

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

**Mika Koponen**

**Maidon proteiinien rajattu hydrolyysi**

Insinööriyö 22.10.2008

Ohjaajat: tutkuspäällikkö Olli Tossavainen  
tutkimusinsinööri Timo Sibakov  
Ohjaava opettaja: yliopettaja Marja Vaheri

Tekijä	Mika Koponen
Otsikko	Maidon proteiinien rajattu hydrolyysi
Sivumäärä	89
Aika	22.10.2008
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaajat	tutkimuspäällikkö Olli Tossavainen tutkimusinsinööri Timo Sibakov
Ohjaava opettaja	yliopettaja Marja Vaheri
<p>Maidon proteiinien entsyymaattista hydrolyysiä tutkittiin tarkoituksena kehittää lehmän-maitoallergisille aikuisille sopiva maitoproteiinihydrolysaatti. Insinööriössä tutkittiin 25 proteaasin toimintaa maitoallergiaa aiheuttavien kaseiinien ja heraproteiinien pilkkojina.</p> <p>Hydrolysaattien tutkimuksissa käytettyjä menetelmiä olivat aistinvaraisen laadun ja hydrolyysiasteen seuranta sekä geelielektroforeesi. Hydrolyysi suoritettiin neutraaleissa olosuhteissa ja niiden kesto 100 cm<sup>3</sup>:ssa Valion rasvatonta maitoa oli 2–4 tuntia. Pilkkoutumista seurattiin myös suuremmassa mittakaavassa (500 cm<sup>3</sup>). Lisäksi tutkittiin partikkelien muodostumista hydrolyysissä ja näytteiden <math>\beta</math>-laktoglobuliinin pitoisuuksia ELISA-testillä ja nestekromatografilla. Entsyymien esikarsinnan jälkeen lisätutkimuksiin valittiin 14 proteaasia. Hydrolysointi tehtiin yksittäisillä entsyymeillä sekä seitsemällä entsyymiyhdistelmällä, joissa oli mukana toisena entsyyminä Proteaasi 3.</p> <p>Proteaasi 3 pilkkoi hyvin kaseiineja, hydrolysaattien laatu säilyi tutkituilla pitoisuuksilla myyntikelpoisena ja hydrolyysiaste oli tyrosiinipitoisuuksien perusteella 2,5 mg/g proteiinia suurempi kuin muilla hyvälaatuisilla näytteillä. Proteaasi 3 ei kuitenkaan vaikuttanut <math>\beta</math>-laktoglobuliinin proteiinivivoihin ja <math>\alpha</math>-laktalbumiinin molekyylikokoalueelle muodostui lisää viivoja geelielektroforeesissa. Entsyymiyhdistelmillä ei saatu pilkottua proteiineja merkittävästi Proteaasi 3:a tehokkaammin, mutta hydrolysaattien aistinvarainen laatu parani lisäentsyymeillä Proteaasi 1 ja 2. <math>\beta</math>-laktoglobuliinin pitoisuutta saatiin laskettua 21 % entsyymiyhdistelmällä Proteaasi 3 ja Proteaasi 4.</p> <p>Jatkotutkimuksissa olisi löydettävä paremmin heraproteiineja pilkkova entsyymi Proteaasi 3:n rinnalle. Hydrolysaattien aistinvarainen laatu säilyisi parempana, jos entsyymien inaktiivointiolosuhteet määritettäisiin tarkasti ylimääräisen lämpökuorman välttämiseksi.</p>	
Hakusanat	maito, proteiini, entsyymi, hydrolyysi, allergia, antigeeni

Author	Mika Koponen
Title	Limited hydrolysis of milk proteins
Number of Pages	89
Date	22 October 2008
Degree Programme	Bio and Food Technology
Degree	Bachelor of Engineering
Instructors	Olli Tossavainen, Research Manager Timo Sibakov, Research Engineer
Supervisor	Marja Vaheri, Principal Lecturer
<p>Enzymatic hydrolysis of milk proteases was researched on purpose to develop a milk protein hydrolysate that suits for milk allergic adults. The function of 25 proteases was observed as hydrolysers of casein and whey proteins that cause milk allergy.</p> <p>The research methods to study hydrolysates were sensory analysis, the observation of the degree of hydrolysis and gel electrophoresis. Hydrolysis was performed in neutral conditions and it took 2–4 hours in 100 cm<sup>3</sup> of Valio's fat free milk. The degradation was observed also in larger scale (500 cm<sup>3</sup>). In addition, the formation of particles was explored during hydrolysis and the <math>\beta</math>-lactoglobulin concentrations of samples were evaluated with ELISA technique and liquid chromatography. After pre-elimination, 14 proteases were chosen for further investigation. The hydrolysis was performed with single proteases and seven enzyme combinations, which had Protease 3 as the second enzyme.</p> <p>Protease 3 hydrolysed caseins well and the quality of hydrolysates preserved marketable with the studied concentrations and the degree of hydrolysis was according to tyrosine concentration 2.5 mg/g protein larger than with the other good quality samples. Yet, Protease 3 did not affect the protein bands of <math>\beta</math>-laktoglobulin and to the molecular weight area of <math>\alpha</math>-laktalbumin emerged more bands in the gel electrophoresis. Proteins could not be chopped remarkably better with enzyme combinations than with Protease 3 but the sample quality of sensory analysis got better with additional enzymes Protease 1 and 2. The concentration of <math>\beta</math>-laktoglobulin was decreased by 21 % with enzyme combination Protease 3 and Protease 4.</p> <p>A better enzyme to hydrolyse whey proteins should be found along with Protease 3 in further study. The quality of sensory analysis of hydrolysates could be preserved better if the enzymes' inactivation conditions could be defined more accurately to prevent extra heat load.</p>	
Keywords	milk, protein, enzyme, hydrolysis, allergy, antigen

## Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

Lyhenteet

1	Johdanto .....	7
	KIRJALLISUUSOSA .....	8
2	Maito ja proteiinit.....	8
2.1	Maidon pääasiallinen koostumus .....	8
2.2	Maitoproteiinit.....	9
2.2.1	Heraproteiinit.....	10
2.2.2	Kaseiinit.....	12
3	Lehmänmaitoproteiineista aiheutuva allergia .....	13
3.1	Herkistyminen lehmänmaidon proteiineille.....	13
3.2	Maitoyliherkkyyden yleistyminen.....	14
3.3	Maitoproteiinien haitalliset reaktiot elimistössä.....	16
3.4	Immuunijärjestelmän toiminta maitoallergisilla ihmisillä.....	17
4	Maitoallergiaa aiheuttavien proteiinien analysointimenetelmiä .....	20
5	Maidon antigeenisyyden vähentäminen .....	22
5.1	Hydrolyysiaste ja proteaasien funktionaalisuus .....	22
5.2	Heraproteiinien hydrolysoiminen.....	24
5.3	Kaseiinien hydrolysoiminen.....	25
5.4	Maitoproteiinien hydrolysoiminen plasmiinilla .....	26
5.4.1	Plasmiinin toiminta .....	27
5.4.2	Lämpökäsittelyn vaikutus plasmiinin aktiivisuuteen.....	28
5.4.3	Painekäsittelyn vaikutus plasmiinin aktiivisuuteen .....	29
5.5	Lämpökäsittelyn vaikutus .....	30
5.5.1	Heraproteiinit.....	32
5.5.2	Heraproteiinit ja kaseiini .....	33
5.6	Painekäsittelyn vaikutus.....	34

TUTKIMUSOSA .....	36
6 Materiaalit ja menetelmät .....	36
6.1 Entsyymit .....	36
6.2 Hydrolyysikokeet.....	37
6.3 Hydrolyysiasteen määrittäminen .....	37
6.4 Geelielektroforeesi.....	38
6.5 Happohydrolyysi .....	39
6.6 Typpi- ja proteiinipitoisuuden määrittäminen.....	40
6.7 Hydrolysaattien aistinvarainen arviointi .....	40
6.8 Partikkelikokoanalyysi.....	41
6.9 $\beta$ -laktoglobuliinin määrittäminen .....	41
7 Tulokset ja tulosten tarkastelu.....	42
7.1 Hydrolyysi yksittäisillä entsyymeillä .....	42
7.1.1 Entsyymien esikarsinta hydrolyysiasteen ja laadun perusteella .....	42
7.1.2 Valittujen entsyymien arviointi hydrolysaatin aistinvaraisen laadun, hydrolyysiasteen ja geelielektroforeesin perusteella.....	44
7.2 Hydrolyysi entsyymiyhdistelmillä.....	57
7.2.1 Entsyymiyhdistelmien arviointi hydrolysaatin aistinvaraisen laadun, hydrolyysiasteen ja geelielektroforeesin perusteella.....	58
7.2.2 Mittakaavan kasvattaminen .....	69
7.3 Näytteiden analysointi partikkelikokoanalyysatorilla .....	70
7.4 $\beta$ -laktoglobuliinipitoisuuden määrittäminen .....	72
8 Yhteenveto .....	73
Lähteet .....	75
Liitteet .....	78
Liite 1: Jatkoon valittujen entsyymien laadunarviointitaulukot .....	78
Liite 2: Yksittäisten entsyymien elektroforeesigeelit.....	81
Liite 3: Entsyymiyhdistelmien elektroforeesigeelit .....	87

## **Lyhenteet**

$\alpha$ -La =  $\alpha$ -laktalbumiini

$\beta$ -Lg =  $\beta$ -laktoglobuliini

BSA = naudan seerumialbumiini

Ig = immunoglobuliini

WPC = heraproteiinikonsentraatti

## 1 Johdanto

Lehmänmaitoallergia on immuunireaktio, joka voi johtua vuorovaikutuksesta yhden tai useamman proteiinin ja yhden tai useamman immuunimekanismin välillä. Suuret allergenipitoisuudet eri proteiineissa on tärkeä syy taudin aiheuttamisessa. Maitoyliherkkyyden on arvioitu olevan 3–6 % 27-vuotiaiden suomalaisten keskuudessa, ja vaikka maitoallergia on aikuisilla luultua yleisempää eri puolilla maailmaa, ei markkinoilla ole täysin maitoallergiaa aiheuttamattomia tuotteita aikuisille. Ensimmäisten maitoallergiaoireiden on havaittu ilmenevän aikuisilla 20–40 vuoden ikäisinä, ja tutkittavat henkilöt olivat herkistyneet useille maidon proteiineille kuten kaseiinille,  $\alpha$ -laktalbumiinille,  $\beta$ -laktoglobuliinille ja naudan seerumialbumiinille. Aikuisten maitoyliherkkyyden yleistymiseen on voinut vaikuttaa elinympäristön, alkuperäisen suoliston mikrobiflooran, elämäntapojen tai raaka-aineiden muuttuminen, väärin diagnosoidut sairaudet ja maidon käsittelytavat. Maidon prosessoinnin on todettu aiheuttavan lisääntyvää herkistymistä proteiineille.

Maitoproteiinien hydrolysointia entsyymeillä on kokeiltu paljon allergisuuden vähentämiseksi. Polypeptidiketjujen molekyylikoko pienenee hydrolyysissä, mikä johtaa antigenisyyden vähenemiseen ja molekyylien rakenteiden muutoksiin. Entsymaattisen hydrolyysin etuja ovat muun muassa miedot olosuhteet, entsyymien spesifisyys ja mahdollisuus suorittaa hydrolyysi ilman monivaiheisia prosesseja. Tuotteissa ei ole kuitenkaan ollut hyväksyttävää makuvaatimusta, koska peptidien ja aminohappojen irtautuminen proteolyysin vaikutuksesta aiheuttaa kitkeryyttä ja muita virhemakuja.

Työssä tutkittiin allergisoivimpien maitoproteiinien entsymaattista hydrolyysiä tarkoituksena maitoallergisille aikuisille sopivan hydrolysaatin kehittäminen. Tutkimuksissa tutkittiin 25 proteaasin toimintaa ja esikarsinnan jälkeen lisätutkimuksia jatkettiin 14 entsyymillä. Entsyymejä karsittiin hydrolysaattien aistinvaraisen laadun, hydrolyysiasteen ja proteiinien pilkkoutumisen perusteella. Hydrolyysikokeet suoritettiin yksittäisillä entsyymeillä sekä seitsemällä entsyymiyhdistelmällä, joissa ensimmäisenä lisätynä proteaasina oli kokeiden perusteella lupaavin entsyymi.

## KIRJALLISUUSOSA

### 2 Maito ja proteiinit

#### 2.1 Maidon pääasiallinen koostumus

Maidon pääasialliset aineosat ovat vesi, rasva, proteiini, laktoosi ja mineraalit. Maito sisältää myös entsyymejä, vitamiineja, fosfolipidejä ja kaasuja. Lehmänmaidossa on 87 % vettä ja 13 % kuiva-ainetta. Kuiva-aineesta rasvaa on 4,0 %, proteiinia 3,5 %, laktoosia 4,7 % ja tuhkaa 0,8 %. (Dairy processing handbook 1995.)

Maidon entsyymit tulevat maitoon lehmän utareista ja bakteerien mukana. Yleisimmät maitoentsyymit ovat peroksidaasi, katalaasi, fosfataasi, lipaasi ja plasmiiini. Peroksidaasi muuttaa vetyperoksidia muiksi hapettaviksi aineiksi ja katalaasi puolestaan pilkkoo vetyperoksidia vedeksi ja hapeksi. Fosfataasin tehtävänä on hydrolysoida tiettyjä fosforihappestereitä fosforihapoiksi ja vastaaviksi alkoholeiksi. Rasvan hydrolysointiin erikoistuneet lipaasit pilkkovat rasvamolekyylin glyseroliksi ja vapaiksi rasvahapoiksi, jotka aiheuttavat maitoon härskiintynyttä makua. (Dairy processing handbook 1995; Burbrink & Hayes 2006.)

Maito sisältää useita vitamiineja, joista parhaiten tiedetään A-, B<sub>1</sub>-, B<sub>2</sub>-, C- ja D-vitamiinit. A- ja D-vitamiinit ovat liuenneina maidon rasvaan ja muut vesiosaan. Maito sisältää myös noin prosentin erilaisia mineraaleja, jotka esiintyvät muun muassa kalsiumsuoloina hera- ja kaseiiniyhdisteisiin kiinnittyneinä. Yleisimpiä maidon mineraaleja ovat kalsium, natrium, kalium ja magnesium. Ne ilmenevät maidossa fosfaatteina, klorideina, sitraatteina ja kaseinaatteina. Maito sisältää myös somaattisia soluja, kuten veri- ja valkosoluja, sekä kaasuja, kuten hiilidioksidia, typpeä ja happea. (Dairy processing handbook 1995.)



## 2.2 Maitoproteiinit

Maito sisältää paljon erilaisia proteiineja, joista suurin osa esiintyy hyvin pieninä pitoisuuksina. Proteiinit jaetaan eri luokkiin kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien mukaan (taulukko 1).

Taulukko 1. *Proteiinien osuudet lehmänmaidossa (Dairy processing handbook 1995).*

proteiini	osuus proteiineista (%)
$\alpha_{S1}$ -kaseiini	30,6
$\alpha_{S2}$ -kaseiini	8,0
$\beta$ -kaseiini	30,8
$\kappa$ -kaseiini	10,1
kokonaiskaseiini	79,5
$\alpha$ -laktalbumiini	3,7
$\beta$ -laktoglobuliini	9,8
veren seerumialbumiini	1,2
immunoglobuliini	2,1
sekalaiset	2,4
kokonaishera	19,2
kalvoproteiinit	1,3
kokonaisproteiini	100

Lehmänmaidossa on noin 30–35 grammaa proteiinia litraa maitoa kohti. Kymosiinin (renniini) vaikutus tai maidon hapatus pH-arvoon 4,6 mahdollistaa kahden proteiinifraktion muodostumisen. Heraproteiinifraktiota on tällöin 20 % ja proteiinin koaguloitunutta osaa kaseiinifraktiota 80 %. Hera koostuu pääosin  $\beta$ -laktoglobuliinista ( $\beta$ -Lg) ja  $\alpha$ -laktalbumiinista ( $\alpha$ -La) sekä naudan seerumialbumiinista (BSA, bovine serum albumin). Kaseiini koostuu neljästä proteiinifraktiosta:  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - ja  $\kappa$ -kaseiinista. Proteiinien geneettisen monimuotoisuuden takia maidon proteiineilla on useita variaatioita. (Wal 2001.) Taulukossa 2 on lueteltu kaseiinien ja heraproteiinien rakenteellisia ja funktionaalisia ominaisuuksia (Monaci 2006).

**Taulukko 2.** *Lehmänmaitoproteiinien rakenteellisia ja funktionaalisia ominaisuuksia (Monaci 2006).*

Proteins		Concentration (g/l)	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point	No. of amino acids	Function
Whole caseins (30 g/l)	$\alpha$ S1-CN	12–15	23.6	4.9–5	199	Calcium binding
	$\alpha$ S2-CN	3–4	25.2	5.2–5.4	207	Calcium binding
	$\beta$ -CN	9–11	24.0	5.1–5.4	209	Calcium binding
	$\kappa$ -CN	3–4	19.0	5.4–5.6	169	Stabilisation and coagulation of milk
Whey proteins (5 g/l)	$\gamma$ -CNs					
	$\gamma_1$ CN		20.5			
	$\gamma_2$ CN		11.8			
	$\gamma_3$ CN		11.6			
	$\beta$ -LG	3–4 g	18.3	5.3	162	Lipid binding protein
	ALA	1–1.5	14.2	4.8	123	Participates in synthesis of lactose
	Ig	0.6–1	<150			Defence scope
BSA	0.1–0.4	66.4	4.9–5.1	582	Transport of ligands and protection from free radicals	
	LF	0.09	76.2	8.7	703	Iron-binding protein, antimicrobial activity

### 2.2.1 Heraproteiinit

Hera koostuu pääosin  $\beta$ -Lg:stä ja  $\alpha$ -La:sta.  $\beta$ -Lg:n rakenteessa on kaksi disulfidisiltaa, ja proteiinifraktion osuus kokonaisproteiinipitoisuudesta on 10 %.  $\alpha$ -La:n rakenteessa on neljä disulfidisiltaa, ja proteiinifraktion osuus kokonaisproteiinipitoisuudesta on 5 %. (Järvinen ym. 2002.)  $\alpha$ -La:lla on tärkeä rooli laktoosin valmistamisessa lehmän utareessa (Dairy processing handbook 1995). Hera sisältää suurimman osan maidon mineraaleista, vitamiineista ja laktoosista.  $\beta$ -Lg:n osuus heran proteiineista on 50 %,  $\alpha$ -La:n 12 %, Ig:n 10 %, BSA:n 5 % ja proteosipeptonien 0,23 %. (Sibakov 1997.)

$\beta$ -laktoglobuliini on pallomainen proteiini, ja siitä tunnetaan seitsemän geneettistä muunnelmaa. Proteiinin sekundaarirakenteesta 15 % on  $\alpha$ -helixiä ja 51 %  $\beta$ -laskosta.  $\beta$ -Lg voi esiintyä monomeerinä, dimeerinä tai oktameerinä. Dimeerit ovat yleensä 36 000 daltonia (Da) molekyyli­massaltaan. Isoelektrisen pisteen (pH 5,2) emäksisellä puolella  $\beta$ -Lg esiintyy yleensä dimeerinä ja alle pH:n 3,5 dimeerit hajoavat monomeereiksi. (Sibakov 1997.)  $\beta$ -Lg:lle ei löydy vastinetta ihmisen maidossa.  $\beta$ -Lg:n ominaisuuksista on vastuussa vapaa kysteini (aminohappo), joka on myös vuorovaikutuksessa kaseiiniin lämpökäsittelyn aikana.  $\beta$ -Lg kuuluu lipokaliiniproteiineihin, jotka sitovat ja kuljettavat

pieniä hydrofobisia molekyyliä kuten steroideja, retinolia (A-vitamiini) ja rasvoja. Lipokaliineista jotkin proteiinit ovat vahvoja allergeeneja, jotka aiheuttavat immuunivasteen elimistössä. (Wal 2001.)

$\alpha$ -laktalbumiini on monomeerinen pallonmuotoinen proteiini, jossa on 123 aminohappoa ja jonka molekyylipaino on 14 400 Da (Wal 2001).  $\alpha$ -La toimii koentsyyminä laktoosin syntetisoinnissa, ja siitä on kaksi geneettisesti erilaista tyyppiä A ja B.  $\alpha$ -La sitoo kalsiumia, ja sillä on suuri affiniteetti metalli-ioneja kohtaan.  $\alpha$ -La:n lämpödenaturoituminen on erittäin palautuva reaktio, johon on arveltu vaikuttavan proteiinin pieni koko ja sen sisältämät neljä disulfidisiltaa, jotka vastustavat muodonmuutosta. Kalsiumilla on vaikutusta renaturoitumiseen, koska happamissa olosuhteissa kalsium irtoaa proteiinista ja denaturoituminen tapahtuu helpommin. (Sibakov 1997.)

Heraproteiineista immunoglobuliinit ovat glykoproteiineja, jotka toimivat vasta-aineina ja joita on löydetty lehmänmaidosta neljä eri tyyppiä: IgG, IgA, IgM ja IgE. Ne ovat maidossa joko monomeereinä tai polymeereinä. Heraproteiineista BSA on fysikaalisilta ja immunologisilta ominaisuuksiltaan veren seerumialbumiinin kaltaista. Laktoferrini on rautaa sitova proteiini, ja sen tehtävä on huolehtia elimistön rautatasapainosta. (Sibakov 1997.) Proteosipeptoni on lämpöä kestävä sekä happoon liukeneva proteiini. Sitä muodostuu  $\beta$ -kaseiinin proteolyysissä, ja plasmiinin aktiivisuus lisää proteosipeptonien pitoisuutta maidossa. (Monaci 2006.)

Ig:lla ja muilla vähäisillä proteiineilla voi olla tärkeä rooli tulevaisuudessa, kun kehitetään niiden tehokkaampia erotusmenetelmiä. Laktoferriniä ja laktoperoksidaasia voidaan käyttää lääkkeissä ja elintarviketeollisuudessa. Kalvoproteiinit ovat ryhmä proteiineja, jotka muodostavat rasvapisaroiden pinnalle suojaavan kerroksen maitoemulsion stabiloimiseksi. Jotkut näistä proteiineista sisältävät rasvajäännöksiä, ja niitä kutsutaan lipoproteiineiksi. Lipoproteiinien rasvat ja hydrofobiset aminohapot muodostavat partikkelin, jossa vettä hylkivät osat ovat kohti rasvaosaa ja hydrofiiliset osat kohti vesiosaa. Fosfolipidit ja lipolyttiset entsyymit adsorboituvat kalvoproteiineihin niiden hydrofobisen vuorovaikutuksen takia. (Dairy processing handbook 1995.)

### 2.2.2 Kaseiinit

Maidon kaseiini koostuu fosfoproteiineista, jotka saostuvat 20 °C:n lämpötilassa pH:ssa 4,6. 80–90 % kaseiinista on kolloidisissa miselleissä, joista noin 93 % on  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - ja  $\kappa$ -kaseiinia. (Sibakov 1997.) Kaseiinifraktioiden pitoisuudet kaseiinimisellissä ovat noin 37 %, 37 %, 13 % ja 13 %. Kaseiinifraktioiden esiintymisalueet ovat erilaiset misellissä. Miselli sisältää sisäosan hydrofobisen ja ulkopinnan hydrofiilisen alueen, joka on  $\kappa$ -kaseiinin esiintymisalue. Reuna-alueilla esiintyy myös polaarisia kaseiineja ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$ ) ja fosfaattiosia, joista fosfoseriinit ovat yhteydessä kalsiumin sitomiseen ja kaseiinimisellin kuljetukseen.  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - ja  $\beta$ -kaseiini ovat kalsiumherkkiä. (Wal 2001.)

Kaseiinit ovat fosforyloituneita proteiineja, joilla on vapaa tertiäärinen ja hydraattinen rakenne. Kaseiinin rakenne hydrolysoituu helposti proteaasien vaikutuksesta, mutta lämpökäsittelyä se kestää hyvin. (Wal 2001.)  $\alpha_S$ - ja  $\beta$ -kaseiinien kalsiumsuolat ovat lähes veteen liukenemattomia, mutta  $\kappa$ -kaseiinin vesiliukoisuus tekee kuitenkin miselleistä vesiliukoisia. Misellien pinnoilla olevien kalsiumfosfaattisidosten ja hydrofobisten vuorovaikutusten takia misellit pysyvät yhdessä.  $\beta$ -kaseiinien hydrolysoituessa plasmiiin vaikutuksesta voi muodostua  $\gamma$ -kaseiinia ja proteosipeptoneita. (Dairy processing handbook 1995; Burbrink & Hayes 2006.)

### 3 Lehmänmaitoproteiineista aiheutuva allergia

#### 3.1 Herkistyminen lehmänmaidon proteiineille

Lehmänmaitoallergia on kliinisesti epänormaali immuunireaktio, joka voi johtua vuorovaikutuksesta yhden tai useamman proteiinin ja yhden tai useamman immuunimekanismin välillä. Lehmän maito sisältää yli 20 eri proteiinia, jotka voivat aiheuttaa allergiaa. (El-Agamy 2007.) Immuunivälitteinen allergia maitoproteiineille aiheutuu usean eri proteiinin vaikutuksesta elimistössä. Tutkimuksissa on osoitettu  $\beta$ -Lg:n olevan allergisoivin proteiini, mutta on myös tutkimuksia, joissa kaseiini on todettu allergiaa herkimmin aiheuttavaksi. Allergisoivin kaseiini lehmänmaidossa on  $\alpha_{S1}$ -kaseiini. (Sharma ym. 2001.)

Monen tutkimuksen mukaan kaseiini ja  $\beta$ -Lg ovat eniten lehmänmaitoallergiaa aiheuttavat proteiinit. Tutkimuksissa on selvinnyt, että viisi IgE-vasta-ainetta sitovaa epitooppia kaseiinissa (2  $\alpha_{S1}$ -kaseiinissa, 2  $\alpha_{S2}$ -kaseiinissa ja 1  $\kappa$ -kaseiinissa) on tunnistettu aiheuttavan sinnikästä maitoallergiaa allergisilla henkilöillä. Kaseiinin hydrofobinen alue, jossa tapahtuu eniten fosforyloitumista, on immunoreaktiivinen ja vastustuskykyinen ruuansulatuksen vaikutuksille. (Wal 2001.) Neljä IgE-vasta-ainetta sitovaa epitooppia on löydetty  $\alpha$ -La:sta ja seitsemän  $\beta$ -Lg:sta. Allergisia reaktioita on havaittu potilailla myös laktoferriniä ja joitakin lehmänmaitoentsyymejä kohtaan. (El-Agamy 2007.)

Useimmat maitoallergiaa sairastaneet henkilöt ovat herkistyneet usealle proteiinille:  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La, kaseiinit, BSA, laktoferrini ja Ig. BSA, Ig ja laktoferrini ovat proteiineja, joita on pieniä pitoisuuksia maidossa, mutta ne vaikuttavat olevan erittäin voimakkaita allergeeneja herkistyneillä ihmisillä. Maidon suuri allergeenipitoisuus eri proteiineissa on tärkeä syy taudin aiheuttamisessa. Kaikki maidon proteiinit voivat aiheuttaa allergiaa, ja yleensä maitoallergiset ihmiset ovat herkistyneinä usealle proteiinille. (Wal 2001.)

Vaikka maitoallergia on nykyään yleistä aikuisilla, ei markkinoilla ole erityisemmin tuotteita, joita voidaan sanoa maitoallergiaa aiheuttamattomiksi. Hong Kongissa ja

Alankomaissa on kehitetty vuohenmaitotuotteita maitoallergisille aikuisille ja yli kolmivuotiaille lapsille. Edellisen tuotteen valmistaja on Fei Fah Medibalm ja tuote valkoinen maitojauhe. Jälkimmäisen tuotteen valmistaja on Eelder Ambachtelijke Zuivel ja tuote valkoista maitoa. Alankomaissa on valmistettu myös toinen samantapainen vuohenmaitotuote. Hongkongilainen yritys Trappist Dairy on myös valmistanut valkoisen maitojuoman, jonka alhaisen laktoosipitoisuuden on todettu vähentävän allergeeneille herkistymistä. (MINTEL gnpd 2008.)

### 3.2 Maitoyliherkkyyden yleistyminen

Pelto (2000) tutki nuorten aikuisten sairastuvuutta maitoyliherkkyyteen. Ryhmään kuului 406 suomalaista, jotka olivat iältään 27-vuotiaita. Heidä haastateltiin maitotuotteiden kulutustottumuksista ja suolistovaivoista tuotteiden kulutuksen jälkeen sekä laktoosi-intoleranssista. Henkilöiltä mitattiin verinäytteistä seerumireaktiivisuudet maitoproteiineja vastaan. Heidät jaettiin ryhmiin oireiden, maidon kulutuksen ja laktoosi-intoleranssin perusteella. Maitoyliherkkyyden arvioitiin olevan 3–6 % 27-vuotiaiden suomalaisten keskuudessa. Aiempien tutkimusten perusteella 12 %:lla suomalaisista on laktoosi-intoleranssi. 13 henkilöllä (3 %) saattoi olla maitoyliherkkyys, kun tutkimuksessa oletettiin 60 % arvioivan maitoyliherkkyysoireensa väärin. Toinen arvio perustui Pellon tutkimustuloksiin, joiden mukaan vain noin 6 %:lla tutkituista henkilöistä oli laktoosi-intoleranssi. 23 henkilön (6 %) arveltiin sairastavan maitoyliherkkyttä, kun 40 % henkilöistä oletettiin arvioineen oireensa väärin. (Taulukko 3.)

*Taulukko 3. Laktoosi-intoleranssia sairastavien henkilöiden lukumäärä ja potentiaaliset maitoyliherkkyttä sairastavat henkilöt. Näiden perusteella arvioitiin maitoyliherkkien lukumäärä. (Pelto 2000.)*

laktoosi-intoleranssi suomalaisilla	potentiaalinen maitoyliherkkyys	arvioitu maitoyliherkkyys
12 % (yleinen)	33 henkilöä	13 henkilöä (3 %)
6 % (tutkimuksessa)	57 henkilöä	23 henkilöä (6 %)

Pelto (2000) tutki myös homogenoidun ja homogeenimattoman maidon vaikutuksia 22–42-vuotiaisiin suomalaisiin, joiden keski-ikä oli 28 vuotta. Tutkimukset tehtiin sokko-

rasitustesteinä, ja veren seerumipitoisuusnäytteet otettiin ennen rasiustestejä ja niiden jälkeen. Henkilöt kirjasiivat oireensa asteikolla 1–10. Homogenoidun maidon ei havaittu aiheuttavan enemmän maitoallergisia oireita homogeenomattomaan maitoon verrattuna.

Verrattuna yleisesti tunnettuun lehmänmaitoallergiaan, jonka aiheuttaa IgE-välitteinen reaktio vastasyntyneillä, on huomattu uusi myöhemmin allergiaa aiheuttava muoto aikuisilla ja kouluikäisillä lapsilla. Lapsuusajan jälkeen maitoallergiareaktiot ovat vain harvoin IgE-välitteisiä. (Paajanen 2005.) Paajasen (2005) tutkimuksissa maidon homogenointi ja pastörointi eivät aiheuttaneet ruoansulatuskanavan oireilua. Homogenoidusta ja homogeenomattomasta maidosta saadut oireet eivät poikenneet toisistaan laktoosi-intoleranssia sairastavilla ja henkilöillä, jotka kertoivat haastatteluissa saavansa oireita homogenoidusta maidosta. Homogenoitu maito ei vaikuttanut veressä olevien vasta-aineiden määrän lisääntymiseen, vaikka tutkittavilla esiintyi ruoansulatuskanavan oireita. Toisessa tutkimusosassa haastateltiin 827 henkilöä, jotka olivat 16–21-vuotiaita. 10 % haastatelluista kertoi saavansa vakavia ruoansulatuskanavan oireita maidosta. Heistä 49:lle tehtiin tarkempia kliinisiä tutkimuksia, joissa selvitettiin laktoosi-intoleranssia, maitoallergiaa ja puolustusvasteen toimintaa. Maitoproteiinin sietokykyä tutkittiin sokkotestillä ja vasta-aineita mitattiin ELISA-testillä. Haastatteluissa 24 % sai mielestään oireita maidosta, 13 % ei juonut ollenkaan maitoa ja 13 % oli laktoosi-intoleranssi. Maitoproteiinien sietokykytestissä 23 henkilöstä ainoastaan yhdellä todettiin maitoyliherkyys (4,3 %). Tulosten perusteella ruoansulatuskanavan oireet vaikuttivat johtuvan puolustusvasteen välittämästä tuntemattomasta syystä, vaikka tutkittavat epäilivätkin niiden johtuvan maidosta. Ruoansulatuskanavan oireyhtymän esiintymisen ei ajateltu olevan lehmänmaidosta aiheutuva. (Taulukko 4.)

*Taulukko 4. Maitoproteiinien sietokykytutkimuksen suoritustavat, oireet ja henkilöiden lukumäärät (Paajanen 2005).*

tutkimustapa	ryhmän kuvailu	henkilöiden lukumäärä
haastattelu	vakavia suolisto-oireita	86
	vähäisiä suolisto-oireita	316
	muita oireita	276
	ei oireita	149
kliinisiä tutkimuksia	suolisto-oireita	49
	ei oireita (kontrolli)	27
sisätähystys	suolisto-oireita	12
	ei oireita (kontrolli)	10

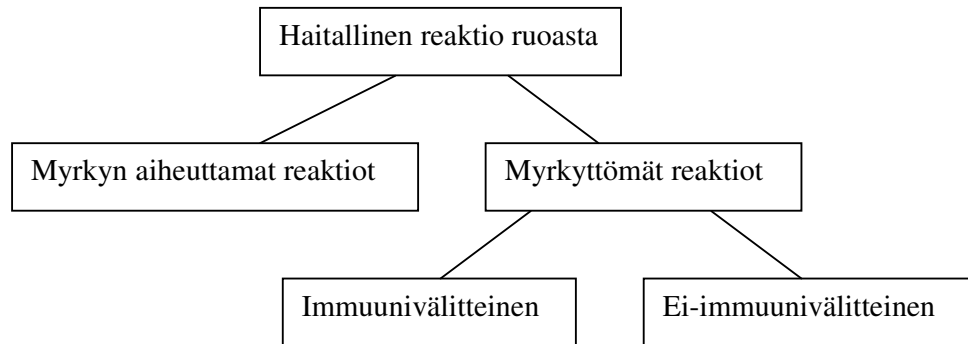
Maidon haitallisia reaktioita elimistössä aiheuttavat yliherkkyys maidolle ja laktoosi-intoleranssi. Yliherkkyttä aiheuttavan immunologisen reaktion on luultu olevan vastasyntyneiden sairaus, ja se on huomattu vain harvoin aikuisilla. Monella aikuisella on kuitenkin suolisto-oireita maidon nauttimisen jälkeen, vaikka heillä ei olisi todettu laktoosi-intoleranssia. Aikuisten maitoyliherkkyiden yleistymiseen on voinut vaikuttaa muun muassa elinympäristön tai alkuperäisen suoliston mikrobiflooran muuttuminen, pienentyneet perhekoot, muuttuneet elämäntavat ja väärin diagnosoidut sairaudet. Yliherkkyttä on voitu luulla laktoosi-intoleranssiksi, ärsyttäväksi suolioireyhtymäksi tai joksikin muuksi suolisto-oireeksi. (Pelto 2000.) Ruoka-allergiat voivat johtua raaka-ainemuutoksista, ruuan valmistustavoista ja nykyaikaisista syömistavoista. Monilla eri ruuanvalmistustekniikoilla lisätyt väri- ja makuaineet voivat olla tekijöitä, jotka aiheuttavat allergiaa. (Monaci 2006.)

### **3.3 Maitoproteiinien haitalliset reaktiot elimistössä**

Ruuan aiheuttamat haitalliset reaktiot voidaan jakaa myrkyllisiin ja myrkyttömiin reaktioihin (kuva 1), joista myrkyllisten reaktioiden vaikutus on riippuvainen annoksen määrästä. Myrkyttömän reaktion ilmeneminen riippuu yksilön immunologisesta sietokyvystä ruoka-ainetta kohtaan. Myrkyttömän reaktion immuunivälitteistä reaktiota kutsutaan yliherkkyudeksi tai allergiaksi ja ei-immuunivälitteistä reaktiota intoleranssiksi. Immuunivälitteiset reaktiot voivat olla IgE-välitteisiä ja -välittömiä. Intoleranssireaktiot



voivat aiheutua entsyymien, lääkeaineen tai määrittelemättömän ruokaintoleranssin vaikutuksesta. (Pelto 2000.)



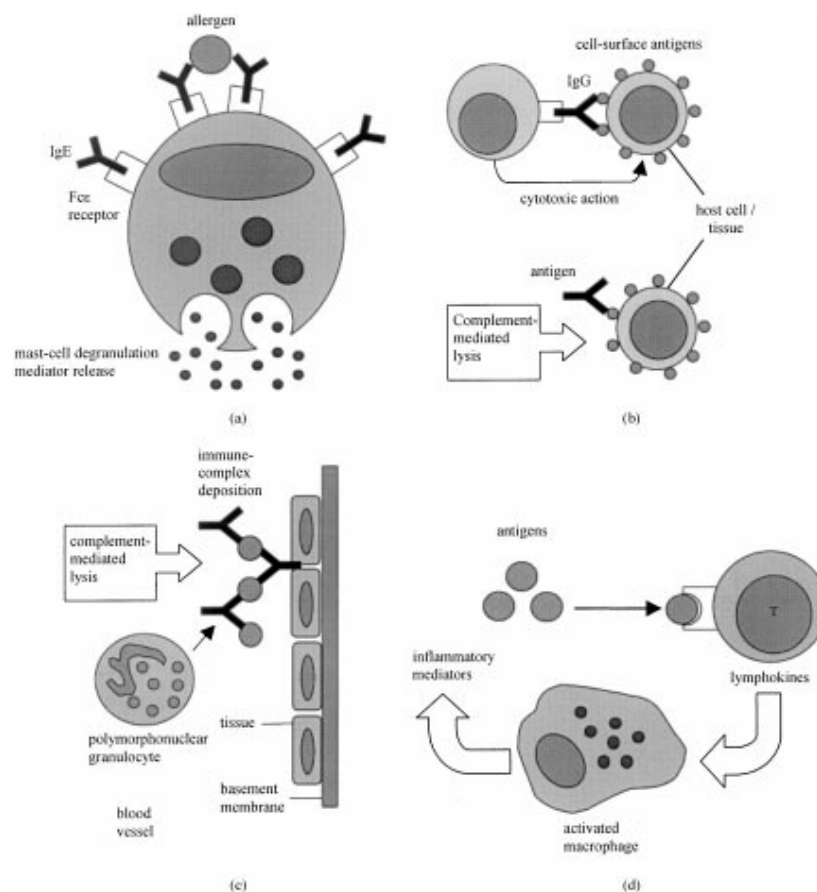
*Kuva 1. Ruuasta aiheutuvan haitallisen reaktion luokittelu (Pelto 2000).*

Allergiset reaktiot jaetaan kahteen ryhmään: välittömät ja viipyvät. Välittömät reaktiot tapahtuvat IgE-vasta-aineen vaikutuksesta, ja oireet ilmenevät yleensä kontaktista allergeniin joidenkin minuuttien jälkeen. Viipyvät reaktiot ovat soluvälitteisiä, ja oireet ilmenevät yleensä kontaktista joidenkin tuntien jälkeen. (Sharma ym. 2001.) Kliiniset välittömät ja viipyvät oireet voivat ilmetä erikseen tai yhdessä. Välittömät reaktiot ovat pääasiassa IgE:n toiminnasta riippuvaisia johtaen ihon, suoliston tai hengitysteiden oireisiin. Viipyvät reaktiot tapahtuvat T-solujen toimintamekanismin jälkeen. Tästä voi aiheutua iho- ja suolisto-oireita. (El-Agamy 2007.) Pellon (2000) tutkimuksessa havaittiin ensimmäisten maitoallergiaoireiden ilmenevän aikuisilla 20–40 vuoden ikäisinä, ja tutkittavat henkilöt olivat herkistyneet useille maidon proteiineille kuten kaseiinille,  $\alpha$ -La:lle,  $\beta$ -Lg:lle ja BSA:lle.

### 3.4 Immuunijärjestelmän toiminta maitoallergisilla ihmisillä

Immuunijärjestelmän aiheuttamat kudosaauriot, jotka aiheutuvat yliherkkyydestä tietylle ruoalle, voidaan jakaa neljän tyyppiin reaktioihin (Pelto 2000). Reaktiot eivät tapahdu toisistaan erillään. Kolme ensimmäistä tyyppiä ovat vasta-ainevälitteisiä ja neljännen tyyppin aiheuttavat T-solujen ja makrofagien toiminta. (Pelto ym. 1999.) Tyyppin yksi yliherkkyys eli anafylaktinen reaktio johtuu välittömästä reaktiosta antigeenien,

IgE-vasta-aineiden ja Mast-solujen sekä basofiilien välillä. Reaktiossa vapautuu välittäjäaineita, jotka aiheuttavat allergian kliinisiä oireita. Tyypin kaksi ja kolme yliherkkyydet johtuvat IgG- ja IgM-vasta-aineista. Tyypissä kaksi, sytotoksinen reaktio, antigeeni on osa tietyn kudossolun pintaa. Vasta-aineen sitoutuminen antigeenin epitoppiin aktivoi komplementtijärjestelmän, jossa fagosyytit ja komplementit vaurioittavat solukalvoa. Tyypissä kolme, immuunikompleksireaktio, antigeeni on liukoinen ja antigeenin sekä vasta-aineen muodostama kompleksi voi fagosyyttien ja komplementtien vaikutuksesta aiheuttaa tulehduksen. Tyypissä neljä, soluvälitteinen immuunireaktio, T-solujen vapauttamat sytokiinit aktivoivat fagosyyttejä, jotka voivat aiheuttaa jatkuvassa altistuksessa kudonvaurioita. Kuva 2 havainnollistaa erityyppisten reaktioiden toimintatavat. (Pelto ym. 1999.) Yliherkkyyteen vaikuttavat kuitenkin kaikki tyypit eikä pelkästään välitön helpommin havaittava IgE-välitteinen reaktio (Pelto 2000).



Kuva 2. Ruoan aiheuttaman allergian reaktiotyypit: I (a), II (b), III (c) ja IV (d) (Pelto ym. 1999).

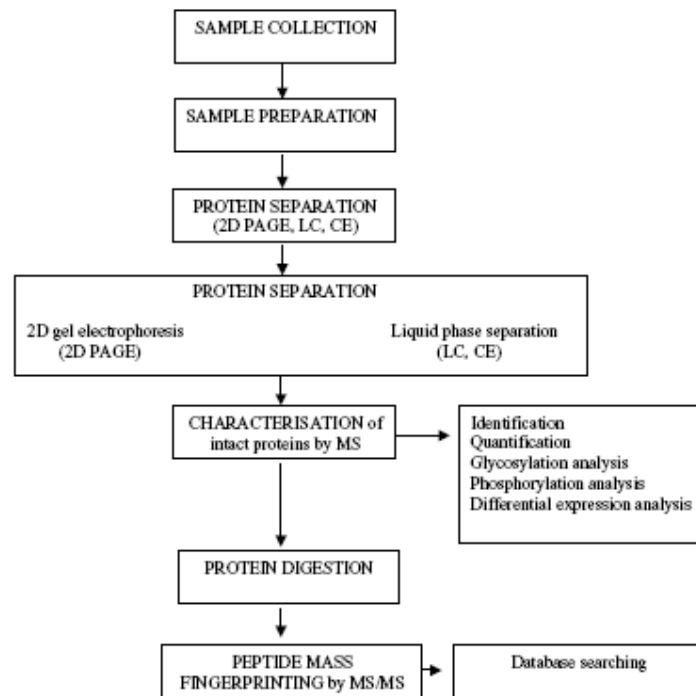
Immuunijärjestelmään vaikuttavat solut, kuten lymfosyytit, dendriittisolut, makrofagit, eosinofiilit, mast-solut ja yksittäiset neutrofiilit ovat yleensä lähellä epiteelisoluja. Nämä solut ja niiden välittäjät muodostavat immunitetin, joka jaetaan synnynnäiseen ja sopeutuvaan immunitettiin. Kasvavaa suolistoseinän läpäisevyyttä ja muuttunutta anti-geenien siirtymistä suoliston limakalvon yli kutsutaan yliherkkyydeksi ympäristön anti-geeneille. Vaikutukset T- ja B-lymfosyyttien välillä sekä tietyt säätelevät sytokiinit vaikuttavat allergisten reaktioiden syntymiseen ja säilymiseen. Monosyytit ja makrofagit sekä muut antigeenejä läsnä olevat solut ovat tärkeitä antigeenejä käsitteleviä organismeja, jotka ovat lymfosyyttien läheisyydessä, jotta oikeanlainen immuunipuolustus käynnistyy. (Paajanen 2005.)

#### 4 Maitoallergiaa aiheuttavien proteiinien analysointimenetelmiä

Elimistön vasta-ainepitoisuutta mitataan yleensä ELISA-testillä (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Seerumin reaktiivisuuden mittaaminen osoittaa antigeenin ja vasta-aineen muodostavan kompleksin kyvyn aktivoida fagosyyttejä. Se siis mittaa vasta-aineiden toiminnallisuutta. (Pelto 2000.) Immunologisista testeistä ELISA on suosituin tutkittaessa proteiinien allergisuutta (Monaci 2006). ELISA-testissä proteiini saadaan tarttumaan alustalla olevan vasta-aineen pintaan. Näytteen antigeenisyyden ilmaisee vasta-aineen ja antigeenin sitoutumisessa muodostuva värillinen yhdiste. Värinmuutos mitataan spektrofotometrillä.

Geelielektroforeesi on ollut suosittu menetelmä määrittäessä peptidejä, jotka aiheuttavat allergisia reaktioita. Analyttisiä erotusmenetelmiä on kehitetty jatkuvasti proteiinin analysoimiseksi. 2D-PAGE on käytännöllinen erotusmenetelmä monimuotoisten näytteiden proteiineille. Siinä yhdistyvät isoelektrinen elektroforeesi- ja natriumdodekyylisulfaattitekniikka. Proteiinit erotetaan isoelektrisen pisteensä ja molekyylipainonsa mukaan. Menetelmän huonona puolena voidaan pitää sen kykenemättömyyttä erotella polypeptidiketjuja, joiden molekyyliainemassat ovat suurempia kuin 150 kDa ja pienempiä kuin 8 kDa, sekä vaikeutta erottaa proteiineja, joita on pieni määrä. Parannusmenetelmiä on kehitetty myös kapillaarielektroforeesitekniikoihin, joissa käytetään fluoresenssihavainnointia ja kapillaarista johtamista. Tämä mahdollistaa heraproteiinien kvantitatiivisen analysoinnin nanomolekyyliarolla, kuten myös  $\beta$ -Lg:n havainnoimisen allergisissa yhdisteissä. Erilaisia nestekromatografisia menetelmiä on kehitetty maidon pääproteiinien havainnoimiseksi. (Monaci 2006.)

Proteiinien analysointi perustuu yleensä tiettyihin vaiheisiin, joita voivat olla näytteiden esifraktiointi, proteiinien liutus ja erotus sekä tärkeimpänä tunnistus (kuva 3). Tässä prosessissa massaspektrometrialla on tärkeä rooli proteiinien karakterisoinnissa ja jälkikäsittelyssä tapahtuneiden muutosten havainnoinnissa. (Monaci 2006.)



Kuva 3. Maitoproteiinien analysointivaiheita (Monaci 2006).

Rosendal ym. (2000) tutkivat maitohydrolysaattien mahdollisia allergiaa aiheuttavia proteiineja. Työssä pyrittiin löytämään proteiineja, jotka aiheuttavat allergiaa potilaille, joilla oli todettu maitoallergia. Tutkimuksessa käytettyjä analyttisiä menetelmiä olivat muun muassa geelisuodatus, geielektroforeesi ja ELISA-testi. Hydrolysaateista saatiin toisistaan eroavia profiileja kaikkein eniten elektroforeesilla. Sen huomattiin soveltuvan potentiaalisten allergeenien kartoittamiseen. Kaikkien näytteiden havaittiin olevan allergiaa aiheuttavia, koska pienikin pitoisuus suurimolekyylisiä proteiinia (>5000 Da) voi aiheuttaa allergiaa.

## 5 Maidon antigeenisyyden vähentäminen

### 5.1 Hydrolyysiaste ja proteaasien funktionaalisuus

Hydrolyysiaste (DH, degree of hydrolysis) on hydrolyysin laajuuden mitta. Sitä pidetään käytännöllisimpänä ja sopivimpana tapana kuvata hydrolysointiprosessin kulkua. Hydrolyysiaste ilmaistaan usein aminohapoissa olevan typen ja kokonaistypen suhteena ( $\alpha$ -aminotyyppi / kokonaistyyppi) tai peptidisidosten pilkkoutumisena (%). Peptidisidosten hydrolyysin vaikutuksesta ionisidosten ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) lukumäärä kasvaa. Tämän myötä hydrofiilisuus ja nettovaraus kasvavat. Polypeptidiketjujen molekyylikoko pienenee, mikä johtaa antigeenisyyden vähenemiseen ja molekyylien rakenteiden muutoksiin. Muutoksista seuraa hydrofobisten alueiden paljastuminen. Tutkimukset ovat osoittaneet osittaisenkin hydrolyysin kasvattavan muodostuvien hydrolysaattien liukoisuutta. (Mahmoud 1994.)

Proteiinien hydrolyysin seurauksena pH yleensä laskee neutraaleissa ja emäksisissä olosuhteissa, kun peptidisidokset katkeavat. pH pidetään yleensä vakiollisena hydrolyysin aikana, jolloin emästä on lisättävä reaktion aikana ja lopullinen hydrolysoitumisaste voidaan määrittää esimerkiksi emäksen kulutuksen perusteella. Entsyymaattisen hydrolyysin etuja ovat miedot olosuhteet ja spesifisyys. Proteaasit voidaan jakaa toimintatavan mukaan peptidaaseihin (eksopeptidaasit) ja proteinaaseihin (endopeptidaasit). Peptidaasit katkovat peptidisidoksia aminohappoketjujen päistä ja proteinaasit keskeltä. Peptidaasit jaetaan ryhmiin sen mukaan, irrottavatko ne aminohappoja vai dipeptidejä ja hydrolysoivatko ne karboksyyli- vai aminopäästä. Proteinaasit jaetaan ryhmiin katalyyssi- ja pH-ominaisuuksien perusteella. Entsyymivalmisteita käytetään teollisuudessa ja tutkimuskäytössä yleensä joko kaupallisina yhdisteinä tai yksittäisinä entsyymeinä. Taulukossa 5 on listattu proteaaseina käytettyjä entsyymivalmisteita. (Kallioinen 1997.)

Taulukko 5. Proteiinihydrolysaattien tuottamisessa käytettyjä entsyymivalmisteita ja niiden substraatteja (Kallioinen 1997).

nimi	alkuperä	substraatti
Alcalase 0.6L	<i>Bacillus licheniformis</i>	heraproteiini
Corolase PP	sian haima	heraproteiini
Corolase 7092	<i>Aspergillus sp.</i>	heraproteiini
Protease S	<i>Bacillus subtilis</i>	heraproteiini
pepsiini	sian ruuansulatuselimistö	heraproteiini
Proleather	<i>Bacillus subtilis</i>	heraproteiini
papaiini	papaija ( <i>Carica papaya</i> )	heraproteiini
kymotrypsiini	naudan haima	heraproteiini
kymosiini	vasikan juoksutusmaha	kaseiini
Alcalase 2.4L	<i>Bacillus licheniformis</i>	kaseiini ja heraproteiini
trypsiini	naudan haima	kaseiini ja heraproteiini
pankreatiini	sian haima	kaseiini ja heraproteiini
Pronase	<i>Streptomyces griseus</i>	kaseiini ja soijaproteiini

Nykyään on jo tehty monia käsittelyjä heran allergisuuden vähentämiseksi, kuten  $\beta$ -Lg:n poisto ultrasuodatuksella, sen denaturointi lämpökäsittelyllä, biologinen muuntaminen fermentoimalla ja hydrolysoiminen entsyymeillä. Fysikaaliset menetelmät sekä lämpökäsittely- ja fermentointimenetelmät kuitenkin yleensä tuottavat karvaan makuisia peptideitä, heikentävät muiden proteiinien ja peptidien toimintoja ja ovat kalliita. (Kim ym. 2007b.)

Maitoproteiinien hydrolysointia entsyymeillä on kokeiltu paljon allergisuuden vähentämiseksi. Tuotteissa ei ole kuitenkaan ollut hyväksyttävää makuvaatimusta, koska peptidien ja aminohappojen irtautuminen proteolyysin vaikutuksesta aiheuttaa kitkeryyttä ja virhemakuja. (El-Agamy 2007.) Nykyään käytetään myös endo- ja eksopeptidaaseja proteiinihydrolysaattien kitkerän maun parantamiseksi ja allergisuuden vähentämiseksi. Endo- ja eksopeptidaaseja käytetään myös nykyaikaisissa reaktoreissa immobilisointientsyymeinä parantamaan proteiinien hydrolyysia tavanomaisen panosprosessin sijaan. (Monaci 2006.)

## 5.2 Heraproteiinien hydrolysoiminen

Heraproteiinien disulfidisiltojen ja muiden kemiallisten vaikutusten takia natiivit heraproteiinit eivät täysin hydrolysoitu entsyymeillä.  $\beta$ -Lg:n suhteellisen hyvä vastustuskyky happohydrolyysille ja proteaaseille pitää osan proteiinista koskemattomana sulatuksen jälkeen. (Wal 2001.)

Heraproteiinin hydrolysaattien tuottamisessa käytettävät yleisimmät proteaasit ovat pepsiini, trypsiini ja kymotrypsiini. Pepsiini hydrolysoi  $\alpha$ -La:a, mutta ei natiivia  $\beta$ -Lg:a. Trypsiini hydrolysoi  $\alpha$ -La:a hitaasti, mutta  $\beta$ -Lg pysyy lähes koskemattomana. Kymotrypsiini hydrolysoi helposti  $\alpha$ -La:a ja pilkkoo  $\beta$ -Lg:a hitaasti. BSA ja  $\beta$ -Lg hydrolysoituvat papaiinilla, mutta  $\alpha$ -La:iin se ei vaikuta.  $\alpha$ -La hydrolysoituu täydellisesti happamissa olosuhteissa, kun kalsiumia sitova sidos puuttuu. Peptidisidosten katkeaminen hydrolyysin vaikutuksesta voi lisätä varauksellisten kemiallisten ryhmien määrää ja hydrofobisuutta, pienentää molekyylipainoa ja muotoilla molekyylien tertiäärirakennetta. Funktionaaliset ominaisuudet riippuvat suuresti hydrolyysiasteesta. Hydrolyysiasteen ollessa korkea hydrolysaatit sietävät yleensä kovaa kuumennusta saostumatta ja liukoisuus on korkea vielä pH-alueella 3,5–4,0. (Korhonen ym. 1998.)

$\beta$ -Lg:n ja  $\alpha$ -La:n hydrolysointi trypsiinillä alentaa niiden allergisuutta 100–1 000-kertaisesti verrattuna niiden natiiveihin muotoihin. Toisaalta BSA on hankala hydrolysoida trypsiinillä, koska sen rakenteessa on monia disulfidisiltoja. Niiden takia BSA:lle on suoritettava lämpö- tai painekäsittely ennen hydrolyysiä proteiinin denaturoitumiseksi. (Fritsché 2003.)

Yhdistetty lämpö- ja entsyymikäsittely parantaa trypsiinin ja pepsiinin hydrolyysiä sekä vähentää  $\beta$ -Lg:n allergisuutta.  $\alpha$ - ja  $\beta$ -kaseiinit sekä  $\beta$ -Lg ja  $\alpha$ -La ovat herkkiä trypsiinikäsittelylle toisin kuin Ig ja BSA.  $\alpha$ -La:n proteaasikäsittelyssä muodostuvilla peptideillä on todettu olevan samanlainen ja jopa suurempi allergiaa aiheuttava vaikutus kuin natiivilla  $\alpha$ -La:lla. Tämä on huomattu korkeampana IgE-vasta-aineen muodostumisena ja hydrofobisten alueiden epitooppien paljastumisena proteiinin denaturoitumisen jälkeen. (Monaci 2006.)



### 5.3 Kaseiinien hydrolysoiminen

Tossavainen (1981) tutki kaseiinien entsyymattista hydrolyysiä yhdeksällä proteaasilla. Tarkoituksena oli kehittää maitoallergiapotilaille sopiva kaseiinihydrolysaatti. Lievän hydrolyysin (hydrolyysiaste 2 %) havaittiin poistavan kaseiinien antigeenisyyden, jonka määrittämisessä käytettiin raketti-immunoelektroforeesia. Hydrolyysiaste määritettiin näytteen  $\alpha$ -aminotyppi-kokonaistyyppisuhteella. Yksittäisillä entsyymeillä päästiin 40–50 % hydrolyysiasteisiin käytettäessä suurta entsyymimäärää (5–25 % substraatin määräästä) ja 24 tunnin hydrolyysiäikää. Pitkälle pilkkoutuneet hydrolysaatit olivat kuitenkin väriltään ruskeita ja maultaan kitkeriä. Entsyymiseoksia kokeilemalla ei saatu yksittäisiä entsyymejä tehokkaampaa hydrolyysiä. Syyksi epäiltiin mikrobientsyymien samantyyppisiä pilkkomisominaisuuksia.

Fosfaatit ovat yleisiä kemiallisia rakenteita  $\alpha$ - ja  $\beta$ -kaseiineissa. Suurin osa fosfaattiryhmistä sijaitsee  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - ja  $\beta$ -kaseiinissa. Nämä alueet ovat tärkeitä tarkasteltaessa proteiinien aiheuttamaa allergisuutta ja proteolyysin tehoa sulatuksen aikana. Kaseiinien seriineihin sidotut fosfaattiryhmät ovat tärkeimpiä epitooppialueita IgE-immunoreaktiivisuuden kannalta. Immuunivastetta aiheuttavat epitoopit  $\alpha_{S1}$ -kaseiineissa sijaitsevat molekyylin hydrofobisissa osissa suojassa vasta-aineilta, kunnes kaseiini hydrolysoituu proteolyysissä. (Molina ym. 2007.) Molina ym. (2007) tutkivat fosfaatasikäsittelyn ja solun ulkopuolisen proteolyysin vaikutusta maidon kaseiinien immunologiin ominaisuuksiin ELISA-testillä. Tutkimuksessa arvioitiin kahden proteaasin (pepsiini ja trypsiini) yksittäistä ja yhdistettyä vaikutusta fosfaatasikäsittelyyn ja käsittelemättömään kaseiiniin. Antigeenisyyden väheneminen on havainnollistettu taulukossa 6. Tutkimuksessa mitattiin antigeenisyyden väheneminen näytteistä, jotka olivat käsitelty proteaaseilla yhdessä (pepsiini ja trypsiini), erikseen (pepsiini tai trypsiini) ja ilman proteaasia. Proteaasikäsittelyt yhdistettiin fosfaatasikäsittelyihin, jotka suoritettiin kaseiinille,  $\alpha$ -kaseiinille ja  $\beta$ -kaseiinille. Antigeenisyyden väheneminen analysoitiin myös kaseiineista, jotka hydrolysoitiin vain proteaaseilla. Fosfaatasikäsittely suoritettiin pH:ssa 5,8 ja lämpötilassa 37 °C. Inkubointiaika oli kuusi tuntia. Pepsiinikäsittelyssä pH oli 2 ja trypsiinikäsittelyssä 8. Proteolyysilämpötila oli 37 °C ja inkubointiaika 3 tuntia. Yhdistetyssä proteolyysissä liuoksen pH oli aluksi 2 pepsiinikäsittelyn aikana ja inku-

bointiaika 1,5 tuntia. Tämän jälkeen pH säädettiin arvoon 8 ja trypsiini lisättiin liuokseen.

*Taulukko 6. Proteolyysin vaikutus fosfataasikäsiteltyjen kaseiinien antigeenisyyden vähenemiseen ELISA-testillä mitattuna (Molina ym. 2007).*

proteaasi	proteiini	antigeenisyyden väheneminen (%)
ei mitään	fosfataasikäsitelty kaseiini	33,0
	fosfataasikäsitelty $\alpha$ -kaseiini	31,2
	fosfataasikäsitelty $\beta$ -kaseiini	24,4
pepsiini	$\alpha$ -kaseiini	61,9
	fosfataasikäsitelty $\alpha$ -kaseiini	74,7
trypsiini	$\alpha$ -kaseiini	61,9
	fosfataasikäsitelty $\alpha$ -kaseiini	75,4
pepsiini ja trypsiini	$\alpha$ -kaseiini	58,5
	fosfataasikäsitelty $\alpha$ -kaseiini	71,3
pepsiini	$\beta$ -kaseiini	4,0
	fosfataasikäsitelty $\beta$ -kaseiini	5,6
trypsiini	$\beta$ -kaseiini	0,6
	fosfataasikäsitelty $\beta$ -kaseiini	69,5
pepsiini ja trypsiini	$\beta$ -kaseiini	70,3
	fosfataasikäsitelty $\beta$ -kaseiini	74,9

Kaseiinin käsitteleminen fosfataasientsyymillä fosfaattisidosten vähentämiseksi yhdistettynä proteolyysiin ei vähentänyt merkittävästi hydrolysaattien antigeenisyyttä. Proteolyysi vähentää kuitenkin kaseiinien antigeenisyyttä verrattuna proteaaseilla käsiteltyihin näytteisiin. Antigeenisyyden vähenemistä huomattiin myös fosfataasi- ja proteaasikäsitellyillä kaseiineilla verrattuna kaseiineihin, jotka olivat saaneet vain proteaasikäsitelyn. Tutkimuksen tehokkain yhdistelmä antigeenisyyden vähentämiseksi (75,4 %) oli  $\alpha$ -kaseiinin käsitteleminen fosfataasilla ja proteolyysin suorittaminen trypsiinillä. (Molina ym. 2007.)

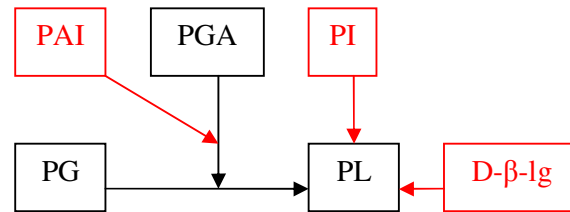
#### 5.4 Maitoproteiinien hydrolysoiminen plasmiinilla

Maidossa luontaisesti esiintyvät entsyymit joutuvat maitoon utareiden erityistuotteina. Maidon alkalinen proteinaasi plasmiini kuuluu seriiniproteinaaseihin. Se on trypsiinin kaltainen entsyymi, jonka pitoisuus maidossa vaihtelee lehmärotujen, lehmien yksilöllisten erojen ja tuotannon vaiheiden mukaan. Plasmiini on sitoutunut pääasiallisesti kaseinifraktioihin. Plasmiini ja sen esiaste plasminogeeni ovat kiinnittyneinä kaseiiniin

lysiiniä sitovista päistä. Plasmiinilla on suurin aktiivisuus hieman alkalisissa olosuhteissa (pH noin 7,5–8) ja lämpötilassa 37 °C. Se kestää hyvin lämmitystä eikä tuhoudu pastöroitaessa, mutta plasmiinin ja plasminogeenin aktiivisuus heikentyy noin 10 % pastöroinnin aikana. Happamissa olosuhteissa plasmiini kestää kuumennusta, mutta se inaktivoituu helposti emäksisissä olosuhteissa. Plasmiinin inaktivoituminen tapahtuu täydellisesti 15 % NaCl-liuoksessa.  $\alpha_{S1}$ -kaseiini pilkkoutuu plasmiinin vaikutuksesta 2–3 kertaa hitaammin kuin  $\beta$ -kaseiini. Plasmiinin sijaitessa kaseiinimisellin pinnalla  $\beta$ -kaseiini on kaseiineista herkin hydrolyysille.  $\beta$ -Lg:a ja  $\alpha$ -La:a entsyymi ei hydrolysoi.  $\beta$ -kaseiinin hydrolyysissä plasmiinilla muodostuu  $\gamma_1$ -,  $\gamma_2$ - ja  $\gamma_3$ -kaseiinia sekä proteosipeptonikomponentteja. (Ollikainen 1989.)

#### 5.4.1 Plasmiinin toiminta

Käsittelemättömässä maidossa plasminogeenin (PG) pitoisuus on 2–20-kertainen plasmiiniin (PL) verrattuna, joten plasminogeenin aktivoiminen voi johtaa plasmiinipitoisuuden merkittävään kasvuun. Varastointi, lämpökäsittely ja pH ovat tärkeimpiä tekijöitä, jotka vaikuttavat PL-systeemiin. (Burbrink & Hayes 2006.) Maidon PL-pitoisuus on 0,7–2,4 mg/l ja PG-pitoisuus 4,8–37,0 mg/l (Ollikainen 2008). PG:n muuttuminen PL:ksi vaatii kahden peptidisidoksen pilkkoutumisen. Urokinaasi ja trypsiini aktivoivat PG:a PL:ksi. Trypsiinillä reaktionopeus on kuitenkin hitaampi kuin urokinaasilla. Plasmiini-inhibiittorit (PI) inhiboivat PG:n aktivoitumista tai suoraan PL:a. Plasminogeeniaktivaattorit (PGA) ovat sitoutuneina kaseinifraktioon. PG:n sekä PL:n inhibiittorit ovat maidon seerumifraktiossa. (Ollikainen 1989.) PL-kompleksissa PL:n esiaste PG muuttuu PGA:n vaikutuksesta PL:ksi. PGA:lla ja PL:lla on kuitenkin inhibiittoreita, jotka estävät reaktiota. Plasmiiniaktivaattori-inhibiittoria (PAI) on heraproteiinin vesiosassa, ja inhibiittoria tuhoutuu pastöroinnin aikana. PI:a on myös herassa, ja se tuhoutuu 77–82 °C:ssa. Denaturoitunut  $\beta$ -laktoglobuliini (D- $\beta$ -Lg) inhiboi myös PL:a muodostamalla kovalenttisia sidoksia sen kanssa. PL-systeemin toiminta on havainnollistettu kuvassa 4. PL hydrolysoi erityisesti  $\alpha_{S2}$ - ja  $\beta$ -kaseiinia. (Ollikainen 2008.)



Kuva 4. Plasmiinisysteemin toiminta. PAI = plasmiiniaktivaattori-inhibiittori, PGA = plasminogeeniaktivaattori, PI = plasmiini-inhibiittori, PG = plasminogeeni, PL = plasmiini, D- $\beta$ -Lg = denaturoitunut  $\beta$ -laktoglobuliini. (Ollikainen 2008.)

#### 5.4.2 Lämpökäsittelyn vaikutus plasmiinin aktiivisuuteen

Prado ym. (2006) tutkivat lehmänmaidon PI:n ja PAI:n stabiilisuutta pastörintiolosuhteissa. Raakamaitoa inkuboitii 15 sekuntia 62–82 °C:ssa. PI:lla ja PAI:lla oli erilaiset stabiilisuudet lämpökäsittelyn aikana. PAI inaktivoitui maidossa 80 %, kun sitä käsiteltiin 74,5 °C:ssa. PI inaktivoitui noin 36 % samassa käsittelyssä. Tutkimuksessa lisättiin myös urokinaasiplasmiiniaktivaattoria (uPA) lämpökäsittelyn (72 °C) jälkeen. Tämä johti huomattavaan PL-aktiivisuuden lisääntymiseen. Syyn arveltiin johtuvan PAI:n inaktivoitumisesta lämpökäsittelyssä. PL-aktiivisuus lisääntyi urokinaasin lisäksi edellisestä suuremmilla pastörintilämpötiloilla (77 ja 88 °C). Tulos selittyi todennäköisesti PI:n inaktivoitumisen lisääntymisellä. Kun urokinaasilisäystä ei tehty, niin myöskään PL-aktiivisuuden lisääntymistä ei tapahtunut lämpökäsittelyssä näytteissä. Tämä voi johtua useasta syystä, mutta todennäköisesti  $\beta$ -Lg sitoutui kovalenttisesti PG:iin, mikä estää PG:n aktivoitumista.

Burbrink ja Hayes (2006) tutkivat lehmänmaidon PG:n denaturoitumisen lämpötila-aluetta. Lisäksi he määrittivät lämpödenaturoinnin vaikutusta lehmänmaidon PG:n aktiivoinnissa. Raakamaitoa pastöroitii 15 sekuntia 52–72 °C:ssa. Näytteet jaettiin lisäksi kahteen osaan, joista toiset saivat uPA-käsittelyn. PG:n aktiivoinnin stimuloinnissa hyvänä lämpötila-alueena pidettiin 40–60 °C. Tuloksien mukaan PG:n denaturoitumislämpötila oli 50,1–61,0 °C. PG-aktiivisuus pienentyi yli 62 °C lämpötiloissa, joissa  $\beta$ -Lg:a on denaturoituneena.  $\beta$ -Lg:n PG:a sitova vaikutus voi olla yksi syy plasmiinin aktiivi-

suuden vähentymisessä. Tämä vaikuttaa myös uPA-käsittelyn toimivuuteen. Entsyymien lisäyksellä voidaan kuitenkin aktivoida sitoutumatonta PG:a.

Newstead ym. (2006) tutkimuksen tavoite oli määrittää UHT-maidon minimiarvot esilämmityskäsittelyssä, jossa PL:n aktiivisuus inhiboituu tehokkaasti tai poistuu kokonaan. Esilämpökäsittelyn lämpötilat olivat 75–90 °C ja käsittelyajat 15–60 sekuntia. Lämpötila- ja aikayhdistelmien vaikutusta proteolyysiin, gelatinoitumiseen, sedimentaatioon ja pH:n muutoksiin seurattiin UHT-käsitellyssä (140 °C ja 4 sekuntia) maidossa kahdessa eri varastointilämpötilassa (20 ja 30 °C) vuoden aikana. Kaikkien esilämmitettyjen näytteiden pilkkoutumista seurattiin geelielektroforeesilla. PL-aktiivisuus pääteltiin  $\beta$ -kaseiinien hydrolysoitumisesta, jolloin muodostui  $\gamma$ -kaseiineja.  $\beta$ -kaseiinin korkein hydrolysoituminen tapahtui esikäsitellyissä 80 ja 85 °C:ssa (30 sekuntia). Pilkkoutuminen oli noin kaksi kertaa korkeampi 80 °C:ssa. Suurin pH:n lasku, sedimentin määrä ja aikaisin gelaation muodostus tapahtuivat esikäsitellyssä, jossa pilkkoutuminen oli mennyt pisimmälle. Tutkimuksissa erotettiin neljä erilaista vaihetta esilämpökäsittelyiden vaikutuksista PL-aktiivisuuksiin. PG:n aktivaatiota kiihdyttivät pastörointi ja käsittelyt, jotka inaktivoivat PAI:n. Alhaisilla esilämpökäsittelyillä PI:n aktiivisuus pysyi tasolla, joka kuitenkin kontrolloi lämpökestävän PL:n aktivoitumista. Keskitason esilämpökäsittelyissä PI inaktivoitui jättäen PL:n vapaasti hydrolysoimaan  $\beta$ -kaseiinia. Korkeimmilla esilämpökäsittelyillä saatiin jäljellä oleva PL inaktivoitumaan.

### 5.4.3 Paine käsittelyn vaikutus plasmiinin aktiivisuuteen

García-Risco ym. (2003) tutkivat painekäsittelyn vaikutusta natiivin lehmänmaidon PL-aktiivisuuteen huoneenlämpötilassa. Työssä tutkittiin myös PGA-lisäyksen vaikutusta PL-aktiivisuuteen ja sen jakautumista eri maitofraktioissa. Tutkimuksen kohteina olivat myös misellirakenteiden muutokset,  $\beta$ -Lg:n denaturoituminen sekä kaseiinien herkkyys proteolyysille painekäsittelyssä ja painekäsittelymättömässä maidossa. Paine käsittelyt tehtiin raaka'alle kuoritulle (30 °C:ssa 30 minuuttia) maidolle, joka oli sentrifugoitu (20 °C:ssa 20 minuuttia) ja suodatettu lasivillan läpi. Paine käsittelyt tehtiin 100–400 MPa paineessa 15 minuutin aikana. Proteiinit määritettiin kapillaarielektroforeesilla ja PL-aktiivisuudet ELISA-testillä. Kokeet kaseiinin herkkyydestä proteolyysille suoritettiin

PL:n optimilämpötilassa (37 °C) 90 minuutin inkubointiajalla. Kaseiinimisellien halkaisijat pienenevät paineen vaikutuksesta 150–300 nm:stä painekäsittelmättömästä kaseiinista (75–230 nm:iin, 100 MPa:ssa; 100 nm:iin, 200 MPa:ssa; 40 nm:iin, 300 ja 400 MPa:ssa). Ultrasentrifugoitujen näytteiden pH:n säätö 4,6:een paljasti, että 12 % liukoisesta  $\beta$ -Lg:sta oli denaturoitunut 200 MPa:n paineessa ja 78 % 400 MPa:ssa. PL-aktiivisuus väheni 20–30 % paineistuksessa PG-aktivaation jälkeen. Proteolyysi tehostui, ja kaseiinista tuli herkempi hydrolyysille paineen vaikutuksen alaisena, kun suoritettiin PGA-lisäys.

## 5.5 Lämpökäsittelyn vaikutus

Lehmänmaitoproteiinien antigeenisuus ei ole riippuvainen ainoastaan lämpötila- ja aikayhdistelmän valinnasta, vaan myös käsittelyn aiheuttamista vuorovaikutuksista muiden proteiinien tai ruoan matriisien kanssa (Monaci 2006). Pastörointi denaturoi osittain heraproteiinit, mutta ei kaseiinia. Korkeammat lämpötilat saattavat vaikuttaa tehokkaammin heran denaturoimiseen. (Pelto 2000.) Roth-Walter ym. (2008) arvioivat pastöroidun maidon vaikutuksia maitoallergiaan. Varmistaakseen  $\alpha$ -La:n,  $\beta$ -Lg:n ja kaseiinin läpikotaisen pastöroinnin näytteitä kuumennettiin joko 33 minuuttia 63 °C:ssa tai 2 minuuttia 72 °C:ssa. Natiivien ja pastöroitujen proteiinien immunoreaktiivisuudet mitattiin käyttäen menetelminä geelisuodatusta ja ELISA-testiä. Vaikka liukoiset heraproteiinit indusoivat vahvimpia anafylaktisia reaktioita, kaseiini oli natiivissa muodossaan immunoreaktiivisin. Suurin ero proteiinien antigeenien sisäänottoreiteissä liukoisten heraproteiinien ja misellejä muodostavien kaseiinien välillä havaittiin olleen heraproteiinien suoliston epiteelisolujen läpi meneminen. Kaseiinimisellien muodostuminen edisti antigeenien sisäänottoa ohutsuolen seinämien Peyerin saarekkeiden kautta. Antigeenin muoto saattoi vaikuttaa niiden vaikutustapoihin elimistössä ja muuttaa siten immunivastetta. Pastörointi ei vähentänyt heraproteiinien antigeenisyyttä, mutta kova kuumennuskäsittely (95 °C yli 30 minuuttia) selvästi vähensi sitä. Kuumennuskäsittely eivät vaikuttaneet kaseiinien antigeenisyyteen. Heraproteiinien pastörointi suojaasi allergisia reaktioita vastaan, kunnes proteiinien aggregoitumisesta johtuva antigeenien epiteelisolujen läpi meneminen heikentyi. Tutkimuksissa havaittiin heraproteiinien pastöroinnin edistävän antigeenien sisäänottoa Peyerin saarekkeiden kautta, kun sisäänotto

absorboivien enterosyyttien kautta heikentyi. Antigeenien sisäänottoreittien muutokset vaikuttivat proteiinien antigeenisyyteen ja allergiaoireisiin. Pastörinti sai heraproteiinit aggregoitumaan, mutta kaseiineihin se ei vaikuttanut, koska ne muodostivat misellejä ilman pastörintiäkin. Heraproteiinien pastörintinista johtuva aggregoituminen edisti niiden antigeenien sisäänottoa Peyerin saarekkeiden kautta estäen samalla niiden kulkua absorboivien enterosyyttien läpi. Kaseiinien antigeenien transsytoosi tapahtui muutoinkin saarekkeiden kautta. Tutkimuksissa havaittiin tästä johtuva heraproteiinien immunogeenisyyden kasvu. Tutkimustulokset vahvistavat olettamusta, jonka mukaan maidon prosessointi aiheuttaa lisääntyvää herkistymistä proteiineille.

Tutkimuksissa on huomattu lehmänmaidon lämpökäsittelyn muuttavan proteiinien tertiärrakennetta, mikä ei välttämättä vähennä maidon allergisuutta. Sen sijaan kuumennuksessa muodostuvat aggregaatit voivat lisätä allergisuutta tai voi muodostua uusia antigeenejä kemiallisten ja fysikaalisten reaktioiden seurauksena. (Monaci 2006.)

Kuumennuskäsittely ei erityisemmin vaikuta kaseiineihin, mutta ne ovat alttiita monille proteinaaseille ja peptidaaseille, jotka muokkaavat kaseiineja ruuansulatuksen jälkeen.  $\beta$ -Lg on suhteellisen kestävä proteiini happamalle ympäristölle ja proteolyttisille entsyymeille, mikä jättää sen rakenteen melko koskemattomaksi ruuansulatuksen jälkeen. Tämä mahdollistaa koskemattomien proteiinien pääsyn elimistöön, jolloin  $\beta$ -Lg:n pinnalla olevat antigeenireseptorit (epitootit) pystyvät sitoutumaan vasta-aineisiin ja aiheuttamaan immuunivasteen elimistössä, mistä seuraa allerginen reaktio. (Järvinen ym. 2002.)

Pitkittyneellä lehmänmaidon kuumennuksella on yritetty saada aikaan vähemmän allergisuutta aiheuttava maito.  $\alpha$ -kaseiini on lämpöstabiilein proteiini, BSA sen sijaan epävakain kuumennukselle ja  $\beta$ -Lg suhteellisen kestävä kuumennukselle. BSA ja Ig menettävät antigeenisyytensä 70–80 tai 100 °C:ssa 15 minuutin aikana. (El-Agamy 2007.)

Kaseiini ei denaturoidu maidon normaaleissa lämpökäsittelyissä normaalissa pH:ssa, normaalissa suola- ja proteiinipitoisuudessa.  $\beta$ -Lg:n lämpökäsittelystä aiheutuva denaturoituminen on irreversiibeli reaktio. Denaturoituminen alkaa jo 65 °C:ssa ja tapahtuu kokonaisuudessaan 90 °C:ssa viiden minuutin aikana. (Dairy processing handbook 1995.)

### 5.5.1 Heraproteiinit

Heraproteiinit voidaan denaturoida 70–80 °C:ssa. Lämpö tuhoaa proteiinien pinnalla olevia epitooppeja, jotka tarttuvat elimistössä vasta-aineisiin aiheuttaen immuunivasteen. Lehmänmaitoproteiineista kaseiinit ovat termostabiileja ja muokkautuvat vain vähän lämmön vaikutuksesta. Heraproteiinit sen sijaan denaturoituvat voimakkaasti lämpökäsittelyissä. (Fritsché 2003.) Kovalenttisten sidosten muuttuminen lämmön tai varastoinnin vaikutuksesta, kuten rasvojen hapettuminen, disulfidididosten katkeaminen tai aminohappojen deaminaatio voivat aiheuttaa maidon allergisuutta.  $\beta$ -Lg:n kuumentaminen 50 °C laktoosin läsnä ollessa on huomattu kasvattavan allergisen ihoreaktion tasoa 100-kertaisesti. (Monaci 2006.)

Kim ym. (2007b) tutkivat pepsiinin ja trypsiinin vaikutusta natiivin ja lämpökäsitellyn heraproteiinkonsentraatin (WPC, whey protein concentrate) hydrolysaattien tuottoon ja antigeenisyyteen. Natiivia ja lämpökäsiteltyä (10 minuuttia 100 °C) WPC:a (2 % liuos) inkuboitiin 50 °C:ssa 30–120 minuuttia. Hydrolyysikäsitteilyt tehtiin 0,1–1 % pepsiinillä ja trypsiinillä. Liuosten pH oli 2 pepsiinihydrolyysissä ja 8 trypsiinihydrolyysissä. Näytteistä määritettiin BSA:n,  $\beta$ -Lg:n ja  $\alpha$ -La:n pilkkoutuminen geelielektroforeesilla sekä hydrolysaattien antigeenisuus ELISA-testillä. Laajin pilkkoutuminen saavutettiin lämpökäsitellyillä WPC:lla. Pilkkoutuminen kasvoi inkubointiajan ja entsyymipitoisuuden kasvaessa. Korkein hydrolyysiaste (25 %) saavutettiin lämpökäsitellyllä WPC:lla, jota oli hydrolysoitu 120 minuuttia ensin 1 % pepsiinillä ja sen jälkeen 1 % trypsiinillä. Geelielektroforeesilla analysoiduissa näytteissä BSA oli täysin hydrolysoitunut natiiveissa ja lämpökäsitellyissä näytteissä 30 minuutin pepsiinikäsitelyssä. Natiivin WPC:n inkubointi 30 minuuttia 1 % pepsiinillä ja trypsiinillä sai BSA:n ja  $\alpha$ -La:n kokonaan hydrolysoituiksi. Natiivin WPC:n  $\beta$ -Lg:iin eivät vaikuttaneet pepsiini- ja trypsiinikäsitteilyt. Antigeenisyyden väheneminen johtui todennäköisesti immuunivastetta aiheuttavien vasta-aineita sitovien epitooppien vähentymisestä hydrolyysin edetessä. Näiden olosuhteiden ja käsittelyiden todettiin olevan tehokkain tapa tuottaa vähän allergisoivia hydrolysaatteja WPC:n hydrolyysissä saavuttaen samalla molekyylipainoltaan pieniä peptidejä.



Kim ym. (2007a) tutkimuksessa arvioitiin lämpökäsittelyn vaikutusta WPC:n hydrolysoitumiseen ja muodostuvien hydrolysaattien antigeenisyyttä. Käytettävät proteaasit olivat Alcalase, Flavourzyme, trypsiini ja papaiini. Hydrolysaattien proteiini- ja peptidikoostumus analysoitiin geelielektroforeesilla ja nestekromatografilla. Antigeenisyydet mitattiin ELISA-testillä. WPC:n (2 % liuos) pH säädettiin arvoon 8, minkä jälkeen suoritettiin lämpökäsittely (10 minuuttia 100 °C). Liuoksia inkuboitiin tämän jälkeen 2 % entsyymeillä 30–240 minuuttia 50 °C:ssa. Korkeimmat WPC:n hydrolyysiasteet saatiin 240 minuutin inkuboinnin kohdalla: Alcalase (12 %), Flavourzyme (12 %), trypsiini (10 %) ja papaiini (9 %). Geelielektroforeesilla huomattiin  $\beta$ -Lg:n,  $\alpha$ -La:n ja BSA:n pilkkoutuneen kokonaan 240 minuutin inkuboinnin aikana. Antigeenisyyttä aiheuttavat pääkomponentit vähenivät WPC:sta 60 minuutin aikana hydrolysoitaessa Alcalasilla, Flavourzymellä ja trypsiinillä. Papaiinilla käsitellyissä WPC:n hydrolysaateissa huomattiin jälkiä  $\beta$ -Lg:sta ja  $\alpha$ -La:sta 240 minuutin inkuboinnin jälkeenkin.

Ehn ym. (2005) tutkivat IgE-vasta-aineen sitoutumista  $\beta$ -lactoglobuliiniin lämpö-, hydrolyysi- ja fermentointikäsitellyillä maitotuotteilla. Proteiinien peptidirakenteet analysoitiin nestekromatografilla ja tuotteiden antigeenisyydet ELISA-testillä. Yhdeksältä aikuiselta otetuista näytteistä suoritettiin antigeenisyydestetit maitohappobakteerifermentoinnin ja hydrolyysikäsitteilyn jälkeen. Maitohappobakteeri oli *Lactobacillus helveticus* ja proteaasina toimi trypsiini. Tutkitut näytteet olivat lähes rasvattomia (<0,1 %), pastöroitu 72 °C:ssa 30 sekuntia, ja jotkin näytteet oli lisäksi lämpökäsitelty 90 °C:ssa 4 minuuttia. Maitotuotteiden  $\beta$ -Lg:sta jäi natiiviksi 60 % 16 tunnin fermentointikäsitteilyn aikana ja 18 % 212 tunnin aikana. Trypsiinikäsitteily jätti koskemattomaa  $\beta$ -Lg:a ainoastaan 12 % 16 tunnin aikana ja vain pieniä pitoisuuksia 23 tunnin hydrolyysin jälkeen. Lämpökäsittely 90 °C:ssa laski merkittävästi vasta-aineiden sitoutumista. Fermentoinnin vaikutus ei ollut merkittävä IgE-vasta-aineen sitoutumisen vähentämisessä.

### 5.5.2 Heraproteiinit ja kaseiini

Wroblewskan ym. (2007) tutkimuksen tavoite oli määrittää maidon WPC:n ja natriumkaseinaatin hydrolysaattien pienimolekyylisten fraktioiden antigeenisyydet. Laktoosin

määrää vähennettiin näytteissä laktaasientsyymikäsitteilyllä proteaasikäsitteilyiden jälkeen. Proteaasit olivat Alcalase ja pepsiini. Molekyylipainoltaan alle 6 000 Da olleet hydrolysaattien fraktiot analysoitiin nestekromatografilla. Hydrolysaattien antigeenisyydet analysoitiin ELISA-testillä. WPC:n hydrolyysi suoritettiin Alcalase-entsyymillä pH:ssa 8 ja lämpötilassa 50 °C, ja inkubointiaika oli 140 minuuttia. Pepsinillä hydrolysoitaessa pH oli 2, lämpötila 37 °C ja inkubointiaika 70 minuuttia. Laktaasilla hydrolysoidessa pH oli 6,5 ja lämpötila 4 °C sekä inkubointiaika 24 tuntia. WPC:n ja natriumkaseinaatin hydrolyysiasteeksi saatiin 18 ja 17 %. Natriumkaseinaatin hydrolysaattien antigeenien IgG-vasta-aineen sitomiskyky oli hieman vähäisempi kuin WPC:n. Proteiinien pilkkominen Alcalasella, pepsinillä ja laktaasilla ei vähentänyt maidon allergisuutta merkittävästi.

## 5.6 Paineikäsitteilyn vaikutus

Maidon homogenointi korkeassa paineessa kasvattaa rasvan pinta-alaa moninkertaisesti. Esiin tulleet alueet adsorboivat proteiineja hydrofobisilla vuorovaikutuksilla. Näitä proteiinerakenteita ovat pääosin kaseiinien misellit. (Pelto 2000.) Fritschén (2003) tutkimuksessa heraproteiinit käsiteltiin korkeassa paineessa (200–700 MPa) ennen trypsiinihydrolyysia, sen aikana ja sen jälkeen. Paineikäsitteily hydrolyysin aikana vähensi lehmänmaidonproteiinien antigeenisyyttä voimakkaasti. WPC:n  $\beta$ -Lg:n jäännösantigeenisuus väheni yli 100-kertaisesti, kun hydrolyysi suoritettiin 400–600 MPa paineessa verrattuna vastaavaan hydrolyysiin normaali-ilmanpaineessa.

Bonomi ym. (2003) tutkivat  $\beta$ -Lg:n pilkkomista trypsiinillä ja kymotrypsinillä ennen paineen vaikutusta, sen aikana (600 MPa) ja paineistuksen jälkeen. pH oli 6,8; lämpötilat olivat 30, 37 ja 44 °C sekä käsitteilyaika 10 minuuttia. Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään käsitteilyiden vaikutus  $\beta$ -Lg:n antigeenisyyteen, jota tutkittiin ELISA-testillä. Proteiinien määrittäminen suoritettiin geelielektroforeesilla. Taulukossa 7 näkyy  $\beta$ -Lg:n jäännösarvot alkuperäisestä erilaisten lämpötilojen ja paineiden vaikutusten alaisena hydrolysoitaessa trypsiinillä ja kymotrypsinillä.

Taulukko 7. Trypsiinin ja kymotrypsiinin vaikutukset  $\beta$ -laktoglobuliinin hydrolyysias-  
teeseen (%) eri olosuhteissa (Bonomi ym. 2003).

paine käsittely	trypsiini			kymotrypsiini		
	30°C	37°C	44°C	30°C	37°C	44°C
Normaali ilmanpaine (0,1 MPa)	3 ± 1	13 ± 3	14 ± 4	10 ± 4	24 ± 4	26 ± 6
Painekäsittelyn (600 MPa) aikana	69 ± 3	89 ± 4	91 ± 3	63 ± 5	97 ± 2	98 ± 1
Normaalissa ilmanpaineessa (0,1 MPa) painekäsittelyn (600 MPa) jälkeen	29 ± 4			38 ± 5		

Tulosten mukaan kymotrypsiinikäsittelyssä (10 minuuttia), 600 MPa paineessa ja 37 °C:ssa  $\beta$ -Lg:n hydrolyysi oli lähes täydellinen. Tulokset osoittavat kymotrypsiinin hydrolysoivan tehokkaasti  $\beta$ -Lg:n hydrofobisia alueita, jotka olivat väliaikaisesti paljastuneina hydrolyysille painekäsittelyn aikana. Alueet eivät paljastuneet käsittelemättömässä proteiinissa tai aiemmin painekäsittelyssä proteiinissa. (Bonomi ym. 2003.)

Proteiinien hydrolyysin aikana käytetyissä painekäsittelytutkimuksissa paineet ovat olleet 300–400 MPa ja inkubointiajat pitkiä, mikä on johtanut usein laajoihin proteiinien hydrolysointeihin ja entsyymien inaktivoitumiseen.  $\beta$ -Lg:n immuunireaktiossa on havaittu laskua näytteissä, jotka painekäsiteltiin kymotrypsiinillä ja trypsiinillä. Kymotrypsiinikäsittelyllä on päästy tutkimuksissa molekyylipainoltaan korkeintaan noin 6 000 Da tuotteisiin. Trypsiinillä suoritetuilla hydrolyyseilla on saavutettu painekäsittelyn jälkeen tuotteita molekyylipainoltaan 5 000–16 000 Da. (Bonomi ym. 2003.)

Chicón ym. (2008) tutkivat korkeapainekäsittelyllä ja pepsiinillä suoritettua hydrolyysin vaikutusta  $\beta$ -Lg:n denaturoitumiseen ja proteiinin aiheuttamaan antigeenisyyteen. Tutkimuksessa vertailtiin erilaisten painekäsittelyiden vaikutusta hydrolyysin kulkuun.  $\beta$ -Lg:n hydrolysointi yli 200 MPa paineessa vähensi selvästi antigeenisuutta, ja 400 MPa paineessa natiivi proteiini oli hydrolysoitunut viidessä minuutissa. Antigeenisyyden voimakas väheneminen vaati kuitenkin pitkän inkubointiajan (1–2 tuntia) pepsiinillä hydrolysoitaessa korkeassa paineessa, jolloin keskikokoiset peptidit saatiin vähemmään. Hydrolysoitujen proteiinien analysoimisessa käytettiin geielektroforeesia ja peptidien tunnistus suoritettiin nestekromatografilla. Hydrolysaattien antigeenisyyttä analysoitiin ELISA-testillä.

## TUTKIMUSOSA

### 6 Materiaalit ja menetelmät

#### 6.1 Entsyymit

Tutkimuksiin etsittiin neutraalilla pH-arvoalueella toimivia proteaaseja, jotka täyttivät elintarvikelaatuvaatimukset. Kokeissa käytetyt 25 entsyymiä ovat mainittuina taulukossa 8.

Taulukko 8. Tutkimuksissa käytetyt entsyymit, niiden tuottajaorganismit ja valmisteiden laatu ( $n = neste, j = jauhe$ ).

entsyymi	tuottajaorganismi	laatu
Proteaasi 1	<i>Organismi 1</i>	j
Proteaasi 2	<i>Organismi 2</i>	j
Proteaasi 3	<i>Organismi 3</i>	n
Proteaasi 4	<i>Organismi 4</i>	n
Proteaasi 5	<i>Organismi 5</i>	n
Proteaasi 6	<i>Organismi 6</i>	j
Proteaasi 7	<i>Organismi 7</i>	n
Proteaasi 8	<i>Organismi 8</i>	j
Proteaasi 9	<i>Organismi 9</i>	j
Proteaasi 10	<i>Organismi 10</i>	j
Proteaasi 11	<i>Aspergillus melleus</i>	j
Proteaasi 12	<i>Aspergillus oryzae</i>	j
Proteaasi 13	<i>Aspergillus oryzae</i>	j
Proteaasi 14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	n
Proteaasi 15	<i>Bacillus licheniformis</i>	n
Proteaasi 16	<i>Bacillus licheniformis</i>	n
Proteaasi 17	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	j
Proteaasi 18	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	j
Proteaasi 19	<i>Bacillus subtilis</i>	j
Proteaasi 20	<i>Bacillus subtilis</i>	n
Proteaasi 21	<i>Bacillus subtilis</i>	j
Proteaasi 22	<i>Bacillus subtilis</i>	j
Proteaasi 23	<i>Bacillus subtilis</i>	n
Proteaasi 24	<i>Carica papaya</i>	j
Proteaasi 25	<i>Geobacillus sp.</i>	n

## 6.2 Hydrolyysikokeet

Substraattina käytettiin Valion rasvattoman maidon (pH 6,8) proteiineja.

Pienen mittakaavan hydrolyysi tehtiin magneettisekoittimien päällä olevassa vesihau-teessa. Inkubointilämpötila oli useimpien entsyymien lämpötilaoptimalueella, mikä mahdollisti tehokkaan hydrolyysin. Suuremmassa mittakaavassa entsyymien inaktivointi tehtiin ensin mikroaaltouunissa, minkä jälkeen näyte siirrettiin lämpöhauteeseen. Käyt-töön otettiin myös jäähdytys viileässä vedessä. Hydrolyysiolosuhteet on esitetty taulu-kossa 9.

*Taulukko 9. Pienen ja suuren mittakaavan hydrolyysiolosuhteet.*

pieni mittakaava		suuri mittakaava	
maidon määrä	100 g	maidon määrä	500 g
inkubointilämpötila	50 °C	inkubointilämpötila	50 °C
inkuboinnin kesto	2–4 tuntia	inkuboinnin kesto	2 tuntia
inaktivointilämpötila	80 °C	inaktivointilämpötila	mikrossa 75 °C ja vesihau-teessa 80 °C
inaktivoinnin kesto	8 minuuttia	inaktivoinnin kesto	noin minuutti ja 5 minuuttia
jäähdetyisaika	–	jäähdetyisaika	2 minuuttia

## 6.3 Hydrolyysiasteen määrittäminen

Reagenssit:

- puskuriliuos: natriumfosfaatti ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ; 25 mM), magnesiumsulfaatti ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 mM) ja liuoksen pH 7
- saostusreagenssi: trikloorietikkahappo (0,11 M), natriumasettaatti (0,22 M) ja etikkahappo (0,31 M)
- natriumkarbonaatti (0,55 M)
- L-tyrosiinista ( $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ; 2,3 mM) tehtiin laimennokset 1:100, 1:50 ja 1:20 puskuriliuokseen
- Folin-Ciocalteu-reagenssi (Merck, Saksa) tehtiin suhteessa 1:3 ionivaihdettuun veteen

Hydrolyysin etenemistä seurattiin vertaamalla hydrolysaattien tyrosiinipitoisuuksia nollanäytteen tyrosiinipitoisuuteen. Tyrosiinimääritys tehtiin muunnellulla Matsubaran ym. (1958) menetelmällä. Koeputkeen pipetoitiin 3 cm<sup>3</sup> näytettä ja 5 cm<sup>3</sup> saostusreagenssia, jonka jälkeen näytettä sentrifugoitiin 3 300 g:ssä 20 minuuttia. Supernatantista määritettiin tyrosiinipitoisuus Folin-Ciocalteu-menetelmällä käyttäen Beckmanin automaattista Biomek 2 000 työasemaa ja spektrofotometriä. Menetelmässä käytetyt pipetointimäärät, laimennokset ja mittausparametrit on esitetty taulukossa 10.

*Taulukko 10. Tyrosiinimäärityksen pipetointimäärät, laimennokset ja mittausparametrit.*

pipetointimäärät		laimennokset		mittausparametrit	
supernatantti	75 µl (2 osaa)	nollanäyte	1:5	absorbanssi	650 nm
natriumkarbonaatti	187,5 µl (5 osaa)	hydrolyysinäyte	1:100	inkubointiaika	50 minuuttia
Folin-Ciocalteu	37,5 µl (1 osa)				

#### 6.4 Geelielektroforeesi

Reagenssit:

- geelit: Homogeneous 20 (PhastGel, GE Healthcare)
- Tris/HCl/EDTA-puskuri: EDTA (1,0 mM), Tris (10 mM) ja liuoksen pH 8
- merkaptoetanol (0,13 M)
- SDS-liuos: Na-layryylisulfaatti (0,35 M)
- bromifenolisininen (1,5 mM)
- standardiliuos (LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis, GE Healthcare, Amersham)
- Coomassie-liuos: 5 kpl PhastGel Blue R -väritablettia (Pharmacia, Ruotsi) liuotettiin 400 cm<sup>3</sup> ionivaihdettua vettä 10 minuuttia sekoittaen. Sekoitusta jatkettiin kolme minuuttia 600 cm<sup>3</sup> metanolilisäyksen jälkeen. Liuos suodatettiin.
- värjäysliuos: Coomassie-liuos ja suolahappo (20 %) suhteessa 1:1 valmistettiin käyttöpäivänä
- pesuliuos: metanoli, etikkahappo (100 %) ja ionivaihdettu vesi suhteessa 3:1:6
- säilytysliuos: glyseroli, etikkahappo (100 %) ja ionivaihdettu vesi suhteessa 1:1:8

Näytettä pipetoitiin 250 µl sentrifugiputkeen, johon lisättiin 250 µl Tris/HCl/EDTA-puskuria, 50 µl merkaptoetanolia ja 125 µl SDS-liuosta. Putkea kuumennettiin kiehu-  
vassa vedessä viisi minuuttia. Putkeen lisättiin kuumennuksen jälkeen 50 µl bromi-  
fenolisinistä, minkä jälkeen putkea sentrifugoitiin 3 500 g:ssä 10 minuuttia. Superna-  
tanttia oli elektroforeesissa 1 µl geelillä. Geelielektroforeesi tehtiin laitteella PhastSys-  
tem (Pharmacia, Ruotsi). Elektroforeesin parametrit ovat nähtävissä taulukossa 11.

*Taulukko 11. Elektroforeesiajon parametrit.*

erotusvaiheet	jännite [V]	virta [mA]	teho [W]	lämpötila [°C]	jänniteaika [Vh, voltitunti]
vaihe 1	500	10	3	15	1
vaihe 2	500	1	3	15	1
vaihe 3	500	10	3	15	158

Elektroforeesin jälkeen geeli värjättiin kehitysyksikössä värjäysliuoksella (kulutus noin 100 cm<sup>3</sup>), pestiin pesuliuoksella (kulutus noin 200 cm<sup>3</sup>) ja säilytysliuoksella (kulutus noin 50 cm<sup>3</sup>). Geelin kehitysvaihe kesti noin 40 minuuttia ja kehityksen aikana lämpötila oli 50 °C.

## 6.5 Happohydrolyysi

Reagenssit:

- suolahappo (6,0 ja 0,1 M)

Hydrolyysiaste (%) pyrittiin määrittämään myös vertaamalla näytteen tyrosiinipitoisuutta happohydrolysoidun maidon tyrosiinipitoisuuteen. Maitoa punnittiin 1,0 g hydrolyysiputkeen ja putkeen pipetoitiin 11 cm<sup>3</sup> suolahappoa (6 M). Hydrolyysiputkea tyytettiin kymmenen minuuttia hapettumisen estämiseksi, minkä jälkeen näytettä pidettiin lämpöhauteessa 110 °C:ssa 20 tuntia. Jäähdytynyt hydrolysaatti siirrettiin pasteurpipetillä 20 cm<sup>3</sup> mittapulloon. Hydrolyysiputki huuhdottiin näytteestä 2 cm<sup>3</sup>:lla suolahappoa (0,1 M) ja ionivaihdetulla vedellä mittapulloon. Veteen liukenematon aines erotettiin näytteestä sentrifugilla 3 300 g:ssä 20 minuutin aikana.

## 6.6 Typpi- ja proteiinipitoisuuden määrittäminen

Valion rasvattoman maidon kokonaistyyppipitoisuus (%) määritettiin Kjehldal-menettelmällä Valion tutkimuksen ja tuotekehityksen kemian analyysipalvelun osastolla. Proteiinipitoisuus laskettiin kertomalla kokonaistyyppitulokertoimella 6,38. Viiden näytteen tyyppipitoisuuskeskiarvosta laskettiin proteiinipitoisuudeksi 3,55 %.

## 6.7 Hydrolysaattien aistinvarainen arviointi

Valion tutkimuksen ja tuotekehityksen aistittavan laadun osaston laatustandardin mukaan rasvattoman maidon pitää täyttää taulukon 12 kriteerit.

*Taulukko 12. Valion rasvattoman maidon laatukriteerit (Aistinvaraisen laadun käsikirja 2006).*

rakenne	homogeeninen, ei saa sisältää hiutaleita, pinnalla ei saa erottua kermakerrosta
maku	makea, raikas, puhdas, happamuudeltaan neutraali neste
väri	sinertävä

Näytteiden aistinvaraista laatua arvioitiin Valion tuotteiden viisiportaisella myyntiinhyväksyntäasteikolla (taulukko 13). Näytteet, joille arvioija antoi asteikon pistemäärän 3 tai vähemmän, oli laatuvirhe nimettävä. (Aistinvaraisen laadun käsikirja 2006.) Hydrolyysinäytteiden ei tarvinnut täyttää Valion rasvattoman maidon hyväksyttävyysskriteerejä, kunhan laatu oli muuten hyvää.

*Taulukko 13. Valion tuotteiden viisiportainen myyntiinhyväksyntäasteikko (Aistinvaraisen laadun käsikirja 2006).*

laatuarvosana	näytteen vertailu laatustandardiin	toimenpide
5	yhdenmukainen spesifikaation kanssa	myyntiin
4	erittäin lieviä poikkeamia spesifikaatiosta	myyntiin
3	lieviä poikkeamia spesifikaatiosta	myyntiin huomautuksin
2	selviä poikkeamia spesifikaatiosta	ei myyntiin
1	erittäin selviä poikkeamia spesifikaatiosta	ei myyntiin
0	ei kelpaa ihmisravinnoksi (ei maisteta)	hylky



Näytteiden aistinvaraista laatua verrattiin inaktivointiolosuhteissa käsiteltyyn maitonäytteeseen. Arvioitavien näytteiden lämpötila oli 17 °C ja näytteitä maistettiin vain lusikallinen pienen määrän takia.

## **6.8 Partikkelikokoanalyysi**

Näytteiden partikkelien tilavuusjakauma (%) mitattiin Mastersizer 2000 (Malvern) laitteella nestemittauspäällä (Hydro 2000S) Valion tutkimuksen ja tuotekehityksen prosessiteknologian osastolla.

## **6.9 $\beta$ -laktoglobuliinin määrittäminen**

$\beta$ -laktoglobuliinipitoisuudet määritettiin ELISA-testillä ja nestekromatografilla (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) Valion tutkimuksen ja tuotekehityksen kemian analyysipalvelun osastolla.

## **7 Tulokset ja tulosten tarkastelu**

### **7.1 Hydrolyysi yksittäisillä entsyymeillä**

Työssä tutkittiin lehmänmaitoproteiinien rajattua hydrolyysiä neutraaleissa olosuhteissa toimivilla proteaaseilla. Tarkoituksena oli saada maitoallergiaa aiheuttavat proteiinit pilkkoutuneiksi maidon laadun säilyessä hyvänä. Hydrolysoidun näytteen tärkeimmät laatukriteerit olivat sen rakenteen, värin, maun ja suutuntuman säilyvyys hyvänä. Entsyymipitoisuus arvioitiin sattumanvaraisesti, jos tutkittavan entsyymin tuoteselosteessa ei annettu tietoa suositeltavasta entsyymin käyttöpitoisuudesta substraattiin nähden. Jatkossa pitoisuutta muutettiin haarukointimenetelmällä. Entsyymipitoisuutta laskettiin huonolaatuisen näytteen (laatuarvosana 0–2) jälkeen ja nostettiin myyntikelpoisen näytteen (laatuarvosana 3–5) kohdalla.

#### **7.1.1 Entsyymien esikarsinta hydrolyysiasteen ja laadun perusteella**

Entsyymien tutkimus aloitettiin kokeilemalla erilaisia entsyymipitoisuuksia hydrolyyiseissä (taulukko 14 ja liite 1). Tarkoituksena oli löytää entsyymipitoisuus, jolla maidon laatu pysyi hyvänä lähes neljä tuntia. Näytteen tyrosiinipitoisuutta mitattaessa haluttiin tapahtuvan nousu tasolle, jossa tyrosiinipitoisuus pysyi vakaana. Taulukon 14 entsyymit karsittiin ensimmäisinä. Hydrolyysiä ei ensimmäisissä kokeissa lopetettu, vaikka maidon rakenne muuttui joidenkin näytteiden kohdalla. Oli mahdollista, että saostuneen näytteen rakenne palasi takaisin maitomaiseksi. Koska tyrosiinipitoisuudet jäivät useissa näytteissä lähes samalle tasolle, entsyymien karsintakriteerejä olivat laadun lisäksi myös

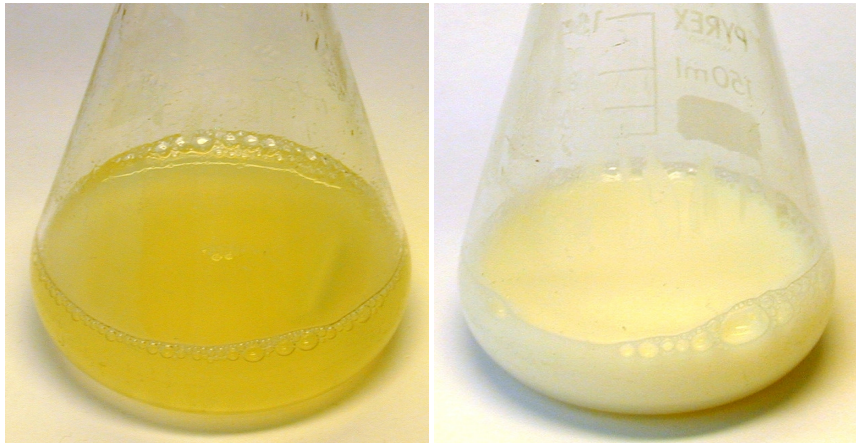
- entsyymin korkeat inaktivointiolosuhteet
- alkalisissa olosuhteissa toimiva entsyymi
- kahdella entsyymillä sama tuottajaorganismi.

Taulukko 14. Alussa karsittujen entsyymien hydrolysaattien hydrolyysiajat, laatuarvosanat, tyrosiinipitoisuudet, sanalliset arvioinnit ja karsinnan syyt.

entsyymi (p-% maidosta)	<sup>1</sup> aika (h)	laatu (0–5)	tyrosiini (mg/g prot.)	sanallinen arvio laadusta	karsinnan syy
Proteaaasi 11					
0,01 %	0,5	0	11	saostunut	alhainen tyrosiinipitoisuus
Proteaaasi 18					
0,001 %	0,5	0	31	saostunut	
0,0001 %	0,5	0	23	saostunut	
	3	0	24	saostunut, kuultava	lämpöä kestävä entsyymi
Proteaaasi 20					
0,001 %	0,5	0	21	saostunut	
0,0001 %	0,5	–	20		
	1	0	20	saostumaa reunoilla	
	1,5	0	20	saostunut, kuultava	
	3	0	20	saostuma, kuultava	saostuu alhaisella pitoisuudessa
Proteaaasi 13					
0,0066 %	0,5	0	–	saostunut	inaktivointi 90 °C 12 minuuttia
Proteaaasi 16					
0,033 %	0,5	0	38	saostunut	emäksisissä olosuhteissa
	4	0	46	saostunut, harmahtava	parhaiten toimiva entsyymi
Proteaaasi 17					
0,0033 %	0,5	0	20	saostunut, kellertävä	alhainen tyrosiinipitoisuus
Proteaaasi 22					
0,0066 %	0,5	0	28	saostunut, harmahtava	inaktivointi 90 °C 5–10 minuuttia,
Proteaaasi 24					
0,0033 %	0,5	0	–	saostunut	inaktivointi 90 °C 15–30 minuuttia,
Proteaaasi 19					
0,001 %	0,5	0	24	saostunut, kellertävä	alhainen tyrosiinipitoisuus
Proteaaasi 9					
0,0033 %	0,5	4	20		sama tuottajaorganismi kuin
	4	4	21		Proteaaasi 6
Proteaaasi 23					
0,033 %	0,5	0	–	saostunut	
0,00002 %	0,5	–	21		
	1	0	21	saostunut	alhainen tyrosiinipitoisuus,
	2,5	0	21	saostunut, kellertävä	saostuu alhaisella pitoisuudessa

<sup>1</sup> = hydrolyysiaika entsyymillä  
– = ei analysoitu

Näytteen maku oli usein virheellinen, jos saostumista ehti tapahtua hydrolyysin aikana. Näytteistä, joiden laatu oli arvosanan nolla tasoinen jo puolen tunnin jälkeen, tehtiin tyrosiinimääritykset vain ensimmäisistä ja viimeisistä noin neljän tunnin näytteistä. Voimakkaan makuisen näytteen jälkeen maku pysyi usein suussa pitkään, mikä vaikutti muiden näytteiden arvioimiseen. Virhemauista kitkeruus oli melko helposti havaittavissa. Kuvassa 5 on laatuarvosanan nolla saanut näyte ja kuvassa 6 moitteeton näyte.

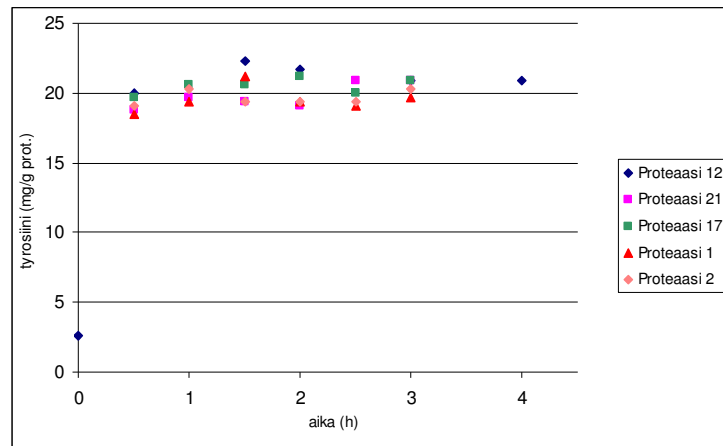


Kuvat 5 ja 6. Proteaasi 2:lla (0,05 p-%) valmistettu hydrolysaatti vasemmalla ja Proteaasi 10:llä (0,00033 p-%) valmistettu hydrolysaatti oikealla.

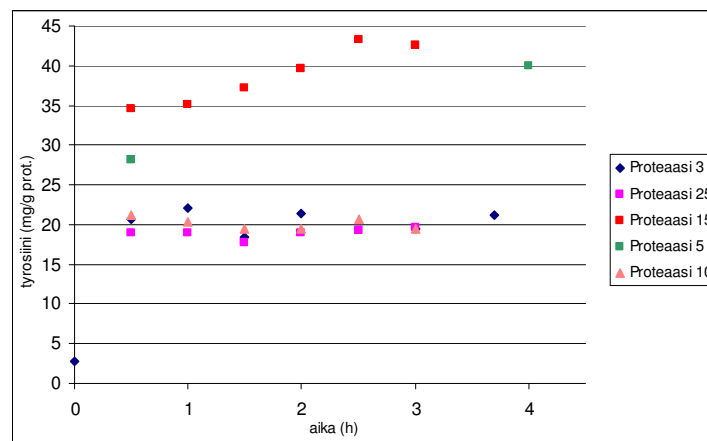
### 7.1.2 Valittujen entsyymien arviointi hydrolysaatin aistinvaraisen laadun, hydrolyysiasteen ja geielektroforeesin perusteella

#### Hydrolysaatin tyrosiinipitoisuus

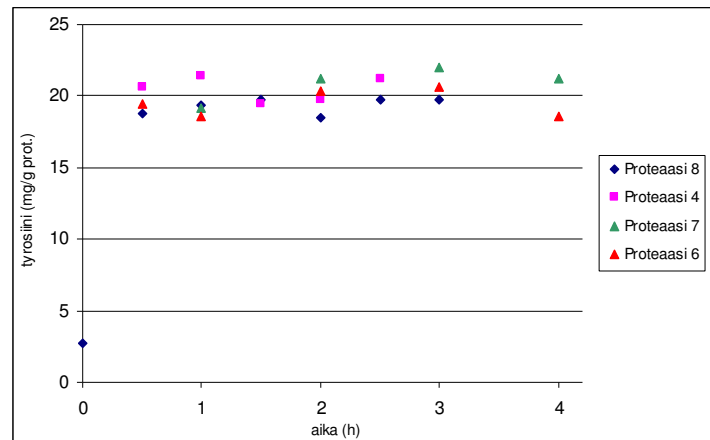
Tyrosiinipitoisuudet yleensä nousivat, ja gealien proteiiniviivoissa tapahtui muutoksia, jos näytteen laatu muuttui hydrolyysin aikana. Jatkoon valittujen entsyymien tyrosiinipitoisuudet olivat noin 20 mg/g proteiinia Proteaasi 15:tä ja Proteaasi 5:tä lukuun ottamatta (kuvat 7, 8 ja 9). Nollanäytteen tyrosiinipitoisuus (4,3 mg/g proteiinia) laski inaktiivoinnin aikana 1,6 mg/g proteiinia. Jatkoon valittujen entsyymien tutkimuksissa käytetyt entsyymipitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat, laatuarvosanat ja sanalliset arviot näytteistä ovat liitteessä 1.



Kuva 7. Näytteiden tyrosiinipitoisuudet ajan funktiona entsyymeillä Proteaasi 12 (0,0009 %), Proteaasi 21 (0,00001 %), Proteaasi 17 (0,0002 %), Proteaasi 1 (0,001 %) ja Proteaasi 2 (0,0001 %).



Kuva 8. Näytteiden tyrosiinipitoisuudet ajan funktiona entsyymeillä Proteaasi 3 (0,001 %), Proteaasi 25 (0,0001 %), Proteaasi 15 (0,01 %), Proteaasi 5 (0,0165 %) ja Proteaasi 10 (0,0001 %).



Kuva 9. Näytteiden tyrosiinipitoisuudet ajan funktiona entsyymeillä Proteaasi 8 (0,001 %), Proteaasi 4 (0,0033 %), Proteaasi 7 (0,0916 %) ja Proteaasi 6 (0,0033 %).

Tyrosiinipitoisuus laskettiin kaavalla:

$$q = (((A * k) + b) * L) - q_0$$

q	on	näytteen tyrosiinipitoisuus (mg/g proteiinia)
A		absorbanssi
k		standardisuoran kulmakerroin
b		y-akselin leikkauspiste
L		laimennoskerroin
q <sub>0</sub>		nollanäytteen tyrosiinipitoisuus (mg/g proteiinia)

Hydrolysaateista pyrittiin määrittämään hydrolyysiaste (%) vertaamalla näytteiden tyrosiinipitoisuuksia happohydrolysoidun maitonäytteen tyrosiinipitoisuuteen. Määrittämisessä oli ongelmana Folin-Ciocalteu-reagenssin reaktiot suolahapon Cl<sup>-</sup>-ionien kanssa, mikä saattoi vääristää tuloksia. Määrittämisessä väriainetta muodostavat aminohapot ovat tyrosiinin lisäksi tryptofaani ja pienemmässä määrin systiini, systeini sekä histidiini. (Peterson 1979.) Happohydrolyysiä voisi kokeilla myös rikki- tai typpihapolla.

Proteaasi 11:sta (1 p-%) tutkittiin näytteiden tyrosiinipitoisuuksien keskihajontaa eri hydrolyysiajoilla (taulukko 15).

*Taulukko 15. Proteaasi 11 (1 p-%) hydrolyysinäytteiden tyrosiinipitoisuuksia ajan funktiona ja niistä lasketut keskihajonnat.*

hydrolyysiaika (h)	0	2	3
tyrosiinipitoisuus (mg/g proteiinia)	2,1	67,5	68,0
	2,3	65,2	66,9
	2,4	64,1	71,2
	2,4	70,3	70,5
		70,3	69,9
		66,9	68,4
		62,0	67,5
		58,3	68,6
		59,2	68,6
		68,4	69,7
keskihajonta (mg/g proteiinia)	0,2	4,3	1,4

Kahden tunnin hydrolysaatin keskihajonta (4,3 mg/g proteiinia) vaikutti suurelta. Mittauksessa on voinut aiheuttaa virhettä näytteen aggregoituminen ja saostuminen, mikä teki näytteestä epähomogeenisen. Keskihajonnat olisivat todennäköisesti olleet selvästi pienempiä, jos ne olisi määritetty hydrolysaateista, joiden tyrosiipitoisuudet olivat useimilla proteaaseilla tasolla 20 mg/g proteiinia.

Tyrosiinipitoisuuden mittaustuloksissa aiheutti eniten virhettä näytteenoton tarkkuus, johon vaikutti näytteen homogeenisuus. Saostunut näyte saattoi tukkia pipetinkärjen. Kolmella rinnakkaisnäytteen keskiarvolla sai tutkimusten kannalta tarkkoja arvoja.

### **Pilkkoutuneiden proteiinien kokojakauma hydrolysaatissa**

Geelielektroforesimenetelmässä hydrolyysin ensimmäisen (0,5 tuntia) ja viimeisen näytteen (2–4 tuntia) välillä tarkkailtiin proteiiniviivojen muutoksia, joita verrattiin nollanäytteen viivoihin. Standardinäytteen viivoja voitiin käyttää hyväksi tarkasteltaessa proteiinien ja peptidien molekyylikokoa (kDa). Tuloksissa toivottiin erityisesti kaseiinin,  $\beta$ -laktoglobuliinin ( $\beta$ -Lg) ja  $\alpha$ -laktalbumiinin ( $\alpha$ -La) proteiiniviivojen haalistumista tai poistumista kokonaan geeliltä. Liitteissä 2 ja 3 ovat tutkimuksessa tehdyt elektroforesigeelit.

### Proteaasi 3

Entsyymeistä lupaavimmalta vaikutti Proteaasi 3. Näytteiden laatu pysyi kaikilla käy-  
tyillä pitoisuuksilla vähintään laatuarvosanan 3 tasoisena (taulukko 16).

*Taulukko 16. Proteaasi 3:n tutkimuksissa käytettyjä pitoisuuksia, näytteiden hydro-  
lyysiaikoja, arvosanat laadusta ja sanalliset arviot.*

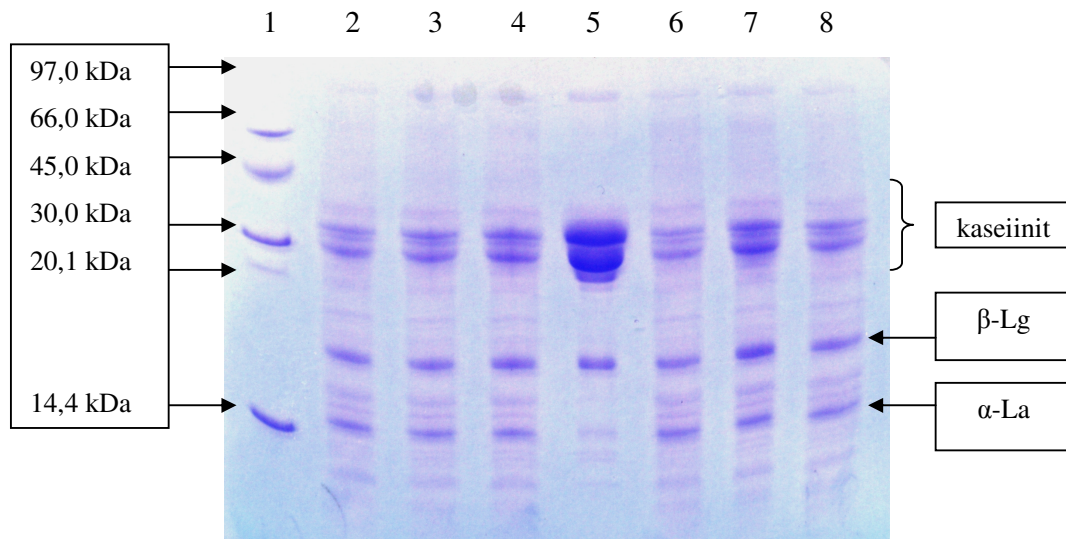
entsyymi (pitoisuus maidosta)	aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
Proteaasi 3			
0,001 %	0,5	4	
	4	4	
0,01 %	0,5	4	
	4	3	hieman kitkerä
0,02 %	0,5	3	hieman kitkerä
	4	3	hieman kitkerä
0,0133 %	0,5	4	
	4	4	
0,0166 %	0,5	4	
	4	4	
0,0185 %	0,5	4	
	4	4	
0,019 %	0,5	3	lämpökäsitellyn makuinen, hieman paksua
	4	3–4	lämpökäsitellyn makuinen
0,0195 %	0,5	3	hieman suolainen
	4	3	hieman kirpeä

Pitoisuuksilla 0,019 % ja 0,0195 % valmistettujen näytteiden geelielektroforeesitulok-  
sista havaittiin kaseiinien pilkkoutuneen merkittävästi. Sen sijaan  $\beta$ -Lg pysyi prote-  
iini viivojen perusteella muuttumattomana nollanäytteeseen verrattuna ja  $\alpha$ -La:n mole-  
kyylirikkoalueelle vaikutti muodostuneen proteiineja. (Taulukko 17 ja kuva 10.)



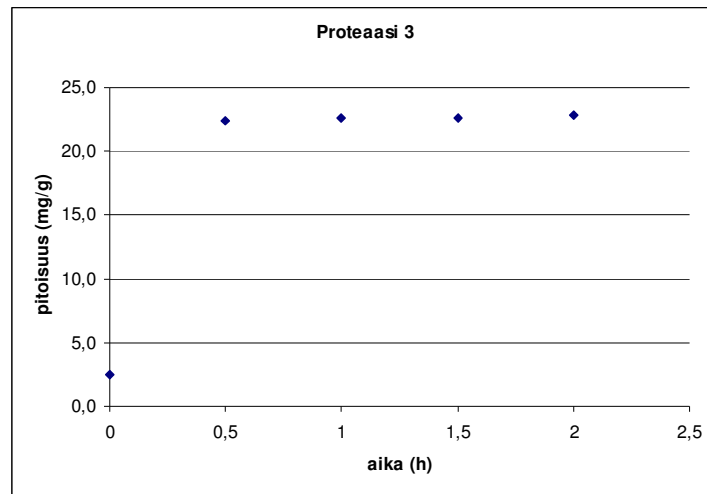
Taulukko 17. Proteaasi 3 pitoisuudet ja näytteiden hydrolyysiajat, jotka viittaavat kuvan 10 elektroforeesigeeliin.

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 3	0,0195	0,5
3	Proteaasi 3	0,0195	2
4	Proteaasi 3	0,0195	4
5	0		
6	Proteaasi 3	0,019	0,5
7	Proteaasi 3	0,019	4
8	Proteaasi 3	0,019	2



Kuva 10. Elektroforeesilla valmistettu Homogeneous 20-geeli Proteaasi 3:n hydrolysaateista taulukon 17 pitoisuuksilla. Geelin oikealla puolella on nimetty tutkimusten kannalta seuratuimmat proteiiniviivat. Yläpuolella on näytepaikkojen numerot 1–8. Geelin vasemmalla puolella on standardinäytteen proteiiniviivojen molekyylikoot.

Tyrosiinipitoisuudet Proteaasi 3:lla olivat muiden jatkossa olleiden entsyymien tasolla (noin 20 mg/g proteiinia) entsyymipitoisuudella 0,001 % (kuva 8). Entsyymipitoisuudella 0,019 % päästiin tyrosiinipitoisuuksissa korkeammalle noin 22,5 mg/g proteiinia (kuva 11).



Kuva 11. Näytteen tyrosiinipitoisuus ajan funktiona Proteaasi 3:n pitoisuudella 0,019 %.

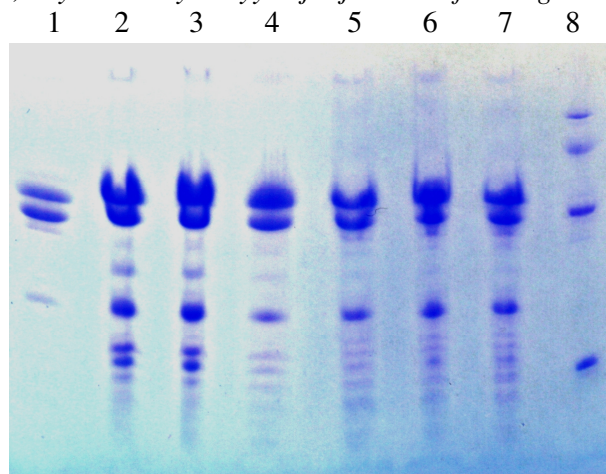
Työssä tutkittiin myös maidon esilämpökäsittelyn (85 °C, 15 sekuntia) vaikutusta hydrolysaattiin ennen entsyymien lisäystä. Tarkoituksena oli denaturoida heraproteiineista erityisesti  $\beta$ -Lg ja siten saada proteiinit herkemmiiksi entsyymien vaikutuksille. Esilämpökäsittely tehtiin mikroaaltouunissa. Proteaasi 3:n pitoisuus oli 0,019 %. Näyte geeliiytyi jo puolessa tunnissa ja saostui kolmessa tunnissa. Tutkimuksia jatkettiin ilman esilämpökäsittelyä.

### Proteaasi 12

Näyte saostui Proteaasi 12:n pitoisuudella 0,0009 % kolmessa tunnissa eivätkä geelin perusteella proteiinit pilkkoutuneet merkittävästi neljässä tunnissa. Näyte oli kitkerä 1,5 tunnin jälkeen. (Taulukko 18 ja liite 1.)

Taulukko 18. Proteaasi 12:n pitoisuus, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	0		
2	Proteaasi 12	0,0009	4
3	Proteaasi 12	0,0009	1,5
4	Proteaasi 12	0,0009	0,5
5			
6			
7			
8	standardi		

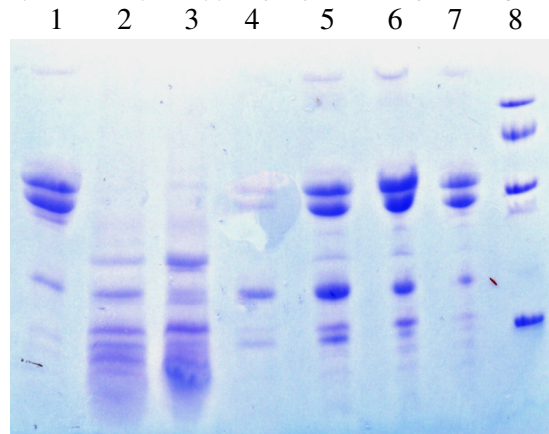


### Proteaasi 21

Näyte saostui Proteaasi 21:n pitoisuudella 0,00001 % kahdessa tunnissa eikä entsyymi hydrolysoinut proteiineja merkittävästi (taulukko 19 ja liite 1).

*Taulukko 19. Proteaasi 21:n pitoisuus, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	0		
2			
3			
4			
5	Proteaasi 21	0,00001	3
6	Proteaasi 21	0,00001	1,5
7	Proteaasi 21	0,00001	0,5
8	standardi		

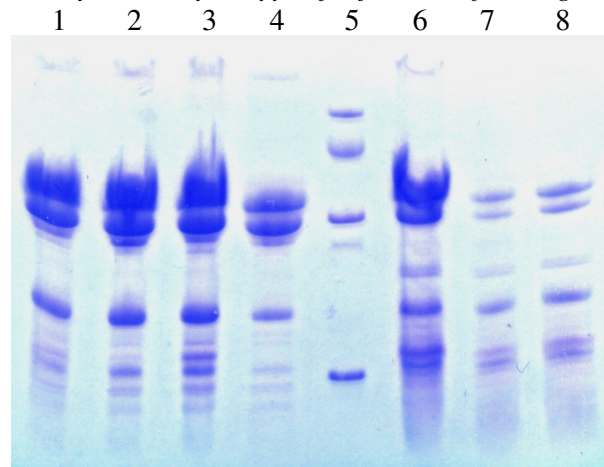


### Proteaasi 17

Proteaasi 17 saosti näytteen pitoisuudella 0,001 % puolessa tunnissa. Se ei pilkkonut proteiineja merkittävästi neljän tunnin aikana. Puolen tunnin näyte oli suutuntumaltaan hiekkainen ja maultaan kitkerä. (Taulukko 20 ja liite 1.)

*Taulukko 20. Proteaasi 17:n pitoisuus, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1			
2			
3			
4	0		
5	standardi		
6	Proteaasi 17	0,001	0,5
7	Proteaasi 17	0,001	4
8	Proteaasi 17	0,001	2



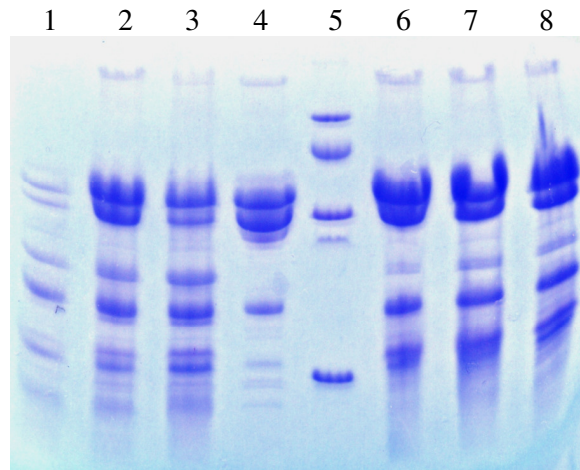
### Proteaasi 15 ja Proteaasi 25

Proteaasi 15:n hydrolysaattien tyrosiinipitoisuus oli muita entsyymejä korkeampi. Se kuitenkin karsittiin, koska näyte saostui tunnin aikana pitoisuudella 0,001 %. Entsyymi ei hydrolysoinut proteiineja merkittävästi neljän tunnin aikana. (Taulukko 21 ja liite 1.)

Proteaasi 25 saosti maidon paksun juoksevaksi kahdessa tunnissa pitoisuudella 0,001 %. Se ei vaikuttanut pilkkovan proteiineja merkittävästi neljän tunnin aikana. (Taulukko 21 ja liite 1.)

*Taulukko 21. Proteaasi 15:n ja Proteaasi 25:n pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	Proteaasi 15	0,001	2
2	Proteaasi 15	0,001	0,5
3	Proteaasi 15	0,001	4
4	0		
5	standardi		
6	Proteaasi 25	0,001	0,5
7	Proteaasi 25	0,001	4
8	Proteaasi 25	0,001	2



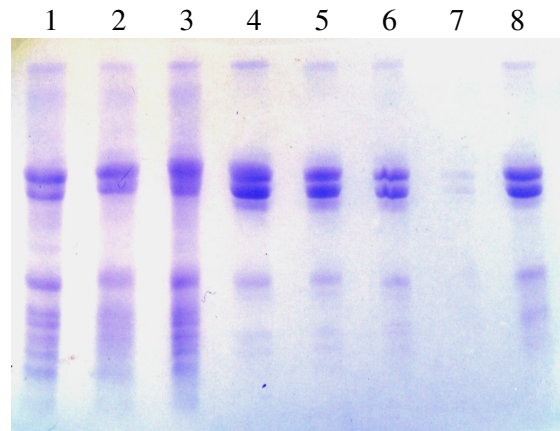
### Proteaaasi 6 ja Proteaaasi 7

Proteaaasi 6 saosti näytteen puolessa tunnissa pitoisuudella 0,01 %, eikä pilkkoutumista tapahtunut merkittävästi neljän tunnin aikana. Puolen tunnin näyte oli suutuntumaltaan hiekaista ja rakenteeltaan paksua. (Taulukko 22 ja liite 1.)

Näyte saostui Proteaaasi 7:llä paksun juoksevaksi kolmessa tunnissa. Se ei pilkkonut merkittävästi proteiineja neljässä tunnissa pitoisuudella 0,2 %. Maultaan kahden tunnin näyte oli kitkerä. (Taulukko 22 ja liite 1.)

*Taulukko 22. Proteaaasi 6:n ja Proteaaasi 7:n pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	Proteaaasi 6	0,01	2
2	Proteaaasi 6	0,01	4
3	Proteaaasi 6	0,01	0,5
4	0		
5	0		
6	Proteaaasi 7	0,2	4
7	Proteaaasi 7	0,2	0,5
8	Proteaaasi 7	0,2	2

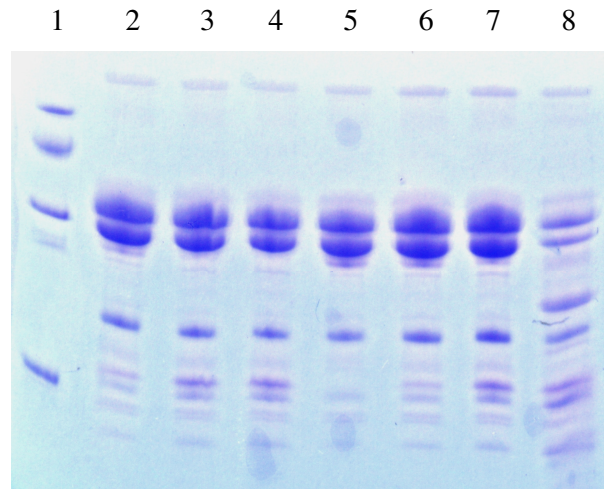


### Proteaaasi 1

Maito saostui Proteaasi 1:n pitoisuudella 0,00035 % kolmen tunnin aikana eikä entsyymi pilkkonut proteiineja nollanäytteeseen verrattuna merkittävästi. Näyte oli suutuntumaltaan hiekkainen ja rakenteeltaan paksua. (Taulukko 23 ja liite 1.)

*Taulukko 23. Proteaasi 1:n pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 1	0,00035	0,5
3	Proteaasi 1	0,00035	2
4	Proteaasi 1	0,00035	4
5	0		
6	Proteaasi 1	0,00025	0,5
7	Proteaasi 1	0,00025	2
8			

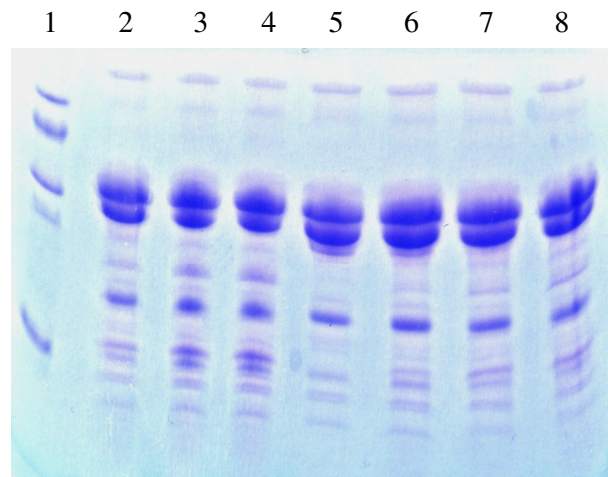


### Proteaasi 4

Näyte saostui Proteaasi 4:llä geelimäiseksi pitoisuudella 0,0066 % kahdessa tunnissa. Proteiinivivoissa ei ollut merkittävää eroa nollanäytteeseen verrattuna neljän tunnin jälkeenkään. (Taulukko 24 ja liite 1.)

*Taulukko 24. Proteaasi 4:n pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 4	0,0066	0,5
3	Proteaasi 4	0,0066	2
4	Proteaasi 4	0,0066	4
5	0		
6	Proteaasi 4	0,0033	0,5
7	Proteaasi 4	0,0033	2
8	Proteaasi 4	0,0033	4

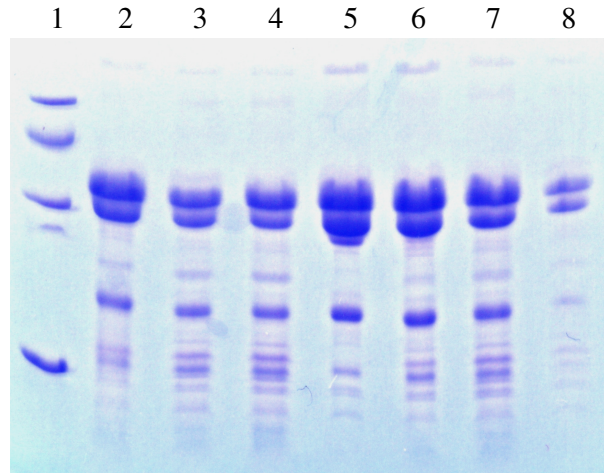


### Proteaasi 2

Näyte saostui geelimäiseksi kahdessa tunnissa Proteaasi 2:n pitoisuudella 0,002 %. Proteiinit eivät pilkkoutuneet merkittävästi neljässä tunnissa. Maku oli kuitenkin hyvä puolen tunnin ja tunnin hydrolyysinäytteissä. (Taulukko 25 ja liite 1.)

*Taulukko 25. Proteaasi 2:n pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 2	0,002	0,5
3	Proteaasi 2	0,002	2
4	Proteaasi 2	0,002	4
5	0		
6	Proteaasi 2	0,0013	0,5
7	Proteaasi 2	0,0013	4
8	Proteaasi 2	0,0013	2

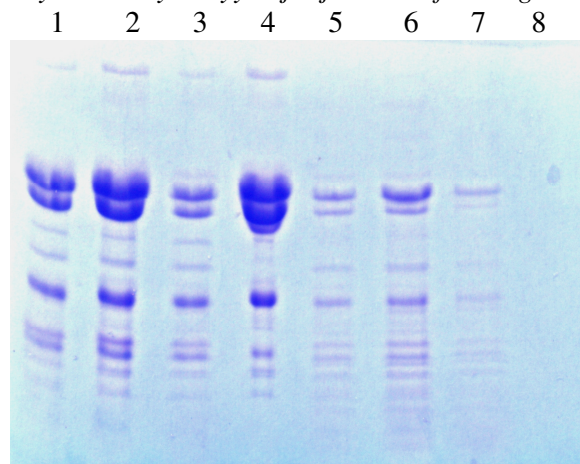


### Proteaasi 8

Maito saostui geelimäiseksi tunnissa Proteaasi 8:n pitoisuudella 0,001 %. Laatu pysyy kuitenkin hyvänä puolen tunnin aikana. Entsyymi vaikutti pilkkovan kaseiineja hyvin ja jonkin verran myös  $\beta$ -Lg:a neljän tunnin aikana, mutta laatu meni huonoksi liian nopeasti. (Taulukko 26 ja liite 1.)

*Taulukko 26. Proteaasi 8:n pitoisuus, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1	Proteaasi 8	0,001	2
2	Proteaasi 8	0,001	0,5
3	Proteaasi 8	0,001	4
4	0		
5			
6			
7			
8			

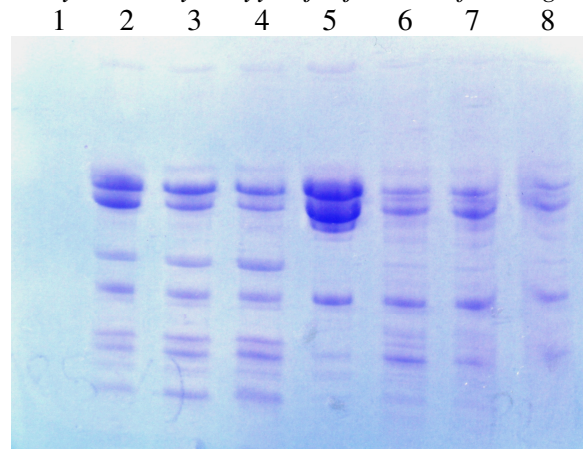


### Proteaasi 5

Proteaasi 5:llä päästiin muihin verrattuna korkeisiin tyrosiinipitoisuuksiin, mutta näyte saostui pitoisuudella 0,002 % kahdessa tunnissa ja suutuntuma oli hiekkainen tunnin näytteessä. Puolen tunnin näytteessä proteiiniviivat olivat selvästi haalistuneet kaseiini-en kohdalla.  $\alpha$ -La:n molekyylikokoalueen proteiiniviivat vahvistuivat. Näytteen laatu meni huonoksi liian nopeasti. (Taulukko 27 ja liite 1.)

Taulukko 27. Proteaasi 5:n pitoisuus, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1			
2	Proteaasi 5	0,002	0,5
3	Proteaasi 5	0,002	2
4	Proteaasi 5	0,002	4
5	0		
6			
7			
8			

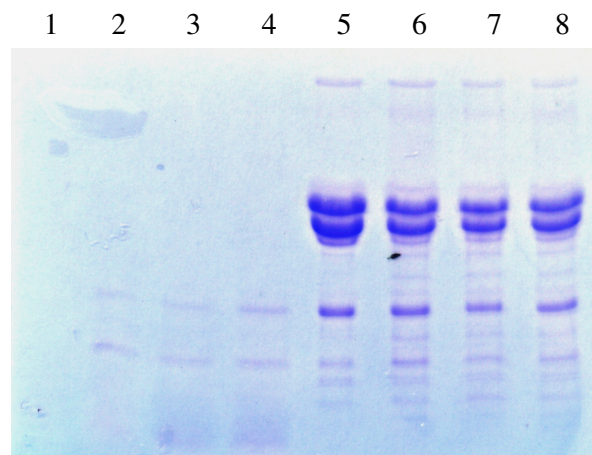


### Proteaasi 10

Proteaasi 10 hydrolysoi hyvin kaikkia proteiineja. Proteaasi 3 tuotetaan samasta organismista ja on nestemäistä, joten se valittiin jatkoon helpomman käytettävyyden perusteella. Proteaasi 10 oli jauheena veteen niukkaliukoinen, joten siitä oli vaikea tehdä sopivia laimennoksia entsyymiä annosteltaessa. Proteaasi 10:n pitoisuudella 0,001 % jäljelle jääneet haaleat proteiiniviivat olivat  $\beta$ -Lg:a ja  $\alpha$ -La:a, joita entsyymi ei pilkkonut kokonaan. Näyte saostui kuultavaksi jo puolessa tunnissa. (Taulukko 28 ja liite 1.)

Taulukko 28. Proteaasi 10:n pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat ja elektroforeesigeeli.

paikka	entsyymi	pitoisuus (%)	aika (h)
1			
2	Proteaasi 10	0,01	0,5
3	Proteaasi 10	0,01	2
4	Proteaasi 10	0,01	4
5	0		
6	Proteaasi 10	0,001	0,5
7	Proteaasi 10	0,001	4
8	Proteaasi 10	0,001	2





Proteiiniviivojen erottuvuudessa oli samoista kehitys- ja erotusliuoksista huolimatta paljon eroja. Tulokset arvioitiin silmämääräisesti. Eniten virheitä elektroforeesissa aiheutti näytekamman asettamisen vaikeus. Taulukossa 29 on yksittäisten entsyymien tulokset tiivistettynä.

*Taulukko 29. Yksittäisten entsyymien tulokset tiivistettynä.*

entsyymi	tyrosiini (mg/g prot.)	hydrolyysin vaikutukset maitoon
Proteaasi 3	22,5	pilkkoï kaseiineja säilyttäen laadun hyvänä
Proteaasi 12	20	ei pilkkonut merkittävästi, maku kitkerä
Proteaasi 21	20	ei pilkkonut merkittävästi, näyte saostui
Proteaasi 17	20	pilkkoï kaseiineja, suutuntuma hiekkainen, maku kitkerä
Proteaasi 15	45	pilkkoï jonkin verran kaseiineja, näyte saostui
Proteaasi 25	20	ei pilkkonut merkittävästi, näyte saostui
Proteaasi 6	20	ei pilkkonut merkittävästi, suutuntuma hiekkainen, rakenne paksua
Proteaasi 7	20	ei pilkkonut merkittävästi, maku kitkerä
Proteaasi 1	20	ei pilkkonut merkittävästi, suutuntuma hiekkainen, rakenne paksua
Proteaasi 4	20	ei pilkkonut merkittävästi, näyte saostui
Proteaasi 2	20	pilkkoï jonkin verran kaseiineja, näyte saostui
Proteaasi 8	20	pilkkoï kaseiineja ja jonkin verran $\beta$ -Lg:a, näyte saostui
Proteaasi 5	40	pilkkoï kaseiineja, näyte saostui
Proteaasi 10	20	pilkkoï kaikkia proteiineja, näyte saostui

## 7.2 Hydrolyysi entsyymiyhdistelmillä

Jatkotutkimuksissa pyrittiin löytämään entsyymiyhdistelmä, jossa Proteaasi 3:n sekaan lisätty entsyymi pilkkoi heraproteiineista erityisesti  $\beta$ -Lg:a. Näytteen aistinvaraisen laadun oli lisäksi säilyttävä hyvänä vähintään kaksi tuntia, sillä tuotantomittakaavan prosesseissa lämpökäsittelyjä ei voida toteuttaa nopeasti suurelle maitomäärälle. Lisäentsyymien käytössä oli huomioitava mahdollinen nopeampi saostuminen tai muu laadun huononeminen alhaisemmilla entsyymipitoisuuksilla verrattuna yksittäisiin entsyymeihin. Yhdistelmissä käytettiin ensimmäisenä lisättynä entsyyminä Proteaasi 3:a pitoisuudella 0,019 %. Elektroforeesiin otettiin vertailunäytteeksi myös Proteaasi 3:n pitoisuudella 0,019 % valmistettu näyte. Geeleillä verrattiin yhdistelmien hydrolysaateista erottuvia proteiiniviivoja Proteaasi 3:n hydrolysaattien viivoihin. Hydrolyysiaika oli kaksi tuntia, koska jo puolessa tunnissa Proteaasi 3:lla tapahtui laajin mahdollinen proteiinin pilkkoutuminen.

### **7.2.1 Entsyymiyhdistelmien arviointi hydrolysaatin aistinvaraisen laadun, hydrolyysiasteen ja geielektroforeesin perusteella**

Entsyymiyhdistelmien tutkiminen aloitettiin kokeilemalla Proteaasi 3:n kanssa entsyymejä Proteaasi 5, Proteaasi 7, Proteaasi 4 ja Proteaasi 8. Yhdistelmillä tutkittiin aluksi entsyymien lisäyshetken vaikutusta hydrolyysiin. Toinen entsyymi lisättiin, kun Proteaasi 3:lla oli hydrolysoitu tunnin ajan. Vertailunäytteenä käytettiin samaa yhdistelmää samoilla pitoisuuksilla, mutta entsyymit lisättiin yhtä aikaa. Elektroforeesin perusteella lisäyshetkellä ei ollut merkitystä. (Liite 3.) Jatkossa hydrolyysin kesto oli kaksi tuntia ja entsyymit lisättiin samaan aikaan.

Hydrolyysiaste mitattiin entsyymiyhdistelmistä, jotka pääsivät jatkoon hydrolysaattien aistinvaraisen laadun ja elektroforeesin perusteella. Tyrosiinipitoisuuskuvaajat on tehty entsyymiyhdistelmä kerrallaan (kuvat 12, 13, 14, 15 ja 16). Kaikilla entsyymipitoisuuksilla ja yhdistelmillä tapahtui hieman tyrosiinipitoisuuden nousua (noin 2,5 mg/g proteiinia) verrattuna Proteaasi 3:n pitoisuudella 0,019 % valmistetun hydrolysaatin tyrosiinipitoisuuteen.

### Proteaasi 3 ja Proteaasi 5

Proteaasi 5 valittiin yhdistelmiin, koska se pilkkoi hyvin kaseiineja pitoisuudella 0,002 % ja näytteen laatu pysyi hyvänä puoli tuntia. Lisäksi  $\beta$ -Lg:n proteiiniviivat haalistuivat selvästi pitoisuudella 0,005 %. (Taulukko 27 ja liitteet 1–2.) Yhdistelmässä entsyymi ei hydrolysoinut pitoisuudella 0,001 % pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin. Näytteen maku oli hieman kitkerä. (Taulukot 30 ja 31.)

*Taulukko 30. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 5 pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat, laatuarvosanat ja sanalliset arviot laadusta.*

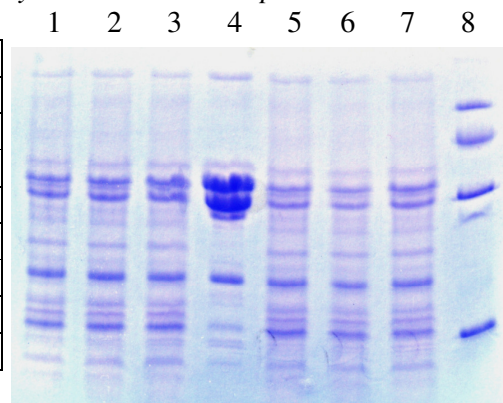
lyhenne	Proteaasi 3 + Proteaasi 5 pitoisuudet (p-%)	aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
E1	0,019 + 0,001	0,5	2	hieman kitkerä
		4	2	hieman kitkerä
E2	0,019 + <sup>1</sup> 0,001	1,5	2	hieman kitkerä
		4	2	hieman kitkerä

<sup>1</sup> = entsyymi lisätty tunnin hydrolyysin jälkeen

*Taulukko 31. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 5 pitoisuudet ja näytteiden hydrolyysiajat, kun verrattiin lisäyshetken vaikutusta proteiiniviivoihin.*

paikka	entsyymit	pitoisuudet (p-%)	aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + <sup>1</sup> 0,001	2
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + <sup>1</sup> 0,001	1,5
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + <sup>1</sup> 0,001	4
4	0		
5	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + 0,001	0,5
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + 0,001	2
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + 0,001	4
8	standardi		

<sup>1</sup> = entsyymi lisätty tunnin hydrolyysin jälkeen



### Proteaasi 3 ja Proteaasi 7

Proteaasi 7:llä oli saatu hyviä tuloksia muissa tutkimuksissa. Yhdistelmässä entsyymi ei pilkkonut pitoisuudella 0,09 % pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin. Näytteen maku oli kitkerä. (Taulukot 32 ja 33.)

*Taulukko 32. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 7 pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat, laatuarvosanat ja sanalliset arviot laadusta.*

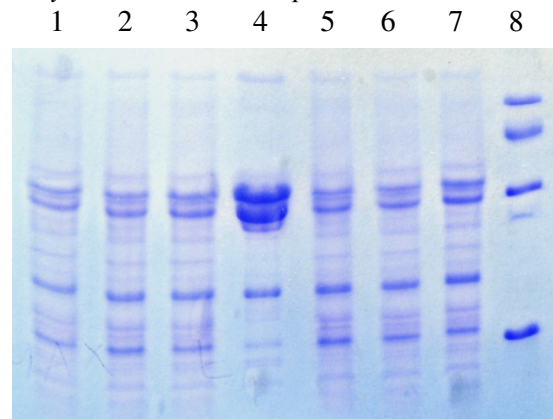
lyhenne	Proteaasi 3 + Proteaasi 7 pitoisuudet (p-%)	aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
E1	0,019 + 0,09	0,5	2	kitkerä
		4	2	kitkerä
E2	0,019 + <sup>1</sup> 0,09	1,5	2	kitkerä
		4	2	kitkerä

<sup>1</sup> = entsyymi lisätty tunnin hydrolyysin jälkeen

*Taulukko 33. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 7 pitoisuudet ja näytteiden hydrolyysiajat, kun verrattiin lisäyshetken vaikutusta proteiiniviivoihin.*

paikka	entsyymit	pitoisuudet	aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + <sup>1</sup> 0,09	2
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + <sup>1</sup> 0,09	1,5
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + <sup>1</sup> 0,09	4
4	0		
5	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + 0,09	0,5
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + 0,09	2
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + 0,09	4
8	standardi		

<sup>1</sup> = entsyymi lisätty tunnin hydrolyysin jälkeen



### Proteaasi 3 ja Proteaasi 4

Proteaasi 4:n toiminnasta oli kokemusta erilaisissa tutkimuksissa. Entsyymi pilkkoi maidon proteiineista muun muassa  $\kappa$ -kaseiinia pitoisuudella 0,0066 % (taulukko 24).

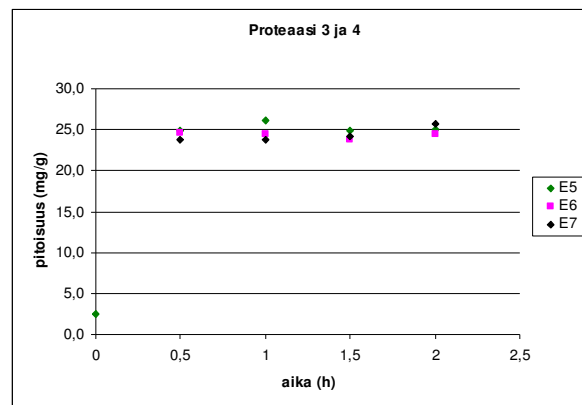
Yhdistelmää tutkittiin useilla eri pitoisuuksilla (taulukko 34).

Taulukko 34. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 4 pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat, laatuarvosanat ja sanalliset arviot laadusta.

lyhenne	Proteaasi 3 + Proteaasi 4 pitoisuudet (p-%)	aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
E1	0,019 + 0,003	0,5	2	kitkerä
		4	2	kitkerä, paksu rakenne
E2	0,019 + <sup>1</sup> 0,003	1,5	2	kitkerä
		4	1	erittäin kitkerä, tarttuu reunoille
E3	0,019 + 0,007	0,5	0	saostunut
		2	0	geelimäisen jähmeä
E4	0,019 + 0,012	0,5	0	geelimäisen jähmeä
		2	0	saostunut pohjalle, kuultava
E5	0,019 + 0,004	0,5	4	
		2	4	
E6	0,019 + 0,005	0,5	4	
		1	0	saostunut
		2	0	lähes jähmeä
E7	0,019 + 0,0045	0,5	3	poikkeava
		2	3	poikkeava

<sup>1</sup> = entsyymi lisätty tunnin hydrolyysin jälkeen

Yhdistelmästä määritettiin hydrolyysiastetta kolmella eri entsyymipitoisuudella (kuva 12). Tyrosiinipitoisuudet olivat noin 25 mg/g proteiinia.



Kuva 12. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 4 tyrosiinipitoisuuksia ajan funktiona kolmella eri pitoisuusyhdistelmällä. Lyhenteiden (E5, E6, E7) merkitykset ovat taulukossa 34.

Proteiiniviivoissa ei ollut merkittävää eroa pelkällä Proteaasi 3:lla valmistettuun hydrolysaattiin verrattuna. Elektroforeesimääritys tehtiin kolmen eri yhdistelmäpitoisuuden hydrolysaateista. (Taulukko 35.)

Taulukko 35. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 4 pitoisuuksia, näytteiden hydrolyysiaikoja ja elektroforeesigeeli.

paikka	entsyymit	pitoisuudet	aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,004	0,5
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,004	2
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,0045	0,5
4	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,0045	2
5	0		
6	Proteaasi 3	0,019	3
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,005	0,5
8	standardi		

### Proteaasi 3 ja Proteaasi 8

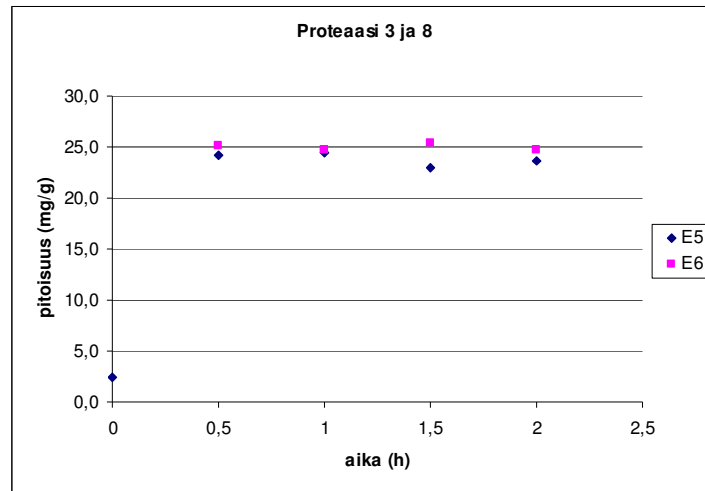
Proteaasi 8 hydrolysoi yksittäisenä hyvin maidon kaseiineja neljässä tunnissa pitoisuudella 0,001 % ja laatu pysyi hyvänä puoli tuntia (taulukko 26 ja liite 1). Yhdistelmissä entsyymiä kokeiltiin useilla eri pitoisuuksilla (taulukko 36).

Taulukko 36. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 8 pitoisuuksia, näytteiden hydrolyysiaikoja ja elektroforeesigeeli.

lyhenne	Proteaasi 3 + Proteaasi 8 pitoisuudet (p-%)	aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
E1	0,019 + 0,0003	0,5	3	vanhan makuinen
		4	3	vanhan makuinen
E2	0,019 + <sup>1</sup> 0,0003	1,5	2	kitkerä
		4	2	kitkerä
E3	0,019 + 0,0004	0,5	4	
		2	4	
E4	0,019 + 0,0005	0,5	4	
		2	4	
E5	0,019 + 0,0007	0,5	3	paksu rakenne
		1	0	saostunut
		2	0	geelimäisen jähmeä
E6	0,019 + 0,006	0,5	4	
		2	4	

<sup>1</sup> = entsyymi lisätty tunnin hydrolyysin jälkeen

Kahdesta pitoisuusyhdistelmästä tehtiin tyrosiinimääritykset, joiden tulokset olivat noin 25 mg tyrosiinia/g proteiinia (kuva 13).



Kuva 13. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 8 tyrosiinipitoisuuksia ajan funktiona kahdella eri pitoisuusyhdistelmällä. Lyhenteiden (E5, E6) merkitykset ovat taulukossa 36.

Yhdistelmällä ei saatu merkittävää muutosta proteiiniviivoihin Proteaasi 3:een verrattuna (taulukko 37).

Taulukko 37. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 8 pitoisuuksia, näytteiden hydrolyysiaikoja ja elektroforeesigeeli.

paikka	entsyymit	pitoisuudet	aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0005	0,5
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0005	2
3	Proteaasi 3	0,019	3
4	0		
5	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0006	0,5
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0006	2
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0007	0,5
8	standardi		

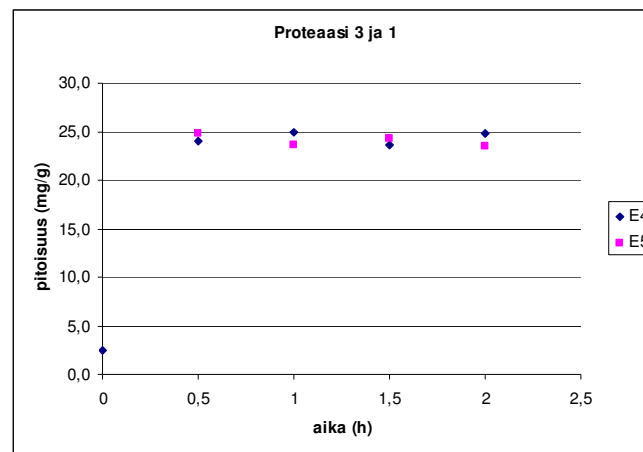
### Proteaasi 3 ja Proteaasi 1

Proteaasi 1:n ajateltiin kitkerän maun vähentäjänä parantavan Proteaasi 3:lla hydrolysoidun näytteen makua. Yhdistelmää tutkittiin viidellä eri Proteaasi 1:n pitoisuudella, joista kolmella saatiin valmistettua laadultaan parempia hydrolysaatteja kuin Proteaasi 3:lla. (Taulukko 38.) Proteaasi 1 saattoi pilkkoa hydrolysaattiin muodostuneita kitkeryyttä aiheuttavia yhdisteitä.

*Taulukko 38. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 1 pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat, laatuarvosanat ja sanalliset arviot laadusta.*

lyhenne	Proteaasi 3 + Proteaasi 1 pitoisuudet (p-%)	aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
E1	0,019 + 0,0004	0,5	5	hiekkainen, hieman kitkerä geelimäisen jähmeä
		1	5	
		1,5	2	
		2	0	
E2	0,019 + 0,0002	0,5	5	
		2	5	
E3	0,019 + 0,0003	0,5	5	
		2	5	
E4	0,019 + 0,00033	0,5	4	
		2	4	
E5	0,019 + 0,00037	0,5	4	saostunut
		2	0	

Kahdella yhdistelmäpitoisuudella (E4 ja E5) hydrolysaattien tyrosiinipitoisuudet olivat muiden yhdistelmien tasolla noin 25 mg/g proteiinia (kuva 14).



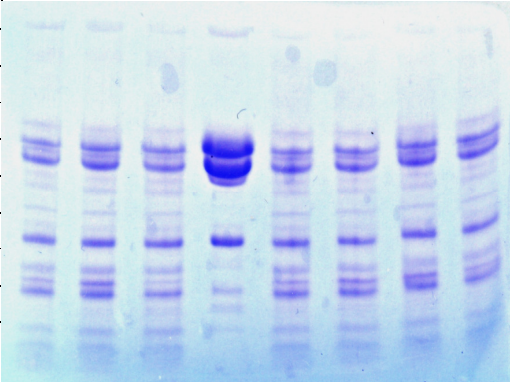
*Kuva 14. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 1 tyrosiinipitoisuuksia ajan funktiona kahdella eri pitoisuusyhdistelmällä. Lyhenteiden (E4, E5) merkitykset ovat taulukossa 38.*



Yhdistelmällä ei saatu hydrolysoitua proteiineja Proteaasi 3:a tehokkaammin (taulukko 39).

*Taulukko 39. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 1 pitoisuuksia, näytteiden hydrolyysiaikoja ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymit	pitoisuudet	aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,0003	0,5
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,0003	2
3	Proteaasi 3	0,019	3
4	0		
5	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,00033	0,5
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,00033	2
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,00037	1,5
8	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,00037	0,5



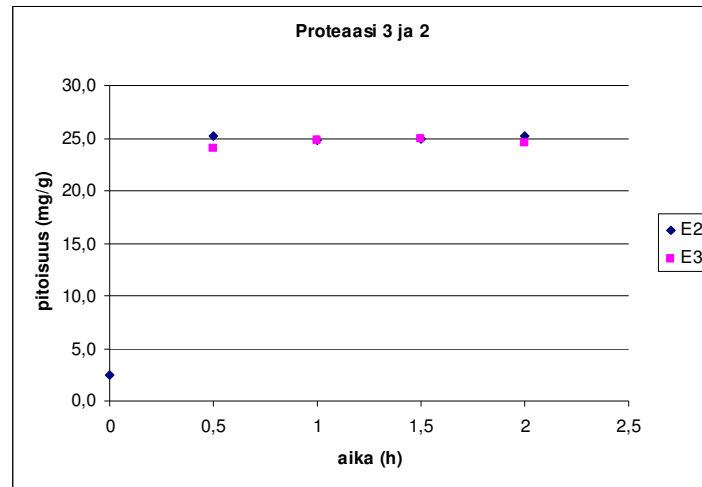
### Proteaasi 3 ja Proteaasi 2

Proteaasi 2 on tuoteselosteen perusteella heran muokkaaja. Entsyymi hydrolysoi pitoisuudella 0,0016 % hyvin kaseiineja (liite 2). Yhdistelmää tutkittiin kolmella eri pitoisuudella, joista kahdella saatiin valmistettua laadultaan parempia hydrolysaatteja kuin pelkällä Proteaasi 3:lla (taulukko 40).

*Taulukko 40. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 2 pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat, laatuarvosanat ja sanalliset arviot laadusta.*

lyhenne	Proteaasi 3 + Proteaasi 2 pitoisuudet (p-%)	aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
E1	0,019 + 0,0016	0,5	4	saostunut geelimäisen jähmeä
		1	0	
		2	0	
E2	0,019 + 0,0013	0,5	5	
		2	5	
E3	0,019 + 0,001	0,5	5	
		2	5	

Tyrosiinimääritykset tehtiin kahden yhdistelmäpitoisuuden hydrolysaateista ja tulokset olivat muiden entsyymiyhdistelmien tasoisia (kuva 15).



Kuva 15. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 2 tyrosiinipitoisuuksia ajan funktiona kahdella eri pitoisuusyhdistelmällä. Lyhenteiden (E2, E3) merkitykset ovat taulukossa 40.

Kolmella yhdistelmäpitoisuudella valmistettujen hydrolysaattien proteiiniivivat eivät muuttuneet merkittävästi Proteaasi 3:een verrattuna (taulukko 41).

Taulukko 41. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 2 pitoisuuksia, näytteiden hydrolyysiaikoja ja elektroforeesigeeli.

paikka	entsyymit	pitoisuudet (p-%)	aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,001	0,5
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,001	2
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,0013	0,5
4	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,0013	1,5
5	0		
6	Proteaasi 3	0,019	3
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,0016	0,5
8	standardi		

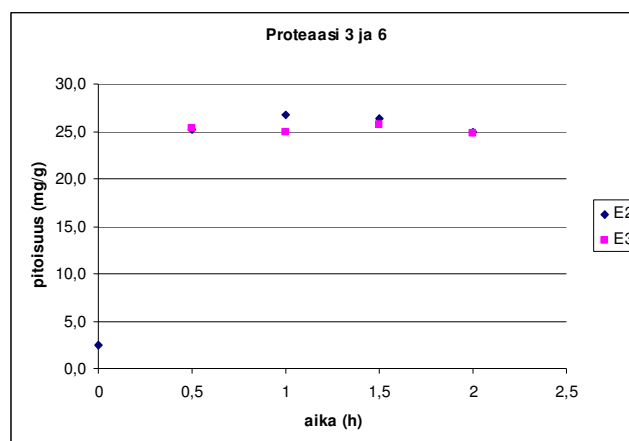
### Proteaasi 3 ja Proteaasi 6

Proteaasi 6:n pitoisuudella 0,01 %  $\beta$ -Lg vaikutti pilkkoutuvan jonkin verran neljän tunnin aikana (taulukko 22). Näytteen laatu oli kuitenkin arvosanan kaksi tasoinen jo puolessa tunnissa (liite 1). Yhdistelmää tutkittiin kolmella pitoisuusyhdistelmällä, ja lisäentsyymipitoisuudella 0,001 % laatu parani puolentoista tunnin hydrolyysin aikana arvostanasta 0 arvostanaan 4. Lisätutkimuksessa huomattiin näytteen kuitenkin menneen huonolaatuiseksi kahdessa tunnissa. (Taulukko 42.)

Taulukko 42. *Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 6 pitoisuudet, näytteiden hydrolyysiajat, laatuarvosanat ja sanalliset arviot laadusta.*

lyhenne	Proteaasi 3 + Proteaasi 6 pitoisuudet (p-%)	aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
E1	0,019 + 0,004	0,5	0	saostunut pohjalle, sameankuultava
		2	0	saostunut pohjalle, sameankuultava
E2	0,019 + 0,001	0,5	0	saostunut
		2	0	saostunut
E3	0,019 + 0,0015	0,5	0	geelimäisen jähmeä
		2	2	paksua, hiekkamainen, maku hyvä

Kahdella yhdistelmäpitoisuudella määritettiin näytteistä lisäksi tyrosiinipitoisuudet, jotka olivat muiden yhdistelmien tasolla (kuva 16).



Kuva 16. *Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 6 tyrosiinipitoisuuksia ajan funktiona kahdella eri pitoisuusyhdistelmällä. Lyhenteiden (E2, E3) merkitykset ovat taulukossa 42.*

Lisäentsyymipitoisuudella 0,001 % proteiiniviivat haalistuivat pelkällä Proteaasi 3:lla hydrolysoitua näytteeseen verrattuna. Proteaasi 6:n pitoisuudella 0,0015 % prote-

iiniviivat olivat lähes samanlaiset Proteaasi 3:een verrattuna, vaikka entsyymipitoisuus oli edellistä suurempi. (Taulukko 43.)

*Taulukko 43. Entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 6 pitoisuuksia, näytteiden hydrolyysiaikoja ja elektroforeesigeeli.*

paikka	entsyymit	pitoisuudet	aika (h)
1			
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 6	0,019 + 0,001	0,5
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 6	0,019 + 0,001	1,5
4	Proteaasi 3 + Proteaasi 6	0,019 + 0,001	2
5	0		
6	Proteaasi 3	0,019	3
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 6	0,019 + 0,0015	2
8	standardi		

Erotusvaihe tai värjäys saattoi aiheuttaa virhettä geelissä. Proteaasi 3:n ja Proteaasi 6:n yhdistelmällä voisi tehdä tutkimuksia näytteen laadun muutoksista sekä proteiinien pilkkoutumisesta pitoisuuksilla, jotka ovat lähellä tutkittuja. Toistokokeilla varmistettaisiin yhdistelmän tehokkuus.

Maitoproteiinit eivät pilkkoutuneet millään entsyymiyhdistelmällä merkittävästi pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin. Joillakin yhdistelmillä pystyttiin kuitenkin vaikuttamaan näytteen laadun parantumiseen. Taulukossa 44 on entsyymiyhdistelmien tulokset tiivistettynä.

*Taulukko 44. Entsyymiyhdistelmien tulokset tiivistettynä.*

entsyymiyhdistelmät	tyrosiini (mg/g prot.)	hydrolyysin vaikutukset maitoon
Proteaasi 3 ja Proteaasi 5	25	ei pilkkonut pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin, maku hieman kitkerä
Proteaasi 3 ja Proteaasi 7	25	ei pilkkonut pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin, maku kitkerä
Proteaasi 3 ja Proteaasi 4	25	ei pilkkonut pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin
Proteaasi 3 ja Proteaasi 8	25	ei pilkkonut pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin
Proteaasi 3 ja Proteaasi 1	25	ei pilkkonut pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin, saatiin laadultaan parempia hydrolyysaatteja
Proteaasi 3 ja Proteaasi 2	25	ei pilkkonut pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaammin, saatiin laadultaan parempia hydrolyysaatteja
Proteaasi 3 ja Proteaasi 6	25	pilkkoi hieman Proteaasi 3:a enemmän proteiineja

## 7.2.2 Mittakaavan kasvattaminen

Kahta entsyymiyhdistelmää tutkittiin myös suuremmissa mittakaavassa (500 cm<sup>3</sup>). Tarkoituksena oli tutkia, erosiko suuremmissa mittakaavassa valmistettujen hydrolysaattien laatu pieneen mittakaavaan verrattuna. Inaktivointi tehtiin nopeamman lämpötilanousun saavuttamiseksi ensin mikroaaltouunissa, minkä jälkeen näyte siirrettiin lämpöhautteeseen. Proteaasi 4 valittiin tutkimuksiin sen halvan hinnan, tunnettuuden ja helpon käytettävyyden takia. Entsyymien nestemäisyyden takia sitä oli helppo käsitellä ja annostella. Proteaasi 3:n ja Proteaasi 1:n yhdistelmällä saatiin valmistettua laadultaan parempia hydrolysaatteja kuin pelkällä Proteaasi 3:lla. Taulukossa 45 on yhdistelmistä käytetyt pitoisuudet, hydrolyysiajat ja laatuarvioinnit.

*Taulukko 45. Suuremmissa mittakaavassa tehtyjen yhdistelmien pitoisuudet, hydrolyysiajat, laatuarvosanat ja sanalliset arviot laadusta.*

entsyymiyhdistelmä	pitoisuudet (p-% maidosta)	<sup>1</sup> aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
Proteaasi 3 ja Proteaasi 4	0,019 + 0,004	0,5	0	saostunut, kellertävä
		2	2	aggregoitunut hiekkaiseksi, maku hieman pistävä
Proteaasi 3 ja Proteaasi 1	0,019 + 0,0003	0,5	0	saostunut
		2	0	saostunut, kellertävä

<sup>1</sup> = hydrolyysiaika entsyymeillä

Näytteiden laatu oli hyvä koeputkimittakaavassa, jossa inaktivointiolosuhteet olivat helpommin hallittavissa – näytteen lämpötila nousee ja laskee nopeasti. Suurempaan mittakaavaan muutetut inaktivointiolosuhteet ja näytteiden käsittelytavat vaikuttivat todennäköisesti eniten laadun selvään huononemiseen. Entsyymipitoisuuksien ollessa näytteen saostumisen rajalla pienetkin muutokset menetelmässä saattoivat aiheuttaa virheitä. Saostuminen olisi voitu ehkä estää lyhytkestoisemmalla entsyymien inaktivoinnilla. Ennen inaktivointiolosuhteiden muuttamista tulisi selvittää, millä lämpötila-aikayhdistelmällä entsyymi menettää aktiivisuutensa.

### 7.3 Näytteiden analysointi partikkelikokoanalysaattorilla

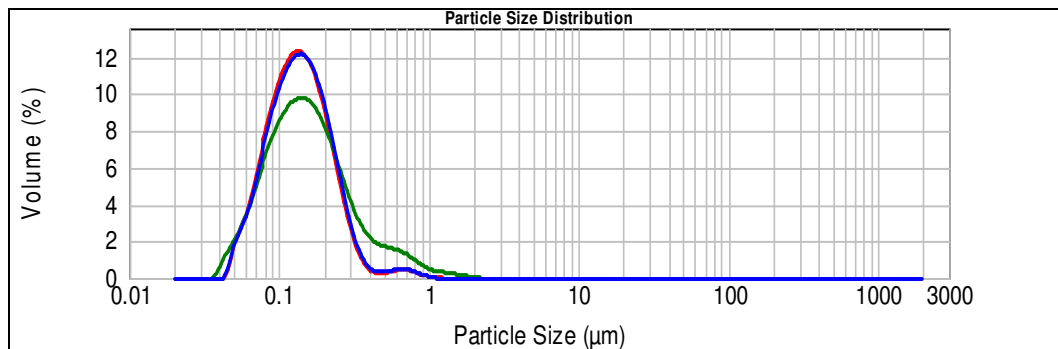
Geelielektroforeesin perusteella kaseiinit olivat selvästi pilkkoutuneita Proteaasi 3:lla valmistetussa näytteessä, minkä oletettiin vaikuttaneen kaseiinimisellien määrään (taulukko 17 ja kuva 10). Misellien vähenemisellä olisi pitänyt olla vaikutusta myös maidon valkoiseen väriin. Maidon valkoisen värin uskotaan johtuvan proteiinirakenteen heijastamasta valosta, joka aistitaan valkoisena värinä. Misellin partikkelikoko on noin 0,15  $\mu\text{m}$ .

Partikkelikokoanalysaattorilla tutkittiin Proteaasi 3:lla valmistetun hydrolysaatin partikkelikokojakaumaa. Mielenkiinnon kohteena oli erityisesti kaseiinimisellien partikkelikokoalue. Toinen näyte oli Proteaasi 3:n ja Proteaasi 4:n entsyymiyhdistelmä pitoisuuksilla 0,019 % ja 0,004 % valmistettu suuremman mittakaavan ( $500 \text{ cm}^3$ ) näyte. Näytteestä tutkittiin, millä tavalla aggregoituminen vaikutti partikkelikokojakaumaan ja kaseiinimisellien määrään. Tulokset on kuvattu tilavuusjakaumina (%), ja niihin on otettu keskiarvo kolmesta eri mittauksesta, jotka sisälsivät neljä rinnakkaismäärittystä. (Kuvat 17 ja 18.) Mittausparametrit ovat taulukossa 46.

*Taulukko 46. Partikkelikokoanalysaattorin mittauksissa käytetyt parametrit ja väliaine.*

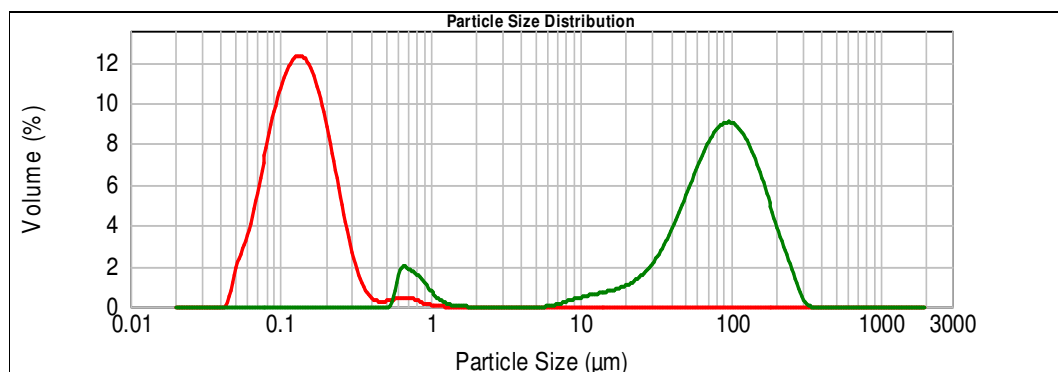
entsyymi (p-% maidosta)	partikkelin taitekerroin	partikkelin absorptio	veden taitekerroin	taustaliuos	obskuraatio [%]
Proteaasi 3 0,019	1,38	0,001	1,33	vesi	6,70
Proteaasi 3 + Proteaasi 4 0,019 + 0,004	1,38	0,001	1,33	vesi	8,03

Proteaasi 3:lla valmistetun puolen tunnin hydrolysaatin misellien suhteellinen osuus pienentyi hieman nollanäytteeseen verrattuna. Kahden tunnin näytteessä suhteellinen osuus oli lähes sama kuin nollanäytteen. Syynä tulokseen voidaan mahdollisesti pitää näytteen hetkellistä aggregoitumista puolen tunnin hydrolyysin aikana, jolloin kaseiinimiselliä suurempia partikkeleita muodostui näytteeseen partikkelikokoalueelle 0,3–1,00  $\mu\text{m}$ . (Kuva 17.) Tulos vastaa näytteen suutuntumaa, joka oli hieman paksua. Kahden tunnin näytteestä paksuus oli hävinnyt, joten on mahdollista, että aggregoituneet partikkelit hajosivat hydrolyysin edetessä lähes nollanäytteen partikkelikokojakauman tasolle.



Kuva 17. Tilavuusjakauma (%) partikkelikoon funktiona Proteaasi 3:n pitoisuudella 0,019 % valmistetuista näytteistä. Punainen käyrä on nollanäyte, vihreä puolen tunnin hydrolyysinäyte ja sininen kahden tunnin hydrolyysinäyte.

Entsyymiyhdistelmän hydrolysaatin tilavuusjakauma (%) partikkelikoon funktiona on kaseiinimisellää suurempien partikkelien alueella, koska näyte aggregoitui. Vaikka näytteen kaseiinimisellien alueella ei ole jakauman perusteella mitään, ovat misellit todennäköisesti aggregoituneet keskenään muodostaen suurempia partikkeleita. Maidon jäänönsrasva (0,05 %) on kuvassa partikkelikokoalueella 0,5–1,0 µm. Alueelle on muodostunut lisää partikkeleita nollanäytteeseen verrattuna. Proteiineja on todennäköisesti tarttunut hydrolyysin aikana rasvamolekyyleihin. (Kuva 18.)



Kuva 18. Tilavuusjakauma (%) partikkelikoon funktiona Proteaasi 3:n ja Proteaasi 4:n yhdistelmällä pitoisuuksilla 0,019 % ja 0,004 % valmistetusta näytteestä. Punainen käyrä on nollanäyte ja vihreä entsyymiyhdistelmällä valmistettu hydrolyysinäyte.

Partikkelikokoanalyysointia voisi käyttää tarkasteltaessa hydrolyysin aikana muodostuvia aggregaatteja, jos niitä ei pystytä silmämääräisesti näytteestä huomaamaan.

#### 7.4 $\beta$ -laktoglobuliinipitoisuuden määrittäminen

$\beta$ -laktoglobuliinin ( $\beta$ -Lg) rinnakkaismääritykset tehtiin ELISA-testillä ja nestekromatografilla. Tarkoituksena oli mitata näytteiden  $\beta$ -Lg-pitoisuutta ja saada kahdella eri menetelmällä tuloksille luotettavuutta. Nollanäytteen  $\beta$ -Lg-pitoisuuksissa ei ollut menetelmien välillä merkittävää eroa. Kahden tunnin aikana Proteaasi 3:lla valmistetun näytteen ELISA-testin vasta-ainevaste kasvoi hieman nollanäytteeseen verrattuna. Nestekromatografilla  $\beta$ -Lg:n pitoisuus laski kuitenkin nollanäytteeseen verrattuna samassa näytteessä. Hydrolyysi saattoi vapauttaa proteiinirakenteista enemmän vasta-ainevastetta aiheuttavia  $\beta$ -Lg:n epitoopeja. (Taulukko 47.)

Taulukko 47.  $\beta$ -laktoglobuliinipitoisuudet tutkituista näytteistä ELISA-testillä ja nestekromatografilla mitattuina.

menetelmä	nollanäyte	Proteaasi 3 0,019 %	Proteaasi 3 + Proteaasi 1 0,019 % + 0,00033 %	Proteaasi 3 + Proteaasi 4 0,019 % + 0,004 %
ELISA (mg/ml)	1,42	1,51	1,28	1,26
HPLC (mg/ml)	1,40	1,20	1,30	1,10

$\beta$ -Lg-pitoisuudet olivat nollanäytettä alhaisemmat Proteaasi 3:n ja Proteaasi 1:n entsyymiyhdistelmällä kahden tunnin hydrolysaatissa. Yhdistelmä ei ollut merkittävästi pelkkää Proteaasi 3:a tehokkaampi  $\beta$ -Lg:n pilkkomisessa. Yhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 4 puolentoista tunnin hydrolysaatin  $\beta$ -Lg-pitoisuus oli edellistä yhdistelmää alhaisempi. (Taulukko 47.)

Tulosten eroavaisuudet keskenään johtuivat lähinnä käytettyjen menetelmien eroista.  $\beta$ -Lg:n pitoisuuserot olivat korkeintaan 21 % pienemmät (0,30 mg/ml) nollanäytteeseen verrattuna. Hydrolyysien aikana ei todennäköisesti tapahtunut merkittävää  $\beta$ -Lg-pitoisuuden alenemista allergisen reaktion kannalta.



## 8 Yhteenveto

Opinnäytetyössä tutkittiin lehmänmaitoproteiinien rajattua hydrolyysiä neutraaleissa olosuhteissa toimivilla proteaaseilla. Työssä tutkittiin 25 proteaasin toimivuutta lehmänmaitoproteiinien hydrolysoijina. Tarkoituksena oli kehittää maitoallergisille aikuisille sopivaa maitotuotetta, jonka allergisia oireita aiheuttavat kaseiini- ja heraproteiinit olisivat entsyymien toimesta mahdollisimman pitkälle pilkkoutuneita.

Entsyymejä karsittiin hydrolysaattien aistinvaraisen laadun, hydrolyysiasteen ja proteiinien pilkkoutumisen perusteella. Proteaasi 3 hydrolysaatin aistinvarainen laatu pysyi melko hyvänä tutkituilla entsyymipitoisuuksilla ja kaseiinit pilkkoutuivat hyvin.  $\beta$ -laktoglobuliini ( $\beta$ -Lg) ei kuitenkaan pilkkoutunut. Hydrolyysiaste kasvoi entsyymiyhdistelmällä vain vähän ja näytteiden aistinvarainen laatu huononi Proteaasi 1:n ja Proteaasi 2:n lisäentsyymejä lukuun ottamatta. Proteiinit eivät pilkkoutuneet yhdistelmällä merkittävästi tehokkaammin. Suuremmassa mittakaavassa (500 cm<sup>3</sup>) tutkittiin lisäentsyymeillä Proteaasi 1 ja Proteaasi 4 valmistettuja hydrolysaatteja, joiden laatu heikkeni todennäköisesti muutettujen inaktivointiolosuhteiden takia.

Proteiinit aggregoituivat keskenään hydrolyysin aikana muodostaen suurempia partikkeleita, kun partikkelikokojakaumia tutkittiin Proteaasi 3:n ja entsyymiyhdistelmän Proteaasi 3 ja Proteaasi 4 hydrolysaateista. Partikkelikokojakauma palautui Proteaasi 3:lla lähes nollanäytteen tasolle hydrolyysin edetessä. Entsyymiyhdistelmällä Proteaasi 3 ja Proteaasi 4  $\beta$ -Lg-pitoisuus pieneni nollanäytteeseen verrattuna 21 %. Lisäentsyymillä Proteaasi 1 ei päästy alhaisempiin pitoisuuksiin, mutta yhdistelmä pilkkoi  $\beta$ -Lg:a Proteaasi 3:a tehokkaammin. Pitoisuuksien lasku hydrolysaateissa ei todennäköisesti ollut merkittävä allergisten reaktioiden kannalta.

Entsyymeillä Proteaasi 6, Proteaasi 14, Proteaasi 16, Proteaasi 20 ja Proteaasi 23 voisi tehdä lisätutkimuksia, koska niiden toiminta hydrolyysissä voisi olla tehokkaampaa. Jatkotutkimuksiin voisi ottaa mukaan myös esimerkiksi entsyymit trypsiini ja kymotrypsiini, joiden on osoitettu pilkkovan heraproteiineja. Koeputkitason tulosten saavuttamiseksi suuremmassa mittakaavassa olisi määritettävä kiinnostavimpien entsyymien

inaktivoinnin tarkat lämpötila-aikayhdistelmät. Turha lämpökuorma saattaa olla ratkaiseva laatuvirheiden kannalta.

Tutkimuksissa löydettiin entsyymi ja entsyymiyhdistelmiä, joilla saatiin pilkottua maitoallergiaa aiheuttavia proteiineja hydrolysaatin aistinvaraisen laadun säilyessä hyvänä. Maitoproteiinien entsymaattinen hydrolyysi on vartenotettava vaihtoehto kehitettäessä maitoallergiaa aiheuttamatonta tuotetta aikuisille, koska entsyymeillä saa pilkottua allergiaa aiheuttavia proteiineja sopivissa olosuhteissa ilman monivaiheisia prosesseja.

## Lähteet

- Aistinvaraisen arvioinnin käsikirja. Aistittava laatu. 6. painos. 2006. Helsinki: Valio Oy, T&K.
- Bonomi, F., Fiocchi, A., Frøkiær, H., Gaiaschi, A., Iametti, S., Poiesi, C., Rasmussen, P., Restani, P., Rovere, P. 2003. Reduction of immunoreactivity of bovine  $\beta$ -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *Journal of Dairy Research* 70, s. 51–59.
- Burbrink, C.N., Hayes, K.D. 2006. Effect of thermal treatment on the activation of bovine plasminogen. *International Dairy Journal* 16, s. 580–585.
- Chicón, R., López-Fandiñ, R., Alinso, E., Belloque, J. 2008. Proteolytic pattern, Antigenicity, and Serum Immunoglobulin E Binding of  $\beta$ -Lactoglobulin Hydrolysates Obtained by Pepsin and High-Pressure Treatments. *Journal Dairy Science* 91, s. 928–938.
- Dairy processing handbook. 1995. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Ehn, B-M, Allmere, T., Telemo, E., Bengtsson, U., Ekstrand, B. 2005. Modification of IgE Binding to  $\beta$ -Lactoglobulin by Fermentation and Proteolysis of Cow's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, s. 3743–3748.
- El-Agamy, E.I. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research* 68, s. 64–72.
- Fritsché, Rodolphe. 2003. Role for technology in dairy allergy. *The Australian Journal of Dairy Technology* 58, s. 89–91.
- García-Risco, M.R., Recio, I., Molina, E., López-Fandiño, R. 2003. Plasmin Activity in Pressurized Milk. *Journal of Dairy Science* 86, s. 728–734.
- Järvinen, K-M, Beyer, K., Vila, L., Chatchatee, P., Busse, P.J., Sampson, H.A. 2002. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 110, s. 293–297.
- Kallioinen, Harri. 1997. Proteiinien entsymaattinen hydrolysointi membraanireaktorilla. Diplomityö. Helsingin teknillinen korkeakoulu.
- Kim, S.B., Seo, I.S., Khan, M.A., Ki, K.S., Lee, W.S., Lee, H.J., Shin, H.S., Kim, H.S. 2007a. Enzymatic Hydrolysis of Heated Whey: Iron-Binding Ability of Peptides and Antigenic Protein Fractions. *Journal of Dairy Science* 90, s. 4033–4042.
- Kim, S.B., Ki, K.S., Khan, M.A., Lee, W.S., Lee, H.J., Ahn, B.S., Kim, H.S. 2007b. Peptic and Tryptic Hydrolysis of Native and Heated Whey Protein to Reduce Its Antigenicity. *Journal of Dairy Science* 90, s. 4043–4050.

Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, A., Tupasela, T. 1998 Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science & Technology* 9, s. 307–319.

Mahmoud, M.I. 1994. Physicochemical and Functional Properties of Protein Hydrolysates in Nutritional Products. *Food Technology* 89, s. 89–95.

Matsubara, H., Hagihara, B., Nakai, M., Komaki, T., Yonetani, T. ja Okunuki, K. 1958. Crystalline bacterial proteinase. II General properties of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis* N. *Journal of Biochemistry* 45, s. 251–258.

MINTEL gnpd. (WWW-dokumentti.)

<<http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd&lang=uk/frontpage/>>. Luettu 28.4.2008.

Molina Tezcucano, A.C, Alli, I., Boye, J.I. 2007. Effects of dephosphorylation and proteolysis on immunogenicity of caseins. *Milchwissenschaft* 62 (4), s. 371–375.

Monaci, M., Treguat, V., van Hengel, A.J., Anklam, E. 2006. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research Technology* 223, s. 149–179.

Newstead, D.F., Paterson, G., Anema, S.G., Coker, C.J., Wewala, A.R. 2006. Plasmin activity in direct-steam-injection UHT-processed reconstituted milk: Effects of preheat treatment. *International Dairy Journal* 16, s. 573–579.

Ollikainen, Pia. 1989. Proteolyysi emmentaljuuston kypsymisessä. Lisensiaatintutkimus. Helsingin yliopisto.

Ollikainen, Pia. 2008. Tekniikan lisensiaatti, Valio Oy, Helsinki. Seminaari 4.4.2008.

Paajanen, Laura. 2005. Milk hypersensitivity. Effects of Cow's Milk and its Processing on Gastrointestinal Symptoms and Delayed-Type Immune Responses. Doctoral Thesis. University of Helsinki.

Pelto, L., Laitinen, I., Lilius, E-M. 1999. Current perspectives on milk hypersensitivity. *Trends in Food Science & Technology* 10, s. 229–233.

Pelto, Leea. 2000. Milk hypersensitivity in adults. Studies on diagnosis, prevalence and nutritional management. University of Turku.

Peterson, G.L. 1979. Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100, s. 201–220.

Prado, B.M., Sombers, S.E., Ismail, B., Hayes, K.D. 2006. Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and plasminogen activators in milk. *International Dairy Journal* 16, 593–599.

Rosendal, A., Barkholt, V. 2000. Detection of Potentially Allergenic Material in 12 Hydrolyzed Milk Formulas. Lyngby, Denmark: Technical University of Denmark, Department of Biochemistry and Nutrition.

Roth-Walter, F., Berin, M.C., Arnaboldi, P., Escalante, C.R., Dahan, S., Rauch, J., Jensen-Jarolim, E., Meyer, L. 2008. Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy* 63, s. 882–890.

Sharma, S., Kumar, P., Betzel, C., Singh, T.P. 2001. Structure and function of proteins involved in milk allergies. *Journal of Chromatography B* 756, s. 183–187.

Sibakov, Timo. 1997. Heraproteiinien hydrolysointi immobilisoiduilla entsyymeillä. Diplomityö. Helsingin teknillinen korkeakoulu.

Tossavainen, Olli. 1981. Kaseiinien entsyymaattinen hydrolyysi. Diplomityö. Helsingin teknillinen korkeakoulu.

Wal, J.M. 2001. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 56 (Suppl. 67), s. 35–38.

Wroblewska, B., Jedrychowski, L., Rarjan, M. 2007. The allergenicity of a low molecular fraction of cow milk protein hydrolysates. *Milchwissenschaft* 62 (4), s. 375–379.

## Liitteet

### Liite 1: Jatkoon valittujen entsyymien laadunarviointitaulukot

entsyymi (p-% maidosta)	<sup>1</sup> aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
Proteaasi 12			
0,0009 %	0,5	5	kitkerä jälkimaku kitkerä jälkimaku saostunut
	1,5	3	
	2	3	
	3	0	
Proteaasi 21			
0,00012 %	0,5	0	saostunut
0,00001 %	0,5	–	saostumaa reunoilla saostunut, kuultava
	1	–	
	1,5	0	
	2	0	
Proteaasi 17			
0,0018 %	0,5	0	saostunut
0,0002 %	0,5	4	
	2,5	4	
0,001 %	0,5	1	hieman saostunut, juoksevaa saostunut, kuultava
	1	0	
Proteaasi 1			
0,043 %	0,5	0	saostunut
0,001 %	0,5	0	saostunut jähmeäksi
	1	0	
0,0001 %	0,5	4	
	4	4	
0,0005 %	0,5	4	saostunut lähes jähmeäksi
	1	4	
	2	0	
0,00025 %	0,5	5	rakenne paksua rakenne paksua
	1	5	
	2	4	
	3	3	
	4	3	
0,00035 %	0,5	5	saostunut, hiekkamaista, paksua
	1	5	
	2	4	
	3	2	

<sup>1</sup> = hydrolyysiaika entsyymillä

– = ei analysoitu

## Jatkoon valittujen entsyymien laadunarviointitaulukko. Liite 1 (sivu 2)

entsyymi (p-% maidosta)	<sup>1</sup> aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
<b>Proteaaasi 2</b>			
0,001 %	0,5	4	
	4	4	
0,01 %	0,5	0	saostunut, kuultava
0,0025 %	0,5	0	tarttuu reunoille
	1	0	saostunut jähmeäksi
0,0013 %	0,5	5	
	2	5	
	3	4	
	4	2	paksun juoksevaa, hiekkamaista
0,002 %	0,5	4	
	1	4	
	2	0	saostunut jähmeäksi
<b>Proteaaasi 25</b>			
0,0033 %	0,5	0	saostunut
0,0001 %	0,5	5	
	1	4	
	3	4	
0,001 %	0,5	4	
	1	3	hieman kitkerä jälkimaku
	2	0	saostunut
<b>Proteaaasi 15</b>			
0,4 %	0,5	0	saostunut, kellertävä
0,01 %	0,5	0	saostunut, hieman kellertävä
0,001 %	0,5	4	
	1	0	hieman saostunut, rakenne paksu
<b>Proteaaasi 5</b>			
0,0165 %	0,5	0	saostunut
	4	1	saostuma lähtenyt, harmahtavaa, erittäin kitkerä
0,001 %	0,5	5	
	4	5	
0,003 %	0,5	0	saostunut
	3	2	juoksevaa, paksua, kitkerä
0,002 %	0,5	4	
	1	2	tarttuu seinämille, hiekkamainen

<sup>1</sup> = hydrolyysi-aika entsyymillä

## Jatkoon valittujen entsyymien laadunarviointitaulukko. Liite 1 (sivu 3)

entsyymi (p-% maidosta)	<sup>1</sup> aika (h)	laatu (0–5)	sanallinen arvio laadusta
<b>Proteaasi 10</b>			
0,033 %	0,5	0	saostunut
0,00033 %	0,5	5	
	2,5	5	
0,001 %	0,5	5	
	4	5	
0,0025 %	0,5	0	saostunut jähmeäksi
0,002 %	0,5	4	
	4	4	
<b>Proteaasi 8</b>			
0,00033 %	0,5	4	
	2,5	4	
0,01 %	0,5	0	saostunut, kuultava
0,001 %	0,5	4	
	1	0	saostunut jähmeäksi
<b>Proteaasi 4</b>			
0,00033 %	0,5	4	
	2,5	4	
0,001 %	0,5	5	
	4	5	
0,0015 %	0,5	5	
	4	5	
0,0033 %	0,5	5	
	3	4	
	4	4	
0,0066 %	0,5	5	
	1	4	
	2	0	saostunut jähmeäksi
<b>Proteaasi 7</b>			
0,0917 %	0,5	5	
	2	4	
	4	4	
0,2 %	0,5	5	
	1	4	
	2	3	hieman kitkerä
	3	2	saostunut, hiekkamaista, kitkerää
<b>Proteaasi 6</b>			
0,0033 %	0,5	4	
	4	4	
0,01 %	0,5	2	saostumaa reunoilla, hiekkamainen
	4	2	saostunut

<sup>1</sup> = hydrolyysiaika entsyymillä

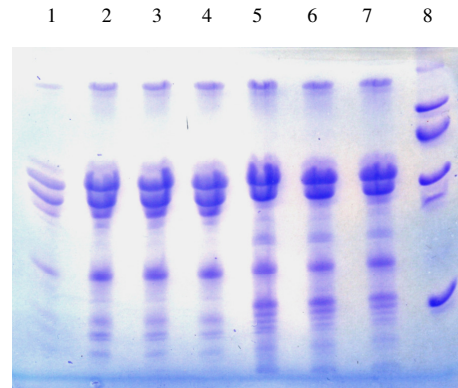


## Liite 2: Yksittäisten entsyymien elektroforeesigeelit

hydrolyysinäytteiden laimennokset 1:1

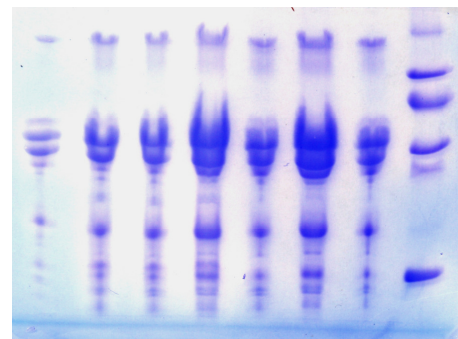
1507-1

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	0 (1:3)		
2	Proteaasi 2	0,0001	3
3	Proteaasi 2	0,0001	2
4	Proteaasi 2	0,0001	0,5
5	Proteaasi 17	0,0002	3
6	Proteaasi 17	0,0002	2
7	Proteaasi 17	0,0002	0,5
8	standardi		



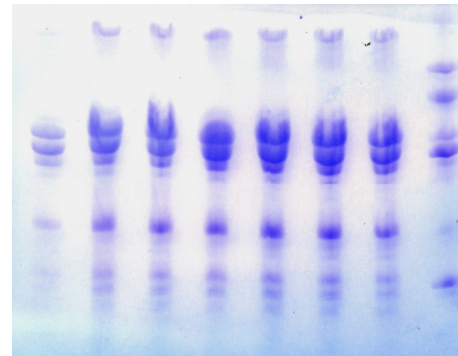
1507-2

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	0 (1:3)		
2	Proteaasi 25	0,0001	3
3	Proteaasi 25	0,0001	2
4	Proteaasi 25	0,0001	0,5
5	Proteaasi 3	0,001	3,7
6	Proteaasi 3	0,001	1
7	Proteaasi 3	0,001	0,5
8	standardi		



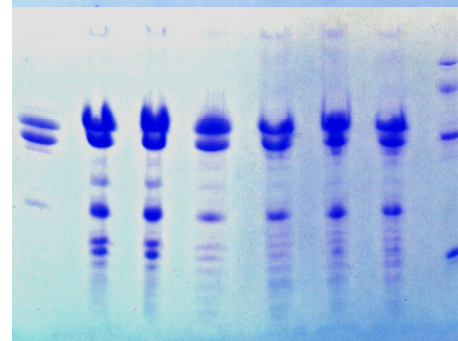
1507-3

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	0 (1:3)		
2	Proteaasi 8	0,0001	3
3	Proteaasi 8	0,0001	1,5
4	Proteaasi 8	0,0001	0,5
5	Proteaasi 10	0,0001	3
6	Proteaasi 10	0,0001	2
7	Proteaasi 10	0,0001	0,5
8	standardi		



1507-4

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	0 (1:3)		
2	Proteaasi 12	0,0009	4
3	Proteaasi 12	0,0009	1,5
4	Proteaasi 12	0,0009	0,5
5	Proteaasi 6	0,0033	4
6	Proteaasi 6	0,0033	2
7	Proteaasi 6	0,0033	0,5
8	standardi		



<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)

<sup>2</sup> = hydrolyysi-aika entsyymillä

Yksittäisten entsyymien elektroforeesigeelit  
hydrolyysinäytteiden laimennokset 1:1

Liite 2 (sivu 2)

1507-5

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	0 (1:3)		
2	Proteaasi 5	0,0165	4
3	Proteaasi 15	0,01	3
4	Proteaasi 1	0,001	3
5	Proteaasi 21	0,00001	3
6	Proteaasi 21	0,00001	1,5
7	Proteaasi 21	0,00001	0,5
8	standardi		

1707-1

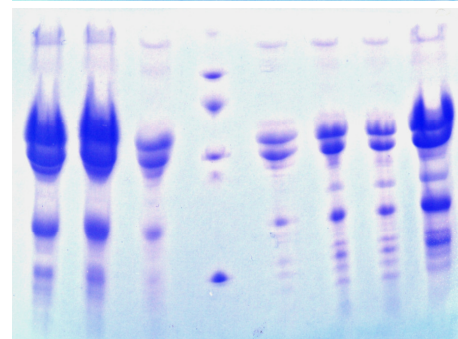
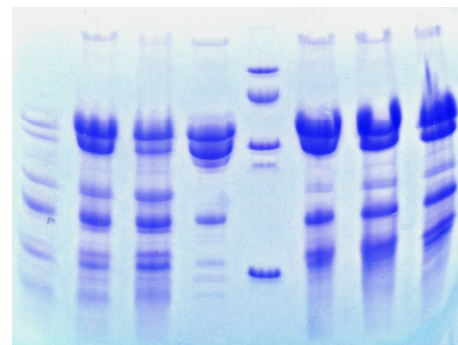
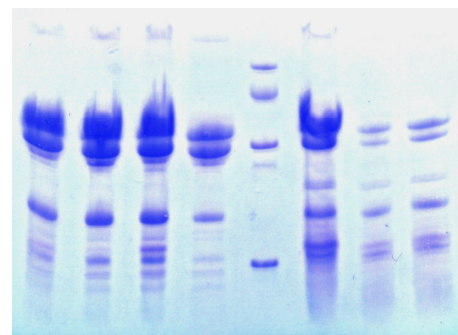
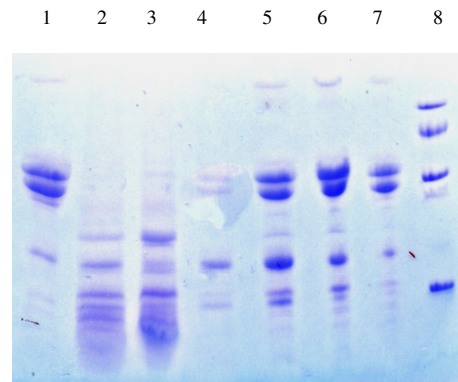
	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 1	0,0001	2
2	Proteaasi 1	0,0001	0,5
3	Proteaasi 1	0,0001	4
4	0 (1:2)		
5	standardi		
6	Proteaasi 17	0,001	0,5
7	Proteaasi 17	0,001	4
8	Proteaasi 17	0,001	2

1707-2

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 15	0,001	2
2	Proteaasi 15	0,001	0,5
3	Proteaasi 15	0,001	4
4	0 (1:2)		
5	standardi		
6	Proteaasi 25	0,001	0,5
7	Proteaasi 25	0,001	4
8	Proteaasi 25	0,001	2

1807-1

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 10	0,0002	2
2	Proteaasi 10	0,0002	0,5
3	Proteaasi 10	0,0002	4
4	standardi		
5	0 (1:2)		
6	Proteaasi 5	0,001	0,5
7	Proteaasi 5	0,001	4
8	Proteaasi 5	0,001	2



<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)

<sup>2</sup> = hydrolyysi-aika entsyymillä

## Yksittäisten entsyymien elektroforeesigeelit

## Liite 2 (sivu 3)

1807-2 (hydrolyysinäytteiden laimennokset 1:1)

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 6	0,01	2
2	Proteaasi 6	0,01	4
3	Proteaasi 6	0,01	0,5
4	0 (1:1)		
5	0 (1:2)		
6	Proteaasi 7	0,2	4
7	Proteaasi 7	0,2	0,5
8	Proteaasi 7	0,2	2

2307-1 (näytteiden laimennokset 1:2)

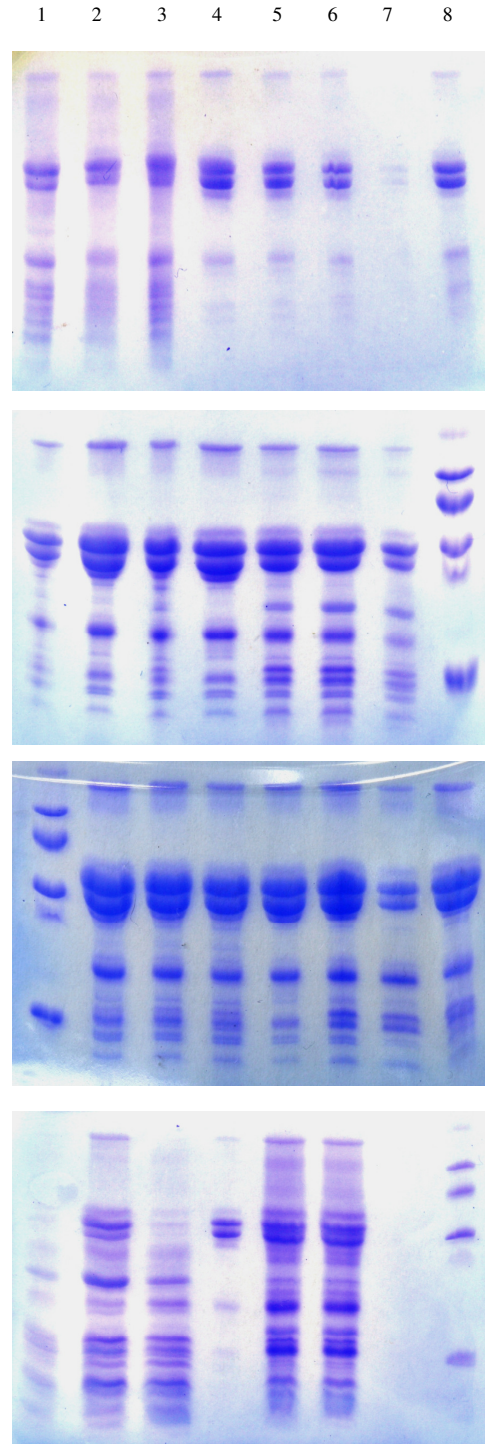
	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 4	0,0015	2
2	Proteaasi 4	0,0015	0,5
3	Proteaasi 4	0,0015	4
4	0		
5	Proteaasi 4	0,01	0,5
6	Proteaasi 4	0,01	2
7	Proteaasi 4	0,01	4
8	standardi		

2307-2 (laimennokset 1:2)

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 2	0,00075	0,5
3	Proteaasi 2	0,00075	2
4	Proteaasi 2	0,00075	4
5	0		
6	Proteaasi 1	0,0005	0,5
7	Proteaasi 1	0,0005	4
8	Proteaasi 1	0,0005	1

2307-3 (laimennokset 1:2)

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 5	0,008	2
2	Proteaasi 5	0,008	0,5
3	Proteaasi 5	0,008	3
4	0		
5	Proteaasi 3	0,02	0,5
6	Proteaasi 3	0,02	2
7	Proteaasi 3	0,02	4
8	standardi		



<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)

<sup>2</sup> = hydrolyysi aika entsyymillä

Yksittäisten entsyymien elektroforeesigeelit  
näytteiden laimennokset 1:2

Liite 2 (sivu 4)

2507-1

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 3	0,0166	0,5
2	Proteaasi 3	0,0166	2
3	Proteaasi 3	0,0166	4
4	0		
5	Proteaasi 8	0,00033	0,5
6	Proteaasi 8	0,00033	2
7	Proteaasi 8	0,00033	2,5
8	standardi		

2507-2

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 1	0,00035	0,5
3	Proteaasi 1	0,00035	2
4	Proteaasi 1	0,00035	4
5	0		
6	Proteaasi 1	0,00025	0,5
7	Proteaasi 1	0,00025	2
8	Proteaasi 5	0,003	4

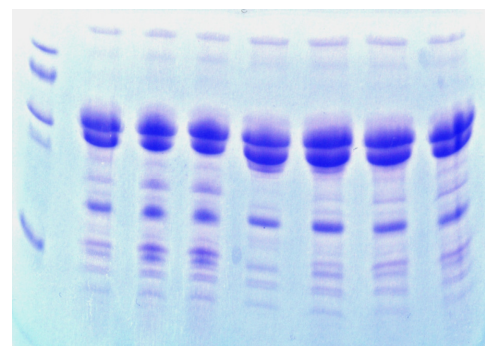
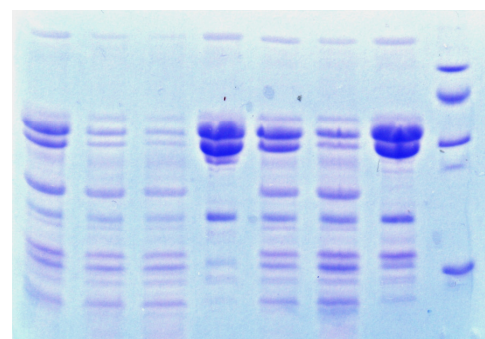
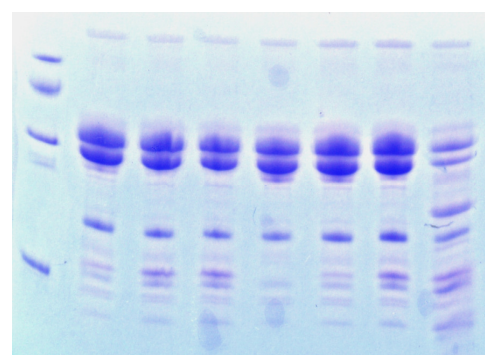
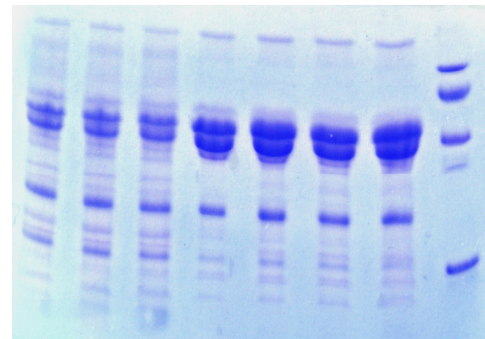
2507-3

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 5	0,005	0,5
2	Proteaasi 5	0,005	2
3	Proteaasi 5	0,005	4
4	0		
5	Proteaasi 5	0,003	0,5
6	Proteaasi 5	0,003	2
7	Proteaasi 1	0,00025	4
8	standardi		

2507-4

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 4	0,0066	0,5
3	Proteaasi 4	0,0066	2
4	Proteaasi 4	0,0066	4
5	0		
6	Proteaasi 4	0,0033	0,5
7	Proteaasi 4	0,0033	2
8	Proteaasi 4	0,0033	4

1 2 3 4 5 6 7 8



<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)

<sup>2</sup> = hydrolyysi aika entsyymillä

Yksittäisten entsyymien elektroforeesigeelit  
näytteiden laimennokset 1:2

Liite 2 (sivu 5)

2507-5

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1			
2	Proteaasi 3	0,0133	0,5
3	Proteaasi 3	0,0133	2
4	Proteaasi 3	0,0133	4
5	0		
6	standardi		
7	Proteaasi 5	0,003	4
8	Proteaasi 1	0,00025	4

2907-1

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 8	0,001	2
2	Proteaasi 8	0,001	0,5
3	Proteaasi 8	0,001	4
4	0		
5	Proteaasi 2	0,01	0,5
6	Proteaasi 2	0,01	2
7	Proteaasi 2	0,01	4
8			

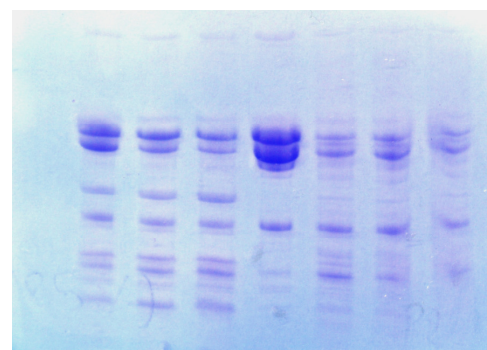
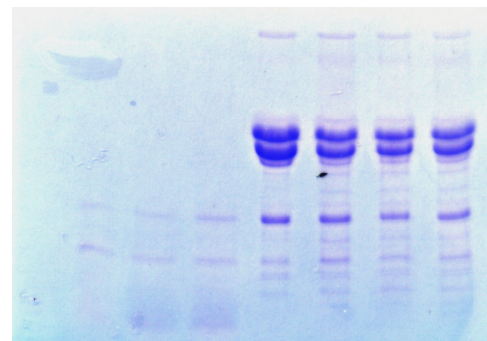
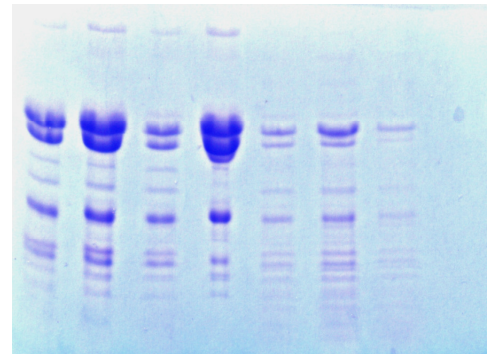
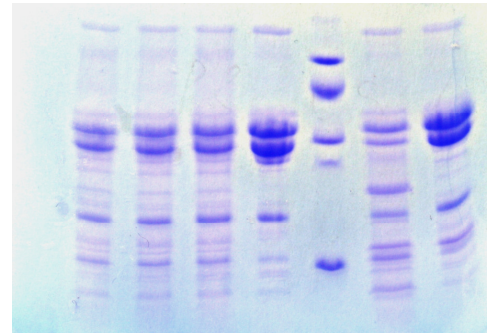
2907-2

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1			
2	Proteaasi 10	0,01	0,5
3	Proteaasi 10	0,01	2
4	Proteaasi 10	0,01	4
5	0		
6	Proteaasi 10	0,001	0,5
7	Proteaasi 10	0,001	4
8	Proteaasi 10	0,001	2

2907-3

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1			
2	Proteaasi 5	0,002	0,5
3	Proteaasi 5	0,002	2
4	Proteaasi 5	0,002	4
5	0		
6	Proteaasi 3	0,0185	0,5
7	Proteaasi 3	0,0185	4
8	Proteaasi 3	0,0185	2

1 2 3 4 5 6 7 8



<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)

<sup>2</sup> = hydrolyysi-aika entsyymillä

Yksittäisten entsyymien elektroforeesigeelit  
näytteiden laimennokset 1:2

Liite 2 (sivu 6)

3007-1

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 2	0,002	0,5
3	Proteaasi 2	0,002	2
4	Proteaasi 2	0,002	4
5	0		
6	Proteaasi 2	0,0013	0,5
7	Proteaasi 2	0,0013	4
8	Proteaasi 2	0,0013	2

3007-2

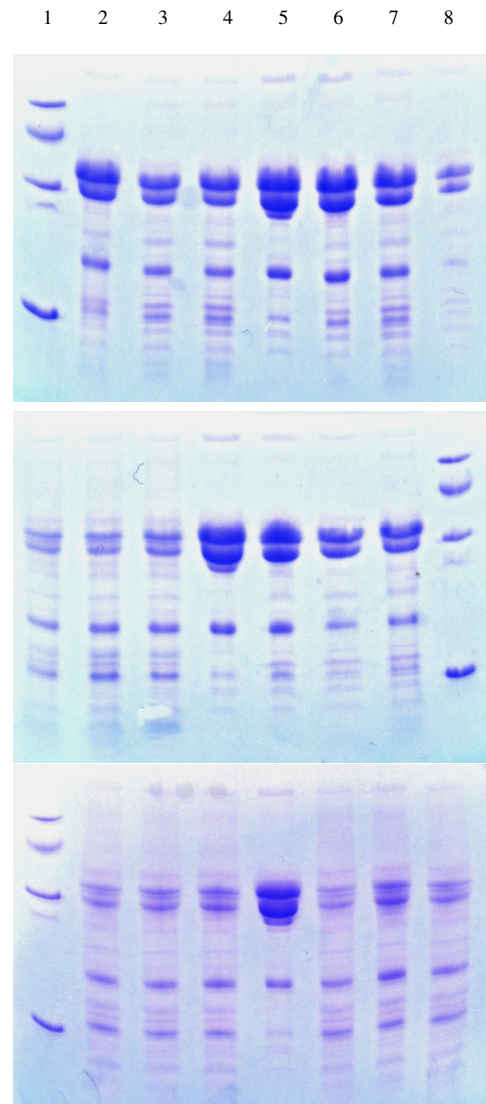
	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 2	0,0016	2
2	Proteaasi 2	0,0016	0,5
3	Proteaasi 2	0,0016	4
4	0		
5	Proteaasi 10	0,002	0,5
6	Proteaasi 10	0,002	2
7	Proteaasi 10	0,002	4
8	standardi		

3007-3

	entsyymi	<sup>1</sup> pitoisuus (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 3	0,0195	0,5
3	Proteaasi 3	0,0195	2
4	Proteaasi 3	0,0195	4
5	0		
6	Proteaasi 3	0,019	0,5
7	Proteaasi 3	0,019	4
8	Proteaasi 3	0,019	2

<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)

<sup>2</sup> = hydrolyysiaika entsyymillä



### Liite 3: Entsyymiyhdistelmien elektroforeesigeelit

näytteiden laimennokset 1:2

0108-1

	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + <sup>3</sup> 0,003	1,5
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + <sup>3</sup> 0,003	2
4	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + <sup>3</sup> 0,003	4
5	0		
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,003	0,5
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,003	4
8	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,003	2

0108-2

	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + <sup>3</sup> 0,09	2
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + <sup>3</sup> 0,09	1,5
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + <sup>3</sup> 0,09	4
4	0		
5	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + 0,09	0,5
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + 0,09	2
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 7	0,019 + 0,09	4
8	standardi		

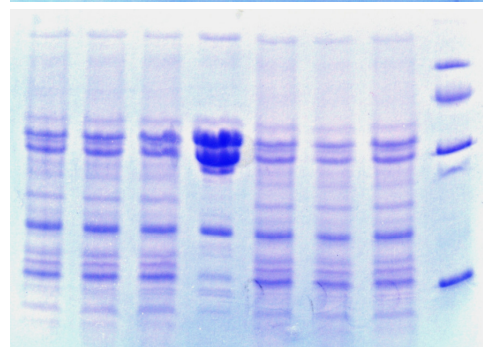
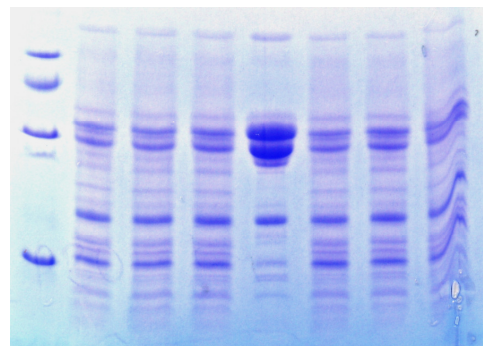
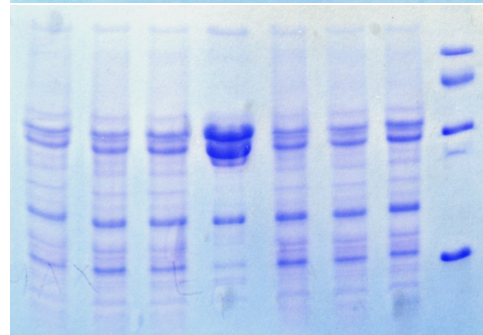
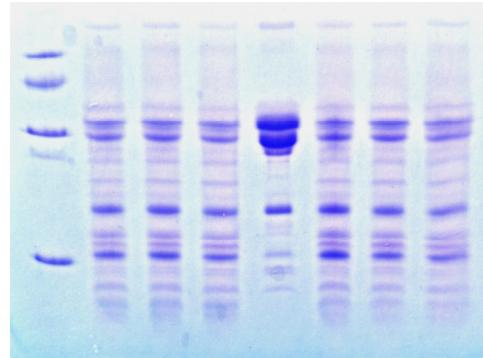
0108-3

	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	standardi		
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + <sup>3</sup> 0,0003	1,5
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + <sup>3</sup> 0,0003	2
4	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + <sup>3</sup> 0,0003	4
5	0		
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0003	0,5
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0003	4
8	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0003	2

0108-4

	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + <sup>3</sup> 0,001	2
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + <sup>3</sup> 0,001	0,5
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + <sup>3</sup> 0,001	4
4	0		
5	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + 0,001	0,5
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + 0,001	2
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 5	0,019 + 0,001	4
8	standardi		

1 2 3 4 5 6 7 8



<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)

<sup>2</sup> = hydrolyysiaika entsyymillä

<sup>3</sup> = entsyymi lisätty tunnin hydrolyysin jälkeen

Entsyymiyhdistelmien elektroforeesigeelit  
näytteiden laimennokset 1:2

## Liite 3 (sivu 2)

0608-1

	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,004	0,5
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,004	2
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,0045	0,5
4	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,0045	2
5	0		
6	Proteaasi 3	0,019	3
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 4	0,019 + 0,005	0,5
8	standardi		

0608-2

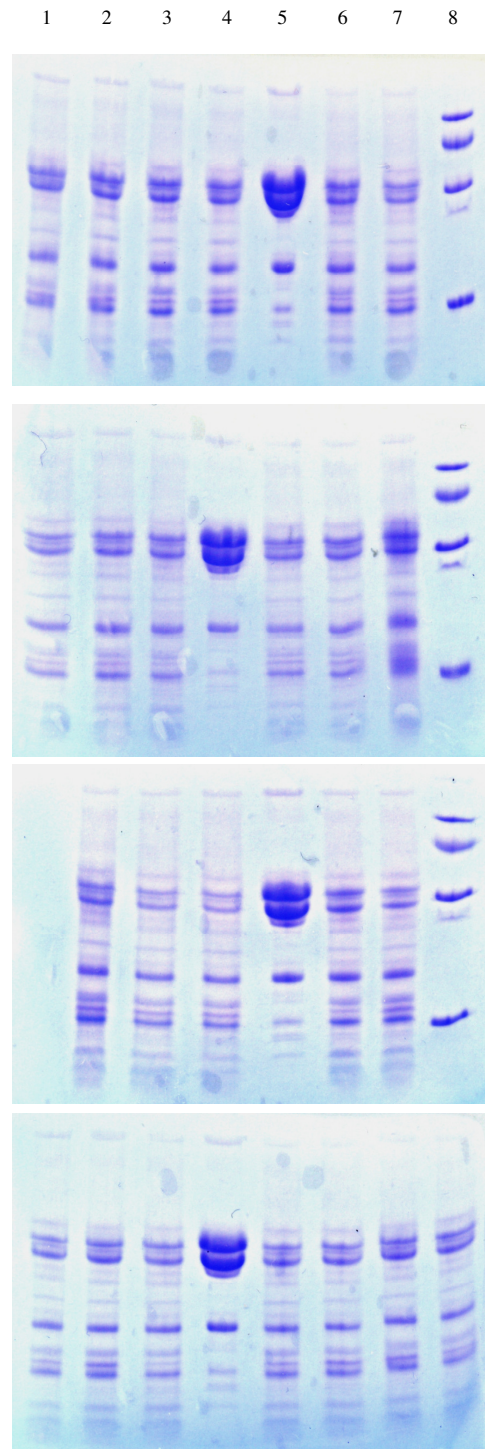
	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0005	0,5
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0005	2
3	Proteaasi 3	0,019	3
4	0		
5	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0006	0,5
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0006	2
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 8	0,019 + 0,0007	0,5
8	standardi		

0608-3

	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1			
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 6	0,019 + 0,001	0,5
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 6	0,019 + 0,001	1,5
4	Proteaasi 3 + Proteaasi 6	0,019 + 0,001	2
5	0		
6	Proteaasi 3	0,019	3
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 6	0,019 + 0,0015	2
8	standardi		

0608-4

	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,0003	0,5
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,0003	2
3	Proteaasi 3	0,019	3
4	0		
5	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,00033	0,5
6	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,00033	2
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,00037	1,5
8	Proteaasi 3 + Proteaasi 1	0,019 + 0,00037	0,5

<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)<sup>2</sup> = hydrolyysi-aika entsyymillä



Entsyymiyhdistelmien elektroforeesigeelit  
näytteiden laimennokset 1:2

Liite 3 (sivu 3)

0608-5

	entsyymit	<sup>1</sup> pitoisuudet (%)	<sup>2</sup> aika (h)
1	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,001	0,5
2	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,001	2
3	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,0013	0,5
4	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,0013	1,5
5	0		
6	Proteaasi 3	0,019	3
7	Proteaasi 3 + Proteaasi 2	0,019 + 0,0016	0,5
8	standardi		

<sup>1</sup> = entsyymin pitoisuus rasvattomasta maidosta (p-%)

<sup>2</sup> = hydrolyysiäika entsyymillä

