

ALLERGENIC PROTEINS IN SHEEP MILK.

Lenka Ruprichová, Michaela Dračková, Ivana Borkovcová, Lenka Vorlová

ABSTRACT

The aim of the work was to determine allergenic proteins in sheep milk by RP-HPLC method. Forty samples of sheep milk were analyzed. The sheep were mainly Lacaune breed. The minor breeds were Improved Wallachian and East Friesian sheep. The samples of milk were collected from sheep farm in Zlín Region in period from May to June 2010. We analyzed major allergenic proteins among which caseins, α -lactalbumin and β -lactoglobulin belong. Content of caseins and whey proteins is different depending on the type of milk and their genetic variations are also various. This variability is determined not only by species of milk producing animal, but also by breed. The composition and allergenic properties of sheep, goat's and cow's milk are also different. The sheep milk contained 13.23 % of α -lactalbumin and 86.77 % of β -lactoglobulin from total whey proteins. Casein in sheep milk were represent in amounts: α_{S1} -casein 23.26 %, α_{S2} -casein 3.63 %, β -casein 42.15 %, κ -casein 30.96 % from total caseins.

Keywords: sheep milk, allergenic protein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, casein, RP-HPLC

ÚVOD

V ovčím mléce můžeme najít šest hlavních proteinů: α -laktalbumin (LA), β -laktoglobulin (LG), α_{S1} -kasein (α_{S1} -CN), α_{S2} -kasein (α_{S2} -CN), β -kasein (β -CN) a κ -kasein (κ -CN) (Park, Haenlein, 2006), které patří zároveň mezi hlavní alergenní bílkoviny (Monaci et al., 2006). Největší zastoupení mají kaseiny, které tvoří 80 % celkových mléčných bílkovin (Park, Haenlein, 2006). Méně jsou v mléce zastoupeny syrovátkové bílkoviny, které tvoří přibližně 20 % (Ng-Kwai-Hang et al., 2003). Za alergeny s největším alergenním potenciálem jsou považovány α_{S1} -kasein a β -laktoglobulin (Monaci et al., 2006).

V různých druzích mléka se liší nejen obsah kaseinů a syrovátkových bílkovin, ale také jejich genetická variace. Park, Haenlein (2006) uvádí, že u již zmíněných syrovátkových bílkovin a kaseinů bylo nalezeno 19 různých genetických variací. Genetický polymorfismus mléčných bílkovin má velký význam, nejen protože ovlivňuje produkci, složení a kvalitu mléka (Amigo et al., 2000), ale je důležitý také ve smyslu prevence alergií na mléko, která závisí především na odstranění všech potravinářských výrobků obsahujících mléko z diety (Monaci et al., 2006).

K dosažení tohoto cíle, je důležité znát obsah alergenů v mléce a následně i potravinářských výrobcích. Cílem této práce je stanovení obsahu jednotlivých kaseinů (α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein, κ -kasein) a hlavních syrovátkových bílkovin (β -laktoglobulin a α -laktalbumin) jako potenciálních alergenů v ovčím mléce metodou RP-HPLC (vysokoučinné kapalinové chromatografie s reverzní fází).

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky:

Vzorky ovčího mléka byly odebírány z ovčí farmy Zlínského kraje České republiky v časovém rozmezí od 2. 5. 2010 do 15. 6. 2010. Nejvíce bylo zastoupeno mléčné plemeno lacaune, méně pak zušlechtilá valaška a východofrišské plemeno.

Vzorky zchlazené na teplotu 4–6 °C byly transportovány tak, aby nedošlo ke zvýšení jejich teploty na více než 8 °C. Po příjmu do laboratoře byly vzorky zmrazeny na

-18 °C a při této teplotě skladovány do doby analýzy. Kaseiny byly izolovány a následně lyofilizovány (López-Fandiño et al., 1993) pomocí lyofilizátoru Lyovac GT 2 (Amsco/Finn-Aqua, Finland).

Chemikálie:

Acetonitril, dichlormethan a 2-merkptoethanol (Merck, Německo), kyselina trifluoroctová a standardy α -casein, β -casein, κ -casein, α -laktalbumin a β -laktoglobulin (Sigma Aldrich, Německo), kyselina octová (Penta, ČR), Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

Příprava vzorků:

Ovčí mléko bylo odstředěno (3000 otáček/15 minut), z povrchu byl odebrán tuk a toto odtučněné mléko bylo pomocí 10% kyseliny octové upraveno na hodnotu pH = 4,6 (tím bylo docíleno vysrážení kaseinu). Poté bylo mléko znovu odstředěno (3000 otáček/15 minut). Odstředěná syrovátka byla oddělena od kaseinu a zmrazena na teplotu -18 °C.

Před vlastním stanovením byl lyofilizovaný kasein rozpuštěn v roztoku Tris-HCl (pH 6,8) a 2-mercaptoethanolu. Dále byly vzorky kaseinů, α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu přefiltrovány přes nylonový membránový filtr (0,22 μ m) do vialek.

Podmínky HPLC stanovení:

Ke stanovení kaseinů, α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu byl použit kapalinový chromatograf Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou X Bridge TM C18, 150 x 3,0 mm, 3,5 μ m (Waters, Ireland). Teplota kolony pro stanovení kaseinů byla 45 °C a pro stanovení syrovátkových bílkovin 40 °C. Mobilní fáze A obsahovala vodu/acetonitril/trifluoroctovou kyselinu (TFA) v poměru 95/5/0,1 (v/v/v) a mobilní fáze B vodu/acetonitril/TFA v poměru 5/95/0,1 (v/v/v). Bylo použito gradientové eluce a průtoku mobilní fáze 0,4 ml.min⁻¹. Detekce byla prováděna při 205 nm. Analýza kaseinů probíhala 30 minut a analýza syrovátkových bílkovin 35 minut. Velikost nástřiku kaseinů byla 5 μ l a syrovátkových bílkovin 10 μ l.

Vyhodnocení:

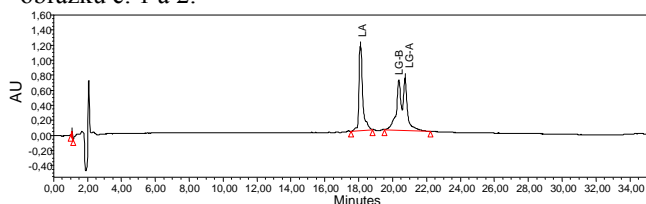
Sběr a vyhodnocení dat u metody RP-HPLC byly provedeny v programu Empower2 (Waters, USA). Základní statistické charakteristiky (průměr, směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka, maximální hodnota, minimální hodnota) byly vypočítány pomocí Microsoft Excel a ke statistickému zpracování byl použit program Statistica 7.

Validace a optimalizace metody RP-HPLC pro syrovátkové bílkoviny:

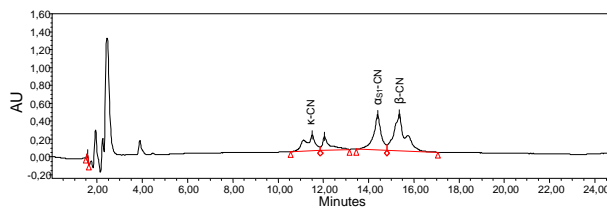
Optimalizace HPLC analýzy byla provedena pomocí standardních roztoků α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu. Kalibrační křivka byla pro α -laktalbumin sestrojena v koncentračním rozsahu 0,404–1,571 mg.ml⁻¹ ($y = 0,5835x - 0,215$; $R^2 = 0,989$). Kalibrační křivka pro β -laktoglobulin byla sestrojena v koncentračním rozsahu 0,406–1,133 mg.ml⁻¹ ($y = 0,3635x + 0,076$; $R^2 = 0,9752$). Citlivost metody byla zjištěna pomocí směrnice kalibrační přímky. Opakovatelnost postupu byla stanovena z výsledků několikanásobného měření jednoho vzorku ($n = 7$) a byla stanovena jako RSD 2,53 % u α -laktalbuminu a RSD 2,40 % u β -laktoglobulinu. Opakovatelnost retenčních časů byla stanovena z výsledků několikanásobného měření jednoho vzorku ($n = 12$) a byla stanovena jako RSD 1,02 % pro α -laktalbumin a RSD 0,33 % pro β -laktoglobulin. Limit detekce byl stanoven jako 3 S/N (poměr signál/šum) 0,0045 mg.ml⁻¹ pro α -laktalbumin i β -laktoglobulin. Mez stanovitelnosti (určena jako 10 S/N) byla 0,015 mg.ml⁻¹ pro α -laktalbumin i β -laktoglobulin. Vyhodnocení bylo provedeno metodou vnějšího standardu a kvantifikace byla provedena metodou časových skupin (timed groups).

Validace a optimalizace RP-HPLC metody pro kaseiny:

Optimalizace HPLC analýzy byla provedena pomocí standardních roztoků α -, β - a κ -kaseinu. Vyhodnocení bylo provedeno metodou vnějšího standardu a kvantifikace byla provedena metodou časových skupin (timed groups). Individuální píky byly seskupeny do skupiny a procesovány jako jeden pík. V případě κ -kaseinu byly sumarizovány píky v časovém rozmezí 10,00 – 12,50 min, u α _{S1}-kaseinu 13,20 – 14,40 min a u β -kaseinu v rozmezí 14,10 – 16,00 min. Opakovatelnost postupu byla stanovena z výsledků několikanásobného měření jednoho vzorku ($n = 6$) a byla stanovena jako RSD 4,6 % u α _{S1}-kaseinu, RSD 6,7 % u β -kaseinu a RSD 0,7 % u κ -kaseinu. Limit detekce byl stanoven jako 3 S/N (poměr signál/šum) 0,0045 mg.ml⁻¹ a mez stanovitelnosti (určena jako 10 S/N) byla 0,015 mg.ml⁻¹. Ukázky chromatogramů standardů jsou na obrázku č. 1 a 2.



Obr. 1: Chromatogram standardů syrovátkových bílkovin



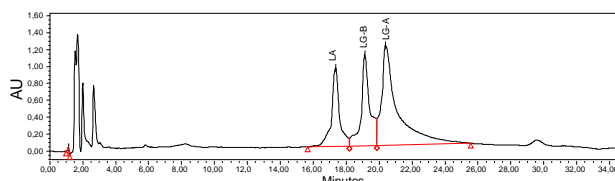
Obr. 2: Chromatogram standardů kaseinů

VÝSLEDKY A DISKUSE

Obsah různých frakcí v jednotlivých druzích mléka se liší (Ng-Kwai-Hang et al., 2003). Amigo et al., (2000) ve své studii uvádí, že α -laktalbumin ovčího mléka má 2 genetické variace, A a B. Frakce B je vzácná a byla zaznamenána pouze u některých plemen.

V našem případě u ovčího mléka pocházejícího převážně z ovčí plemene lacaune nebyla frakce α -laktalbuminu B identifikována. Ani v případě minoritních plemen zušlechtěná valaška a východofrišské plemeno se tato frakce nevyskytovala. Obsah α -laktalbuminu v ovčím mléce byl 13,23 %.

Chromatografické záznamy analýz jsou uvedeny na obrázku č. 3 a 4.



Obr. 3: Chromatogram syrovátkových bílkovin v ovčím mléce

Na chromatogramu ovčího mléka byly u β -laktoglobulinu A a B (obr. 3) zřejmé dva píky. Amigo et al. (2000) ve své práci dále uvádí, že v případě ovčí plemene lacaune byly zaznamenány genetické variace A a B, stejně jako v našem případě (obr. 3). U ovčího mléka činil obsah frakce β -laktoglobulinu B 30,06 % a β -laktoglobulinu A 69,56 %. Celkový obsah β -laktoglobulinu v ovčím mléce byl 86,77 %.

Tabulka 1: Obsah kaseinů a syrovátkových bílkovin v ovčím mléce v %.

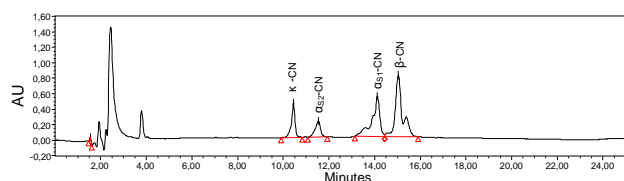
[%]	Kaseiny				Syrvátkové bílkoviny			
	α _{S1} -CN	α _{S2} -CN	β -CN	κ -CN	LA	LG-B*	LG-A*	LG
Průměr	23,26	3,63	42,15	30,96	13,23	30,06	69,56	86,77
Min	17,31	1,42	35,01	19,16	10,08	19,53	63,28	83,24
Max	35,33	7,34	55,23	39,48	16,76	37,05	78,77	89,92
SD	4,37	1,33	5,24	5,98	1,92	3,42	3,12	1,92

*součet LG-B a LG-A je 100 %

V tabulce č. 1 jsou uvedeny obsahy jednotlivých kaseinů a syrovátkových bílkovin ovčího mléka. U β -laktoglobulinu je navíc uvedeno jeho procentuální zastoupení frakcí A a B. Kaseiny obsahují stejně jako syrovátkové bílkoviny různé genetické variace (Ng-Kwai-Hang et al., 2003). Park, Haenlein, (2006) ve své práci uvádí genetické variace pro různé typy kaseinů ovčího mléka. U α _{S1}-kaseinu bylo identifikováno nejvíce genetických variací (A, B, C, D, E, F). U α _{S2}-kaseinu byly zjištěny 3 genetické variace (A, B, Fast), podobně jako u β -kaseinu (A, B, C).

U κ -kaseinu byly identifikovány zatím jen 2 genetické variace (A, B). V této práci jsme se však nezaměřovali na konkrétní identifikaci jednotlivých genetických variací, i když je z chromatogramu zřejmé, že pík α_{S1} -kaseinu a β -kaseinu obsahuje více frakcí. Tyto frakce však nejsou dostatečně odděleny, aby mohly být spolehlivě identifikovány.

Vyhodnoceny byly pouze α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein a κ -kasein, jejichž procentuální zastoupení je uvedeno v tabulce 1. α_{S2} -kasein byl vyhodnocen na základě práce **Trujillo et al. (2000)**. Pomocí Wilcoxonova párového testu byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl u α -laktalbuminu, β -laktoglobulinu i kaseinů ovčího mléka ($P < 0,01$).



Obr. 4: Chromatogram kaseinů v ovčím mléce

CONCLUSION

Obsah α -laktalbuminu u ovčího mléka byl $13,23 \pm 1,92$ % a celkový obsah β -laktoglobulinu činil $86,77 \pm 1,92$ %. Procentuální zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí činilo pro α_{S1} -kasein $23,26 \pm 4,37$ %, α_{S2} -kasein $3,63 \pm 1,33$ %, β -kasein $42,15 \pm 5,24$ % a κ -kasein $30,96 \pm 5,98$ %. Těmto výsledkům odpovídá i celkový statisticky vysoce významný rozdíl kaseinů a syrovátkových bílkovin ovčího mléka ($P < 0,01$), který byl vyhodnocen pomocí Wilcoxonova párového testu. Vzhledem k tomu, že mezi nejvíce alergenní bílkoviny mléka patří α_{S1} -kasein a β -laktoglobulin, lze z výsledků vyvodit, že u ovčího mléka je největším potenciálem vyvolávající alergii β -laktoglobulin.

LITERATURA

AMIGO, L., RECIO, I., RAMOS, M., 2000. Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – a review. In *International Dairy Journal*, roč. 10, 2000, s. 135-149.
 LÓPEZ-FANDIÑO, R., OLANO, A., CORZO, N., RAMOS, M., 1993. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. In *Journal of Dairy Research*, roč. 60, 1993, s. 339.

MONACI, L., TREGOAT, V., A. J. VAN HENGEL, ANKLAM, E., 2006. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. In *European Food Research and Technology*, roč. 223, 2006, s. 149–179.
 NG-KWAI-HANG, K.F., CREAMER, L.K., HORNE, D.S., MUNRO, P.A., SOUTHWARD, C.R., ZHANG, Y., BREW, K., SAWYER, L., HAGGARTY, N.W. a kol.: Milk Proteins, In Roginski, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F., 2003. *Encyclopedie of Dairy Science*, Amsterdam: Academic press, 2003, roč. 3, s. 1967, ISBN 0-12-227238-2.
 PARK, Y. W., HAENLEIN, G. F. W., 2006. *Handbook of milk of non-bovine mammals*. Blackwell Publishing Ltd, UK, 2006, s. 449, ISBN 0-8138-2051-0.
 TRUJILLO, A.-J., CASALS, I., GUAMIS, B., 2000. Analysis of major ovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography and flow injection analysis with electrospray ionization mass spectrometry. In *Journal of Chromatography A*, roč. 870, 2000, s. 371–380.

Poděkování: Práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury VFU Brno 72/2010/FVHE.

Kontaktní adresa:

Ing. Lenka Ruprichová. Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42, Brno. Česká republika. Tel.: +420 541 562 722, Email: ruprichoval@vfu.cz

MVDr. Michaela Dračková, PhD. Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42, Brno. Česká republika. Tel.: +420 541 562 714, Email: drackovam@vfu.cz

RNDr. Ivana Borkovcová, PhD. Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42, Brno. Česká republika. Tel.: +420 541 562 715, Email: borkovcovai@vfu.cz

Prof. MVDr. Lenka Vorlová, PhD. Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42, Brno. Česká republika. Tel.: +420 541 562 710, Email: vorloval@vfu.cz