

А. Шаафсма, А.А. Давыдовская, Т.И. Гаранкина, С.Г. Грибакин

Компания «ФризлендКампина», Москва, Российская Федерация - Лееварден, Нидерланды

Переносимость детских молочных смесей и проблема качественного состава белка

Contacts:

Gribakin Sergey Germanovich, PhD, MD, professor, scientific consultant of a company "FrieslandCampina"

Address: 115320, Moscow, Varshavskoye Shosse, 42, bldg. 3, Tel.: (495) 775-25-08, e-mail: gribakin@anika-ru.ru

Article received: 20.12.2012, Accepted for publication: 01.02.2013

Процесс производства детских молочных смесей является сложным и многоступенчатым и включает этапы термической обработки. Имеются сведения о том, что разные режимы термической обработки оказывают влияние на структуру белково-углеводных комплексов, что может повлиять на степень усвоения белка смеси. Показано, что контакт сложных белковых агрегатов смеси с клетками пейеровых бляшек повышает риск развития аллергических реакций у предрасположенных к атопии детей раннего возраста. Рассматривается влияние денатурации белка детских молочных смесей на их переносимость.

Ключевые слова: детское питание, переносимость, денатурация белка, пищевая аллергия.

(Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (1): 93–97)

93

Естественное вскармливание является «золотым стандартом» для питания детей первого года жизни. При невозможности или недоступности грудного вскармливания детские молочные смеси (ДМС) служат основным источником белков для новорожденных. При производстве ДМС используют различные режимы тепловой обработки, которые оказывают воздействие на структуру молочных белков. Однако влияние этих структурных изменений на процессы переваривания молочных белков и роль биоактивных пептидов, которые появляются в просвете кишечника, до недавнего времени были мало изучены.

Температурную обработку широко применяют в молочной промышленности для обеспечения безопасности и увеличения продолжительности сроков хранения молочных продуктов. При производстве ДМС воздействие температуры может приводить к взаимодействию различных компонентов молочной основы

с образованием соединений, известных как «продукты реакции Майара». Эти комплексные соединения могут оказывать негативное влияние на организм ребенка [1].

Физиологическое пищеварение — довольно сложный процесс, в котором сочетаются скорость эвакуации пищи из желудка, процессы переваривания и всасывания в тонкой кишке и особенности формирования и ферментативной активности кишечной микробиоты в толстой кишке [2–4].

За последние несколько лет проведено 2 крупномасштабных социологических исследования, целью которых было сравнительное изучение переносимости наиболее известных марок детских молочных смесей. Исследования были выполнены в европейских странах и основаны на подробном анкетировании как медицинских работников, так и родителей. Врачи и родители ответили на ряд вопросов о том, как переносится ребен-

A. Shaafsma, A.A. Davydovskaya, T.I. Garankina, S.G. Gribakin

«FrieslandCampina», Moscow, Russian Federation - Leeuwarden, the Netherlands

Tolerance of milk formulas for infants and the problem of qualitative protein composition

The process of milk formulas for infants production is complex and multistage and includes the thermal processing. There is data, that different regimens of thermal processing influence on the structure of the protein-carbohydrate complexes, which can affect the formula's protein uptake. It was shown, that interaction between complex protein units of the formula and the cells of the Peyer's patches increased the risk of allergic reactions development in infants with predisposition to atopy. The influence of denaturation of milk formulas on the tolerance of them is discussed in this article.

Key words: infant food, tolerance, protein denaturation, alimentary allergy.

(Voprosy sovremennoi pediatrii — Current Pediatrics. 2013; 12 (1): 93–97)

ком та или иная ДМС, как часто кормление смесью сопровождается наличием срыгиваний, кишечных колик, функциональных запоров или разжиженного стула. Иными словами, насколько успешно различные ДМС перевариваются и усваиваются (что по-английски обозначается как *easy in, easy out*).

В обоих исследованиях было отмечено, что ДМС марки «Фрисо» оказывают более выраженный благоприятный эффект и вызывают меньшее число нежелательных воздействий по сравнению с другими марками ДМС в плане влияния на частоту и консистенцию стула и выраженность функциональных нарушений пищеварения.

Поскольку химический состав различных смесей сходен, возникает закономерный вопрос: чем же можно объяснить значительные различия в показателях перевариваемости и переносимости продуктов?

В последнее время внимание исследователей вновь привлекли процессы денатурации белка, хотя об изменении свойств различных белковых молекул при температурной обработке и возможном взаимодействии белков с другими компонентами, присутствующими в составе молока и молочных продуктов, было известно достаточно давно [5, 6].

ЧТО ОЗНАЧАЕТ «ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКА»

Под термином «денатурация белков» понимают изменение нативной пространственной структуры макромолекулы, приводящее к утрате природных свойств белка. Другими словами, происходит конформационное изменение молекул с нарушением четвертичной, третичной и вторичной структуры [7–9]. Глубина нарушения нативной структуры белка зависит от природы денатурирующего агента, типа белка, окружающей среды и т.д.

В результате денатурации изменяются многие физико-химические свойства белка: растворимость, константа седиментации, вязкость, оптические, электрохимические свойства и др. Денатурацию белков вызывают как некоторые химические соединения, так и физические факторы. К последним относится и нагревание. В процессе тепловой денатурации компонента свернутая молекула белка превращается в «беспорядочный клубок». Основные изменения во вторичной, третичной и четвертичной структуре белка, которые не сопровождаются разрывом белковой молекулы, получили название «денатурация белка».

Природная структура белков является термодинамически наиболее стабильной и образуется при строго определенных физиологических условиях, придавая молекуле белка вне- и внутримолекулярные притягивающие и отталкивающие силы [10, 11]. Однако различные внешние факторы, такие как температура, давление или химические воздействия, способны оказывать влияние на природную структуру белковой молекулы.

Как правило, глобулярные белки могут находиться только в двух состояниях: нативном и полностью денатурированном (развернутом). Некоторые из них (α -лактальбумин) при тепловой денатурации переходят в промежуточное компактное состояние, которое сочетает в себе характеристики нативного и полностью денатурированного (развернутого) состояния. Промежуточное состояние белка характеризуется близкими к нативным размерам молекулы и содержанием вторичной структуры при отсутствии нативной пространственной (третичной структуры).

Денатурация глобулярных белков приводит к последующей агрегации их молекул, сопровождаемая потерей растворимости и утратой других функциональных свойств [12, 13].

ДМС производят из растворенных в водной фазе сывороточных белков и казеинов с различным содержанием сухого вещества, а образовавшийся молочный концентрат в процессе производства подвергается серии температурных воздействий и только после этого поступает на распылительную сушку, после чего получается готовый продукт. В процессе производства ДМС используют более 60 ингредиентов, включая витамины, минеральные вещества и др. [14, 15].

Термическая обработка молока приводит к образованию белковых комплексов — агрегатов, которые более устойчивы к перевариванию, чем те нативные белки, из которых образовались эти комплексы. В исследовании D. Dupont и соавт. [16] было изучено влияние двух основных технологических параметров (процентное содержание сухого вещества в молочном концентрате перед термической обработкой и интенсивность теплового воздействия) на степень резистентности белков-казеинов к перевариванию в условиях физиологической модели.

На первом этапе исследования методом распылительной сушки было произведено 6 образцов обезжиренной молочной основы с содержанием сухих веществ 25 или 35%. Эти образцы сухого молочного концентрата подвергали 3 режимам температурной обработки, которые обычно используют при производстве ДМС: 80°C в течение 20 с, 85°C/180 с или 105°C/60 с. После тщательного качественного изучения этих 6 образцов (с определением размера частиц, состава и т.д.) и не прошедшего температурной обработки контрольного образца все они были подвергнуты перевариванию *in vitro* в условиях, которые максимально соответствовали процессам пищеварения в желудочно-кишечном тракте ребенка.

Пептиды, резистентные к перевариванию, были идентифицированы при помощи масс-спектрометрии. Оказалось, что режим температурного воздействия на образцы молока перед распылительной сушкой оказывает большое влияние на резидуальную иммунореактивность молекул казеина, остающихся после переваривания. Наиболее резистентными к перевариванию оказались те участки белковых молекул, которые обладают высокогидрофобными свойствами.

Эти результаты, изначально полученные на модели обезжиренного молока, впоследствии были подтверждены и на более сложных, включая жидкие молочные, пищевых продуктах. Выяснилось также, что термическая обработка в разной степени повышает резистентность к перевариванию различных казеиновых доменов. В большей степени резистентность к перевариванию приобретают гидрофобные домены, которые становятся менее восприимчивыми к воздействию пищеварительных ферментов. Наряду с ними наибольшую резистентность в пищеварительном тракте имеют соединения, образующиеся в ходе взаимодействия разных пищевых веществ, а именно продукты гликозилирования и фосфорилирования.

КАКОЕ ПИЩЕВАРИЕ СЧИТАТЬ ОПТИМАЛЬНЫМ?

Грудное молоко принято считать оптимальным продуктом для стимуляции адекватного пищеварения у маленьких детей [3, 4]. Оно имеет неповторимый белковый состав, а также содержит гормоны и ферменты, участвующие

щие в пищеварении. В грудном молоке присутствует небольшое количество белка, подвергшегося гликации и денатурации, а состав грудного молока варьируется как в процессе одного кормления (в переднем молоке содержится больше белка, в заднем — больше жиров), так и в течение дня (в вечерних порциях по сравнению с утренними количество жира повышается, а белка — снижается).

Эти изменения состава оказывают влияние на эвакуаторную функцию желудка: первоначальный более быстрый пассаж (преобладание растворимого белка) сменяется на более медленный, когда возрастает концентрация жира.

Очень важно, что растворимые белки, первыми проходящие желудочную фазу пищеварения, столь же быстро всасываются и метаболизируются, стимулируя также чувство насыщения. Это служит объяснением того, что дети, находящиеся на свободном вскармливании («по требованию»), едят более часто и меньшими порциями.

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКА НА ПЕРЕНОСИМОСТЬ ДЕТСКОЙ МОЛОЧНОЙ СМЕСИ

По сравнению с теми процессами, которые происходят при грудном вскармливании, применение ДМС может привести к ряду проблем. Слишком высокая степень денатурации белка и последующее образование белково-жировых компонентов — агрегатов (что, в свою очередь, зависит от качества исходного сырья и от степени температурной обработки смеси в процессе производства) — замедляют скорость эвакуации белковых фракций из желудка [17, 18]. Это может привести к чувству дискомфорта и обусловить срыгивания (гастроэзофагеальный рефлюкс).

Если желудочная фаза пищеварения происходит слишком быстро (при небольшой скорости образования белково-жировых комплексов), это может приводить к высокой степени ферментации белка и последующему вздутию живота, а в ряде случаев — к осмотической диарее.

При производстве ДМС невозможно воспроизвести те особенности (неоднородность состава и в одном кормлении, и в течение дня), которые характерны при естественном вскармливании: непреодолимыми трудностями при этом являются, например, неоднородность состава подобного продукта, возможное подозрение на испорченный продукт и т. д. К тому же для этого потребовались бы бутылочка и соска специальной конструкции, позволяющие сначала «пропустить» белки, и только потом — жиры.

В реальности ДМС содержат равномерное количество жира в течение всего кормления. В результате происходит преципитация/коагуляция белково-жирового сгустка в желудке, которая сопровождается его медленным транспортом в тонкую кишку. Денатурированные белки в большей степени предрасположены к взаимодействию с жирами с образованием соединений-агрегатов. Степень денатурации белков и их взаимодействие с жирами в результате образования таких комплексов могут влиять на скорость пассажа частично расщепленных белков через желудок и, соответственно, на последующую фазу их переваривания и усвоения в тонкой кишке. Гликация белков тормозит их полный гидролиз, вследствие чего часть не полностью расще-

пленных гликированных белков/полипептидов достигает дистальных отделов тощей кишки и полости толстой кишки, где подвергается ферментации присутствующими там микроорганизмами. Это приводит к изменению баланса общей кишечной микробиоты в менее благоприятном направлении, с преобладанием протеолитических бактерий.

Гликирование в комбинации с денатурацией способно приводить к образованию трудноперевариваемых агрегатов [19, 20]. Более того, мелкие фрагменты таких комплексов способны проникать в пейеровы бляшки и тем самым миновать кишечный барьер [21, 22]. В результате они могут вступать во взаимодействие с иммунной системой и вызывать сенсibilизацию к этим белковым фрагментам. Впоследствии при особых условиях (повышенная проницаемость кишечного барьера, пиноцитоз) повторный контакт с нативным белком на фоне уже имеющейся сенсibilизации может привести к развитию аллергической реакции [23–28].

ПУТИ РЕШЕНИЯ ВОПРОСА

Каким образом можно оптимизировать переваривание и усвоение белка в составе ДМС? Это можно достигнуть путем высокого качества переваривания белка, т.е. необходим контроль процесса гликозилирования и денатурации белка, который происходит во время технологической обработки белка для уменьшения степени взаимодействия между жиром и белком, а также между сывороточным белком и казеином [29–32].

Хотя денатурация белка (начальная фаза переваривания) направлена на улучшение пищеварения, сам процесс денатурации при взаимодействии с другими пищевыми веществами может приводить к образованию структур, которые снижают скорость эвакуации пищи из желудка (образование сгустка) и становятся более трудно перевариваемыми (отчасти утрачивая соответствие пищеварительным ферментам) [33, 34].

При наличии больших количеств денатурированного белка большая его часть достигает толстой кишки. Напротив, уменьшение степени денатурации белка способно обеспечить хороший баланс между эвакуаторной функцией желудка и протеолитической способностью тонкой кишки. Такие методы, как FAST и HPLC (жидкостная хроматография высокого разрешения), позволяют получить информацию об уровне денатурации белка в конечном продукте [35, 36]. По результатам исследования FAST, продукты «Фрисо» имеют наиболее благоприятные показатели.

Гликация белка может происходить в процессе термической обработки белков и при их взаимодействии с углеводами и другими соединениями. Процесс гликации протеинов сопровождается приобретением ряда негативных свойств, которые следует ограничивать. Отражением степени гликозилирования является концентрация фурина в смеси. В продуктах «Фрисо» эти концентрации ниже, чем в других ДМС, что сопровождается благоприятной эвакуаторной функцией желудка, более быстрым перевариванием белка, меньшим количеством резидуальных количеств белка, попадающих в толстую кишку. Это оказывает меньшее негативное влияние на состав кишечной микрофлоры. Следовательно, такое переваривание белка снижает риск перекармливания и наиболее близко к эффекту при грудном вскармливании.

REFERENCES

- Sebekova K., Somoza V. Dietary advanced glycation end products (AGEs) and their health effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51: 1079–1084.
- Digestive system of child, its maturation and development. In a book: Guideline on children's nutrition. Edited by Tutelyan V.A., Kon I.Ya. Moscow: MIA. 2004. Pp. 28–51.
- National Program "Optimization of infants' nutrition in Russian Federation". Moscow: Union of pediatricians of Russia. 2011. 112 pp.
- Principles of nutrition of immature and newborn children. Moscow: Soyuzmedinfo. 1989. 52 pp.
- Izmaylova V.N., Rebinder P.A. Formation of structures in protein systems. Moscow: Nauka. 1974. 265 pp.
- Gorbatova K.K. Chemistry and physics of milk proteins. Moscow: Kolos. 1993. 126 pp.
- Smyth E., Clegg R.A., Holt C. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles *Int. J. Dairy Technol.* 2004; 57: 121–126.
- Rytönen J., Valkonen K.H., Virtanen V., Foxwell R.A., Kyd J.M., Cripps A.W., Karttunen T.J. Enterocyte and M-cell transport of native and heat-denatured bovine beta-lactoglobulin: significance of heat denaturation. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 1500–1507.
- Besler M., Steinhart H., Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2001; 756: 207–228.
- Dupont D., Mandalari G., Molle D., Jardin J., Rolet-Repecaud O., Duboz G., Leonil J., Mills E.N.C., Mackie A.R. Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010; 54: 1677–1689.
- Davis P.J., Smales C.M., James D.C. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins. *Allergy.* 2001; 56: 56–60.
- Czerwenka H., Maier I., Pittner F., Lindner W. Investigation of the lactosylation of whey proteins by liquid chromatography — mass spectrometry. *J. Agric. Food Sci.* 2006; 54: 8874–8882.
- Scaloni A., Perillo V., Franco P., Fedele E., Froio R., Ferrara L., Bergamo P. Characterization of heat-induced lactosylation products in caseins by immunoenzymatic and mass spectrometric methodologies. *Biochem. Biophys. Acta.* 2002; 1998: 30–39.
- Floris R., Lambers T., Alting A., Kiers J. Trends in infant formulas: a dairy perspective. In: Griffiths M.W. (ed.). Improving the safety and quality of milk. Vol. 2: improving quality in milk products. Woodhead, Cambridge. 2007. P. 454–474.
- Thompson D.K., Kharb S. Aspects of infant food formulation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2007; 6: 79–102.
- Dupont D., Boutrou R., Menard O., Jardin J., Tanguy G., Schuck P., Haab B.B., Leonil J. Heat treatment of milk during powder manufacture increases casein resistance to simulated infant digestion. *Food Dig.* 2010; 1: 28–39.
- Boutrou R., Jardin J., Blais A., Tome D., Leonil J. Glycosylations of k-casein-derived caseinomacropptide reduce its accessibility to endo- but not exo- intestinal brush border membrane peptidases. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 8166–8173.
- Boutrou R., Coirre E., Jardin J., Leonil J. Phosphorylation and coordination link of mineral inhibit the hydrolysis of the casein (1–25) peptide by intestinal brush-border membrane enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58 (13): 7955–7961.
- Marvin L.F., Parisod V., Fay L.B., Guy P.A. Characterization of lactosylated proteins of infant formula powders using two-dimensional gel electrophoresis and nanoelectrospray mass spectrometry. *Electrophoresis.* 2002; 23: 2505–2512.
- Luz Sanz M., Corzo-Martinez M., Rastall R.A., Olano A., Moreno F.J. Characterization and in vitro digestibility of bovine α -lactoglobulin glycosylated with galactooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 7916–7925.
- Fujita M., Baba R., Shimamoto M., Sakuma Y., Fujimoto S. Molecular morphology of the digestive tract; macromolecules and food allergens are transferred intact across the intestinal absorptive cells during the neonatal-suckling period. *Med. Mol. Morphol.* 2007; 40: 1–7.
- Bischoff S.C., Mayer J.H., Manns M.P. Allergy and the gut. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2000; 121: 270–283.
- Besler M., Steinhart H., Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr. Biomed. Sci.* 2001; 756: 207–228.
- Mills E.N., Breiteneder H. Food allergy and its relevance to industrial food proteins. *Biotechnol. Adv.* 2005; 23: 409–414.
- Guyomarc'h F., Law A.J., Dalgleish D.G. Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 4652–4660.
- Lowe E.K., Anema S.G., Bienvenue A., Boland M.J., Creamer L.K., Jimenez-Flores R. Heat-induced redistribution of disulfide bonds in milk proteins. 2. Disulfide bonding patterns between bovine beta-lactoglobulin and kappa-casein. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 7669–7680.
- Patel H.A., Singh H., Anema S.G., Creamer L.K. Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 3409–3420.
- Roth-Walter F., Berin M.C., Arnaboldi P. Pasteurisation of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy.* 2008; 63 (7): 882–890.
- Bischoff S.C., Mayer J.H., Manns M.P. Allergy and the gut. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2000; 121: 270–283.
- Breiteneder H., Mills E.N. Molecular properties of food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 14–23.
- Wal J.M. Bovine milk allergenicity. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2004; 93: 2–11.

32. Teufel M., Biedermann T., Rapps N., Hausteiner C., Henningsen P., Enck P., Zipfel S. Psychological burden of food allergy. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13: 3456–3465.
33. Sun H.S., Hill Park J., Won K.S. Determination of proteins in infant formula by high-performance liquid chromatography — electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatography.* 2007; 845: 69–73.
34. Seiquer I., Diaz-Alguacil J., Delgado-Andrade C., Lopez-Frias M., Munoz Hoyos A., Galdo G., Navarro M.P. Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11–14 y. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83: 1082–1088.
35. Birlouez-Aragon I., Nicolas M., Meyais A., Marchond N., Grenier J., Calvo D. A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk. *Int. Dairy J.* 1998; 8:771–777.
36. Birlouez-Aragon I., Leclere J., Ruedraogo C.L., Birlouez E., Grougnet J.F. The FAST method, a rapid approach of the nutritional quality of heat-treated foods. *Nahrung.* 2001; 45: 201–205.