

## **Charakterizácia laboratórne pripraveného hypoalergénneho prípravku na báze kravského mlieka**

VIERA HERMANOVÁ - IMRICH STRAPÁČ  
- JURAJ GAŠPERÍK - MARTIN TOMÁŠKA

**SÚHRN.** V práci je popísaná charakteristika laboratórne pripraveného hydrolyzátu bielkoviny kravského mlieka vo vzťahu k jeho alergénemu potenciálu. Hydrolyzát bol charakterizovaný dosiahnutým stupňom hydrolyzy (OPA-metódou), zastúpením peptidov (elektroforéza, frakcionácia na molekulových sitách a po ultrafiltrácii) a imunologickými vlastnosťami (reakcia s pozitívnymi sérami pacientov alergických na bielkovinu kravského mlieka). V pripravenom hydrolyzáte bol dosiahnutý stupeň hydrolyzy 24,7 %, hydrolyzát neobsahoval peptidy s molekulovou hmotnosťou nad 5 000 Da (elektroforetické hodnotenie) a jeho imunologická aktivita bola veľmi nízka - 0,4 %. Takto pripravený prípravok môže byť použitý ako zložka hypoalergénnych detských výživ na báze kravského mlieka.

Potravinové alergie predstavujú pomerne veľkú časť alergických ochorení. Diagnostika alergií všeobecne a potravinových zvlášť je komplikovaná a nákladná. Mlieko je väčšinou prvá potravina, s ktorou sa človek stretáva. I keď o jednoznačnej prioritě dojčenia sa nedá pochybovať, niektorí novorodenci sú odkázaní prijímať náhradnú detskú výživu, najčastejšie na báze kravského mlieka. Bielkovina kravského mlieka patrí medzi potenciálne alergény. U citlivých jedincov sa tak môže už od narodenia rozvinúť alergické ochorenie, či neznášanlivosť na mliečnu bielkovinu. Takto postihnutí pacienti sú odkázaní na prijímanie hypoalergickej výživy. Výroba takejto výživy, ako aj jej uvádzanie do obehu, je komplikovaná záležitosť.

Pred započatím vlastného vývoja výroby hypoalergickej detskej výživy je užitočné identifikovať alergizujúce zložky bielkoviny mlieka a poznať spôsoby, ako znížiť ich alergénny potenciál. Poznatky z iných pracovísk jednoz-

---

Ing. Viera HERMANOVÁ, Oddelenie klinickej biochémie, Nemocnica s poliklinikou, V. Španyola 43, 010 01 Žilina.

RNDr. Imrich STRAPÁČ, CSc., Huma-Lab CS, Galaktická 9A, 040 61 Košice.

Ing. Juraj GAŠPERÍK, CSc., Ústav molekulárnej biológie, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava.

Dr. Ing. Martin TOMÁŠKA, Výskumný ústav mliekárenský, a.s., Dlhá ul. 95, 010 01 Žilina.

načne dokazujú, že najefektívnejšia cesta zníženia alergénneho potenciálu bielkovín je ich hydrolýza [1-3], ktorá môže byť doplnená tepelnou denaturáciou zvyškových imunoreaktívnych epitopov [1]. Od tohto technologického kroku sa potom odvíja aj výber a použitie vhodných analytických a imunochemických metód umožňujúcich celý proces výroby monitorovať a charakterizovať výsledný produkt tak, aby na nákladné klinické testovanie (nutné pri vývoji hypoalergénnych detských výživ) boli poskytnuté iba také preparáty, ktoré budú pacienti klinicky a metabolicky tolerovať.

Cieľom tohto článku je charakterizovať vhodnými analytickými a imunochemickými metódami laboratórne pripravený hypoalergénny prípravok na báze kravského mlieka, ktorý môže slúžiť ako rozhodujúca zložka finálnej hypoalergénnej detskej výživy. Daný prípravok bol vyrobený hydrolýzou kazeínového koncentrátu z kravského mlieka (KNK) pankreatínom.

## **Materiál a metódy**

### *Príprava KNK*

KNK bol pripravený z odstredeného kravského mlieka spôsobom bezmembránovej osmózy [4], za použitia pektínu.

### *Hydrolýza KNK*

KNK bol hydrolyzovaný pankreatínom (Pankreatin, FU USP, Merck) po dobu 5 hodín. Hydrolýza prebiehala za občasného miešania za nasledovných reakčných podmienok: teplota 50 °C, pH regulované v rozmedzí 7,2 až 8,0 prídavkami 1 mol.dm<sup>-3</sup> NaOH resp. KOH. Koncentrácia použitého enzýmového prípravku bola 0,025 g.g<sup>-1</sup> bielkoviny. Enzýmová aktivita bola v odoberaných vzorkách inaktivovaná 20 minútovým zázehvom na 80 °C.

### *Stanovenie stupňa hydrolýzy*

Stupeň hydrolýzy bielkovín (%) bol vypočítaný ako podiel hydrolyzovaných peptidových väzieb k celkovému počtu peptidových väzieb násobený 100. Počet hydrolyzovaných peptidových väzieb bol vypočítaný na základe výsledkov OPA metódy [5]. Celkový počet peptidových väzieb pre kazeín bol rovný 197, molekulová hmotnosť kazeínu bola rovná 23 000 Da [6].

### *Elektroforéza*

Testované vzorky boli podrobené elektroforetickému deleniu v polyakrylamidovom géle v prítomnosti aniónového detergentu dodecylsulfátu sodného. V práci bola použitá modifikácia diskontinuálnej vertikálnej elektro-

forézy podľa Schägerra a von Jagowa, detailne popísaná v [6]. Ako štandardy boli použité: zmes 7 polypeptidov Sigma MW-SDS-17S (molekulové hmotnosti 2 500 - 17 000 Da) a zmes individuálnych proteínov Sigma MW-SDS-70L (14 000 - 70 000 Da); všetko Sigma. Počas elektroforézy bol aplikovaný konštantný prúd 20 mA počas 1 hodiny, ktorý bol potom zvýšený na 30 mA. Prítomné látky bielkovinovej povahy boli identifikované vyfarbením s Brilliant Blue G (Sigma, USA). Molekulová hmotnosť neznámych frakcií bola zisťovaná porovnaním retardačných faktorov testovanej vzorky a známych štandardov.

#### *Frakcionácia pomocou molekulových sít a ultrafiltrácie*

Testované vzorky boli rozpustené v deionizovanej vode, centrifugované (20 000 g, 5 min) a následne frakcionované na molekulovom site Sephadex G-25 (Pharmacia) a Bio-Gel P-10 (Bio Rad) (podmienky: kolóna 39 x 2,5 cm, prietok 1 ml.min<sup>-1</sup>, zberanie frakcií po 4,5 ml, meranie absorbancie frakcií pri 280 nm) a na ultrafiltri Amicon, použitím membrán UM-5 a UM-10. Získané frakcie boli lyofilizované a vážené.

#### *Imunochemické testovanie*

Kvantifikácia imunologickej aktivity testovaných vzoriek bola počítaná cez zostatkovú aktivitu, ktorá bola meraná nasledovne: Sérum pacientov, ktoré malo byť použité na reakciu so vzorkou bolo testované pomocou ELISA-anti-MILK súpravy (Huma-Lab CS), postupom popísaným v [6], pričom bola zaznamenaná jeho absorbancia pri 492 nm. K séru boli pridané testované vzorky v optimálnej koncentrácii a reakcia prebiehala asi 18 h pri 4 °C. Následne bola zmes testovaná ELISA-anti-MILK súpravou a opäť bola meraná absorbancia pri 492 nm. Zostatková aktivita vzorky (%) bola vyjadrená ako:

$$\text{zostatková aktivita (\%)} = \frac{\text{absorbancia reakčnej zmesi}}{\text{absorbancia séra}} \cdot 100$$

Potom imunologická aktivita vzorky bola:

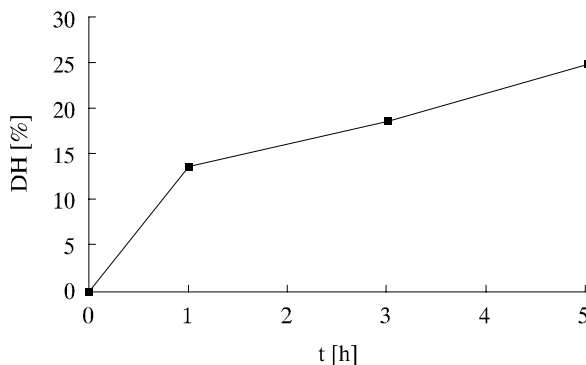
$$\text{imunologická aktivita (\%)} = 100 \% - \text{zostatková aktivita (\%)}$$

## Výsledky a diskusia

### Stanovenie stupňa hydrolyzy

Aplikovaná OPA-metóda umožňovala merať stupeň hydrolyzy bielkovín. Princíp tejto metódy je založený na reakcii  $\alpha$ -aminoskupín uvoľnených hydrolyzou s OPA činidlom a  $\beta$ -merkaptotanolom za vzniku aduktu silne absorbujúceho pri 340 nm. Molárna absorptivita je podobná pre všetky  $\alpha$ -aminoskupiny. Navyše, absorptivita aduktu s  $\alpha$ - a  $\epsilon$ -aminoskupinami bielkovín je tiež podobná a nie je ovplyvnená, keď sú bielkoviny denaturované v prostredí SDS. Číže pozadie je pre vzorky v rôznom stupni hydrolyzy konštantné a počet hydrolyzovaných väzieb môže byť správne vypočítaný [5]. Celkový počet peptidových väzieb potrebný k stanoveniu stupňa hydrolyzy bol vypočítaný na základe priemerného zastúpenia jednotlivých frakcií bielkovín a ich známeho aminokyselinového zloženia. Minoritné frakcie neboli brané do úvahy.

Typický priebeh hydrolyzy KNK Pankreatinom FU USP za nami zvolených podmienok, meraný OPA-metódou je zobrazený na obr. 1. Z obrázku vidno, že najvyšší nárast stupňa hydrolyzy bol nameraný už po hodine hydrolyzy. Štandardne dosiahnutý stupeň hydrolyzy v konečnom produkte bol 20 - 25 %.



OBR. 1. Závislosť dosiahnutého stupňa hydrolyzy (DH) od času (t) pri hydrolyze kazeínového koncentráta z kravského mlieka pankreatínom.

FIG. 1. Degree of a cow milk casein concentrate hydrolysis (DH) by pancreatin in dependence upon time of hydrolysis (t).

### Zastúpenie bielkovinových a peptidových frakcií

Vzorky substrátu (KNK) a hydrolyzátov odobraných v rôznom čase hydrolyzy boli podrobené elektroforetickému deleniu. V KNK boli zastúpené všetky bielkovinové frakcie mlieka, aj keď kazeínová zložka bola majoritná. Postupnou hydrolyzou dochádzalo k odbúraniu bielkovín na peptidy, pričom už po 3 hodinách hydrolyzy neboli touto metódou dokázané

žiadne peptidy s vyššou molekulovou hmotnosťou ako 5 000 Da. Keď bola použitá nižšia koncentrácia Pankreatinu FU USP, boli detegované rezíduá  $\beta$ -laktoglobulínu.

Na druhej strane frakcionáciou hydrolyzátu získaného po hodine hydrolýzy, ako aj konečného produktu hydrolýzy (po 5 hodinách) technikami využívajúcimi molekulové sitá a ultrafiltráciu, bol dokázaný dosť významný podiel peptidov s molekulovou hmotnosťou nad 5 000 Da. Túto skutočnosť možno vysvetliť podmienkami analýzy. Pri tejto metóde, na rozdiel od elektroforézy, neboli vzorky denaturované a teda natívne existujúce agregáty a diméry neboli rozrušené. Zastúpenie peptidových frakcií v testovaných vzorkách meraných uvedenou metódou, vyjadrené v % zobrazuje tabuľka 1. Z danej tabuľky je zrejmé, že hlavný podiel v oboch vzorkách tvorili látky s molekulovou hmotnosťou pod 2 500 Da, pričom po hodine hydrolýzy bol tento podiel 50,9 % a v konečnom produkte 71,3 %.

TABUĽKA 1. Percentuálne zastúpenie zložiek hydrolyzátu kazeínového koncentrátu z kravského mlieka v závislosti od ich molekulových hmotností.

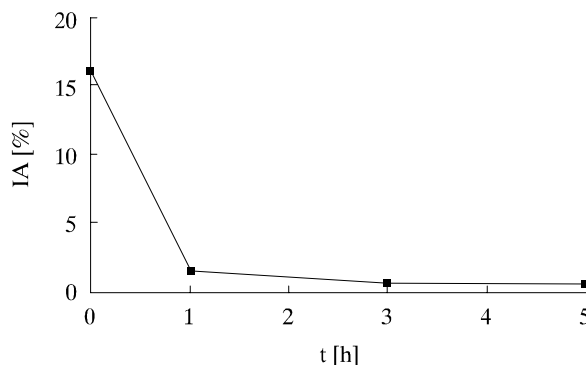
TABLE 1. Distribution of peptides in hydrolysates of cow milk casein concentrate (expressed in %) in dependence upon molecular weight.

Čas hydrolýzy <sup>2</sup> [h]	Molekulová hmotnosť <sup>1</sup> [Da]			
	> 10 000	10 000 - 5 000	5 000 - 2 500	< 2 500
1	15,3 %	26,0 %	7,8 %	50,9 %
5	10,5 %	12,7 %	5,5 %	71,3 %

1 - molecular weight, 2 - time of hydrolysis.

### *Imunochemické testovanie*

Keďže odozva na alergény môže byť fatálna, je nevyhnutné pri testovaní hydrolyzátoz stanoviť ich antigénny potenciál, resp. imunogenicitu či imunoreaktivnosť [7]. Kvantitatívne vyhodnotenie imunologickej aktivity umožňuje metóda merania zostatkovej aktivity pozitívneho séra použitého na testovanie, z ktorej sa potom počíta imunologická aktivita. Imunologická aktivita je teda ekvivalentná tej časti aktivity pozitívneho séra, ktorá bola vyblokováná reakciou antigénov prítomných vo vzorke s príslušnými špecifickými IgG protilátkami zo séra. Obr. 2. zobrazuje pokles imunologickej aktivity počas hydrolýzy KNK. Tá bola znížená zo 16,1 % až na 0,4 %, pričom najmarkantnejšie zníženie bolo zaznamenané už po hodine hydrolýzy.



OBR. 2. Pokles imunologickej aktivity (IA) od času (t) pri hydrolyze kazeínového koncentráta z kravského mlieka pankreatínom.

FIG. 2. Immunological activity (IA) of a cow milk casein concentrate hydrolyzed by pancreatin in depen-

## Záver

Použitím štyroch odlišných analytických a imunochemických metód bolo možné získať nevyhnutné informácie o alergénnych vlastnostiach laboratórne pripraveného prípravku hydrolyzáta bielkoviny z kravského mlieka. Nadväznosť stanovenia stupňa hydrolyzy, monitorovania zastúpenia peptidov v hydrolyzáte technikami elektroforézy a v konečnej etape meranie imunologických vlastností, umožňovalo navyše viesť a regulovať spôsob výroby hydrolyzáta tak, aby sa skutočne dosiahol požadovaný efekt - pripraviť komponent hypoalergénnej detskej výživy. Tieto tri metódy preto predstavujú základ, ktorý by malo zvládnuť každé laboratórium podieľajúce sa na vývoji hypoalergénnych prípravkov nielen na báze mliečnej bielkoviny. Sledovanie zastúpenia peptidových frakcií technikami frakcionácie na molekulových sitách a po ultrafiltrácií možno považovať za doplnkovú charakteristiku, avšak významnú, pretože jej výsledky naznačujú, že závery každého merania (podiel nízkomolekulových látok v hydrolyzáte) treba vždy interpretovať a posudzovať vzhľadom na podmienky, za akých bolo uskutočnené.

### Zoznam používaných skratiek:

- KNK - kazeínový koncentrát z kravského mlieka
- OPA - ortoformaldialdehyd
- DH - stupeň hydrolyzy
- IA - imunologická aktivita
- IgG - imunoglobulíny triedy G

## Literatúra

1. ASSELIN, J. - HÉBERT, J. - AMIOT, J.: Effect of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J. Food. Sci.*, 54, 1989, č. 4, s. 1037-1039.
2. MAHMOUD, M. I. - MALONE, W. T. - CORDLE, C. T.: Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food. Sci.*, 57, 1992, č. 5, s. 1223-1229.
3. NAKAMURA, T. - SADO, H. - SYUKUNOBE, Y.: Antigenicity of whey protein hydrolysates prepared with various proteases against rabbit antiserum to bovine  $\beta$ -laktoglobulin. *Anim. Sci. Technol.*, 63, 1992, č. 8, s. 814-817.
4. KONTOVÁ, M.: Overenie výroby kazeínového koncentrátu v prevádzkových podmienkach. [*Výskumná správa.*] Žilina, Výskumný ústav mliekárenský 1992. 60 s.
5. CHURCH, F. C. - SWAISGOOD, H. E. - PORTER, D. H. - CATIGNANI, G. L.: Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 66, 1983, č. 6, s. 1219-1227.
6. HERMANOVÁ, V. - TOMÁŠKA, M.: Alergény v mlieku. [*Výskumná správa.*] Žilina, Výskumný ústav mliekárenský 1997. 59 s.
7. STRAPÁČ, I. - TALÁN, J. - MUCHA, J. - CHUDÝ, D.: Identification of specific immunoglobulin antibodies of the IgA, IgG and IgM classes in human serum against selected allergens immobilised on nitrocellulose membrane. *Immunoassay*, 1, 1992, č. 1, s. 3-15.

Do redakcie došlo 20.10.1997.

### Characteristics of a hypoallergenic laboratory preparation from cow milk

HERMANOVÁ, V. - STRAPÁČ, I. - GAŠPERÍK, J. - TOMÁŠKA, M.:  
*Bull. potrav. Výsk.*, 36, 1997, p. 265-271.

**SUMMARY.** A cow milk protein hydrolysate prepared in the laboratory was studied in connection to its allergenic potential. Hydrolysis degree was characterized by the OPA-method. Distribution of peptides was studied by electrophoresis, fractionation using molecular sieves, and ultrafiltration. Immunological activity was studied using the sera of patients with a positive allergy to cow milk proteins. The hydrolysis degree of 24.7 % was achieved for the prepared hydrolysate. The hydrolysate did not contain the peptides with the molecular weight above 5 000 Da (electrophoretic measurement) and its immunological activity was very low - 0.4 %. The hydrolysate prepared in the described way can be used as a component of the hypoallergenic infant formulae based on the cow milk.