



Zmiany właściwości immunoreaktywnych białek mleka krowiego w wybranych procesach termicznych i fermentacji mlekowej

Barbara Wróblewska, Lucjan Jędrychowski

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polska Akademia Nauk, Olsztyn

Changes of immunoreactive properties of cow milk proteins as a result of technological processing

Summary

Technological processes can affect immunoreactivity properties. Pasteurization applied during production of milk can decrease proteins immunoreactivity. Such severe conditions (90°C/15 min) reduced immunoreactivity of α -la and β -lg to 12,72% and 18,74%, respectively. Ultrasonic and microwave processes proved much more effective than severe pasteurization. Ultrasonics in a temperature of 50°C for 1 hour reduced α -la and β -lg to 0,88% and 6,42%, respectively. Microwaving in a temperature of 98°C for 2 min. reduced α -la and β -lg to 1,37% and 12,86%, respectively. Lactic acid fermentation decreased milk proteins immunoreactivity to below 1%. The products obtained retained good organoleptic properties (acid taste and aroma). The allergenicity assay performed *in vivo* of both whey proteins was only slightly attenuated.

Key words:

α -la, β -lg, allergenicity, ELISA, immunoreactivity, lactic acid bacteria, pasteurization.

1. Wprowadzenie

W początkowym okresie życia każdego człowieka mleko jest najbardziej wartościowym pokarmem. Oprócz cennych walorów odżywczych, zawiera ono dużą ilość składników biologicznie aktywnych odgrywających niebagatelną rolę we wzmacnianiu ukła-

Adres do korespondencji

Barbara Wróblewska,
Instytut Rozrodu Zwierząt
i Badań Żywności,
Polska Akademia Nauk,
ul. Tuwima 10,
10-747 Olsztyn;
e-mail:
Barbara.Wroblewska@pan.
olsztyn.pl

du odpornościowego. Ponadto stanowi swoistą szczepionkę czynników odpornościowych przenoszonych z matki na dziecko dzięki systemowi karmienia naturalnego. Należy również mieć świadomość, że mleko stanowi także zbiór różnorodnych białek, z których każde może stać się alergenem, a zatem czynnikiem szkodliwym dla organizmu. Do głównych alergenów mleka zaliczane są: kazeina, β -laktoglobulina (β -lg) i α -laktoalbumina (α -la) (1).

W literaturze niewiele jest danych dotyczących wpływu procesów technologicznych na właściwości immunogenne i alergenne białek mleka. Podczas obróbki technologicznej mleka stosuje się różne procesy m.in. pasteryzację, homogenizację, standaryzację składu. Mogą one mieć wpływ na alergenicność uzyskanego produktu poprzez zmiany w obrębie białek. Stwierdzono znaczny, bezpośredni wpływ wysokiej temperatury na obniżenie antygenowości produktów mleczarskich, co jest związane ze zmianami denaturacyjnymi. Wzrost temperatury mleka podczas obróbki termicznej do 50°C powoduje wzrost uwodnienia białek i częściową utratę pierwotnej struktury trzeciorzędowej. Wzmaga się ruchliwość poszczególnych fragmentów polipeptydów, wskutek wzrostu energii kinetycznej cząsteczek i zaczyna rozluźniać się struktura drugorzędowa β - i α -heliksu. Dalsze ogrzewanie białek do temperatury 70-80°C powoduje pękanie wiązań dwusiarczkowych i zniszczenie struktury trzeciorzędowej, a także rozpoczyna się naruszenie struktury drugorzędowej. Powyżej temperatury 70°C następuje wzajemne przenikanie się struktur fragmentów tłuszczowych, związków mineralnych i białek. Powstają nowe połączenia poprzez interakcje hydrofobowe, zaczynają się reakcje agregacji i precipitacji. Dalsze podniesienie temperatury o 10°C, do 80-90°C powoduje utratę drugorzędowej struktury białek. W temperaturze 90-100°C zaczynają formować się międzycząsteczkowe wiązania dwusiarczkowe, zaś w temperaturze 100-105°C następuje koagulacja białek, tworzą się związki lizynoalaninowe oraz produkty nieenzymatycznej reakcji Maillarda (2). Podczas działania wysokich temperatur pierwszorzędowe grupy aminowe łańcuchów peptydowych wchodzi w reakcję z cukrami redukującymi powodując powstanie melanoidyny o specyficznym zapachu i posmaku oraz nadając brązowy kolor produktom mleczarskim. W wyniku reakcji Maillarda tworzą się nowe struktury, które mogą być determinantami odpowiedzialnymi za połączenia antygeny z przeciwciałami. Tym samym mogą one powodować wzrost symptomów reakcji alergicznej u ludzi uczulonych na białka mleka (3).

Stwierdzono także, że homogenizacja powoduje wzrost immunoreaktywności – alergenicności mleka (4). Zjawisko to tłumaczy się tym, że podczas homogenizacji następuje ujednoczenie i zmniejszenie rozmiarów kuleczek tłuszczu do średnicy mniejszej niż 1 μ m. Stosunkowo duże rozwinięcie powierzchni tłuszczu w wyniku procesu homogenizacji pozwala na migrację białek mleka (frakcji kazeiny i białek serwatkowych) i umiejscowienie się ich w strefie międzyfazowej. Białka otaczające powierzchnię kuleczek tłuszczowych spełniają rolę stabilizatora powstałej emulsji dzięki występowaniu sił odpychających pomiędzy cząsteczkami. Zmniejszenie rozmiaru kuleczek tłuszczowych poprzez homogenizację ułatwia przenikanie ich przez

barierę jelitową i wpływa na zwiększenie możliwości uczulenia przez białka związane z tłuszczem (5).

Ostatnio duże znaczenie w prozdrowotnym oddziaływaniu żywności przyznaje się niektórym grupom drobnoustrojów. W badaniach dotyczących wpływu bakterii na organizm ludzki, w tym przede wszystkim na jego układ immunologiczny, podkreśla się znaczącą rolę mikroflory bytującej naturalnie w jelicie człowieka, a szczególnie z rodzaju *Lactobacillus*. Podanie doustne preparatów zawierających tego rodzaju drobnoustroje decyduje o zwiększonej produkcji tzw. immunoglobuliny wydzielniczej klasy A (IgA) w jelicie myszy (6), szczurów (7) oraz u ludzi (8,9). Obserwowany jest przy tym także wzrost aktywności fagocytów i limfocytów. Podczas produkcji mleczarskich produktów fermentowanych, oprócz tradycyjnych szczepów i szczepionek coraz częściej stosowane jako dodatkowo kultury probiotyczne, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium*. Szczepy te charakteryzują się takimi właściwościami jak wzmacnianie systemu immunologicznego, adhezja do komórek nabłonkowych jelita i utrzymywanie w równowadze mikroflory jelitowej. Niektóre szczepy powodując znaczne obniżenie ilości enzymów fekalnych, stanowią ochronę jelit w biegunkach polekowych oraz wywołanych radioterapią, a także skutecznie pomagają przy terapii zaparć. Probiotyki mają zróżnicowany, modulujący wpływ na fagocytozę w zależności od tego, czy podajemy je ludziom zdrowym, czy też osobom atopowym. Wykazano, że szczep *Lactobacillus* GG ma zdolność do zmniejszania, a nawet likwidacji fagocytozy indukowanej antygenami mleka. *Lactobacillus* GG powoduje zablokowanie receptorów odgrywających rolę w procesie fagocytozy na neutrofilach i monocytach (10). Ponadto działalność probiotyków polega głównie na zwiększeniu wydzielania IFN- γ , a także wzmożeniu wydzielania IL-2 i IL-12 (11).

Od dawna znanym i niezaprzeczalnym faktem jest istniejący związek pomiędzy spożywaniem mleczarskich produktów fermentowanych a odpornością organizmu ludzkiego. Zauważono, że spożywanie jogurtu lub kefiru obniża stężenie IgE w surowicy krwi. Lecznicy wpływ drobnoustrojów polega na ułatwieniu zmian prekursorowych komórek Th0 w kierunku ciągu komórkowego Th1, a ściślej na możliwości zachowania właściwych proporcji pomiędzy różnicującymi się komórkami na dwie podgrupy Th1 i Th2, co prowadzi do efektu leczniczego.

Zastosowanie ukierunkowanej fermentacji mlekowej, przy wykorzystaniu wybranych szczepów o właściwościach obniżających antygenowość mleka krowiego może być przyczynkiem do rozwinięcia produkcji nutraceutyków – żywności leczniczej o właściwościach wspomagających układ odpornościowy.

Aktualnie poszukuje się takich procesów technologicznych, dzięki którym będzie możliwa modyfikacja konfiguracji poszczególnych białek w kierunku obniżenia ich immunoreaktywności. W artykule przedstawiono wyniki badań własnych dotyczących zmian immunoreaktywności α -la i β -lg podczas procesów termicznych, fizycznych (ultradźwięki i mikrofałe). Oszacowano także wpływ enzymów egzogennych uwalnianych w procesie fermentacji mlekowej podczas stosowania ok. 400 różnych szczepów i szczepionek, z których część jest stosowana w przemyśle mleczarskim.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał badawczy

W badaniach stosowano zbiorcze, odtuszczone mleko pochodzące od krów będących pod stałym nadzorem weterynaryjnym.

2.2. Przygotowanie prób mleka podczas procesów termicznych

Próbki odtuszczonego mleka poddano następującym procesom termicznym: ogrzewanie w temperaturze 60°C (czas trwania procesu 15, 30, 45 i 60 minut), 72°C (czas 15 sekund, 1 minuta, 15 minut, 30 minut), 80°C (czas 15 sekund, 1 minuta, 15 minut, 30 minut), 90°C (czas 15 sekund, 1 minuta, 15 minut). Wykonano również modyfikacje mleka za pomocą ultradźwięków (częstotliwość 25 kHz). Próby pobierano w odstępach 10-minutowych, co odpowiadało następującym temperaturom: 10 minut – 25°C, 20 minut – 32°C, 30 minut – 42°C, 40 minut – 45°C, 50 minut – 50°C, 60 minut – 52°C. Do oceny oddziaływania mikrofal na zmiany immunoreaktywności białek zastosowano kuchenkę mikrofalową typu PANASONIC NN-5050/NN-5000 o mocy 440 W. Zastosowano następujące warunki temperaturowo-czasowe: 7,5 sekund – 55°C, 15 sekund – 64°C, 30 sekund – 80°C, 1 minuta – 85°C, 2 minuty – 98°C.

2.3. Przygotowanie prób mleka poddanego fermentacji mlekowej przy udziale szczepów i szczepionek mezofilnych oraz termofilnych

Wszystkie szczepy i szczepionki mikrobiologiczne uzyskano dzięki uprzejmości firmy Biolacta-Textel w Olsztynie. Drobnoustroje namnażano na mleku krowim, uprzednio wysterylizowanym. Przy namnażaniu bakterii mezofilnych stosowano temperaturę inkubacji 25°C, a bakterii termofilnych – temperaturę 37°C. Namnażanie prowadzono do uzyskania skrzepu o pH 4,6. Następnie próby wirowano (6000 g przez 15 minut) i tak uzyskaną serwatkę, podzieloną na porcje (1 ml), zamrażano do czasu wykonywania analiz.

2.4. Produkcja króliczych przeciwciał poliklonalnych

2.4.1. Odczynniki

Wszystkie stosowane odczynniki pochodziły z firmy Sigma: α -la (L-6010), β -lg (L-6879), (standardy), 10 mM roztwór buforu fosforanowego do rozcieńczania antygenów, pH 7,4 (P- 4417), kompletny (F-5881) i niekompletny (F-5506) adiuwant Freuda.

2.4.2. Uzyskiwanie specyficznej immunoglobuliny G

W celu wykonania analizy metodą ELISA niezbędne jest wyprodukowanie poliklonalnych przeciwciał króliczych skierowanych do α -la i β -lg. Immunogen do pierwszego szczepienia przygotowano przez emulgację 2,5 mg białka (antygeny) w 5 ml 0,9% roztworu NaCl z równoważną ilością pełnego adiuwantu Freuda. Immunizację przeprowadzano śródskórnie i domięśniowo. Do kolejnych trzech szczepień stosowano niepełny adiuwant Freuda. Skuteczność immunizacji określano po ok. 2 miesiącach, pobierając krew z żyły brzeżnej ucha królika i analizowano wzrost ilości przeciwciał w surowicy metodą pośrednią (*indirect*) ELISA. W przypadku stwierdzenia dostatecznie wysokiego miana przeciwciał (10 tys.-100 tys.), zwierzęta skrwawiano, surowicę oczyszczano poprzez wysolenie Na_2SO_4 . Tak uzyskaną immunoglobulinę zamrażano w małych porcjach (po 0,5 ml) i liofilizowano (12).

2.5. Oznaczanie zmian właściwości immunoreaktywnych białek serwatkowych – metodą ELISA

2.5.1. Odczynniki

Stosowane odczynniki: α -la (Sigma, nr kat. L-6010), β -lg (Sigma, nr kat. L-6879), koniugat koziej przeciwi króliczej immunoglobuliny z peroksydazą chrzanową, jako znacznikiem (Sigma, nr kat. A-6154), 50 mM roztwór buforu węglanowego do o płaszczania mikro płytek, pH 9,8, bufor do przemywania mikro płytek – roztwór soli fizjologicznej, zbuforowany 10 mM roztworem fosforanów, z dodatkiem 0,5% Tween – 20, 10 mM roztwór buforu fosforanowego do rozcieńczania prób, surowicy, koniugatu, pH 7,4 (Sigma, nr kat. P- 4417), substrat do wywoływania reakcji barwnej, o-PD (dichlorowodorek o-fenylodiaminy), (Sigma, nr kat. P-3804), 9 mM roztwór buforu cytrynianowego, pH 5,0 do o-PD, 4M roztwór kwasu siarkowego.

2.5.2. Metoda pośrednia (*indirect*) ELISA

Metodę pośrednią ELISA stosowano w celu wyznaczenia odpowiednich stężeń poszczególnych analitów używanych w metodzie współzawodniczącej ELISA (13).

2.5.3. Metoda współzawodnicząca (*competitive*) ELISA

Metodę współzawodniczą ELISA stosowano w celu ilościowego oszacowania immunoreaktywności prób zmodyfikowanych białek α -la i β -lg uzyskanych w wyniku różnych procesów technologicznych (14).

Mikroplątki opłaszczano antygenem, stosując rozcieńczenia określone uprzednio metodą indirect ELISA (1 μ g/ml dla β -lg i 5 μ g/ml dla α -la), w 9 mM roztworze buforu węglanowego o pH 9,6, w ilości 100 μ l na studzienkę. Inkubację mikroplątek z antygenem prowadzono 18 godzin w temperaturze 4°C, po czym mikroplątki 4-krotnie płukano 10 mM roztworem buforowanej fosforanami, soli fizjologicznej o pH 7,4 z dodatkiem 0,5% Tween-20. Procedurę tę stosowano po każdym kroku metody. Nie wypełnione antygenem miejsca mikroplątek wysycano 1,5% roztworem żelatyny w ilości 150 μ l na studzienkę i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 25°C. Po przemyciu mikroplątek, do studzienek podawano jednocześnie próbę z antygenem oraz poliklonalne przeciwciała królicze wyprodukowane do danego antygeny (po 50 μ l każdego roztworu, w odpowiednim stężeniu, na studzienkę). W celu wymieszania składników reakcji mikroplątki wytrząsano przez 5 minut, przy użyciu wytrząsarki firmy Janke and Kunkel (IKA-SCHUTTLER MTSZ) i poddawano inkubacji w temperaturze 37°C przez godzinę. Po kolejnym przemyciu podawano koniugat immunoglobuliny koziej, przeciwiokróliczej z peroksydazą – znacznikiem, w ilości 100 μ l na studzienkę i ponownie inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C. Po przemyciu mikroplątki stosowano dodatek 100 μ l substratu (roztwór o-PD w buforze cytrynianowym, pH 5,0) i po 30 minutach zatrzymywano reakcję za pomocą 4 M roztworu H₂SO₄. Odczytu absorbancji dokonywano przy użyciu automatycznego czytnika Reader 510 firmy ORGANON-TEKNIKA, przy długości fali $\lambda = 492$ nm.

Uzyskane wyniki opracowywano stosując oprogramowanie komputerowe ImmunoFIT™ EIA/RIA firmy Beckman.

2.6. Rozdział elektroforetyczny białek mleka (SDS-PAGE)

W celu wykonania rozdziału elektroforetycznego uzyskanych prób zastosowano następujące warunki analizy: żel rozdzielający o składzie: 12% akrylamid; 0,32% bisakrylamid; 0,1% roztwór SDS; 8 M roztwór mocznika; 0,37 M bufor TRIS-HCl o pH 8,8; żel zagęszczający o składzie: 3,7% akrylamid; 0,1% bisakrylamid; 0,1% roztwór SDS; 8 M roztwór mocznika; 0,06 M bufor TRIS-HCl o pH 6,8. Jako katalizatorów polime-

ryzacji używano N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED) i nadsiarczanu amonu. Próby przygotowano poprzez zmieszanie z równoważną objętością buforu o składzie: 4% SDS; 10% roztwór β -merkптоetanolu; 20% roztwór glicerolu; 87 mM bufor TRIS-HCl o pH 6,5 oraz 0,01% błękitu bromofenolowego. Po zmieszanu próby ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut i wirowano (9000 g przez 5 minut), a następnie наносzono do studzienek żelu zagęszczającego. Elektroforeza przebiegała w środowisku buforu o pH 8,3 zawierającego: 0,025 M roztwór TRIS; 0,192 M roztwór glicyny; 0,1% roztwór SDS. Początkowe napięcie prądu wynosiło 50 V, a następnie 80 V. Żele po zakończonym rozdziale wybarwiano przez 30 minut w 0,1% roztworze barwnika Coomassie brilliant blue R-250 (roztwór barwnika w mieszaninie metanolu, kwasu octowego i wody, w stosunku 4,5:1:4,5). Odbarwienie przeprowadzono w roztworze metanolu, kwasu octowego i wody w stosunku odpowiednio 1:1:8. Po częściowym odbarwieniu żele przemywano wodą destylowaną i suszono (15).

2.7. Określenie stopnia alergenicności wybranych prób mleka poddanego fermentacji mlekowej

Dziesięciu pacjentów Katedry i Kliniki Alergologii i Chorób Wewnętrznych, Szpitala im. dr. J. Bizuela w Bydgoszczy zostało poddanych badaniom, które miały na celu ustalenia stopnia alergenicności wybranych, najkorzystniejszych prób mleka uzyskanych po fermentacji mlekowej. Testy skórne wykonywano metodą śródskórną, wprowadzając w dłoniową powierzchnię przedramienia po 0,1 ml roztworu badanych preparatów oraz standaryzowany alergen mleka krowiego firmy Sevac Czechy, jako dodatnią próbę kontrolną. Wyniki testów odczytywano po upływie 20 minut, mierząc w dwóch prostopadłych wymiarach średnicę bąbla w mm. Za odczyt dodatni przyjmowano reakcję o średnicy 10 mm oznaczając jako ++, 15 mm jako +++, 20 mm i powyżej jako +++++. Kontrolę ujemną testu przeprowadzono wstrzykując 0,1 ml płynu używanego przez producenta do rozcieńczania alergenów.

3. Omówienie wyników

3.1. Wpływ procesów termicznych na zmianę immunoreaktywnych właściwości białek mleka krowiego

Możliwość modyfikacji właściwości immunoreaktywnych białek mleka wskutek zastosowania procesów jednostkowych, podczas obróbki mleka zasygnalizowana w piśmiennictwie (16,17), spowodowała zainteresowanie się tym zagadnieniem w prezentowanej pracy.

Stosowanie wysokiej temperatury jest nieodzownym procesem technologicznym, podczas produkcji mleka spożywczego, głównie zapewniającym wymaganą jakość mikrobiologiczną uzyskanych produktów mleczarskich. Jednocześnie procesy termiczne powodują częściową denaturację białek mleka, zmieniając ich właściwości biologiczne, a w konsekwencji zmniejszając ich alergenicność. Niektórzy badacze sugerują stosowanie zdenaturowanych białek serwatkowych jako podstawowego składnika do produkcji hipoalergicznym odżywek dla dzieci, głównie z obciążeniami genetycznymi, (18,19). Niestety w większości przypadków, zmiany uzyskane w obrębie białek, w wyniku zastosowania jedynie obróbki termicznej są niewystarczające. Wymagane są dalsze modyfikacje mające na celu zmiany determinant alergenów, co powinno spowodować obniżenie stopnia alergenicności gotowego produktu.

W prezentowanych badaniach zastosowano obróbkę termiczną mleka, poddając je działaniu temperatur 60, 72, 80 i 90°C w różnych przedziałach czasowych, a także określono możliwość stosowania mikrofal i ultradźwięków.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono zmniejszenie immunoreaktywności zarówno α -la, jak i β -lg, w zależności od temperatury oraz czasu trwania ogrzewania próby (tab. 1 i 2). Dzięki zastosowaniu metody ELISA możliwe było wykazanie różnic właściwości białek poddanych różnym procesom termicznym. Wpływ pasteryzacji na zmniejszenie immunoreaktywności α -la był ściśle skorelowany z temperaturą. Przy stosowaniu temperatury 60°C obniżenie immunoreaktywności α -la następowało wraz z upływem czasu w sposób łagodny i po godzinnym procesie ogrzewania osiągnęło wartość ok. 50% (tab. 1). Podwyższenie temperatury spowodowało drastyczny spadek immunoreaktywności już po 15 sekundach pasteryzacji.

Tabela 1

Zmiany immunoreaktywności α -la i β -lg w wyniku zastosowania wybranych procesów termicznych

Warunki procesu termicznego	Pozostała immunoreaktywność białek serwatkowych w stosunku do mleka surowego	
	α -la (%)	β -lg (%)
mleko surowe	100	100
60°C/15 min	90,27	48,85
60°C/30 min	70,45	33,21
60°C/45 min	63,63	33,21
60°C/60 min	52,72	21,57
72°C/15 sek	48,18	53,04
72°C/1 min	31,81	30,87
72°C/30 min	28,18	27,34
80°C/15 sek	43,18	42,35
80°C/1 min	37,40	31,17
80°C/15 min	26,13	28,06
80°C/30 min	18,32	22,15
90°C/15 sek	46,12	30,44
90°C/1 min	34,91	21,18
90°C/15 min	12,72	18,74

Tabela 2

Zmiany immunoreaktywności α -la i β -lg w wyniku zastosowania wybranych procesów fizycznych

Rodzaj stosowanego procesu fizycznego (warunki)	Pozostała immunoreaktywność białek serwatkowych w stosunku do mleka surowego	
	α -la (%)	β -lg (%)
ultradźwięki		
10 min – 25°C	2,65	69,18
20 min – 32°C	1,44	46,84
30 min – 42°C	1,18	26,27
40 min – 45°C	1,11	12,95
50 min – 50°C	0,94	6,90
60 min – 52°C	0,88	6,42
mikrofale		
7,5 s – 55°C	13,26	34,73
15 s – 64°C	4,14	24,34
30 s – 80°C	2,33	17,50
1 min – 85°C	1,77	12,99
2 min – 98°C	1,37	12,86

Najkorzystniejszym procesem, w kontekście zmiany właściwości immunoreaktywnych, okazało się zastosowanie warunków 90°C/15 min co pozwoliło uzyskać obniżenie immunoreaktywności do 12,72%. Podobne tendencje zaobserwowali również inni autorzy (17). Redukcję immunoreaktywności oddziałującej β -lg do wartości 48,85% uzyskano już w wyniku procesu termicznego w warunkach 60°C/15 min. W zastosowanych innych rodzajach procesów termicznych wykazano, że pozostała immunoreaktywność kształtowała się na poziomie 20-30%, a najbardziej drastyczne warunki (90°C/15 min) umożliwiły obniżenie immunoselektywności β -lg do 18,74%. Długi czas trwania poszczególnych procesów oraz wysokie temperatury powodowały zmiany organoleptyczne mleka. Pojawiał się charakterystyczny tzw. „posmak pasteryzacji”.

Poddanie mleka działaniu ultradźwięków spowodowało po 10 minutach uzyskanie redukcji immunoreaktywnej α -laktoalbuminy o 97,35% w stosunku do wartości obserwowanej w mleku surowym. Temperatura próby wynosiła tylko 25°C. Przy takiej temperaturze duży wpływ na zmianę właściwości immunoreaktywnych odgrywały oprócz czynnika temperaturowego, oddziaływania mechaniczne (kawitacja). Redukcja immunoreaktywności β -lg przy zastosowaniu ultradźwięków przebiegała wolniej. Po godzinie ich stosowania, stwierdzono metodą ELISA, obniżenie β -lg do 6,42% w stosunku do pierwotnej zawartości w mleku surowym.

Użycie mikrofal do obróbki termicznej mleka pozwoliło na szybkie osiągnięcie wysokich temperatur w znacznie krótszym czasie. Miało to również bezpośredni wpływ na obniżenie immunoreaktywności obydwu białek serwatkowych. Oddziaływanie mikrofal o mocy 440 W ograniczono do dwóch minut, po których próbka 20 ml mleka osiągnęła temperaturę 98°C. W tym czasie immunoreaktywność α -la pozostała na poziomie 1,37%, zaś β -lg, 12,86% wartości obserwowanej w mleku surowym.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że białka serwatkowe mleka po poddaniu ich działaniu wysokich temperatur, zmieniają swoje cechy immunoreaktywne. W przeprowadzonych badaniach klinicznych wykazano jednak, że właściwości alergenne nie są jednak całkowicie eliminowane.

Kilshaw P. J. i in. (17) zaproponowali wykorzystanie serwatki zamiast mleka do produkcji hipoalergiczných odżywek dziecięcych po uprzednim zastosowaniu procesu termicznej denaturacji, mającej na celu obniżenie właściwości alergennych surowca. Potwierdzono to w badaniach metodami biologicznymi przy użyciu zwierząt doświadczalnych. Badając wpływ denaturowanych termicznie białek mleka na układ odpornościowy świnek morskich, stwierdzono ich niższą zdolność uczulania (18). Wydaje się jednak, że niezbędne są badania zmierzające do ukierunkowanej modyfikacji białek, mającej na celu całkowitą eliminację immunoreaktywności poszczególnych białek mleka.

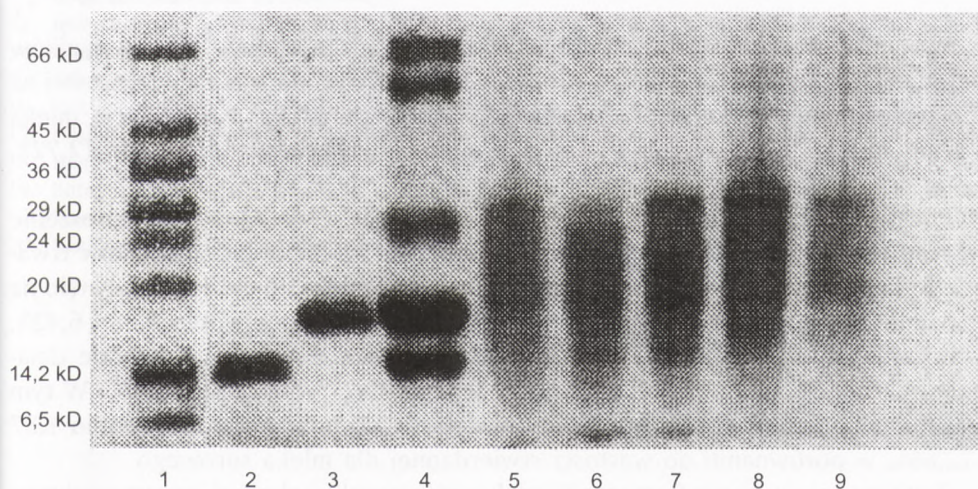
3.2. Wpływ procesów fermentacji mlekowej na zmianę immunoreaktywnych właściwości białek mleka krowiego

W literaturze można znaleźć dużo doniesień dotyczących stymulującego wpływu drobnoustrojów na niespecyficzne działanie układu immunologicznego, tj. oddziaływań wzmacniających układ odpornościowy i zmniejszających możliwości wystąpienia stanów zapalnych. Wśród dobrze opisanych szczepów znajdują się: *Lactobacillus* GG, *L. rhamnosus* LC 705, *Bifidobacterium animalis* Bb12, *L. acidophilus* NCFB-L61748, *L. bulgaricus* ATCC 11842, *Streptococcus thermophilus* T101 i szczep Shermanii *Propionibacterium freudenreichii* (20). Nie znaleziono natomiast informacji na temat obniżania immunoreaktywności poszczególnych białek mleka, w wyniku działania enzymów proteolitycznych egzo- i endogennych drobnoustrojów wykorzystywanych do prowadzenia fermentacji mlekowej. Skłoniło to autorów do przeanalizowania ok. 400 różnych prób napojów fermentowanych przygotowanych z użyciem szczepów i szczepionek o charakterze mezo- i termofilnym. Wśród dużej ilości kultur mikrobiologicznych znalazły się również typowe probiotyki. Niektóre z najkorzystniejszych wyników zostały wyszczególnione w tabeli 2. Stwierdzono, że mleko poddane pasteryzacji, a później fermentacji mlekowej zmienia swoje właściwości immunoreaktywne w kierunku dalszego ich obniżenia. W większości przypadków ilość pozostałej α -la i β -lg kształtowała się na poziomie poniżej 1% (tab. 3), w porównaniu do reaktywności stwierdzonej w mleku surowym, nie poddanym żadnym procesom technologicznym. Przeprowadzony proces fermentacji mlekowej doprowadził do hydrolizy głównych alergenów białek serwatkowych α -la i β -lg co przedstawiono na rysunku 1. Metodą elektroforezy stwierdzono brak białek odpowiadających za właściwości wymienionych białek. Widoczne na elektroforegramach smugi wskazują na obecność dużej ilości niezidentyfikowanych peptydów.

Tabela 3

Zmiany immunoreaktywności α -la i β -lg pod wpływem fermentacji mlekowej przy zastosowaniu wybranych szczepów i szczepionek

Rodzaj próby/rodzaj stosowanego szczepu lub szczepionki mikrobiologicznej	Pozostała immunoreaktywność białek serwatkowych w stosunku do mleka surowego	
	α -la (%)	β -lg (%)
mleko surowe	100,00	100,00
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> w83	0,18	1,37
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>Cremoris</i> 412	0,28	1,09
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 32	0,01	0,70
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> 23	0,08	0,74
mezofilne szczepionki bakterii fermentacji mlekowej 14D	0,99	0,67
<i>Lactobacillus helveticus</i> 5 V	0,29	0,37
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> SL	0,40	0,41
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> G-1	0,22	0,88
<i>Lactobacillus casei</i> 3/II	0,99	1,56
<i>Lactobacillus lactis</i> 147	2,15	3,07
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1ndz	1,45	0,56
szczepionki jogurtowe napój AC	0,36	0,17
napój Th	0,18	0,38



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny białek serwatkowych (SDS-PAGE) uzyskanych po fermentacji mlekowej z udziałem szczepów *Lactobacillus casei* i *Bifidobacterium*: 1) wzorce o niskiej masie cząsteczkowej firmy Sigma nr kat. M-3913, 10 μ l, 2) α -laktoalbumina – standard, 3) β -laktoglobulina – standard, 4) serwatka, 5) Bif. 6459, 6) Lbc. Cas. Cu 40, 7) Lbc. Cas. 101, 8) Bif. 62, 9) Bif. J.

Tak korzystne wyniki skłoniły autorów do wykonania dalszych badań o charakterze klinicznym. Próby skórne przeprowadzone zostały w bydgoskim szpitalu, pod kierunkiem prof. med. B. Romańskiego, na grupie pacjentów, u których wcześniej stwierdzono alergię na mleko krowie (13).

3.3. Określenie alergенności wybranych prób preparatów uzyskanych w wyniku fermentacji mlekowej

Na podstawie przeprowadzonych testów skórnych, wykonanych u osób uczulonych na mleko (wywiad dodatni, natychmiastowe odczyny skóry) stwierdzono, że wszyscy badani reagowali podobnie, silnym, natychmiastowym odczynem skóry na alergen mleka i nieznacznie słabszym na badane preparaty. Stwierdzono, że przeciętna średnica bąbla powstałego pod wpływem standardowego alergenu, tzw. kontroli dodatniej, mleka wynosiła 16 mm. Próbkę poszczególnych napojów fermentowanych w najkorzystniejszych przypadkach pozwoliły na uzyskanie wyniku w granicach 12,5-13 mm (13). Na podstawie przeprowadzonych testów skórnych wykazano konieczność dalszych poszukiwań analitycznych, dzięki którym można byłoby obniżyć alergенność mleka krowiego. Badania prowadzone metodą ELISA, której podstawą jest reakcja antygen-przeciwiła, winny być później korelowane z tak czułym układem jakim jest organizm ludzki.

4. Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych procesów technologicznych oraz analizy wyników metodą ELISA, stwierdzono wpływ procesów termicznych i fermentacji mlekowej na obniżenie immunoreaktywności białek serwatkowych mleka. Pasteryzacja mleka w temperaturze 90°C trwająca 15 min pozwoliła obniżyć zawartość α -la do 12,72%, a β -lg do 18,74% w stosunku do obserwowanej w mleku surowym.

Pod wpływem działania ultradźwięków i mikrofal stwierdzono przyspieszenie procesu redukcji immunoreaktywności. Zsumowane działanie ultradźwięków trwające godzinę oraz podwyższonej temperatury próbki mleka do ok. 50°C wpłynęło na obniżenie immunoreaktywności α -la i β -lg do poziomu odpowiednio 0,88 i 6,42%, w stosunku do immunoreaktywności mleka surowego. Stosunkowo krótkie działanie mikrofal (2 min) pozwoliło osiągnąć temperaturę próbki mleka 98°C. W tym czasie immunoreaktywność α -la i β -lg obniżyła się do poziomu odpowiednio 1,37 i 12,86%, w porównaniu do wartości stwierdzonej dla mleka surowego.

Zastosowanie procesu fermentacji mlekowej pozwoliło obniżyć immunoreaktywność białek mleka do poziomu poniżej 1% w przypadku obydwu białek serwatkowych.

W przeprowadzonych badaniach klinicznych wskazuje się na konieczność podejmowania dalszych badań zmierzających do dalszej redukcji immunoreaktywności

i alergienności poszczególnych białek mleka. Fermentacja mlekowa jest procesem stosunkowo łatwym. Właściwy dobór szczepów do produkcji napojów fermentowanych charakteryzujących się wysoką aktywnością enzymów proteolitycznych może mieć podstawowe znaczenie w produkcji hydrolizowanych odżywek. Cenne przy tym, jak się wydaje, jest to, że uzyskane w ten sposób preparaty charakteryzują się przyjemnym, kwaskowatym smakiem i zapachem.

Literatura

1. Wal J. M., (1998), *Allergy*, 53 (Suppl., 46), 114-117.
2. Yung-Hsiung Lee, (1992), *The Journal of Pediatrics*, 121, 5, 2, 47-50.
3. Jost R., Monti J. C., Pahud J. J., (1991), *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing*, 309-320.
4. Jost R., Fritsche R., Pahud J. J., (1991), *Bibl. Nutr. Dieta. Basel*, Karger, 48, 127-137.
5. Wróblewska B., Jędrychowski L., (1999), *Przemysł Spożywczy*, 8, 46-48.
6. Perdigón G., Alvarez S., Medici M., Vintini E., de Giori G. S., de Kairuz M. N., de Ruiz Holgado A. P., (1995), *Milchwissenschaft*, 50 (7), 367-371.
7. Bielecka M., Biedrzycka E., Wróblewska B., Jędrychowski L., Zduńczyk Z., (2000), *Medical Science Monitor, International Med. J. for Experimental and Clin Research*, 6, 3, 130, 24th Conference of the Polish Society of Microbiologist, Białystok (12-15 Sept).
8. Perdigón G., Alvarez S., de Macias M. E., Roux M. E., de Ruiz Holgado A. P., (1990), *J. Food Protect.*, 53, 404 -410.
9. Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S., Arvilommi H., (1992), *Pediatr. Res.*, 32, 141-144.
10. Pelto L., Isolauri E., Lilius E. M., Nuutila J., Salminen S., (1998), *Clin. Exp. Allergy*, 28, 1474-1479.
11. Zawisza E., (2000), *Alergia i Ty*, 2 (5), 38.
12. Boehringer M., (1991/1992), *Biochimica – Antibodies and Reagents for Immunochemistry. Methods and Materials*. Katalog firmy.
13. Jędrychowski L., Wróblewska B., (1999), *Food and Agricultural Immunology*, 11, 91-99.
14. Wróblewska B., (1996), praca doktorska. Olsztyn.
15. Schagger H., von Jagow G., (1987), *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379.
16. Jost R., Monti J. C., Pahud J. J., (1987), *Food Techn.*, October, 118-121.
17. Kilshaw P. J., Heppell L. M. J., Ford J. E., (1982), *Arch. Dis. Child*, 57, 842-847.
18. Heppell L. M., Cant A. J., Kilshaw P. J., (1984), *British J. of Nutrit.*, 51, 29-36.
19. Botey J., Eserverri J. L., Dordal M. T., Andreu J., Marin A., (1993), *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, March-April, 3 (2), 100-102.
20. Kankaanpää P., Sütas Y., Arvilommi H., Salminen S., Isolauri E., (1998), *GastroIntero. Int.*, 11, S139.