

Т.Н. Головач<sup>1,2</sup>, Н.К. Жабанос<sup>1</sup>, к.т.н., В.П. Курченко<sup>2</sup>  
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»<sup>1</sup>,  
Белорусский государственный университет<sup>2</sup>

## 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 –  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -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  $\beta$ -лактоглобулин ( $\beta$ -лг),  $\alpha$ -лактальбумин ( $\alpha$ -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  $\beta$ -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 °C, 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 °C в течение 10 мин, после чего пробы немедленно замораживали при –20 °C 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  $\beta$ -лг. Кроликов иммунизировали  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -лактоглобулин ( $\beta$ -лг),  $\alpha$ -лактальбумин ( $\alpha$ -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  $\beta$ -лг > казеин >  $\alpha$ -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  $\beta$ -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 – Ser<sub>221</sub>, His<sub>64</sub> и Asp<sub>32</sub>, трипсина – Ser<sub>195</sub>, His<sub>57</sub> и Asp<sub>102</sub>, образующие систему переноса заряда [19–20]. Механизм гидролиза сериновыми протеазами включает нуклеофильную атаку Ser<sub>221</sub> (алкалазы):Ser<sub>195</sub> (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 Asp<sub>189</sub>. 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%  $\beta$ -лг и 55%  $\alpha$ -ла, а также 30% БСА (рис. 1). При увеличении продолжительности протеолиза до 120 мин количество расщепленного белков  $\beta$ -лг возрастает незначительно и по результатам SDS-электрофореза составляет менее 95%, тогда как степень протеолиза  $\alpha$ -ла увеличивается до 90%, а БСА – до 35% (рис. 1).

Таким образом, наиболее интенсивный гидролиз белковых субстратов  $\beta$ -лг и БСА трипсином установлен в первые 30 мин, а  $\alpha$ -ла – до 90 мин ферментативного процесса (рис. 1). Кроме того, в данных условиях гидролиза трипсин наиболее эффективно расщепляет  $\beta$ -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).

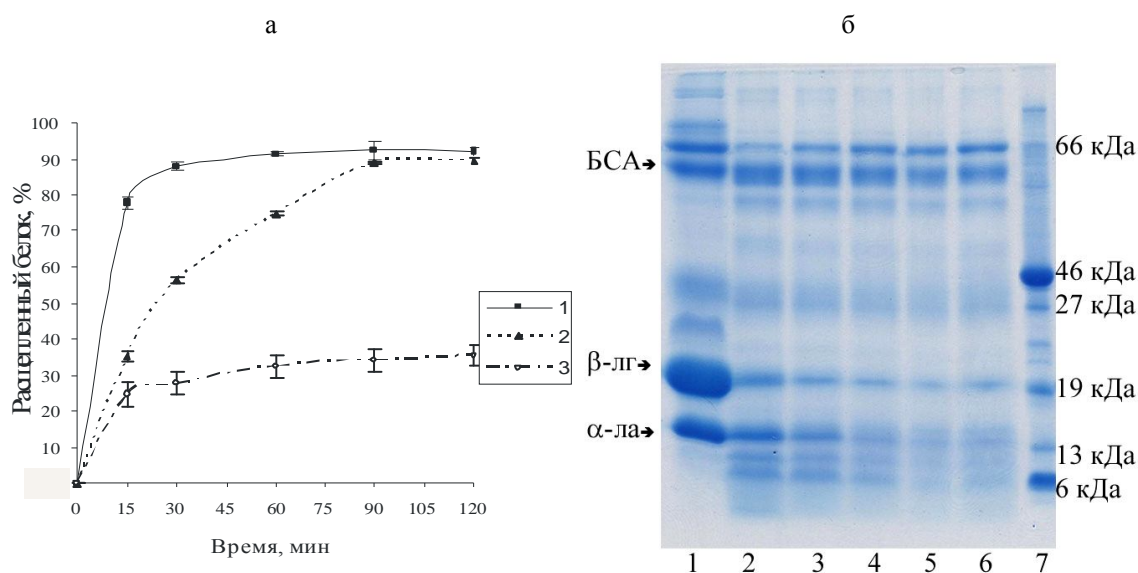


Рисунок – 1 Зависимость степени расщепления  $\beta$ -лг,  $\alpha$ -ла и БСА трипсином от времени: а –  $\beta$ -лг (кривая 1),  $\alpha$ -ла (кривая 2), БСА (кривая 3); б – электрофореграмма продуктов гидролиза КСБ трипсином: 1 – контроль, 0 мин; 2 – 15 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин; 5 – 90 мин; 6 – 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%  $\beta$ -лг, 70%  $\alpha$ -ла и 10% БСА (рис. 2), а после 120 мин на промежуточные продукты расщепляются около 15% БСА, более 95%  $\beta$ -лг и практически весь  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\beta$ -лг и  $\alpha$ -ла, кроме БСА, что можно связать как с конформационными состояниями белковых субстратов [15–18], так и широкой субстратной и сайт-специфичностью алкалазы [19].

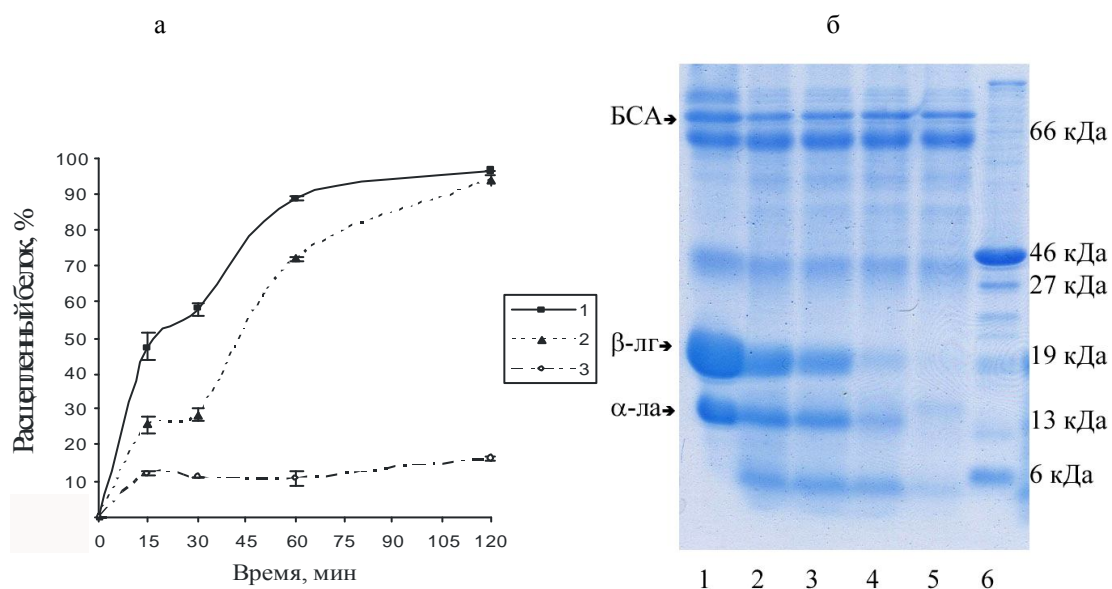


Рисунок – 2 Зависимость степени расщепления  $\beta$ -лг,  $\alpha$ -ла и БСА алкалазой от времени: а –  $\beta$ -лг (кривая 1),  $\alpha$ -ла (кривая 2), БСА (кривая 3); б – электрофореграмма продуктов гидролиза КСБ алкалазой: 1 – контроль, 0 м; 2 – 15 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин; 5 – 90 мин; 6 – 120 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  $\beta$ -лг, являющийся главным аллергеном молока, и  $\alpha$ -ла, однако трипсин обладает большей субстратной специфичностью к  $\beta$ -лг, чем алкалаза (рис. 1, 2). Кроме того, в гидролизате КСБ, полученном с использованием алкалазы, обнаружено меньшее количество высокомолекулярной белковой фракции  $\beta$ -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  $\beta$ -лг (около 80%) и 25% БСА (рис. 3), тогда как по истечении 2 ч расщепляются около 35% БСА и установлен практически полный гидролиз  $\beta$ -лг на промежуточные пептиды (рис. 3). В случае  $\alpha$ -ла в первые 15 мин протеолизу подвергаются около 55% белка, в течение 60 мин – около 90%, а через 2 ч ферментативного процесса практически весь  $\alpha$ -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  $\beta$ -лг, тогда как  $\alpha$ -ла расщепляется комплексом протеаз вплоть до 120-й минуты гидролиза. Кроме того, комплексный протеолиз приводит к практически полному расщеплению как  $\beta$ -лг, так и  $\alpha$ -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  $\leq 10$  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.

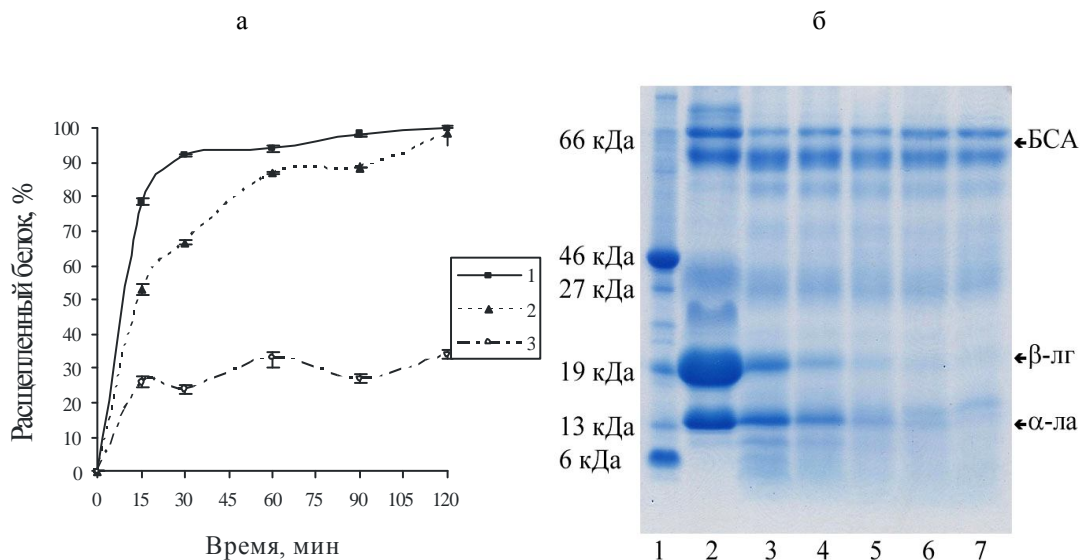


Рисунок – 3 Зависимость степени расщепления  $\beta$ -лг,  $\alpha$ -ла и алкалазой и трипсином от времени: а –  $\beta$ -лг (кривая 1),  $\alpha$ -ла (кривая 2), БСА (кривая 3); б – электрофореграмма продуктов гидролиза КСБ алкалазой и трипсином: 1 – контроль, 0 м; 2 – 15 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин; 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  $\beta$ -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  $\alpha$ -ла на поздних стадиях протеолиза не обладала антигенными свойствами. Согласно реакции иммунопреципитации (по Ухтерлони) получены фильтраты гидролизатов, не содержащие бивалентных антигенных детерминант  $\alpha$ -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  $\leq 10$  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 –  $\beta$ -лг и  $\alpha$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein / M.Z. Papiz // *Nature.* – 1986. – Vol. 324. – P. 383–385.
17. Brew, K.  $\alpha$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lg and  $\alpha$ -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%.