

Т.Н. Головач^{1,2}, Н.К. Жабанос¹, к.т.н., В.П. Курченко²
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»¹,
Белорусский государственный университет²

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОЦЕНКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ СЕРИНОВЫМИ ПРОТЕАЗАМИ ТРИПСИНОМ И АЛКАЛАЗОЙ

Исследованы степень протеолиза и антигенные свойства гидролизатов сывороточных белков, полученных с использованием сериновых протеаз: алкалазы и трипсина, а также комплекса ферментов. Методами SDS-электрофореза в ПААГ, высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено, что при совместном использовании сериновых протеаз достигается наиболее полный гидролиз основных белковых аллергенов молока – β -лактоглобулина и α -лактальбумина, тогда как удаление высокомолекулярной фракции БСА осуществляется путем фильтрации гидролизатов. Изучение антигенных свойств гидролизата, полученного с использованием алкалазы и трипсина, методом двойной радиальной иммунодиффузии (по Ухтерлони), показало наличие в нем бивалентных антигенных детерминант; согласно результатам иммуноферментного анализа выявлено снижение способности связывать антитела на 60%. Фильтрация гидролизата привела к получению не образующей иммунные комплексы в реакции Ухтерлони пептидной фракции с $M_r \leq 10$ кДа, антигенный потенциал которой составил менее 10%.

Введение. Основные сывороточные белки, среди которых выделяют β -лактоглобулин (β -лг), α -лактальбумин (α -ла) и бычий сывороточный альбумин (БСА), составляют 20% общего белка молока и используются в качестве белкового компонента для широкого ассортимента продуктов питания [1]. Но данные белки являются основными аллергенами молока [2]. В частности, в молоке содержится относительно большое количество β -лг – 12%, а в сыворотке оно составляет 60% [3]. Этот белок выступает в качестве эффективного иммуномодулятора и является основной причиной аллергической реакции на молоко, которая возникает у 2–3% детей [4]. Ферментативный гидролиз аллергенной фракции позволяет расщепить антигенные детерминанты нативных сывороточных белков [5]. Для самих белков, а также продуктов их гидролиза показано наличие широкого спектра биологических активностей: антибактериальные

и антифунгальные свойства, гипотензивный, иммуномодулирующий эффекты и др. [6]. Для получения гипоаллергенного белкового компонента продуктов специализированного и детского питания необходим ферментативный гидролиз сывороточных белков с применением эндо- и экзопротеаз или комплексов различных протеаз для увеличения глубины протеолиза, преобладания в гидролизате короткоцепочечных пептидов [7]. Ферментативное расщепление сывороточных белков осуществляется с использованием широкого спектра протеаз микробного (алкалаза, нейтраза, термолизин), животного (пепсин, трипсин, химотрипсин) и растительного (папаин, бромелаин, фицин) происхождения [8].

Цель работы – исследование степени протеолиза и антигенных свойств гидролизатов сывороточных белков, полученных с использованием алкалазы и трипсина, а также комплекса ферментов.

Материалы и методы исследования. В работе использовали концентрат сывороточных белков, 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 [9]). Для гидролиза сывороточных белков применяли фермент алкалазу (*Protease from Bacillus licheniformis*, 2.4 AU/g, Sigma, USA) и трипсин (*protease from bovine pancreas*, $\geq 6,000$ BAEE units/mg, Sigma, USA).

Ферментативное расщепление сывороточных белков проводили при концентрации КСБ-УФ-70 2% (по белку) и соотношении фермент: субстрат 1% (концентрации алкалазы $0,48 \cdot 10^{-3}$ AU/ml, трипсина – $\geq 1,2$ BAEE units/ml), 50 °С, pH 8,0, в течение 2 ч. При комплексном использовании ферментов вносили по 0,5% алкалазы и трипсина. pH раствора сывороточных белков доводили с использованием 1N NaOH. Фермент инактивировали прогреванием гидролизата при 90 °С в течение 10 мин, после чего пробы немедленно замораживали при –20 °С для последующего анализа. Степень протеолиза сывороточных белков контролировали с использованием SDS-электрофореза в полиакриламидном геле [10]. Электрофореграммы продуктов гидролиза сывороточных белков оценивали с помощью специализированного программного обеспечения для обсчета электрофореграмм ImageQuant 5.1. Степень протеолиза определяли как относительное количество расщепленного белка, выраженное в %.

Для изучения антигенных свойств гидролизатов сывороточных белков трипсином и алкалазой использовали иммуноферментный анализ (ИФА) [11]. Антигенность определяли как соотношение значений оптической плотности нативного белка к оптической плотности исследуемого образца, выраженное в %. Статистическую обработку экспериментальных данных и построение графиков осуществляли в программе Statistica 7.0.

Получение поликлональных антител против β -лг. Кроликов иммунизировали β -лг (варианты А и В; Sigma, USA) с интервалом 7 дней 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 7 дней в количестве 20–40 мл. Специфичность отделенной от кровяного сгустка сыворотки определяли методом двойной радиальной иммунодиффузии в агарозном геле (по Ухтерлони) [12]. Далее полученные сыворотки использовали для определения аллергенных свойств модифицированного β -лг и его гидролизатов по Ухтерлони.

ВЭЖХ анализ белкового и пептидного состава КСБ и гидролизатов сывороточных белков проводили на хроматографе Agilent 1100 (США) с использованием колонки Zorbax-300SB C18 (4,6×250 мм). Колонку уравнивали 0,1%-ным водным раствором ТФУ. Элюцию белков осуществляли с использованием линейного градиента ацетонитрила от 0 до 50% в течение 40 мин при комнатной температуре в потоке 1,0 мл/мин. Детекцию проводили при 214 и 280 нм.

Результаты и их обсуждение. Данное исследование направлено на изучение особенностей протеолиза сывороточных белков, являющихся основными аллергенами молока, сериновыми протеазами: алкалазой и трипсином, а также при комплексном их использовании. Известно, что преобладающими компонентами фракции сывороточных белков являются β -лактоглобулин (β -лг), α -лактальбумин (α -ла) и бычий сывороточный альбумин (БСА) в соотношении 10 : 4 : 1 [1]. Из 25 белков молока, способных вызвать аллергическую реакцию у человека, наибольшим аллергенным потенциалом обладают β -лг > казеин > α -ла > БСА [13]. Ферментативный гидролиз белкового компонента направлен на расщепление

антигенных детерминант, а также получение продукта с повышенной питательной ценностью [14].

Лактоглобулин – основной белок сыворотки, имеющий глобулярную структуру, представленную цепью из 162 аминокислотных остатков; молекулярная масса β -лактоглобулина составляет 18,4 кДа [15]. Белок содержит два стабилизирующих дисульфидных мостика и три тиольных группы. В нейтральных условиях происходит агрегация мономеров с образованием димера, диссоциирующего на субъединицы при $\text{pH} < 3,5$ и $\text{pH} > 6,5$ [16]. Лактальбумин – глобулярный белок, образованный цепью из 123 аминокислотных остатков, с молекулярной массой 14,2 кДа; в структуре глобулы выявлено наличие четырех дисульфидных мостиков и связанных ионов кальция [17]. БСА представлен одной полипептидной цепью, которая сформирована 583 аминокислотными остатками и при $\text{pH} 5\text{--}7$ содержит 17 дисульфидных мостиков и 1 сульфгидрильную группу; молекулярная масса белка составляет 66,4 кДа [18].

Для получения гидролизатов описанных выше белков использовали ферменты класса сериновых протеаз: алкалазу и трипсин. 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 $\text{pH} 6,5\text{--}8,5$. Трипсин (3.4.21.4) катализирует гидролиз пептидных связей, образованных остатками основных аминокислот – аргинина и лизина. Фермент проявляет каталитическую активность в диапазоне $\text{pH} 7,0\text{--}9,0$ [20]. В активном центре указанных ферментов содержатся три аминокислотных остатка: у алкалазы – Ser₂₂₁, His₆₄ и Asp₃₂, трипсина – Ser₁₉₅, His₅₇ и Asp₁₀₂, образующие систему переноса заряда [19–20]. 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 [20].

На первом этапе исследования проводили гидролиз сывороточных белков трипсином, алкалазой, а также в присутствии обоих ферментов.

Ферментативное расщепление 2%-ного раствора сывороточных белков трипсином осуществляли в течение 2 ч при концентрации фермента 1%, рН 8,0 и температуре 50 °С. На рис. 1, а приведены средние значения трех экспериментов, а на рис. 1, б представлена типичная электрофореграмма продуктов гидролиза трипсином. Установлено, что в первые 30 мин ферментативной реакции на пептиды расщепляются около 90% β -лг и 55% α -ла, а также 30% БСА (рис. 1). При увеличении продолжительности протеолиза до 120 мин количество расщепленного белков β -лг возрастает незначительно и по результатам SDS-электрофореза составляет менее 95%, тогда как степень протеолиза α -ла увеличивается до 90%, а БСА – до 35% (рис. 1).

Таким образом, наиболее интенсивный гидролиз белковых субстратов β -лг и БСА трипсином установлен в первые 30 мин, а α -ла – до 90 мин ферментативного процесса (рис. 1). Кроме того, в данных условиях гидролиза трипсин наиболее эффективно расщепляет β -лг, что связывается с конформационными состояниями указанных белков [15–18], а также субстратной специфичностью фермента [20]. Анализ пептидной фракции гидролизата КСБ трипсином показал образование промежуточных пептидов с $13 < M_r \leq 6$ кДа, количество которых уменьшается на протяжении всего ферментативного процесса (рис. 1).

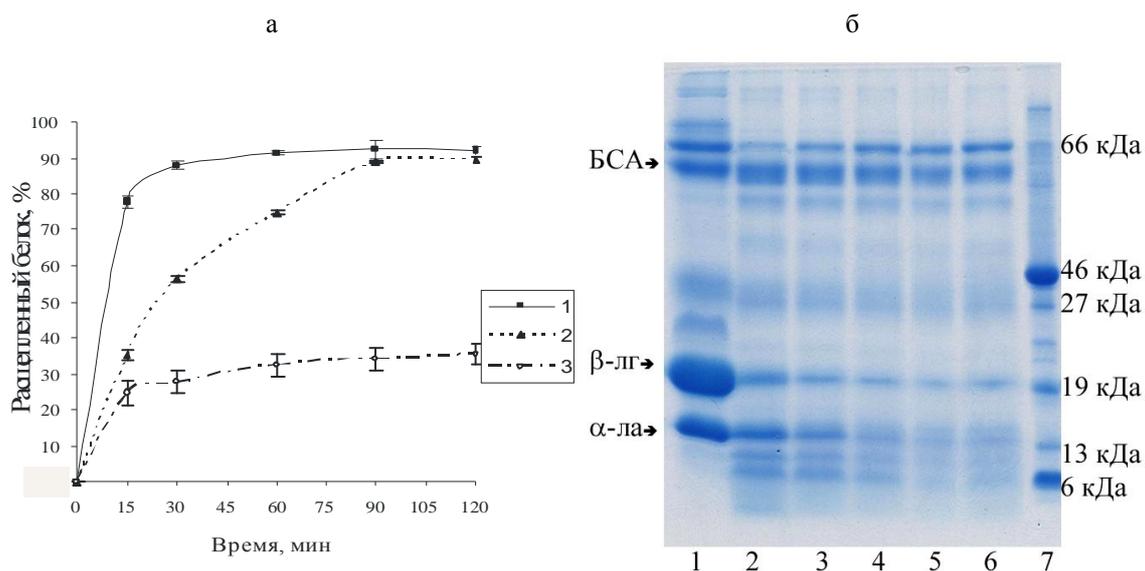


Рисунок – 1 Зависимость степени расщепления β -лг, α -ла и БСА трипсином от времени: а – β -лг (кривая 1), α -ла (кривая 2), БСА (кривая 3); б – электрофореграмма продуктов гидролиза КСБ трипсином: 1 – контроль, 0 мин; 2 – 15 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин; 5 – 90 мин; 6 – 120 мин; 7 – маркер молекулярных масс

В случае алкалазы протеолиз проводили в аналогичных условиях. Показано, что основная часть белковых субстратов подвергается гидролизу в течение 60 мин и составляет около 90% β -лг, 70% α -ла и 10% БСА (рис. 2), а после 120 мин на промежуточные продукты расщепляются около 15% БСА, более 95% β -лг и практически весь α -ла (рис. 2). В случае гидролиза БСА степень его протеолиза возрастает от 10 до 15% в течение 2-го ч ферментативной реакции, что указывает на низкую эффективность гидролиза данного субстрата алкалазой (рис. 2). Следует отметить, что значительное возрастание степени протеолиза α -ла алкалазой наблюдается вплоть до 120 мин ферментативного процесса (рис. 2). Анализ пептидного состава гидролизата КСБ алкалазой показал образование дискретной пептидной фракции с $M_r < 6$ кДа, количество которой значительно уменьшается с 90 до 120 мин на протяжении всего протеолиза (рис. 1).

Таким образом, в данных условиях гидролиза алкалаза достаточно эффективно расщепляет β -лг и α -ла, кроме БСА, что можно связать как с конформационными состояниями белковых субстратов [15–18], так и широкой субстратной и сайт-специфичностью алкалазы [19].

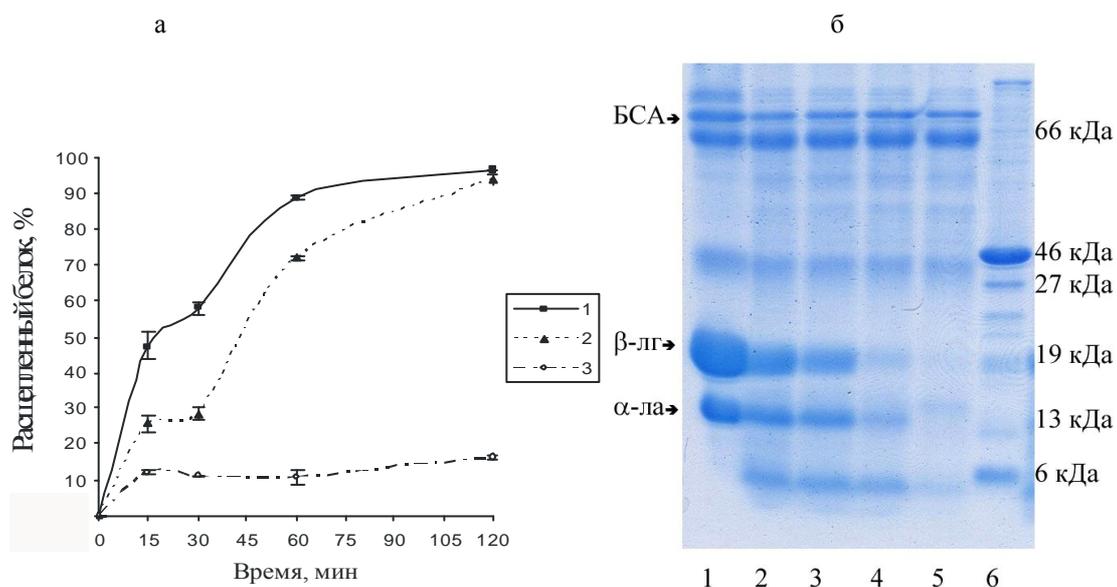


Рисунок – 2 Зависимость степени расщепления β -лг, α -ла и БСА алкалазой от времени: а – β -лг (кривая 1), α -ла (кривая 2), БСА (кривая 3); б – электрофореграмма продуктов гидролиза КСБ алкалазой: 1 – контроль, 0 м; 2 – 15 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин; 5 – 90 мин; 6 – 120 мин; 7 – маркер молекулярных масс

Сравнительный анализ гидролизатов, полученных с использованием алкалазы и трипсина, показал невысокую степень расщепления БСА трипсином и алкалазой, что составляет 15 и 35% соответственно. Но ука-

занные ферменты эффективно гидролизуют β -лг, являющийся главным аллергеном молока, и α -ла, однако трипсин обладает большей субстратной специфичностью к β -лг, чем алкалаза (рис. 1, 2). Кроме того, в гидролизате КСБ, полученном с использованием алкалазы, обнаружено меньшее количество высокомолекулярной белковой фракции β -лг (рис. 1, б, 6; 2, б, 5).

В связи с этим ферментативное расщепление основных сывороточных белков проводили при комплексном воздействии двумя протеазами и других аналогичных условиях. Показано, что в первые 15 мин протеолизу подвергается основная часть β -лг (около 80%) и 25% БСА (рис. 3), тогда как по истечении 2 ч расщепляются около 35% БСА и установлен практически полный гидролиз β -лг на промежуточные пептиды (рис. 3). В случае α -ла в первые 15 мин протеолизу подвергаются около 55% белка, в течение 60 мин – около 90%, а через 2 ч ферментативного процесса практически весь α -ла расщепляется на пептиды с $M_r < 14$ кДа. Очевидно, что с 30 по 120 мин наблюдается дальнейшее расщепление пептидной фракции с $M_r < 6$ кДа (рис. 3, б). Сравнительный анализ гидролизатов КСБ алкалазой и трипсином показал, что при комплексном использовании ферментов характерные для трипсинового гидролизата продукты промежуточного гидролиза с $13 < M_r \leq 6$ кДа расщепляются уже по истечении 60 мин и не обнаруживается специфичная для гидролизата алкалазой фракция с $M_r < 6$ кДа (рис. 3, б).

Таким образом, при совместном гидролизе КСБ алкалазой и трипсином установлено, что уже при 15 мин ферментативной реакции гидролизуется большая часть белкового субстрата β -лг, тогда как α -ла расщепляется комплексом протеаз вплоть до 120-й минуты гидролиза. Кроме того, комплексный протеолиз приводит к практически полному расщеплению как β -лг, так и α -ла на промежуточные пептиды; а также к образованию отличной от наблюдаемой у гидролизатов трипсином и алкалазой пептидной фракции: на поздних стадиях протеолиза алкалазой и трипсином не обнаруживаются характерные пептиды с $M_r < 6$ и $13 < M_r \leq 6$ кДа (рис. 1, б, 2, б, 3, б). В случае гидролиза БСА использование данных сериновых протеаз, а также их комплекса неэффективно. В связи с этим возникла необходимость дополнительной стадии удаления из гидролизатов БСА – фильтрации с использованием фильтров с пропускающей спо-

способностью ≤ 10 кДа. Получены фильтраты гидролизатов КСБ трипсином, алкалазой, а также комплексом протеаз.

Согласно результатам ВЭЖХ, для гидролизатов алкалазой и трипсином характерны специфические профили элюции, а совместное использование сериновых протеаз приводит к наиболее полному удалению высокомолекулярной белковой фракции – БСА и к дальнейшему расщеплению пептидной фракции.

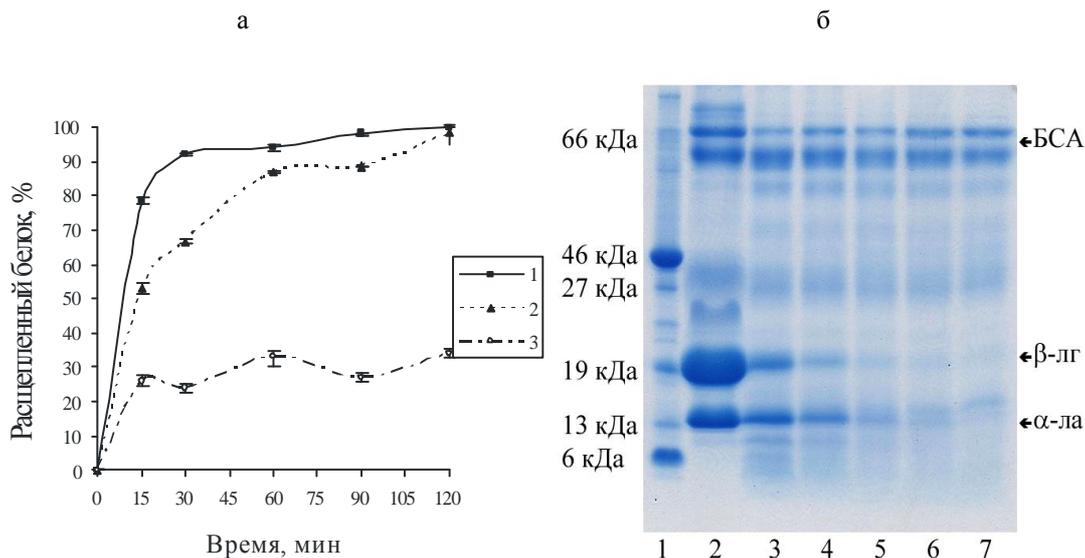


Рисунок – 3 Зависимость степени расщепления β -лг, α -ла и алкалазой и трипсином от времени: а – β -лг (кривая 1), α -ла (кривая 2), БСА (кривая 3); б – электрофореграмма продуктов гидролиза КСБ алкалазой и трипсином: 1 – контроль, 0 м; 2 – 15 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин; 5 – 90 мин; 6 – 120 мин; 7 – маркер молекулярных масс

На втором этапе исследования оценивали аллергенный потенциал полученных гидролизатов. В связи с тем, что ферментативный гидролиз белковых субстратов [5] должен приводить к изменению их антигенных свойств [22], был проведен качественный анализ иммунореактивности как нативного КСБ, так и его гидролизатов трипсином, алкалазой, а также при комплексном воздействии протеаз. Анализ проведен методом двойной радиальной иммунодиффузии в агарозном геле (по Ухтерлони) [12] с использованием кроличьих антител против основных сывороточных белков.

Возникновение преципитата предполагает сохранение у продуктов гидролиза по меньшей мере двух эпитопов, которые при связывании с бивалентными антителами образуют гетеромерный комплекс -[антиген-антитело]-. Сравнительный анализ гидролизатов и их фильтратов трипсином и алкалазой показал наличие остаточного количества не-

расщепленного β -лг и/или сохранившихся бивалентных антигенных детерминант среди продуктов гидролиза, однако в гидролизате, полученном при комплексном гидролизе протеазами, преципитат практически не выявлялся; исследование фильтратов показало, что полученные продукты не способны к образованию иммунных комплексов $-\beta$ -лг-антитело-.

Последующий анализ был направлен на обнаружение иммунных комплексов $-\alpha$ -ла-антитело- и $-\text{BCA}$ -антитело-. Полученные результаты подтвердили сохранение нерасщепленного BCA во всех гидролизатах и необходимость его удаления фильтрацией, тогда как пептидная фракция α -ла на поздних стадиях протеолиза не обладала антигенными свойствами. Согласно реакции иммунопреципитации (по Ухтерлони) получены фильтраты гидролизатов, не содержащие бивалентных антигенных детерминант α -ла и BCA, способных вызвать образование иммунных комплексов.

Для количественной оценки антигенности нативного КСБ и его гидролизатов проведен иммуноферментный анализ, направленный на выявление моновалентных антигенных детерминант. По итогам ИФА установлено, что гидролиз КСБ трипсином, алкалазой и комплексом ферментов позволяет снизить антигенные свойства продуктов гидролиза до $\approx 40\%$; достоверных различий между способностью связывать антитела указанными гидролизатами не выявлено. Однако в результате фильтрации с пропускающей способностью фильтра ≤ 10 кДа была получена пептидная фракция, у которой способность связывать антитела против основных сывороточных белков была снижена в 10–12 раз. В связи с этим фильтраты гидролизатов КСБ представляют собой гипоаллергенный белковый компонент, содержащий фракцию пептидов с $M_r \leq 10$ кДа, для которой методом иммунопреципитации не выявлена способность к образованию иммунных комплексов.

Заключение. Полученные данные о степени протеолиза белковых субстратов при воздействии алкалазой, трипсином, а также комплексом протеаз методами SDS-электрофоретического анализа и ВЭЖХ, иммунохимические исследования ферментативных гидролизатов показали, что совместное использование указанных протеаз приводит к наиболее полному расщеплению высокомолекулярной фракции, содержащей основные аллергены молока – β -лг и α -ла, тогда как удаление негидролизован-

ного БСА достигается последующей фильтрацией ферментативных гидролизатов.

Литература

1. Smithers, G.F. Advances in dairy foods processing and engineering: symposium / G.F. Smithers [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 1996. – Vol. 79. – P. 1454–1459.
2. Cavagni, G. Allergy to cow's milk proteins in childhood: the author's personal experience and new diagnostic and therapeutic proposals / G. Cavagni [et al.] // *Pediatr. Med. Chir.* – 1994. – Vol.16. – № 5. – P. 413–419.
3. Foegeding, E. A. Advances in modifying and understanding whey protein functionality / E. A. Foegeding [et al.] // *Trends in Food Science and Technology*. – 2002. – Vol. 13. – P. 151–159.
4. Wal, J.M. Bovine milk allergenicity / J.M. Wal // *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*. – 2004. – Vol. 93. – P. 2–11.
5. Nakamura, T. Production of low antigenic whey protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis and denaturation with high pressure / T. Nakamura, H. Sado, Y. Syukunobe // *Milchwissenschaft*. – 1993. – Vol. 48. – № 3. – P. 141–144.
6. Mullally, M.M. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digest of whey proteins / M.M. Mullally, H. Meisel, R.J. Fitzgerald // *International Dairy Journal*. – 1997. – Vol. 7. – P. 299–303.
7. Korhonen, H. Impact of processing on bioactive proteins and peptides / H. Korhonen [et al.] // *Trends in Food Science and Technology*. – 1998. – Vol. 9. – P. 307–319.
8. 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 [et al.] // *Nahrung*. – 2002. – Vol. 46. – P. 283–289.
9. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – P. 265–275.
10. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование: практ. пособие / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.

11. Kim, S.B. 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. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. – М.: Мир, 1979. – 518 с.
13. Gjesing, B. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes / B. Gjesing [et al.] // *Allergy.* – 1986. – Vol. 41. – P. 51–56.
14. Haddad, Z.H. IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digest of β -lactoglobulin: significance in food hypersensitivity Z.H. Haddad, V. Kalra, S. Verma // *Ann. Allergy.* – 1979. – Vol. 42. – P. 368–371.
15. Wong, D.W.S. Structures and functionalities of milk proteins / D.W.S. Wong; W.M. Camirand; A.E. Paviath // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 1996. – Vol. 36. – P. 807–844.
16. Papiz, M. Z. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein / M.Z. Papiz // *Nature.* – 1986. – Vol. 324. – P. 383–385.
17. Brew, K. α -lactalbumin / K. Brew, J.A. Grobler // P. Fox, Editor, *Advances in Dairy Chemistry-1.* – Elsevier. – Amsterdam, 1992. – P. 191–229.
18. Peters, T.Jr. Serum albumin / T.Jr. Peters // *Adv. Protein Chem.* – 1985. – Vol. 3. – P. 161–245.
19. 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.
20. Диксон, М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб; пер. с англ. – М., 1982. – С. 370–376.
21. Besler, M. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods / M. Besler, H. Steinhart, A. Paschke // *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* – 2001. – Vol. 756. – P. 207–228.
22. Restani, P. Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas / P. Restani [et al.] // *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* – Vol. 25. – P. 651–658.

T. Halavach, N. Zhabanos, V. Kurchenko
**COMPARATIVE ANALYSIS AND ANTIGENIC PROPERTIES
EVALUATION OF WHEY PROTEINS HYDROLYSATES WITH
SERINE PROTEASES TRYPSIN AND ALCALASE**
Summary

Degree of proteolysis and antigenic properties of whey proteins hydrolysates with application of serine proteases (alcalase and trypsin) and their complex were investigated. At application of both proteases by SDS-PAGE and high performance liquid chromatography the most complete proteolysis of β -lg and α -la to peptides was demonstrated, while deleting of high molecular BSA fraction was achieved by filtration of hydrolysates. By double-immunodiffusion methods for products received with both serine proteases antigenic properties were detected; by ELISA reduction of ability to bind antibodies on 60% was reported. Filtration of hydrolysate provided obtaining of peptide fraction with $M_r \leq 10$ kDa that wasn't able to form immune complexes and had antigenic potential <10%.