рисунок 3, дорожка 1); а по истечении 60 мин в гидролизатах не обнаруживается высокомолекулярная фракция α -ла (рисунок 3, дорожка 4). Таким образом, в результате пепсинового протеолиза КСБ получены гидролизаты, содержащие пептидную фракцию расщепленных БСА и α -ла,

тогда как для β -лг показана исключительная устойчивость к протеолизу пепсином, что согласуется с литературными данными [27].

В связи с этим пепсиновые гидролизаты КСБ в последующем использовались для получения β -лг из сыворотки коровьего молока.

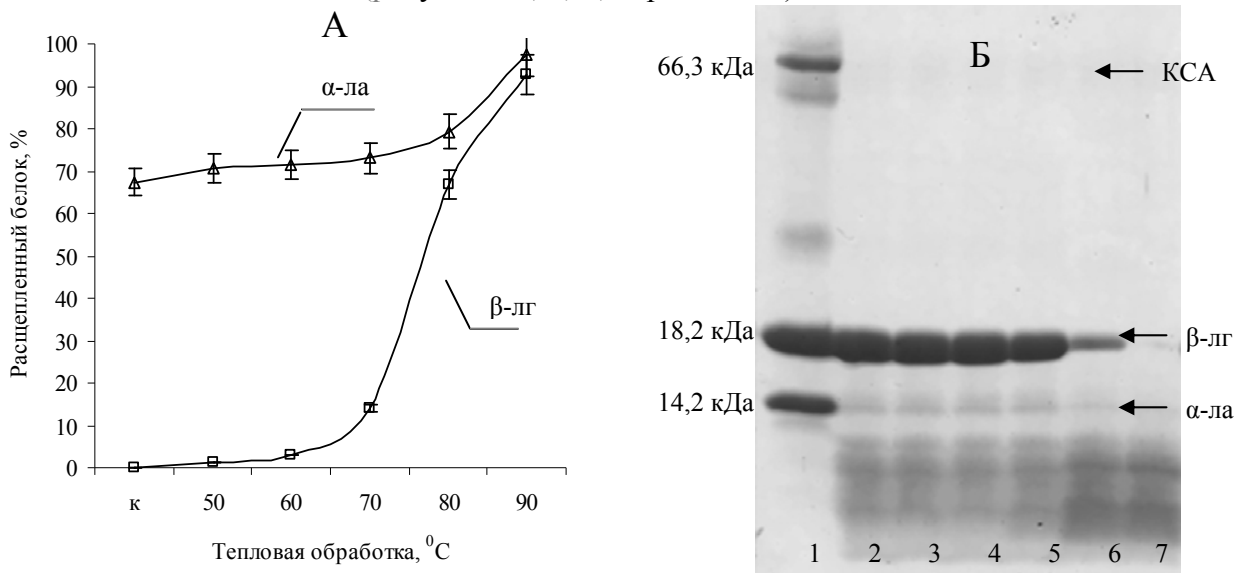
2.2 Гидролиз термоденатурированных сывороточных белков козьего молока пепсином

Так как сравнительный анализ антигенных свойств сывороточных белков коровьего и козьего молока методом иммунопреципитации (по Ухтерлони) показал большую термостабильность белков коровьего молока, в частности основного аллергена β -лг, для изучения влияния температурной обработки на протеолиз пепсином и изменения антигенных свойств гидролизатов использовали сыворотку козьего молока.

Сывороточные белки козьего молока подвергали предварительной обработке при 50, 60, 70, 80 и 90°C в течение 10 мин; затем проводили ферментативное расщепление при концентрации белкового субстрата 1%, фермента 0,15%, температуре 37°C, pH 2,0 в течение 3 ч. Электрофореграмма продуктов гидролиза белков сыворотки козьего молока пепсином представлена на рисунке 4.

Установлено, что степень протеолиза α -ла нативной и термизированной при 50, 60 и 70°C сыворотки козьего молока изменяется незначительно, увеличиваясь с ~70 до 75%. В случае предварительной тепловой обработки при 80°C количество гидролизованного белкового субстрата составляет около 80%, а при 90°C – практически весь α -ла расщепляется на пептиды (рисунок 4А, 2; Б, дорожки 1-6). КСА гидролизуется пепсином как в нативной, так и в термизированной сыворотке козьего молока (рисунок 4Б, дорожки 1-6).

Показано, что β -лг практически не подвергается протеолизу в нативной и обработанной в диапазоне температур 50-70°C сыворотке козьего молока. Однако при нагревании 80 и 90°C степень протеолиза белкового субстрата пепсином возрастает до 80 и более 95% соответственно (рисунок 4А, 1; Б, дорожки 1-6).



А – диаграмма, построенная в результате обсчета электрофореграмм с использованием программы Imagequant 5.1; к – контроль (гидролиз нативной сыворотки); 50-90 – гидролиз сыворотки, подвергнутой тепловой обработке при 50-90°C.

Б – электрофореграмма продуктов гидролиза сыворотки пепсином: дорожка 1 – контроль (без пепсина), дорожка 2 – гидролиз нативного белка, дорожка 3 – тепловая обработка 10 мин при 50°C; дорожка 4 – 60°C, дорожка 5 – 70°C, дорожка 6 – 80°C, дорожка 7 – 90°C.

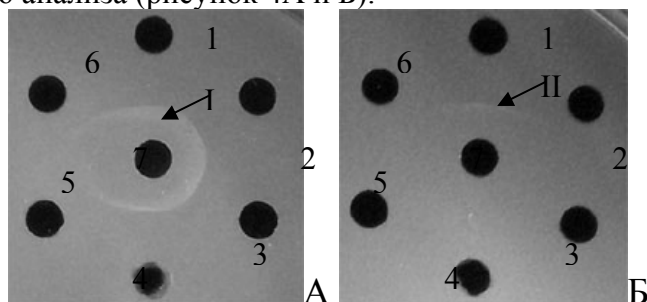
Рисунок 4 - Зависимость степени расщепления пепсином сыворотки козьего молока, подвергнутой предварительной тепловой обработке в диапазоне температур 50-90°C:

Таким образом, нативный КСА эффективно гидролизуется пепсином; возрастание глубины протеолиза α -ла наблюдается в результате предварительной обработки молочной сыворотки при температуре $>70^{\circ}\text{C}$, однако нативный α -ла достаточно эффективно гидролизуется пепсином. Как и в случае пепсинового протеолиза сывороточных белков коровьего молока, α -ла и сывороточный альбумин козьего молока подвергаются гидролизу пепсином в физиологических условиях при pH 2,0 и температуре 37°C . В то же время для повышения биодоступности β -лг необходима предварительная обработка при температуре выше 70°C .

Антигенные свойства гидролизатов сыворотки козьего молока, полученных с использованием пепсина, были изучены методом двойной радиальной иммунодиффузии (по Ухтерлони).

С использованием антисыворотки против β -лг установлено, что в результате предварительной термической обработки сывороточных белков при $80-90^{\circ}\text{C}$ и их последующем гидролизе происходит значительное смещение линии преципитации и уменьшение количества иммунных комплексов (рисунок 5А, 5-Б). Это следствие как существенного изменения антигенных свойств козьего β -лг, вызванного его денатурацией при температуре $80-90^{\circ}\text{C}$ (рисунок 2А), так и результат интенсивного протеолиза β -лг в данном температурном диапазоне (рисунок 4А и Б).

Для пепсиновых гидролизатов способность связывать антитела против сывороточных альбуминов (КСА, α -ла) не выявлена, что связано с высокой степенью гидролиза данных белковых соединений согласно результатам ДСН-электрофоретического анализа (рисунок 4А и Б).



1 – сыворотка козьего молока, контроль; 2 – гидролизат, нативная сыворотка, 3 – предварительная термообработка сыворотки при 60°C ; 4 - 70°C ; 5 - 80°C ; 6 - 90°C ; 7 – антисыворотка; I – линия преципитации комплекса $-\beta\text{-лг-Ат}-$, II – комплекса $-\alpha\text{-ла-Ат}-$

Рисунок 5 - Двойная радиальная иммунодиффузия (по Ухтерлони) в агарозном геле продуктов гидролиза термизированных сывороточных белков козьего молока пепсином с использованием антисыворотки против β -лг (А) и α -ла (Б)

Полученные данные, очевидно, указывают на протекание основных конформационных изменений в молекуле β -лг козьего молока в результате нагревания белкового субстрата $>70^{\circ}\text{C}$, приводящих к экспонированию ранее не доступных пепсиновых сайтов протеолиза и реорганизации областей антигенных детерминант.

2.3 Гидролиз термоденатурированных сывороточных белков коровьего молока алкалазой

Помимо пепсина в пищеварительной системе белки подвергаются гидролизу ферментами, принадлежащими к классу сериновых протеаз (трипсин, химотрипсин). В исследовании также была использована протеаза указанного класса микробного происхождения – алкалаза.

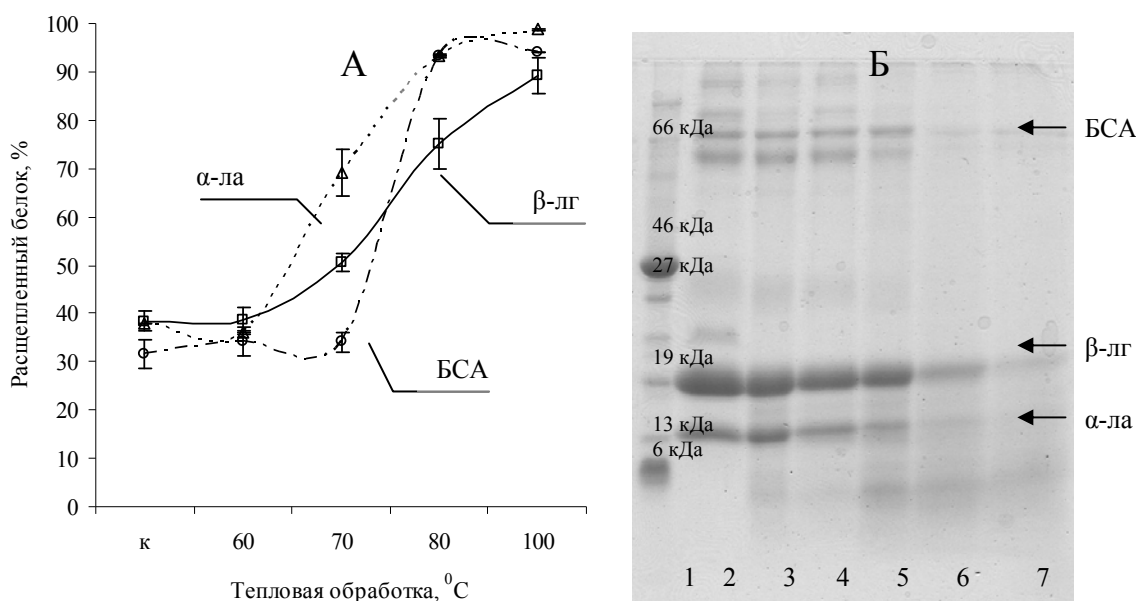
Трипсин (3.4.21.4) катализирует гидролиз пептидных связей, образованных остатками основных аминокислот – Arg и Lys. Фермент проявляет каталитическую активность в диапазоне pH 7,0-9,0 [30]. Алкалаза (3.4.21.62) - протеолитический фермент, полученный глубинной ферментацией штамма *Bacillus licheniformis*. Расщепление субстрата указанным ферментом происходит преимущественно по Phe, Trp, Tyr, Glu, Met, Leu, Ala, Ser, Lys-аминокислотным остаткам при pH 6,5-8,5 [31]. В активном центре

указанных ферментов содержатся три аминокислотных остатка: у алкалазы - Ser₂₂₁, His₆₄ и Asp₃₂, трипсина - Ser₁₉₅, His₅₇ и Asp₁₀₂, образующие систему переноса заряда. Механизм гидролиза сериновыми протеазами включает нуклеофильную атаку Ser₂₂₁ (алкалазы)/Ser₁₉₅ (трипсина) карбонильной группы субстрата с образованием ацилфермента, который затем гидролизуется водой. В трипсине участок активного центра, отвечающий за специфическое связывание субстратов, содержит фиксированный отрицательный заряд, обусловленный карбоксильной группой боковой цепи Asp₁₈₉. Этим объясняется тот факт, что трипсин расщепляет только пептидные связи, к которым примыкают остатки Arg и Lys, несущие в нейтральной среде положительный заряд [30].

Известно, что при нагревании в белковых макромолекулах, в частности β-лг, наблюдаются конформационные переходы, которые могут привести к изменению чувствительности модифицированного белка к перевариванию в желудочно-кишечном тракте [32], а также к изменению аллергенного потенциала [33]. В работе S. V. Kim et al. [34] установлено уменьшение антигенных свойств и увеличение степени протеолиза алкалазой термизированного при 100°C КСБ; согласно исследованию C. Bertrand-Harb et al. [19] показано, что термоденатурация основных сывороточных белков при ≥85°C и pH 7,5 увеличивает глубину протеолиза пепсином и трипсином β-лг и α-ла коровьего молока. Кроме того, необходимость тепловой обработки сывороточных белков коровьего и козьего молока для снижения антигенных свойств и увеличения степени пепсинового протеолиза была продемонстрирована в приведенных выше результатах и их обсуждении.

В связи с этим была проведена предварительная термическая обработка раствора КСБ при pH 8,0 и температуре 60, 70, 80, 90, 100°C; а белков молочной сыворотки козьего молока – при 50, 60, 70, 80, 90°C в течение 10 мин.

Далее осуществляли гидролиз сывороточных белков коровьего молока алкалазой при концентрации фермента 0,25%, pH 8,0 и температуре 50°C в течение 1 ч.



А – диаграмма, построенная в результате обсчета электрофореграмм с использованием программы Imagequant 5.1; к – контроль (гидролиз нативной сыворотки); 60-100 – гидролиз сыворотки, подвергнутого тепловой обработке при 60-100°C.

Б – электрофореграмма продуктов гидролиза сыворотки коровьего молока алкалазой: дорожка 1 – маркер молекулярных масс, дорожка 2 - контроль (без алкалазы), дорожка 3 – гидролиз нативного белка, дорожка 4 – тепловая обработка 10 мин при 60°C; дорожка 5 – 70°C, дорожка 6 – 80°C, дорожка 7 – 100°C.

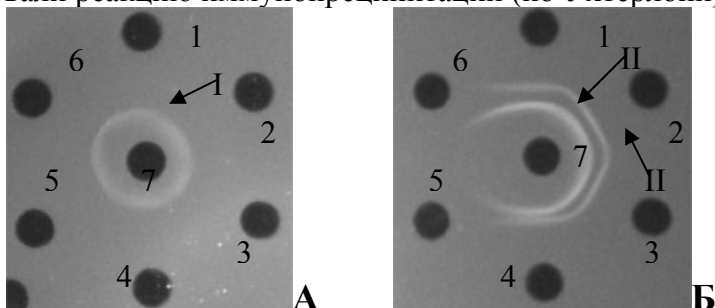
Рисунок 6 - Зависимость степени расщепления алкалазой КСБ, подвергнутого предварительной тепловой обработке в диапазоне температур 60-100°C:

На рисунке 6А приведены средние значения трех экспериментов, а на рисунке 6Б представлена типичная электрофореграмма продуктов гидролиза КСБ алкалазой.

Анализ гидролизатов исходного и термизированного КСБ на присутствие негидролизованного β -лг показал, что степень протеолиза нативного и подвергнутого тепловой обработке при 60°C β -лг составляет около 40%, тогда как нагретого до 70°C белкового субстрата – 50%, 80°C – 75%, 100°C – 90% (рисунок 6А; Б, дорожки 2-7). Очевидно, алкалаза эффективно гидролизует β -лг, являющийся основным аллергеном молока. Таким образом, анализ кривой зависимости степени протеолиза термоденатурированного β -лг показал возрастание степени протеолиза данного белкового субстрата при температуре предварительной обработки >60°C, что указывает на протекание в данных условиях ряда конформационных перестроек в белковой глобуле, приводящих к ее разворачиванию и высвобождению скрытых сайтов протеолиза [21].

Кривая зависимости степени протеолиза белковых субстратов α -ла и БСА имеет характерную сигмоидную форму (рисунок 6А). Так гидролиз нативного и термизированного при 60°C α -ла приводит к расщеплению на пептиды около 30-35% белка, тогда как в случае обработки при 70°C наблюдается существенное возрастание степени протеолиза до 70%. В температурном диапазоне 70-80°C количество гидролизованного α -ла увеличивается 95% соответственно; в результате предварительной тепловой обработки при 100°C на пептиды гидролизуется практически весь α -ла (рисунок 6А; Б, дорожки 2-7). Степень протеолиза нативного и термизированного при 60 и 70°C БСА составляет 30-35%; температурная обработка данного субстрата при $\geq 80^\circ\text{C}$ привела к ферментативному расщеплению 90-95% БСА (рисунок 6А; Б, дорожки 2-7). Следовательно, полученные данные указывают на экспонирование на поверхность белковых молекул ранее скрытых участков взаимодействия с протеазой при температуре >60°C для α -ла и >70°C для БСА.

Для осуществления качественного анализа антигенных свойств гидролизатов КСБ алкалазой использовали реакцию иммунопреципитации (по Ухтерлони).



1 – сывороточные белки, контроль; гидролизаты: 2 – нативный КСБ, 3 - предварительная термоденатурация при 60°C; 4 - 70°C; 5 - 80°C; 6 - 100°C; 7 – антисыворотка; I – линия преципитации комплекса $-\beta\text{-лг-Ат}-$, II – комплекса $-\alpha\text{-ла-Ат}-$, III – комплекса $-\text{БСА-Ат}-$

Рисунок 7 - Двойная радиальная иммунодиффузия (по Ухтерлони) в агарозном геле гидролизатов термизированных сывороточных белков коровьего молока алкалазой с использованием антисыворотки против β -лг (А) и сывороточных альбуминов (Б)

В связи с высокой чувствительностью метода иммунопреципитации образование комплексов $-\beta\text{-лг-Ат}-$ выявлено во всех пробах, однако некоторое смещение линии преципитации и количества иммунного комплекса установлено в гидролизате КСБ, предварительно обработанном при температуре 80°C (рисунок 7А, 5), тогда как в результате нагревания при 100°C отмечено существенное снижение способности термизированного β -лг связывать антитела (рисунок 7А, 6). Согласно приведенным ранее результатам в реакции иммунодиффузии (по Ухтерлони) для β -лг в составе КСБ показано незначительное снижение антигенных свойств при обработке >70°C (рисунок 1Б, 5-6), тогда как линия преципитации комплекса $-\beta\text{-лг-Ат}-$ в пробах гидролизатов в диапазоне 80-100°C существенно смещена от центральной лунки (рисунок 7А, 5-6), что связано с расщеплением большей части β -лг. Таким образом, если по результатам ДСН-

электрофоретического анализа гидролизатов КСБ алкалазой основные конформационные переходы в молекуле β -лг, увеличивающие его восприимчивость к протеолизу, наблюдаются при температуре предварительной обработки $>60^{\circ}\text{C}$ (рисунок 6А-Б), то уменьшение антигенного потенциала гидролизатов достигается в диапазоне $80-100^{\circ}\text{C}$ в результате расщепления участков молекулы, соответствующих антигенным детерминантам. В связи с этим для эффективного протеолиза основного аллергена молочной сыворотки (β -лг) алкалазой и получения гипоаллергенного белкового компонента целесообразно проводить предварительную тепловую обработку КСБ при $\geq 80^{\circ}\text{C}$.

С использованием антисыворотки против сывороточных альбуминов показано, что гидролизаты КСБ, подвергнутые предварительной тепловой обработке при $>70^{\circ}\text{C}$ не способны связывать антитела (рисунок 7Б, 5-6), что обусловлено как существенным снижением антигенного потенциала БСА (рисунок 1Г-Д), так и эффективным расщеплением данного субстрата алкалазой (рисунок 6А; Б, дорожки 6-7). Аналогичная картина установлена и для α -ла: комплексы $-\alpha\text{-ла-Ат}$ - не выявляются в гидролизатах КСБ с предварительной температурной обработкой $\geq 80^{\circ}\text{C}$, что согласуется с результатами ДСН-электрофоретического анализа, указывающего на эффективное расщепление указанного белкового субстрата (рисунок 6А; Б, дорожки 6-7) и данными реакции иммунопреципитации (по Ухтерлони), которые выявили значительное снижение антигенных свойств денатурированного при 80 и 90°C α -ла (рисунок 1В и Д).

Таким образом, конформационные переходы в белках фракции сывороточных альбуминов, приводящие к увеличению степени протеолиза данных субстратов, инициируются при $>60^{\circ}\text{C}$ для α -ла и $>70^{\circ}\text{C}$ для БСА, а гипоаллергенные продукты гидролиза, не способные взаимодействовать с антителами против сывороточных альбуминов, получены в результате термоденатурации КСБ при 80 и 100°C . Очевидно, предварительная тепловая обработка основных сывороточных белков коровьего молока при температуре $\geq 80^{\circ}\text{C}$ является оптимальной для снижения их антигенного потенциала и увеличения степени протеолиза алкалазой.

В связи с тем, что β -лг достаточно эффективно гидролизуется алкалазой, обоснованным является увеличение степени протеолиза данного субстрата за счет возрастания концентрации фермента, тогда как термоденатурация при $\geq 80^{\circ}\text{C}$, в первую очередь направлена на расщепление высокомолекулярной фракции БСА и, в меньшей степени α -ла.

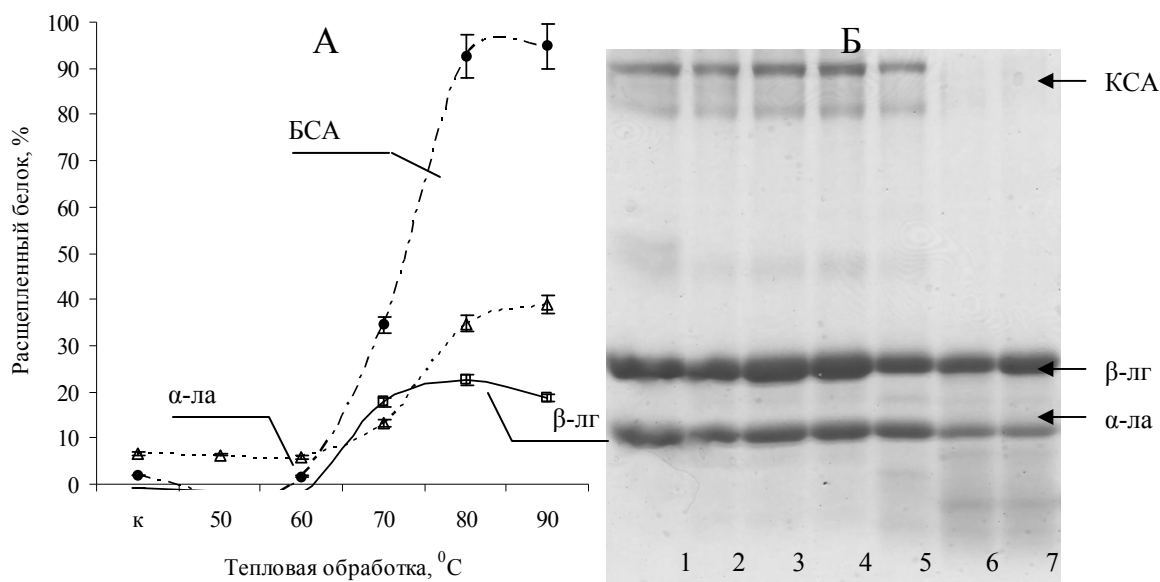
2.4 Гидролиз термоденатурированных сывороточных белков козьего молока трипсином

На следующем этапе были изучены антигенные свойства и степень протеолиза термоденатурированных сывороточных белков козьего молока другой сериновой протеазой – трипсином. Ферментативное расщепление 1% раствора сывороточных белков козьего молока трипсином осуществляли при концентрации фермента 2%, рН 8,0 и температуре 37°C в течение 3 ч. На рисунке 8А приведены средние значения трех экспериментов, а на рисунке 8Б представлена типичная электрофореграмма продуктов гидролиза сыворотки козьего молока трипсином.

По результатам ДСН-электрофоретического анализа нативный и термизированный при 50 и 60°C β -лг козьего молока практически не гидролизуется трипсином, тогда как температурная обработка данного субстрата при 70°C привела к возрастанию степени протеолиза до $\sim 20\%$; дальнейшее увеличение температуры не оказало влияния на глубину протеолиза данного белкового субстрата (рисунок 8А; Б, дорожки 2-7). Проведенные ранее исследования показали, что для более эффективного гидролиза β -лг трипсином необходимо увеличение концентрации ферментного препарата. Таким образом, в температурном диапазоне предварительной обработки $60-70^{\circ}\text{C}$ установлено возрастание глубины протеолиза β -лг, связанное с разворачиванием белковой глобулы и

экспонированием сайтов протеолиза трипсином. Очевидно, основные денатурационные процессы в молекуле β -лг связаны с указанным температурным диапазоном.

Нативные и термизированные при 50 и 60°C альбумины (α -ла и КСА) устойчивы к протеолизу трипсином, тогда как на пептиды расщепляются 35 и 90% термизированного при 70 и 80-90°C КСА, а также 15 и 35% обработанного при 70 и 80°C α -ла соответственно (рисунок 8А; Б, дорожки 2-7).



А – диаграмма, построенная в результате обсчета электрофореграмм с использованием программы Imagequant 5.1; к – контроль (гидролиз нативной сыворотки); 50-90 – гидролиз сыворотки, подвергнутой тепловой обработке при 50-90°C.

Б – электрофореграмма продуктов гидролиза сыворотки трипсином: дорожка 1 – контроль (без трипсина), дорожка 2 – гидролиз нативного белка, дорожка 3 – тепловая обработка 10 мин при 50°C; дорожка 4 – 60°C, дорожка 5 – 70°C, дорожка 6 – 80°C, дорожка 7 – 90°C.

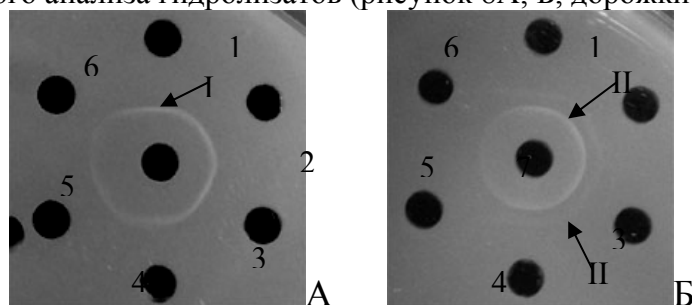
Рисунок 8 - Зависимость степени расщепления трипсином сыворотки козьего молока, подвергнутой предварительной тепловой обработке в диапазоне температур 50-90°C:

Степень протеолиза термоденатурированного при 90°C α -ла возрастает незначительно и составляет около 40%. Следовательно, при >60°C наблюдается разрушение упорядоченной структуры КСА, а в диапазоне 70-80°C основные конформационные изменения, заключающиеся в высвобождении сайтов протеолиза трипсином, претерпевает α -ла козьего молока.

Анализ полученных трипсиновых гидролизатов методом иммунопреципитации (по Ухтерлони) показал смещение линии преципитации и уменьшение количества комплекса - [β -лг-Ат]- при предварительной тепловой обработке сывороточных белков козьего молока уже при температуре >60°C (рисунок 9А); наименьшее количество иммунного комплекса выявлено в гидролизате термизированных при 90°C сывороточных белков. Полученные данные связаны как со снижением иммунореактивности термизированного β -лг (рисунок 2А), так и возрастанием степени протеолиза белкового субстрата (рисунок 8А; Б, дорожки 5-7). Следует отметить, что восприимчивость к протеолизу β -лг козьего молока возрастает в температурном диапазоне 60-70°C, тогда как способность связывать антитела уменьшается у гидролизатов, термизированных при 70, 80 и 90°C. Кроме того, снижение антигенных свойств вызвано дальнейшим протеолизом промежуточных продуктов расщепления β -лг трипсином. Следовательно, для снижения антигенных свойств и увеличения степени протеолиза β -лг целесообразно проводить обработку при температуре $\geq 70^\circ\text{C}$.

Исследование антигенных свойств фракции альбуминов козьего молока показало отсутствие способности к образованию иммунных комплексов -[КСА-Ат]- и гидролизатов

сыворотки, предварительно обработанной при 80 и 90°C, что связывается как со снижением антигенного потенциала термизированного в данных условиях КСА (рисунок 2Б), так и практически полным гидролизом субстрата по данным ДСН-электрофоретического анализа гидролизатов (рисунок 8А; Б, дорожки 6-7).



1 – сывороточные белки, контроль; гидролизаты: 2 – нативная сыворотка, 3 – предварительная термоденатурация при 60°C; 4 – 70°C; 5 – 80°C; 6 – 90°C; 7 – антисыворотка; I – линия преципитации комплекса $-\beta\text{-лг-Ат}-$, II – комплекса $-\alpha\text{-ла-Ат}-$, III – комплекса $-\text{КСА-Ат}-$

Рисунок 9 - Двойная радиальная иммунодиффузия (по Ухтерлони) в агарозном геле гидролизатов термизированных сывороточных белков козьего молока трипсином с использованием антисыворотки против $\beta\text{-лг}$ (А) и сывороточных альбуминов (Б)

Также установлено некоторое смещение линии преципитации комплекса $-\alpha\text{-ла-Ат}-$ в случае термизированных при 80 и 90°C сывороточных белков (рисунок 9Б, 5-6); как показали проведенные ранее иммунохимические исследования, полученные результаты связаны как с уменьшением способности термизированного $\alpha\text{-ла}$ взаимодействовать с антителами (рисунок 2Б, 5-6), так и частичным протеолизом субстрата (рисунок 8А; Б, 6-7). Следовательно, снижение антигенных свойств термизированного $\alpha\text{-ла}$ инициируется при температуре $>70^\circ\text{C}$, тогда как возрастание степени протеолиза трипсином наблюдается при 60-80°C. Очевидно, денатурационные процессы, связанные с разрушением областей антигенные детерминант и экспонирование ранее не доступных сайтов протеолиза, следует рассматривать отдельно, так как четкие корреляции между снижением антигенного потенциала и возрастанием степени протеолиза не выявлены. Таким образом, для снижения аллергенного потенциала и эффективного протеолиза основных сывороточных белков козьего молока трипсином оптимальной является обработка при $\geq 80^\circ\text{C}$.

Выводы

Согласно результатам реакции иммунопреципитации (по Ухтерлони) устойчивость сывороточных белков коровьего молока к термоденатурации, определяющаяся способностью связывать специфические иммуноглобулины, уменьшается в ряду $\beta\text{-лг} \rightarrow \alpha\text{-ла} \rightarrow \text{БСА}$, тогда как сывороточных белков козьего молока – $\alpha\text{-ла} \rightarrow \beta\text{-лг} \rightarrow \text{БСА}$. Установлено, что существенное снижение антигенного потенциала термизированных $\alpha\text{-ла}$ и $\beta\text{-лг}$ сыворотки козьего молока достигается при 80 и 90°C, тогда как $\alpha\text{-ла}$ коровьего молока – 90 и 100°C. Сывороточный альбумин коровьего и козьего молока утрачивает способность взаимодействовать с антителами после тепловой обработки $>70^\circ\text{C}$. $\beta\text{-лг}$ коровьего молока в составе КСБ, термизированного при 80, 90 и 100°C, лишь частично теряет иммунореактивные свойства. Наиболее устойчивым компонентом сыворотки козьего молока является $\alpha\text{-ла}$, тогда как сыворотки коровьего молока – $\beta\text{-лг}$.

В результате пепсинового протеолиза КСБ получены гидролизаты, содержащие пептидную фракцию расщепленных БСА и $\alpha\text{-ла}$, тогда как для $\beta\text{-лг}$ показана исключительная устойчивость к гидролизу пепсином. Установлено возрастание степени протеолиза $\beta\text{-лг}$ козьего молока пепсином в результате предварительной обработки сыворотки при температуре 80 и 90°C.

Показано, что для получения гипоаллергенного белкового компонента на основе сывороточных белков коровьего и козьего молока необходимо комплексное использование предварительной тепловой обработки белковых субстратов при $\geq 80^{\circ}\text{C}$ и последующий ферментативный гидролиз с использованием алкалазы, трипсина.

Список литературы

- 1 Cavagni, G. Allergy to cow's milk proteins in childhood: the author's personal experience and new diagnostic and therapeutic proposals / G. Cavagni, A. Plebani, P. Restani, S. Marini, M. Gardenghi, C. Poiesi, M. Duse, A.G. Ugazio // *Pediatr. Med. Chir.* – 1994. – Vol. 16. - № 5. – P. 413–419.
- 2 Docena, G.H. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk / G.H. Docena, R. Fernandez, F.G. Chirido, C.A. Fossati // *Allergy.* – 1996. - Vol. 51. - № 6. –P. 412–416.
- 3 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.
- 4 Bernard, H. Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins / H. Bernard, C. Creminon, M. Yvon, J.M. Wal // *Int. Arch. Allergy Immunol.* - 1998. – Vol. 115. - № 3. – P. 235–244.
- 5 El-Agamy, E.I. A comparative study of milk proteins from different species. II. Electrophoretic patterns, molecular characterization, amino acid composition and immunological relationships. A comparative study of milk proteins from different species. II. Electrophoretic patterns, molecular characterization, amino acid composition and immunological relationships / E.I. El-Agamy, Z.I. Abou-Shloue, Y.I. Abdel-Kader // In: *Third Alexandria Conference on Food Science and Technology, Alexandria, Egypt, 1–3 March.* – P. 51–62.
- 6 Taylor, S.L. Immunologic and allergic properties of cow's milk proteins in humans / S.L. Taylor // *J. Food Prot.* - 1986. –Vol. 49. - № 3. – P. 239–250.
- 7 El-Agamy, E.I. The challenge of cow milk protein allergy / E.I. El-Agamy // *Small Ruminant Research.* – Vol. 68. - № 1-2. – P. 64-72.
- 8 Ribadeau-Dumas, B. Structure and variability of milk proteins / B. Ribadeau-Dumas. - In: *Barth CA, Schlimme E, editors. Milk Proteins: Nutritional, Clinical, Functional and Technological Aspects. Darmstadt, Germany: Steinkopff; 1989.* – P. 112–113.
- 9 Симоненко, С.В. Особенности состава козьего молока как компонента продуктов питания / С.В. Симоненко, Г.М. Лесь, И.В. Хованова, Т.Н. Головач, Н.В. Гавриленко, Е.М. Червяковский, В.П. Курченко // *Труд. Белорусск. гос. ун-та. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем.* – 2009. – Т. 4. – Ч. 1. – С. 100-107.
- 10 Besler, M. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods / M. Besler, H. Steinhart, A. Paschke // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* – 2001. – Vol. 756. – P. 207–228.
- 11 Paschke, A. Stability of bovine allergens during food processing / A. Paschke, M. Besler // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2002. – Vol. 89. – P. 16-20.
- 12 Host, A. Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison: a double-blind placebo-controlled study in milk allergic children / A. Host, E.G. Samuelsson // *Allergy.* – 1988. – Vol. 43. – P. 113–118.
- 13 Oldaeus G. Antigenicity and allergenicity of cow milk hydrolysates intended for infant feeding / G. Oldaeus, B. Bjorksten, R. Emarsson, N.I.Kjellman // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 1991. – Vol. 2. – P. 156 –164.
- 14 Astwood, J.D. Stability of food allergens to digestion in vitro / J.D. Astwood, J.N. Leach, R.L. Fuchs // *Nat. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 10. – P. 1269-1273.
- 15 Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* - 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
- 16 Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1981. – 288 с.
- 17 Иммунологические методы. Под ред. Х. Фримеля. - М.: Мир, 1979. - 518 с.

- 18 Kleber, N. The antigenic response of b-lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation / N. Kleber, I. Krause, S. Illgner, J. Hinrichs // *European Food Research and Technology*. – 2004. – Vol. 219. – P. 105–110.
- 19 Bertrand-Harb, C. Thermal modifications of structure and co-denaturation of a-lactalbumin and b-lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases / C. Bertrand-Harb, A. Baday, M. Dalgalarondo, J.-M. Chobert, T. Haertler // *Nahrung/Food* – 2002. – Vol. 46. - № 4. - P. 283 – 289.
- 20 Prabakaran, S. Thermal unfolding of β -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.
- 21 Edwards, P. J. B. Heat-resistant structural features of bovine β -lactoglobulin A revealed by NMR H/D exchange observations / P. J. B. Edwards, G. B. Jameson, K. P. Palmano, L. K. Creamer // *Int. Dairy J.* – 2002. Vol. 12. – P. 331-344.
- 22 Hendrix, T. M. Energetics of structural domains in α -lactalbumin / T. M. Hendrix, Y. Griko, P. Privalov // *Protein Science*. – 1996. – Vol. 5. – P. 923-931.
- 23 Peters, T. Jr. Serum albumin / T. Jr. Peters // *Adv. Protein Chem.* – 1985. - Vol. 37. – P. 161-245.
- 24 Alexander, S. S. A comparison of the denaturation of bovine β -lactoglobulins A and B and goat β -lactoglobulin / S. S. Alexander, C. N. Pace // *Biochemistry*. – 1973. – Vol. 10. – P. 27-38.
- 25 Phillips, N. I. Immunochemical comparison of β -lactoglobulins / N. I. Phillips, R. Jenness, E. B. Kalan // *J. Immunol.* - 1968. – Vol. 100. – P. 307.
- 26 Järvinen, K. M. IgE and IgG binding epitopes on lactoglobulin in cow's milk allergy / K. M. Järvinen, P. Chatchatee, L. Bardina, K. Beyer, H. A. Sampson // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2001. - Vol. 126. – P. 111–118.
- 27 Reddy, I. M. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion / I. M. Reddy, N. K. D Kella, J. E. Kinsella // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1988. – Vol. 36. – P. 737–741.
- 28 Sorva, R. β -Lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cows' milk allergy / R. Sorva, S. Makinen-Kiljunen, K. Juntunen-Backman // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1994. – Vol. 93. – P. 787–792.
- 29 Антонов В. К., Химия протеолиза. - Наука, изд. 2, 1991. – С. 83-89.
- 30 Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Пер. с англ. - М.: Мир;1982. -Т. 1. - Гл. 6.– С. 370-376.
- 31 Doucet, D. Gel formation of peptides produced by extensive enzymatic hydrolysis of β -lactoglobulin / D. Doucet, E. A. Foegeding // *Biomacromolecules*. – 2005. – Vol. 6. – P. - 1140-1148.
- 32 Guo, M. R. Susceptibility of b-lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin / M. R. Guo, P. F. Fox, A. Flynn, P. S. Kindstedt // *Journal of Dairy Science*. – Vol. 78. – P. 2336–2344.
- 33 Rytönen, J. Effect of heat denaturation on betalactoglobulin-induced gastrointestinal sensitization in rats: Denatured β -lg induces a more intensive local immunologic response than native β -lg / J. Rytönen, T. J. Karttunen, K. H. Valkonen, M. C. Jenmalm, T. Alatossava, B. Björkstén // *Paediatric Allergy and Immunology*. - 2002. – Vol. 13. – P. 269–277.
- 34 Kim, S. B. Enzymatic Hydrolysis of Heated Whey: Iron-Binding Ability of Peptides and Antigenic Protein Fractions / S. B. Kim, I. S. Seo, M. A. Khan, K. S. Ki, W. S. Lee, H. J. Lee, H. S. Shin, H. S. Kim // *J. Dairy Sci.* - 2007. – Vol. 90. – P. 4033-4042.