

BARBARA WRÓBLEWSKA, LUCJAN JĘDRYCHOWSKI, MAREK FARJAN

JAKOŚĆ HYDROLIZATÓW BIAŁEK MLEKA KROWIEGO W ASPEKCIE PRODUKCJI ODŻYWEK HYPOALERGICZNYCH

Streszczenie

Celem badań było obniżenie poziomu immunoreaktywności białek mleka krowiego, obecnych w preparatach WPC-65 (α -laktoalbuminy i β -laktoglobuliny) i kazeinianu sodu (α -, β -, κ -kazeiny) pod wpływem hydrolizy enzymatycznej przeprowadzonej z wykorzystaniem Alkalazy 2.4 L f-my Novo Nordisk (*Bacillus licheniformis*), pronazy – (proteaza ze *Streptomyces griseus*), papainy – EC 3.4.22.2, pepsyny (E.C. 3.4.23.1) (Sigma), a także LactozymuTM3000 L HPG (Novo Nordisk).

Analizę uzyskanych produktów przeprowadzono, stosując następujące metody analityczne: ELISA, elektroforeza 2D i immunoblotting, rozdziały chromatograficzne, analiza sensoryczna i spektroskopia masowa. Porównano działanie immunoreaktywne wybranych hydrolizatów i handlowo dostępnych odżywek (Profylac i Nutramigen), wykorzystując surowice chorych na alergią spowodowaną spożyciem mleka krowiego.

Stwierdzono możliwość uzyskania hypoalergennego produktu na bazie niskocząsteczkowej frakcji hydrolizatu Alkalazowo-pronazowego białek serwatkowych WPC-65.

Słowa kluczowe: alergia, hydroliza enzymatyczna, mleko krowie, immunoreaktywność

Wprowadzenie

Białka serwatkowe mleka krowiego i kazeina są podstawowym surowcem do produkcji ukierunkowanych odżywek dla chorych wymagających specjalnej diety. Najliczniejszą grupę wśród takich osób stanowią pacjenci cierpiący na alergię pokarmową spowodowaną spożyciem mleka. Obecnie szacuje się, że 1,9 do 4,4% populacji dziecięcej świata cierpi na alergię pokarmową wywołaną spożyciem mleka krowiego. W Polsce alergia na białko mleka krowiego występuje u 2,7% niemowląt karmionych sztucznie i u 1,8% karmionych naturalnie [8].

Często zdarza się, że alergii na mleko towarzyszy nietolerancja laktozy, czego przyczyną jest niedobór laktazy (β -D-galaktozydazy). Badania Woś i wsp. [13] wska-

zują, że nietolerancja laktozy występuje u 40% dzieci, u których wcześniej stwierdzono alergię na białka mleka krowiego.

Hydroliza enzymatyczna białek mleka to najczęściej stosowana modyfikacja podczas produkcji odżywek hypoalergiczných. Dochodzi wówczas do rozerwania niektórych wiązań peptydowych w obrębie sekwencji epitopów konformacyjnych. Możliwość ścisłej kontroli warunków procesu proteolizy pozwala na otrzymywanie produktów o określonym i przewidywalnym stopniu hydrolizy, pożądaných masach cząsteczkowych poszczególných frakcji oraz określonej zawartości wolnych aminokwasów. Zasadniczą wadą metody jest powstawanie peptydów o gorzkim smaku, nadających specyficzne cechy sensoryczne, trudne do zaakceptowania.

Podjęte badania miały na celu uzyskanie hydrolizatu białkowego o obniżonym stopniu alergizacji, mogącego stanowić składnik odżywki hypoalergicznę dla dzieci atopowych.

Material i metody badań

Do badań użyto preparatu białek serwatkowych WPC-65 oraz kazeinianu sodu, pochodzących z firmy Laktopol w Suwałkach. W celu przeprowadzenia hydrolizy białek mleka zastosowano: pronazę – EC 3.4.24.31 (proteaza ze *Streptomyces griseus*, Sigma P 8811), Alkalazę 2,4 L FG f-my Novo Nordisk (proteaza z *Bacillus licheniformis*), papainę – EC 3.4.22.2 (Sigma P 3375), pepsynę - E.C. 3.4.23.1, (Sigma P 7000) oraz Lactozym™3000 L HPG (Novo Nordisk) obniżający zawartość laktozy, cukru wywołującego nietolerancję pokarmową. Proces hydrolizy prowadzono wg metodyki przedstawionej we wcześniejszych pracach [14, 15, 16].

Rozdział hydrolizatów preparatów białek serwatkowych i kazeinianu sodu z użyciem żelu Sephadex G-75

W chromatografii żelowej zastosowano kolumnę chromatograficzną (85 cm x 3 cm) o objętości 600 ml, firmy Pharmacia LKB (Uppsala, Szwecja), wypełnioną żelem Sephadex G-75. Na szczyt kolumny nanoszono próbę o stężeniu 70 mg/ml. Eluat zbierano po 5 ml do probówek umieszczonych w kolektorze frakcji (Pharmacie LKB-FRAC-100, Uppsala, Szwecja). Absorbancję mierzono przy długości fali 214 i 280 nm w aparacie Spectrophotometer Dn 7500 (Beckman).

Chromatografia frakcji hydrolizatów o masach cząsteczkowych poniżej $14,4 \cdot 10^3 Da$ w systemie FPLC z użyciem kolumny Superdex™ Peptide HR 10/30

Rozdział wykonywano na kolumnie Superdex™ Peptide HR 10/30 (firmy Amersham Pharmacia Biotech) z użyciem zestawu do FPLC (Pharmacia LKB Pump P-500, Controller LCC-501 Plus). Próby przed naniesieniem na szczyt kolumny filtrowano przez filtry Millex® GV (firmy Millipor) o średnicy porów 0,22 μm. Rozdział pro-

wadzano z szybkością 0,2 ml eluatu na min, a absorbancję odczytywano przy długości fali 214 nm.

Dwukierunkowa elektroforeza (IEF oraz SDS-PAGE), KEKI, Budapeszt

Pierwszy kierunek rozdziału białek (IEF) prowadzono w żelu w gradiencie pH, na pasku IPG (nakładano 0,7-0,9 mg próby na każdy pasek). Próby były rozpuszczane w 250 µl buforu rehydracyjnego (8 mol/L mocznik, 1% CHAPS, 20 mmol/l DTT), [4, 12]. Rozdział prowadzono w urządzeniu pHaser do izoelektrofokusingu (Bio-Rad PROTEAN IEF Cell). Po osiągnięciu równowagi, pasek inkubowano w 1,5 ml roztworu 6 mol/l mocznik, 375 mmol/l Tris, 130 mmol/l DTT, 2% SDS, 20% glicerolu i delikatnie wytrząsana przez 10 min, w temp. pokojowej, a następnie wykonywano rozdział białek w drugim kierunku metodą SDS-PAGE w żelu cienkowarstwowym (75 mm x 83 mm x 1,5 mm) w aparacie Mini-protean II-cell. Stężenie akrylamidu w żelu rozdzielającym wynosiło 15%. Po zakończeniu rozdziału, żełe przemyto 20% roztworem TCA i barwiono barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250. Żele skanowano stosując system Gel Doc 2000.

Oznaczanie zawartości immunoreaktywnych białek serwatkowych i kazeinianu sodu metodą COMPETITIVE ELISA.

Mikro płytki opłaszczano roztworem antygeny o stężeniu 1 µg/ml w buforze węglanowym o pH 9,6 w ilości 100 µl/studzienkę, a następnie inkubowano 60 min w temp. 37°C. Po tym czasie płukano 0,9% roztworem NaCl w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,5 z 0,05% dodatkiem Tween-20 (PBS-T). Po każdym etapie metody ELISA stosowano inkubację mikro płytek w temp. 37°C i trzykrotne przemycie roztworem PBS-T. Następnie wprowadzano do studzienek po 150 µl 1,5% roztworu żelatyny w PBS-T i inkubowano 30 min w temp. 37°C. Kolejnym etapem było równoczesne wprowadzenie do każdej ze studzienek 50 µl badanych antygenów, bądź standardu i 50 µl roztworu surowicy króliczej zawierającej specyficzne przeciwciała. Następnie podawano 100 µl koniugatu koziej przeciwo króliczej IgG znaczonej peroksydazą chrzanową.

Oznaczając poziom specyficznej IgE na tym etapie analizy dodawano do studzienek ludzką surowicę w rozcieńczeniu 1:2, prowadzono inkubację 2 h, a następnie dodawano biotynylowany koniugat poliklonalnej antyludzkiej surowicy IgE (1:5000), (Nordic Immunology). W dalszej kolejności dodawano 100 µl streptawidyny skoniugowanej z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:100 (Nordic Immunology).

Ciąg dalszy w obydwu rodzajach analizy był taki sam. Po kolejnej inkubacji i przemyciu mikro płytki, dodawano substrat (100 µl roztworu 3,3',-5,5'-tetrametylobenzidyny, TMB) w buforze fosforanowo-cytrynowym, pH 5,5. Po 30-minutowej inkubacji reakcję enzymatyczną zatrzymywano dodając 2 M roztwór kwasu

siarkowego (50 µl/studzienka). Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm stosując czynnik „Sunrise” firmy Tecan.

Ocena sensoryczna wybranych hydrolizatów

Do badań przygotowano 1% roztwory hydrolizatów WPC w wodzie destylowanej. Z badań sensorycznych wyłączono hydrolizaty kazeinowe, ze względu na wyraźny gorzki smak. Ocena sensoryczną wykonywano metodą ilościowej analizy opisowej (Quantitative Descriptive Analysis–QDA) [2, 9] w laboratorium sensorycznym, spełniającym wymagania określone normą ISO 8589 [6]. Do oszacowania wyników zastosowano skomputeryzowany system wspomagania analiz sensorycznych ANALSENS.

Analiza białek mleka przy zastosowaniu spektrometrii mas wykonana w Zakładzie Biochemii Żywności, UWM, Olsztyn

Masy cząsteczkowe uzyskanych preparatów hydrolizowanych białek analizowano w trybie liniowym za pomocą spektrometru mas, typu Ettan MALDI-ToF Pro (Amersham Biosciences), stosując jako matrycę kwas sinapinowy (Amersham) w roztworze 50% acetonitrylu i 0,1% kwasu trifluorooctowego. Do kalibracji zewnętrznej wykorzystano α -laktoalbuminę (SIGMA). Teoretyczne masy cząsteczkowe wyliczono na podstawie sekwencji aminokwasowej, korzystając z programu pI/MW, dostępnego na stronie <http://www.expasy.org>.

Wyniki i dyskusja

Dostępna aktualnie na rynku oferta odżywek dla alergików charakteryzuje się resztkową aktywnością alergenną i antygenową [11]. W publikacji Giampietro [3] dotyczącej hypoalergicznymi odżywek podkreślono, że żadna z dotychczas opracowanych i znajdujących się w sprzedaży odżywek nie jest całkowicie bezpieczna, oprócz mieszaniny aminokwasów. Współczesne badania skupiają się więc na wskazaniu granicznej wartości masy cząsteczkowej peptydów, które wchodziłyby w skład standaryzowanej mieszanki hypoalergicznej i nie inicjowały reakcji alergicznej poprzez wiązanie przeciwciał klasy IgE. Duże możliwości technologiczne stwarza hydroliza enzymatyczna białek.

Ocena surowca za pomocą analizy spektralnej

Mleko jest bardzo rozbudowaną matrycą żywnościową o licznych interakcjach występujących pomiędzy poszczególnymi składnikami. Współczesne techniki badawcze, takie jak np. spektroskopia masowa, pozwalają w pełni zaobserwować niektóre wzajemne powiązania pomiędzy białkami, cukrami, tłuszczami i innymi substancjami o mniejszym znaczeniu technologicznym, ale bardzo dużym wpływie na organizm ludzki.

Stwierdzono, że surowiec wybrany do produkcji hydrolizatów (WPC-65) jest bogatym zbiorem glikoprotein (białka skoniugowane z laktozą lub heksozą), które niewątpliwie stanowią duże zagrożenie alergenne. Na podstawie analizy mas cząsteczkowych wykazano obecność 15 glikoprotein w zakresie mas cząsteczkowych od 14519,767 do 19251,765 Da (tab. 1). W pracy dotyczącej zastosowania spektrometrii masowej do monitorowania jakości mleka, Siliciano i wsp. [10] zwracają szczególną uwagę na fakt pojawiania się laktozylowanych białek, które reagują w sposób zbliżony do haptenu, powodując wzrost aktywności alergennej poszczególnych białek.

Tabela 1

Masy cząsteczkowe białek i glikoprotein scharakteryzowane w składzie surowca białek serwatkowych użytych do produkcji hydrolizatów, przy zastosowaniu spektrometru mas typu Ettan MALDI ToF Pro (Amersham Biosciences).

Molecular weight of proteins and glycoproteins found in WPC raw material used to production of hydrolysates determined by mass spectrum with usage Ettan MALDI ToF Pro (Amersham Biosciences).

Masa cząsteczkowa [Da] Molecular weight [Da]	Powierzchnia [jednostki umowne} Area [arbitrary units]	Czas [μs] Time [μs]	Przewidywany produkt Components
14190,9	5209	80,7581	α-la
14519,7	12647	81,6850	α-la+2 heksozy
14683,6	16588	82,1430	α-la+laktoza+heksoza
14842,6	18521	82,5850	α-la+2 laktozy
15016,2	18402	83,0651	α-la+laktoza+3 heksozy
15173,3	16655	83,4970	α-la+ 2 laktozy+2 heksozy
15330,9	12968	83,9280	α-la+3 laktozy+heksoza
15493,7	11468	84,3708	α-la+4 laktozy
18511,2	2633	92,1946	β-Ig+heksoza
18599,2	2925	92,4128	β-Ig+laktoza
18776,7	4560	92,8514	β-Ig+3 heksozy
18837,9	4876	93,0022	β-Ig+3 heksozy
18926,5	6201	93,2200	β-Ig+laktoza+2 heksozy
19098,8	8751	93,6421	β-Ig+laktoza+3 heksozy
19157,0	9690	93,7841	β-Ig+2 laktozy+heksoza
19251,7	11809	94,0150	β-Ig+3 laktozy

Immunoreaktywność hydrolizatów – ELISA i elektroforeza 2D

Metodą ELISA stwierdzono, że zarówno hydroliza jedno- i dwustopniowa preparatu białek serwatkowych nie pozwoliła na wyizolowanie frakcji całkowicie pozbawionej immunoreaktywności. Wraz ze zmniejszaniem się udziału białek

wysokocząsteczkowych w poszczególnych frakcjach obserwowano obniżanie się poziomu immunoreaktywności względem α -la i β -lg, która jest charakterystyczna dla białek niemodyfikowanych. Procesy enzymatyczne, powodując rozerwanie łańcucha białkowego, nie niszczyły jednak obszarów obejmujących epitop. Dlatego też w każdej, analizowanej oddzielnie frakcji, stwierdzano aktywne wiązanie się antygeny z przeciwciałem. W tab. 2. przedstawiono pozostałą immunoreaktywność wybranych hydrolizatów serwatkowych podzielonych na frakcje w zależności od mas cząsteczkowych składowych białek. Enzymem najbardziej obniżającym immunoreaktywność α -la była pronaza. Koszty jej zakupu są jednakże zbyt wysokie, aby wskazywać ją jako enzym do wykorzystania w przyszłej produkcji odżywek dla dzieci alergicznych. Dlatego też uwagę zwrócono na Alkalazę, która jest tańsza, a również skuteczna. Proces hydrolizy dwustopniowej z Alkalazą i pronazą był najkorzystniejszym procesem, albowiem pozwolił na uzyskanie obniżenia immunoreaktywności α -la do 0,244 $\mu\text{g/ml}$, a β -lg do 1,566 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 2

Immunoreaktywność poszczególnych frakcji wybranych hydrolizatów białek serwatkowych.
Immunoreactivity of fractions of selected WPC hydrolysates.

Enzym stosowany do hydrolizy Enzyme used for hydrolysis	Numer frakcji Number of fraction	Masy cząsteczkowe białek frakcji serwatkowych Protein molecular mass of fraction [$\cdot 10^3$ Da]	Immunoreaktywność Immunoreactivity	
			α -la [$\mu\text{g/ml}$]	β -lg [$\mu\text{g/ml}$]
Pronaza	I	67-43	4,002	0,051
	II	43-25	4,299	7,626
	III	25-13,7	5,921	14,160
	IV	13,7-6,5	0,197	1,566
	V	6,5-1,35	0,037	3,272
Alkalaza	I	18,5-6,8	21,460	13,910
	II	6,8-4,8	10,420	11,710
	III	4,8-1,4	0,215	2,467
	IV	>1,4	0,116	2,476
Alkalaza + pronaza	I	25-13,7	4,746	3,647
	II	13,7-6,5	4,831	5,587
	III	6,5-1,35	0,244	1,566

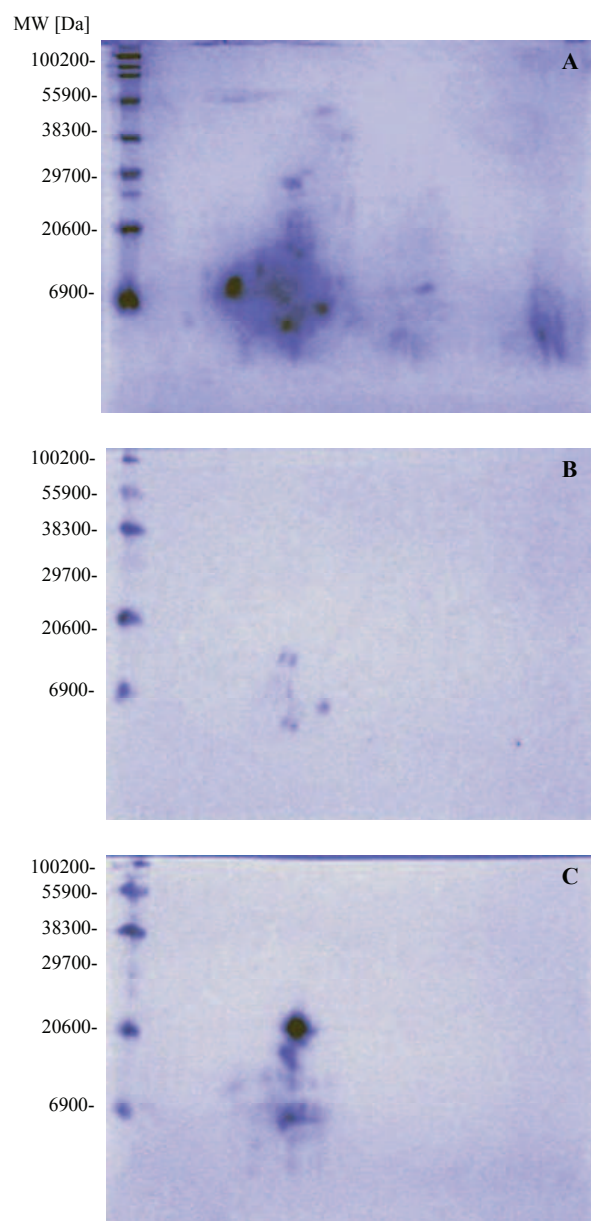
Immunoreaktywne właściwości poszczególnych hydrolizatów zostały dobrze udokumentowane metodą immunoblottingu, wykonaną po dwukierunkowej elektroforezie.

Obraz elektroforetyczny hydrolizatu uzyskanego z WPC przy udziale Alkalazy uwidocznił mnogość białek i peptydów obecnych praktycznie w całym analizowanym zakresie pI (3-10) i mas cząsteczkowych (do $67 \cdot 10^3$ Da). Największe skupisko immunoreaktywnych podjednostek białkowych stwierdzono w obszarze poniżej $14,4 \cdot 10^3$ Da i pI 2,5-7. Elektroforegram białek WPC hydrolizowanych pronazą uwidocznił białka w większości zhydrolizowane do cząsteczek mniejszych niż $20 \cdot 10^3$ Da głównie w zakresie pI 4-6,5 oraz 9-10 pI. Natomiast na immunoblocie wykonanym z przeciwciałem anty α -la widocznych było wyodrębnionych 5 plamek, zaś z przeciwciałem anty β -lg było wyraźne skupisko większej liczby plamek poniżej $22 \cdot 10^3$ Da. Elektroforegramy rozdzielów białek serwatkowych w systemie 2D uzyskanych podczas dwustopniowej hydrolizy przedstawiają skupisko plamek białkowo-peptydowych w zakresie pI 3-6,5 (hydrolizat WPC z Alkalazą i papainą) pI 3,8-6,2 (hydrolizat WPC z pronazą i Alkalazą), pI 4,2-6,2 (hydrolizat WPC z pronazą i papainą), poniżej masy cząsteczkowej odpowiadającej wielkości cząsteczek $20,6 \cdot 10^3$ Da. Na rys. 1. przedstawiono przykład elektroforezy dwukierunkowej i immunoblottingu hydrolizatu WPC z Alkalazą i pronazą. Żaden z procesów dwustopniowej hydrolizy nie zagwarantował całkowitej redukcji immunoreaktywności nowo wytworzonych produktów z WPC. Jednocześnie stwierdzono, że łatwiej hydrolizowane jest białko α -la niż β -lg. Proteoliza β -lg spowodowała powstanie większej ilości peptydów, w których pozostały epitopy o charakterze liniowym, reagujące z przeciwciałem anty- β -lg.

Holland i wsp. [5] zastosowali metodę elektroforezy 2D do analizy wszystkich białek mleka. Stosując 24 cm żel do rozdzielu białek na paskach w zakresie pI 4-7 i SDS-PAGE w 14% żelu oznaczono 150 plam wskazujących na obecność różnych białek, z czego 50 zidentyfikowano metodą PMF (Peptide Mass Fingerprinting). Najwyraźniej były widoczne plamy pochodzące od α_{s1} kazeiny, β -kazeiny, β -lg i α -la. W obrębie α_{s2} kazeiny scharakteryzowano trzy plamki, które obrazowały różne poziomy fosforylacji. κ -kazeina występowała w postaci przynajmniej 10 oddzielnych plamek w przedziale pI 5-81 – 4,47. Autorzy stwierdzili, że obraz elektroforetyczny białek mleka jest następstwem potranslacyjnych ich modyfikacji występujących u poszczególnych krów.

Ocena sensoryczna

Produkcja hydrolizatów z białek mleka łączy się z ryzykiem uzyskania produktów o niezadawalających lub wręcz negatywnych cechach sensorycznych, co jest szczególnie ważne podczas produkcji odżywek dla dzieci. Dlatego też zastosowanie analizy sensorycznej do oceny hydrolizatów pozwala na wyeliminowanie całkowicie niekorzystnych produktów i wyłonienie tych, które mogą spełniać oczekiwania konsumentów.



Rys. 1. A) Elektroforeza dwukierunkowa hydrolizatu białek serwatkowych WPC uzyskanego z pronazą i Alkalazą,

B) immunoblotting z przeciwciałami skierowanymi do α -la (rozc. 1:1500),

C) immunoblotting z przeciwciałami skierowanymi do β -lg (rozc. 1:1000)

Fig. 1. A) 2D electrophoresis of WPC hydrolysate obtained with pronase and Alcalase,

B) Immunoblotting with anti- α -la antibodies (diluted 1:1500),

C) Immunoblotting with anti- β -la antibodies (diluted 1: 1000).

Zaobserwowano, że dominującymi cechami, typowymi dla tego rodzaju produktów, były smak i zapach mydlasty oraz mleka w proszku. Intensywność tych wyróżników była znacznie wyższa od pozostałych, takich jak zapach tłuszczu, smak słodki i słony.

Wszystkie hydrolizaty charakteryzowały się słabo wyczuwalnym zapachem tłuszczu oraz niskim poziomem smaku słodkiego. Podczas hydrolizy laktozy znacznie wzrosła w preparacie ilość glukozy, aczkolwiek nie miało to wpływu na poprawę smaku hydrolizatu.

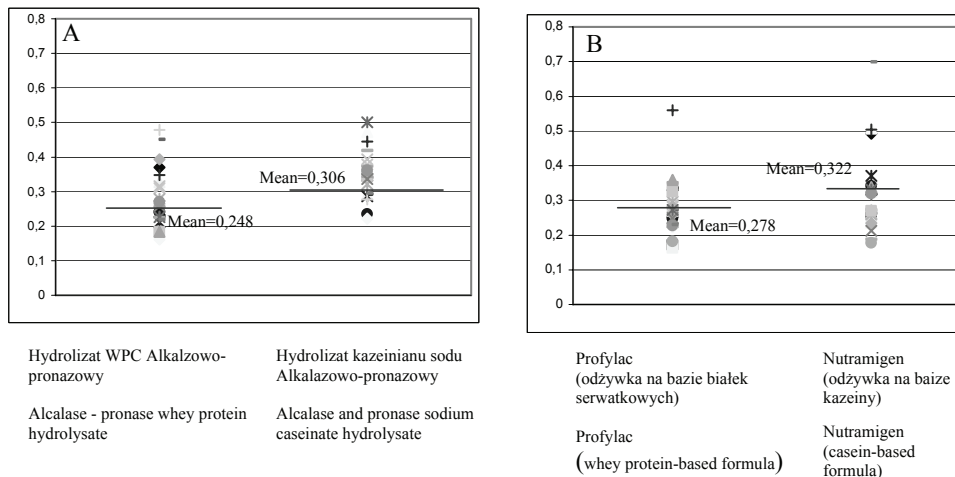
Hydrolizat pepsynowy opisano jako najbardziej słony, na co niewątpliwie miał wpływ proces przygotowywania preparatu, a w szczególności konieczność zmiany pH do wartości optymalnej do działania każdego ze stosowanych enzymów. Podczas tego procesu używano roztworów NaOH oraz HCl, co było przyczyną wytworzenia znacznej ilości soli w reakcji zobojętniania.

Głównym wyróżnikiem decydującym o jakości sensorycznej hydrolizatów białkowych było natężenie smaku gorzkiego. Smak gorzki stwierdza się zazwyczaj w preparatach zawierających peptydy o masach cząsteczkowych poniżej $10 \cdot 10^3$ Da. Jego nasilenie jest proporcjonalne do stopnia hydrolizy i aktywności zastosowanej proteazy [1]. Stwierdzono, że wszystkie badane hydrolizaty charakteryzowały się mniej lub bardziej intensywną goryczą, której towarzyszył dodatkowo smak zjełczałego tłuszczu. Najwyższą ocenę ogólną uzyskał hydrolizat Alkalazowo-papainowy.

Alergenność hydrolizatów

Wytwarzanie specyficznych przeciwciał klasy IgE jest genetycznie uwarunkowaną cechą atopii, aczkolwiek na poziom immunoglobulin wpływa dużo innych czynników środowiskowych, ustrojowych oraz procesy regulacji komórkowej.

W badaniach porównano potencjał alergenny dwóch hydrolizatów o najniższej immunogenności produkcji własnej oraz dwóch wyprodukowanych przemysłowo (Nutramigen i Profylac). Uzyskane wartości średnie absorbancji opisujące poziom IgE specyficznej oszacowany w stosunku do hydrolizatów Alkalazowo-pronazowych z WPC i kazeinianu sodu były niższe (0,248 i 0,306) niż analogicznych handlowych odżywek (Nutramigen i Profylac) wyprodukowanych na bazie takiego samego surowca (0,278 i 0,332), (rys. 2.). Skłania do wyciągnięcia wniosku o słusznym i korzystnym kierunku prowadzonych badań dążących do wprowadzenia nowego zestawu enzymatycznego mogącego stanowić w przyszłości podstawę do produkcji odżywek hypoalergiczych.



Rys. 2. Poziom specyficznej immunoglobuliny klasy E w reakcji z A) hydrolizatem WPC i kazeinianu sodu uzyskany przy zastosowaniu Alkalazy i pronazy, B) odżywkami Nutramigen i Profylac.

Fig. 2. The level of specific IgE determined against of A) Alcalase-pronase hydrolysate from WPC and sodium caseinate, B) Nutramigen and Profylac.

Wnioski

1. Metoda spektrometrii masowej pozwoliła na ocenę stosowanego liofilizatu białek mleka i wykazanie obecności adduktów reszt cukrowych z cząsteczkami białkowymi, co może inicjować reakcje alergiczne jako skutek procesu technologicznego wstępnej obróbki mleka.
2. Stwierdzono znaczne zróżnicowanie immunoreaktywności frakcji peptydowo-białkowych hydrolizatów serwatkowych i kazeinowych. Produktem charakteryzującym się najniższą immunoreaktywnością w stosunku do przeciwciał anty- α -la i anty- β -lg był hydrolizat białek serwatkowych uzyskany przy użyciu dwustopniowej hydrolizy WPC-65 Alkalazą i pronazą, a w szczególności jego niskocząsteczkowa frakcja.
3. Podczas analizy metodą ELISA z wykorzystaniem ludzkich surowic stwierdzono, że hydrolizaty te charakteryzowały się niższą alergenicnością aniżeli preparaty handlowe Nutramigen i Profylac.
4. Zastosowanie Laktozemu pozwoliło na obniżenie poziomu laktozy w hydrolizatach, co może mieć duże znaczenie dla osób cierpiących na nietolerancję mleka wywołaną obecnością tego dwucukru.
5. Ocena sensoryczna wybranych hydrolizatów wykazała znaczny poziom niekorzystnych cech smakowych i zapachowych utrzymujących się w hydrolizatach. Poprawę walorów sensorycznych hydrolizatu WPC uzyskano stosując hydrolizę dwustopniową z Alkalazą i papainą.

Badania wykonano w ramach grantu PBZ/KBN021/P06/99/16

Autorzy składają serdeczne podziękowanie pracownikom Zakładu Biochemii Żywności, UWM w Olsztynie, prof. dr hab. Jerzemu Dziubie, dr. inż. Marcie Niklewicz i dr hab. Piotrowi Minkiewiczowi, prof. UWM za pomoc w wykonaniu i opracowaniu wyników uzyskanych metodą spektroskopii masowej.

Praca była prezentowana podczas XXXVII Ogólnopolskiej Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN, Gdynia, 26 – 27.IX.2006.

Literatura

- [1] Bumberger E, Belitz HD.: Bitter taste of enzymic hydrolyzates of casein. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 1993, **197**, 14–19.
- [2] Baryłko-Pikielna N.: Sensoryczna analiza profilowa i ocena konsumencka w opracowaniu nowych produktów żywnościowych. *Mat. Konf. „Food product development – Opracowywanie nowych produktów żywnościowych” Akademia Rolnicza, Poznań 1995*, s. 207-220.
- [3] Giampietro P.G., Kjellman N.I.M., Oldaeus G., Wouters-Wesseling W., Businco L.: Hypoallergenicity of an extensively hydrolyzed whey formula. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2001, **12**, 2, 83-86.
- [4] Hanson B. J., Schulenberg B., Patton W.: A novel subfraction approach for mitochondrial proteins: A tree-dimensional mitochondrial proteome map. *Electrophoresis* 2001, **22**, 950-959.
- [5] Holland J. W., Deeth H. C., Allewood P. F.: Proteomic analysis of k-casein micro-heterogeneity. *Proteomics*, 2004, **4**, 743-752.
- [6] ISO 8589:1998. Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms.
- [7] ISO/DIS 13299.2:1998. Sensory analysis – Methodology - General guidance for establishing a sensory profile.
- [8] Kozłowska-Wojciechowska M., Naruszewicz M., Mamcarz A., Mamcarz B.: Rada Promocji Zdrowego Żywności Człowieka. Mleko i jego przetwory – niezbędne produkty w zachowaniu zdrowia. Ekspertyza i rekomendacje. Warszawa 2004.
- [9] Matuszewska I., Szczecińska A., Baryłko-Pikielna N.: Przydatność sensorycznej metody profilowej w interpretacji preferencji konsumenckich wybranych produktów. *Żywność. Technologia. Jakość*, 1998, **1**, (14), 5-21.
- [10] Siciliano R., Rega B., Amoresano A., Pucci P.: Modern mass spectrometric methodologies in monitoring milk quality. *Analytical Chemistry*, 2000, (72), 2, 15.
- [11] Rosendal A., Barkholt V.: Detection of Potentially Allergic Material in 12 Hydrolyzed Milk Formulas. *J. Dairy Sci.*, 2000, **83**, 2200-2210.
- [12] Szabó E., Hajós Gy., Matuz J.: Identification of major allergens of cereal proteins by electrophoretic methods. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2002, **11/52**, SI 2, 131-134.
- [13] Woś H., Grzybowska-Chlebowczyk U., Ubik-Wróbel B., Szymańska M., Maciejowska A., Kopyta I.: Częstość występowania nietolerancji laktozy u dzieci z IgE-zależną alergią na białka mleka krowiego. *Pediatrica Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 2000, **2**, 1, 31-34.
- [14] Wróblewska B., Jędrychowski L., Szabó E., Hajós G.: The reduction of cow milk proteins immunoreactivity by two-step enzymatic hydrolysis. *Acta Alimentaria*, 2005, **34**, 3, 307-315.
- [15] Wróblewska B., Troszyńska A.: Enzymatic hydrolysis of cow's whey milk protein in aspect of utility in production of hypoallergenic formulas. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, 4, 349-357.

- [16] Wróblewska B., Jędrychowski L., Hajós G., Szabó E.: Properties of an enzymatic hydrolysate obtained from sodium caseinate isolate as a hypoallergenic formula. *Pol. J. Envir. Studies*, 2005, **14**, II, 411-416.

QUALITY OF COW MILK PROTEIN HYDROLYSATES IN ASPECT OF PRODUCTION OF HYPOALLERGENIC FORMULAE

S u m m a r y

The aim of the study was to reduce of the immunoreactivity of cow milk proteins, present in WPC-65 (α -lactalbumin i β -lactoglobulin) and sodium caseinate (α -, β -, κ -casein) as a result of enzymatic hydrolysis prepared with Alcalase 2.4 L, Novo Nordisk (*Bacillus licheniformis*), pronase – (*Streptomyces griseus* protease), papain – EC 3.4.22.2, pepsin (E.C. 3.4.23.1) (Sigma), and LactozymuTM3000 L HPG (Novo Nordisk).

The analysis was carried out by ELISA methods, 2D electrophoresis, gel chromatography, sensory analysis and mass spectroscopy. The immunoreactivity of selected hydrolysates and hypoallergenic formulas (Profylac and Nutramigen) was compared using of CMA patients sera.

It was concluded that there is possibility to obtain hypoallergic product based on low molecular fraction of WPC-65 Alcalase-pronase hydrolysate.

Key words: allergy, enzymatic hydrolysis, cow milk, immunoreactivity 