

Grażyna Pokorska-Lis, Andrzej Tokarz, Paweł Dębek

HYDROLIZA ENZYMATYCZNA BIAŁKA MLEKA I JEGO PRZETWORÓW W WARUNKACH *IN VITRO*

Katedra i Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: Prof. WUM dr hab. *A. Tokarz*

e-mail: grazyna.pokorska-lis@wum.edu.pl

Podjęto próbę określenia skuteczności trawienia białka (kazeiny) zawartego w różnych rodzajach mleka i mlecznych napojach fermentowanych różniących się m.in. zawartością tłuszczu i białka oraz sposobem przeprowadzonych zabiegów przetwórczych.

Hasła kluczowe: mleko, przetwory mleczne, białko, kazeina, strawność

Key words: milk, dairy product, protein, casein, digestion

Jednym z najbardziej znanych, odgrywających ogromną rolę w żywieniu człowieka, lubianych i cenionych produktów żywnościowych, mimo różnych kontrowersji, jest mleko. Już ojciec medycyny *Hipokrates* około 2400 lat temu uznał je za „najdoskonalszy i najbardziej kompletny pokarm, jaki stworzyła natura” (1).

Skład chemiczny mleka jest zróżnicowany i zależy od szeregu czynników, takich jak: rasa i cechy osobnicze zwierzęcia, rodzaj pokarmu, jakim było karmione, okres laktacji, czy pora udoju. Jednym ze składników odżywczych mleka jest białko. Mleko krowie, podobnie jak mleko owcze, kozie, bawole i wielbłądzie jest mlekiem zaliczanym do typu kazeinowego - przeciętnie zawiera 2,7-4,0% białek, a około 3% stanowi kazeina, która jest głównym białkiem mleka. Białka mleka cechują się wysoką wartością biologiczną, są szeroko wykorzystywane w przemyśle spożywczym (2,3,4). Na szczególną uwagę zasługują mleczne napoje fermentowane, powstałe z mleka dzięki aktywności swoistych drobnoustrojów. Proces fermentacji przedłuża trwałość produktów i nadaje im nowe cechy organoleptyczne. Otrzymywane produkty różnią się składem, smakiem, zapachem, konsystencją i wartością odżywczą (5,6).

Wobec wielu krytycznych opinii odnośnie możliwości trawienia kazeiny mleka, przez ludzi, zwłaszcza poddawanego zabiegom przetwórczym związanym z działaniem wysokiej temperatury sformułowany został pogląd co do zasadności spożywania mleka w jego nieprzetworzonej formie (6 - 8).

Celem prezentowanej pracy była próba porównania strawności białka (kazeiny) zawartego w różnych rodzajach mleka krowiego i w mlecznych napojach fermentowanych, a także określenie ewentualnego wpływu tłuszczów zawartych w tych produktach oraz zastosowanej obróbki termicznej, na strawność zawartego w nich białka.

MATERIAŁY I METODY

Badane produkty zawierające białko (kazeinę) oraz samą kazeinę poddawano procesowi enzymatycznego trawienia w warunkach *in vitro*. W specjalnie przygotowanym dwukompartamentowym układzie reakcyjnym pozwalającym badać proces dializy aminokwasów przez błonę półprzepuszczalną, imitującym warunki zbliżone do warunków panujących w organizmie ludzkim, zawierającym enzymy proteolityczne, prowadzono hydrolizę białka do wolnych aminokwasów.

Proces hydrolizy enzymatycznej przebiegał w dwóch etapach:

- Trawienie pepsyną w środowisku kwasu chlorowodorowego.
- Trawienie trypsyną w środowisku lekko zasadowym.

Do oznaczeń pobierano próbki dializatów po czasie 20, 40, 60, 90 i 120 minut, czyli od rozpoczęcia hydrolizy zasadowej i dializy w celu wyznaczenia kinetyki procesu trawienia. Następnie przeprowadzano reakcję ninhydrinową zachodzącą pomiędzy zhydrolizowanymi wcześniej aminokwasami w dializacie a ninhydriną. Powstały w wyniku reakcji barwny produkt oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm (9).

Analizie poddano dwie grupy produktów:

Mleka:

a)* Mleko surowe („prosto od krowy”, niepoddawane żadnym zabiegom przetwórczym)

b) Mleko „Łaciate” 0,5% tł. UHT

c) Mleko 3,2% tł. UHT

d) Mleko „Zimne” 3,2% tł.(mleko uzyskane po mikrofiltracji i pasteryzacji w niskiej temperaturze)

Przetwory mleczne:

e) Zsiadłe Mleko „Jovi”

f) Kefir lekki 0% tł. Piątnica

g) Kefir Piątnica

h) Kefir naturalny Bakoma

i) Jogurt naturalny Danone

j) *Jogurt “domowy” (z mleka surowego, niepoddawanego zabiegom przetwórczym)

k) Maślanka Milko

l) Mleko fermentowane z aktywnymi *L. casei Defensis*

m) Mleko acidofilne „Wiejska Fantazja” o smaku waniliowym

* W celu wyznaczenia podstawowych parametrów dokonano oznaczenia zawartości białka metodą *Kjeldahla* i zawartości tłuszczu metodą *Gerbera* (10).

Otrzymane wyniki poddano ocenie statystycznej według testu t-Studenta przy $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

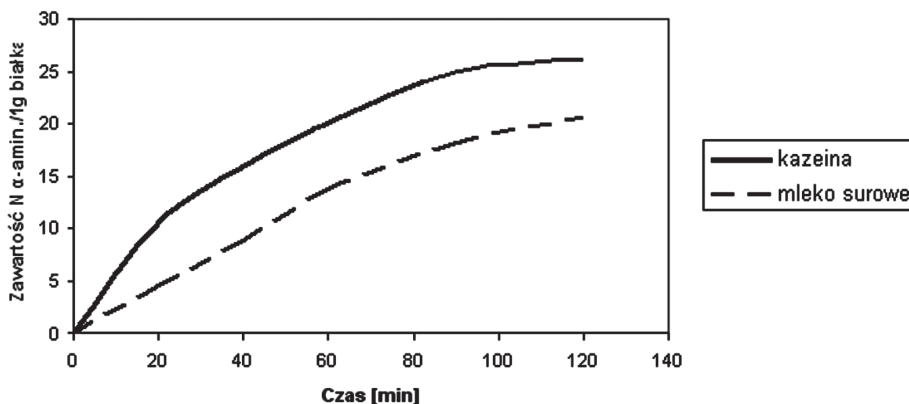
Wyniki analizy kinetyki i strawności mleka i produktów mlecznych wraz z ich oceną statystyczną przedstawiono w tabeli I i na rycinach 1-2.

Na temat kazeiny i jej trawienia opublikowano wiele różnych, zaskakujących, często sprzecznych ze sobą, opinii. Przeciwnicy spożywania mleka, twierdzą, że nie jest ono zdrowym i cennym żywieniowo produktem m.in. właśnie ze względu na zawartość kazeiny, która będąc trudną do strawienia, może tworzyć w przewodzie pokarmowym duże, zbite, ciężkostrawne, długo zalegające „grudy” i przyczyniać się do wytworzenia gęstego śluzu. Ten zaś zalegając w jelitach może utrudniać wchłanianie innych substancji odżywczych. (7,8).

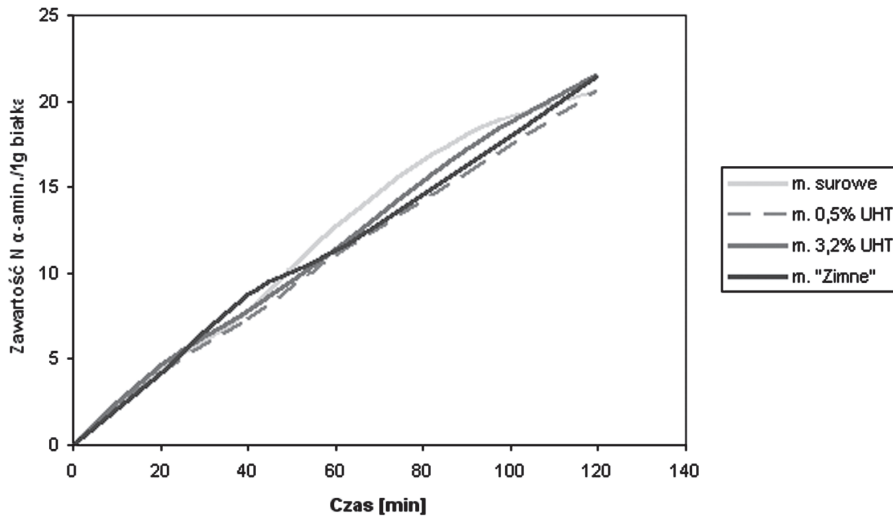
Krytyczne opinie dotyczą także pewnych zabiegów przetwórczych, jakim poddawane jest mleko. Szczególnie negatywnie oceniana jest pasteryzacja, a zwłaszcza sterylizacja UHT. Poddawanie mleka działaniu tak wysokiej temperatury powoduje poniekąd nieodwracalne zmiany w jego składzie chemicznym prowadzące do m.in.: denaturacji białka i obniżenia jego przyswajalności, a także zniszczenia sporej części witamin, przez co mleko UHT jest produktem uboższym odżywczo od mleka nie poddanego procesom przetwórczym (6,8)

Opinia zwolenników spożywania mleka i znacznej większości żywieniowców jest zgoła odmienna. Zalecają oni spożywanie mleka, jako źródła pełnowartościowego białka, cennego i lekkostrawnego. Natomiast obróbka cieplna nie wpływa na zmniejszenie zawartości białka, tłuszczu, laktozy i składników mineralnych w produkcie finalnym i nie obniża wartości odżywczej mleka. Wręcz przyczynia się do rozluźnienia struktury chemicznej i denaturacji białka, czyniąc je bardziej dostępnym dla enzymów trawiennych (1,11).

Wykonane analizy wykorzystujące najprostsze modele *in vitro* badania strawności białka zawartego w różnych rodzajach mleka zdają się potwierdzać stanowisko tych ostatnich. Wprawdzie istnieje widoczna różnica, istotna statystycznie (tab. I), pomiędzy szybkością trawienia czystej kazeiny (układ sztuczny, stworzony jedynie na potrzeby eksperymentu) a kazeiny zawartej w mleku (ryc. 1), ale już wyniki przedstawiające kinetykę trawienia białka zawartego w poszczególnych badanych rodzajach mleka prezentują się bardzo podobnie (ryc. 2).



Ryc.1 Kinetyka trawienia kazeiny i mleka surowego.



Ryc. 2. Kinetyka trawienia różnych rodzajów mleka.

Nie stwierdzono różnicy pomiędzy strawnością białka zawartego w mleku surowym (nie poddawanym żadnym zabiegom przetwórczym), mleku poddawanym niskiej pasteryzacji i mikrofiltracji („Zimne”) a mleku sterylizowanym UHT („Łaciate”) (tab. 1; wyniki zgodne statystycznie). Zawartość uwolnionego z 1g białka w procesie hydrolizy enzymatycznej azotu α -aminowego po czasie $t=120$ minut dla wszystkich badanych rodzajów mleka mieściła się w granicach 20-22 mg N α -amin./1g białka, co może świadczyć, że proces obróbki cieplnej nie wpływa niekorzystnie na przyswajalność i wartość odżywczą białka zawartego w mleku. Otrzymane w prezentowanym eksperymencie wyniki potwierdzają wręcz niektóre dane bibliograficzne m.in. dotyczące rozluźnienia struktury chemicznej białka na skutek obróbki termicznej i ułatwionego dostępu enzymów proteolitycznych do zdenaturowanej struktury(11). Oznaczone zawartości azotu α -aminowego, uwolnionego w procesie hydrolizy enzymatycznej po czasie $t=120$ minut, są najwyższe właśnie dla mleka poddawanego procesowi sterylizacji UHT (tab. I).

Zawartość tłuszczu w mleku zdaje się nie mieć istotnego wpływu na strawność białka mlecznego. Wyniki uzyskane dla mleka chudego (0,5% tłuszczu), mleka tłustego (3,2%tł.) i mleka pełnotłustego (5,2% tł., surowe) są bardzo zbliżone i zgodne statystycznie (tab. 1). Zawartość azotu α -aminowego po czasie $t=120$ minut dializy dla mleka 0,5% tł. i mleka 5,2% tł. prezentuje się prawie na tym samym poziomie - odpowiednio 20,59 i 20,64 mg N α -amin./1g białka. Dodatkowo, krzywe przedstawiające graficznie hydrolizę białka (ryc. 2) oraz ilości azotu α -aminowego, otrzymanego po całym procesie trawienia, poddają w wątpliwość informacje, jakoby kazeina miała tworzyć długo zalegające, trudne do strawienia „grudy” w przewodzie pokarmowym.

Tab e l a 1. Zawartość azotu α-aminowego w badanych produktach mlecznych [mg/1 g białka], analiza statystyczna. wobec mleka surowego i 1% kazeiny oraz charakterystyka wartości odżywczej.

Badana próba	Mleko * surowe	Mleko Łaciate 0,5% UHT	Mle- ko 3,2% UHT	Mleko „Zimne” 3,2%	Zsiadłe mleko Jovi	Kefir lek- ki Piąt- nica 0% tł.	Kefir Piąt- nica	Kefir Bakoma	Jogurt naturalny Danone	Jogurt „Domo- wej ro- boty”	Maslan- ka Mil- ko	Actimel Danone	Mleko acido- filne	1% roz- twór ka- zeiny #
Średnia arytmetyczna	20,64	20,59	21,62	21,47	21,64	18,33	19,65	18,85	16,10	16,58	18,63	28,25	19,65	26,18
Odchylenie standardowe	0,78	0,33	1,32	0,28	0,56	0,56	0,29	0	0,20	1,91	0,85	1,43	0,69	1,13
T empiryczne p = 0,95	8,0613#	0,1179*	1,2779*	1,7244*	2,0669*	4,8044*	2,6510*	4,5838*	11,2480*	3,9280*	3,4870*	9,3561*	1,90355*	8,0613*
T teoretyczne p = 0,95	2,447	2,447	2,447	2,571	2,447	2,447	2,365	2,447	2,447	2,447	2,447	2,447	2,447	2,447
Wynik statystycznie	niezg.#	zgodny*	zgodny*	zgodny*	zgodny*	Niezg.*	niezg.*	niezg.*	niezg.*	niezg.*	niezg.*	niezg.*	zgodny*	niezg.*
Wart. energ. [kcal/100g]	-	36	61	58	50	25	43	55	61	-	45	69	86	-
Białko [g/100 g]	3,6	3,2	3,3	3,0	3,3	3,2	3,2	3,0	4,6	3,6	3,3	2,8	3,0	-
Cukry [g/100 g]-4,7	-	4,7	4,8	4,3	4,8	3,0	3,0	4,0	6,1	-	4,5	10,5	14,0	-
Tłuszcz [g/100g]	5,2	0,5	3,2	3,2	2,0	0,0	2,0	3,0	2,0	5,2	1,5	1,3	2,0	-

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy nie wykazują większych różnic pomiędzy strawnością białka zawartego w mleku bądź w mlecznych napojach fermentowanych. Krzywe prezentujące kinetykę reakcji hydrolizy białka przedstawiają się bardzo podobnie, a ilość azotu α -aminowego uwolnionego po całym procesie hydrolizy ($t=120$ minut), dla większości badanych produktów występuje w podobnych ilościach: 20-22 mg N α -amin./1g białka w różnych mlekach i 18-22 mg N α -amin./1g białka w napojach fermentowanych - tab.1. Od średniej odbiegają nieco wyniki strawności badanych jogurtów, z których wynika, że zawarte w nich białko jest trawione nieznacznie wolniej, niż białko mleka i mlecznych napojów fermentowanych (różnica istotna statystycznie - tab. 1). Być może, jest to spowodowane inną technologią produkcji, wstępnym zagęszczeniem mleka, z którego wytwarzany jest jogurt, bądź dodatkiem mleka w proszku, innym składem drobnoustrojów stosowanych do produkcji tego napoju. Aktywność żywych mikroorganizmów zawartych w mlecznych napojach fermentowanych powoduje też wstępne nadtrawienie kazeiny, dzięki czemu może być ona później łatwiej i szybciej przyswajana przez organizm człowieka (6, 7, 12, 13,14).

Oceniając wpływ tłuszczu oraz obróbki cieplnej na kinetykę trawienia mlecznych napojów fermentowanych otrzymano wyniki podobne do wyników uzyskanych dla mleka, tzn. - zawartość azotu α -aminowego po całym procesie hydrolizy ($t=120$ minut) dla większości mlecznych napojów fermentowanych kształtowała się na podobnym poziomie, w granicach 16-21 mg N α -amin./1g białka, a w przypadku kefiru produkowanego z mleka pasteryzowanego o zawartości tłuszczu 0% była prawie identyczna, jak dla jogurtu domowej produkcji, wytworzonego z mleka surowego, nie poddawanego obróbce termicznej, o zawartości tłuszczu równej 5,2% - odpowiednio 18,33 i 16,59 mg N α -aminowego (tab. I).

Należy zaznaczyć, iż badania strawności białka zawartego w mleku i mlecznych napojach fermentowanych prowadzono w oparciu o prosty model doświadczalny *in vitro*. Założono zatem, że badane procesy zachodzą podobnie w przewodzie pokarmowym człowieka, aczkolwiek w ludzkim organizmie trawienie białka przebiega w sposób bardziej złożony ze względu na obecność dodatkowych czynników, zawartych w trawionych produktach i ich ewentualnych oddziaływań m. in. na zmiany w wydzielaniu soków trawiennych, których to wpływu na proces trawienia białka, z uwagi na prostotę zastosowanego do badań modelu doświadczalnego *in vitro* nie sposób dokładnie odtworzyć.

WNIOSKI

1. Prezentowany układ reakcyjny *in vitro*, imitujący warunki zbliżone do warunków fizjologicznych, umożliwia prowadzenie hydrolizy enzymatycznej białka i dostarcza podstawowych informacji o stopniu strawności białka.

2. Wykazano różnicę pomiędzy kinetyką trawienia czystej kazeiny a kinetyką trawienia kazeiny zawartej w mleku i mlecznych napojach fermentowanych.

3. Nie wykazano znaczących różnic pomiędzy kinetyką trawienia białka zawartego w mleku a kinetyką trawienia białka zawartego w mlecznych napojach fermentowanych.

4. Nie stwierdzono istotnego wpływu ilości tłuszczu zawartego naturalnie w badanych produktach ani przeprowadzonej obróbki termicznej na strawność białka mleka i mlecznych napojów fermentowanych.

G. Pokorska-Lis, A. Tokarz, P. Dębek

IN VITRO ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MILK AND DAIRY PRODUCTS PROTEINS

Summary

The aim of this study was to compare the digestibility of protein in different types of milk and fermented milk beverages and to determine the possible effects of certain components of these beverages (e.g. fat) or the method of processing procedures performed on this process. It was shown that the content of α -aminonitrogen in dialysis fluid after full enzymatic hydrolysis of milk and its products ranged from 16.10 to 28.25 mg/1g protein. Statistically significant difference was found between the kinetics of digestion of pure casein and casein contained in milk and dairy products. There were no significant differences in the digestibility between the protein contained in milk and milk protein contained in the fermented beverage. Moreover, there was no significant relationship between amount of contained fat and performed thermal processes on the digestibility of protein in these products.

PIŚMIENNICTWO

1. XII Konferencja Dyskusyjna: Fakty i fikcje w żywieniu człowieka; Mleko – za i przeciw, Program i streszczenia referatów, Polskie Towarzystwo Nauk Żywnościowych, Warszawa, 2004. – 2. *Gertig H., Przysławski J.*: Bromatologia; Zarys nauki o żywności i żywieniu. PZWL, Warszawa, 2007; 273-277. – 3. *Sikorski Z.E.* (red): Chemia Żywności. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2002; 34-36, 295-311. – 4. *Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K.*: Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. PZWL, Warszawa, 2005, 10. – 5. *Ziemiański Ś.*: Wartość żywnościowo-biologiczna mleka i jego przetworów. Przem. Spoż. 1996; 4: 5-6. – 6. *Woźniak J.*: Mleko - najzdrowszy produkt spożywczy? Farm. Pol. 1996; 52(15):722-730. – 7. *Motył-Patelska L.*: Mleko za i przeciw. www. aktywnoedchudzanie.com.pl data.dost. 2009.02.12. – 8. *Berthold A.*: Mleko UHT: czy warto je pić? www. forumczestochowa.pl dost.2007.17.05. – 9. *Woźniak J., Pokorska - Lis G.*: Oddziaływanie azotanów i azotynów z substratami enzymatycznego trawienia kazeiny. Bromat. Chem. Toksykol. 1996; 29 (3): 283-287. – 10. *Olędzka R., Woźniak J.* (red.): Analiza bromatologiczna; Jakość zdrowotna żywności. Oficyna Wydawnicza Akademii Medycznej w Warszawie, Warszawa, 2007. – 11. *Kozłowska - Wojciechowska M., Naruszewicz M., Mamcarz A., Mamcarz B.*: Mleko i jego przetwory - niezbędne produkty w zachowaniu zdrowia. Ekspertyzy i rekomendacje. Rada Promocji Zdrowego Żywnienia, Warszawa, 2005. – 12. Praca zbiorowa: Higiena w produkcji i przetwarzaniu mleka, Krajowy Punkt Kontaktowy Programów Badawczych UE, Instytut Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, 2004; 26-49. – 13. *Żbikowska A., Żbikowski Z.*: Znaczenie i właściwości białek w mlecznych napojach fermentowanych. Przegl. Mlecz., 1995; 11: 304-311. – 14. *Fesnak D., Fetliński A.*: Kefir to zdrowie. Przem. Spoż., 1996; 10: 24-25.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.