

İnek Sütü Alerjenleri ve Kontrol Yöntemleri

Tuba Erkaya, Mustafa Şengül

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum

Geliş Tarihi (Received): 10.02.2012, Kabul Tarihi (Accepted): 02.04.2012

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): terkaya@atauni.edu.tr (T. Erkaya)

☎ 0 442 231 27 28 📠 0 442 232 09 58

ÖZET

İnek sütü alerjisi, çocuklarda görülen en yaygın gıda alerjilerinden birisi olup sindirim sonrası süt proteinlerine karşı ortaya çıkan olumsuz bir reaksiyondur. Yapılan çalışmalar inek sütü alerjisine yol açan esas alerjenlerin β -laktoglobulin ve kazeinler olduğunu, diğer proteinlerin de antijenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. İnek sütünü diyetten çıkarmadan bu alerjenlerin kontrol altına alınması önemli bir sorun teşkil eder. İnek sütü proteinlerinin diyetten tamamen uzaklaştırılması beslenme açısından olumsuz etkide bulunacağından, son yıllarda yapılan araştırmalar farklı gıda işleme yöntemlerinin süt alerjenlerini kontrol altına almada etkisi üzerine odaklanmıştır. Bu nedenle inek sütü alerjisinin azaltılması için çeşitli teknolojik işlemler araştırılmakta ve uygulanmaktadır. Bu çalışmada, inek sütü alerjenlerinin yapısı, alerji oluşum nedenleri ve alerjenlerin kontrol altına alınmasında başvurulan (ısıtma işlemi, enzimatik hidroliz, Maillard reaksiyonu, yüksek basınç ve fermantasyon gibi) bazı teknolojik yöntemler derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İnek sütü alerjisi, Süt proteinleri, Teknolojik işlemler

Cow's Milk Allergens and their Control Methods

ABSTRACT

Cow's milk allergy, one of the most common food allergies endemic in childhood, is a reaction arisen against milk proteins after digestion. Studies have been demonstrated that β -lactoglobulin and caseins are the major allergens caused to cow's milk allergy, and other milk proteins have antigenic properties. Controlling these allergens without elimination of cow's milk from the diet is an important problem to be solved. The complete elimination of cow's milk proteins from diet may have a negative effect on child nutrition; therefore, recently, studies have focused on the effects of food processing methods on controlling the milk allergens. Different processing techniques have been searched to reduce cow's milk allergy. In this study, the structures of cow's milk allergens, the reasons of allergic reaction and some technological methods such as heat treatment, enzymatic hydrolysis, Maillard Reaction, high pressure and fermentation applied for controlling the allergens have been reviewed.

Keywords: Cow's milk allergy, Milk proteins, Technological processes

GİRİŞ

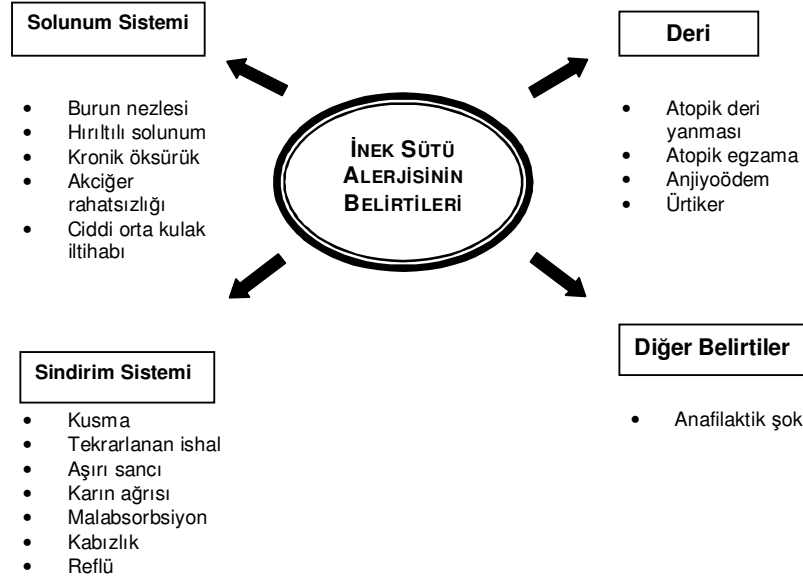
Gıda alerjisi, gıda alımını takiben ortaya çıkan ve bağışıklık sisteminde meydana gelen bir reaksiyondur. Son yıllarda, gıdalara bağlı alerjiler giderek artmakta ve özellikle bebekler ve çocuklar bir veya daha fazla gıdaya karşı alerjik reaksiyonlara maruz kalabilmektedir.

Genellikle, yumurta, inek sütü, fıstık, soya, buğday, balık ve kabuklu deniz hayvanları gibi gıdalar böyle reaksiyonların oluşumuna neden olmaktadır [1]. Gıda alerjilerinin ortaya çıkışında, söz konusu gıdanın yapısında bulunan ve "alerjen" adı verilen proteinler ile vücudun bağışıklık sistemi arasında bazı etkileşimlerin

olduğu ve bunun sonucunda da çok önemli klinik vakaların ortaya çıktığı bildirilmektedir [2].

İnek sütü alerjisi (İSA), genellikle inek sütü antijenlerine karşı mast hücrelerinin ve mediatörlerin salgılanmasını uyaran spesifik immunoglobulin E (IgE) tarafından oluşturulan immunolojik yanıt olarak tanımlanmaktadır [3]. İSA, en yaygın gıda alerjisi tipi olup, çoğunlukla bebeklerde rastlanan ve sindirim sonrası süt proteinlerine karşı ortaya çıkan olumsuz bir reaksiyondur [4]. İnek sütü, kazein ve serum proteinleri gibi bağışıklık sisteminde duyarlılığa neden olabilen

proteinler içermektedir ve bu proteinlere bağlı olarak oluşan alerji sonucu vücudun farklı bölgelerinde, özellikle mide-bağırsak, deri ve solunum sistemlerinde çeşitli semptomlar ortaya çıkmaktadır [1] (Şekil 1). Örneğin; "anafilaktik şok" (IgE tarafından meydana gelen gıda duyarlılığı reaksiyonu) çok ciddi bir alerji semptomudur [6]. İSA, özellikle bebekler ve küçük çocukların yaşamını ve gelişimini tehdit eden, fizyolojik, psikolojik, sosyal ve ekonomik boyutları bulunan önemli sağlık sorunlarından biridir. Bu alerji, yaşamın ilk yılında giderek azalmasına rağmen alerjik çocukların %15'inde kalıcı olabilmektedir.



Şekil 1. İnek Sütü Alerjisinin Belirtileri [15]

İnek sütündeki proteinlerin yaklaşık %80'ini kazein ve geriye kalan kısmını ise serum proteinleri oluşturmaktadır. Serum proteinlerinin yaklaşık %50'sini oluşturan β -laktoglobulin (β -LG) anne sütünde bulunmadığından en önemli inek sütü alerjisi olarak düşünülmektedir [7]. Ancak bazı araştırmacılar; inek sütü proteinlerindeki alerjinin başlıca kazein olduğunu vurgulamakla beraber, serum proteinlerine karşı da alerji geliştiğini bildirmektedirler [4, 6]. Bebek beslenmesinde inek sütünün çoğunlukla anne sütü yerine kullanılması ve önemli bir bölümünü inek sütünün oluşturduğu ek besinlere erken başlanması, alerjik hastalık riskini giderek artırmaktadır. Gelişmiş ülkelerde İSA problemi için önemli çözümler ortaya konulmakta iken, gelişmekte olan ülkeler ise çözümü inek sütünü diyetten çıkarmakta bulmaktadırlar. Fakat birçok işlenmiş ürünün yapısında da yer alan inek sütü ve proteinlerini diyetten tümüyle çıkarmak mümkün değildir. Buna ilaveten, inek sütü proteinlerinin tamamen giderilmesi beslenme açısından eksikliğe neden olacağından bebeklerin ve çocukların gelişimine olumsuz etkide bulunacaktır. Dolayısıyla inek sütü alerjenlerinin azaltılması ve dolayısıyla inek sütü alerjisinin de elimine edilmesi için çeşitli teknolojik işlemler araştırılmakta ve uygulanmaktadır.

Bu derlemede; inek sütü alerjenlerinin yapısı, alerji oluşum nedenleri ve İSA'nın kontrol altına alınmasında başvurulan teknolojik yöntemlerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

İNEK SÜTÜ ALERJİSİNİN NEDENLERİ

Bebeklerde meydana gelen yüksek miktardaki antijenlerin ilk kaynağını inek sütü proteinlerinin oluşturduğu düşünülmektedir [8, 9]. Alerjik reaksiyon faktörlerinin yanı sıra inek sütü ile anne sütünün protein kompozisyonu bakımından farklılık göstermesi, yeni doğanlarda inek sütü alerjisinin başlıca nedeni olarak görülmektedir. Bu farklılık; ilk olarak anne sütünün protein içeriğinin (%1.2) inek sütünün protein içeriğine (%3-3.5) göre daha düşük olmasından kaynaklanmakta, ikinci olarak ise; inek sütündeki toplam kazein oranının anne sütüne nispeten daha fazla olması ve anne sütünün serum proteinleri bakımından daha zengin olmasından ortaya çıkmaktadır. Bu durum anne sütünün bebek midesinde daha yumuşak bir pıhtı oluşturması açısından da anne sütünü üstün kılmaktadır. Yüksek kazein içeriğine sahip inek sütü ise hazımsızlığa ve

alerjiye neden olabilecek sert bir pıhtının midede oluşumuna sebep olmaktadır [10, 11]. Buna ilaveten; inek sütünün serum proteinlerinin büyük kısmını oluşturan ve anne sütünde bulunmayan β -LG [12], pepsin hidrolizine karşı direnç göstermesi nedeniyle önce bağırsak mukozasına geçmekte ardından da kana karışarak bebeklerde alerjenik reaksiyon oluşumunu teşvik etmektedir [13, 14]. Bununla birlikte; immünolojik materyal içeriği bakımından inek sütüne nazaran daha zengin olan anne sütü, bebeklerin bağırsıklık fonksiyonlarının gelişmesini sağlamakta ve süt alerjisi oluşumunu önlemektedir [10, 11, 15]. Bu nedenle inek sütü alerjisine anne sütüyle beslenmeyen bebeklerde daha sık rastlanmaktadır.

İNEK SÜTÜ ALERJENLERİ

İnek sütü, alerjik reaksiyonlara neden olabilecek 20'den fazla protein içermektedir. Başlıca proteinlerini kazein ve serum proteinleri oluşturmaktadır. Kazein; α_{s1} , α_{s2} , β ve κ -kazein olmak üzere 4 fraksiyona sahiptir. Serum proteinleri ise β -LG, α -laktalbumin (α -LA), sığır serum albumini ve immüoglobulinlerden oluşmaktadır. Bunlara ilaveten bazı minör proteinler de inek sütünde mevcuttur [15]. Birçok araştırmada kazein ve β -LG'in inek sütünde bulunan başlıca alerjenler olduğu ortaya konulmuştur [16-20]. Bununla birlikte, süt alerjisi olan hastaların % 82'sinin β -LG'e karşı duyarlı oldukları ve bu nedenle β -LG'in inek sütündeki esas alerjen olduğu bildirilmektedir [21]. Kazeinlerin ise kalıcı alerjide önemli bir rol oynadığı ve bu yüzden de yetişkinler açısından en önemli süt alerjeni olduğu düşünülmektedir [22, 23]. Ayrıca, sığır serum albumini ve hatta laktoferrin gibi diğer proteinlerin de potansiyel alerjenler olabileceği belirtilmektedir [24, 25].

β -Laktoglobulin

β -LG; anne sütünde bulunmayan ancak inek sütü serum proteinlerinin yaklaşık %50'sini oluşturan, sütün en önemli çözünen proteindir. Molekül ağırlığı 18350 Da olup 162 aminoasitten meydana gelmiştir. Asidik ($pH < 3.0-3.5$) ve bazik ($pH > 7.5-8.0$) koşullarda monomerik form gösteren bu globüler proteinin yapısı iki disülfid bağı tarafından stabilize edilmektedir [26, 27]. Ayrıca yapısında, diğer serum proteinleri ve kazeinlerin -SH grupları arasında gerçekleşen önemli disülfid değişimlerinde rol alan serbest bir disülfid grubu da yer almaktadır [28, 29]. β -LG, lipokalin protein ailesine mensuptur ve bu ailenin tüm üyeleri 8 antiparalel β -strands'dan oluşan yüksek alerjenik potansiyele sahip bir β -barrel molekülüdür [30]. En iyi lipid bağlayıcı proteinlerden biri olarak tanımlanan bu protein; retinol, β -karoten, doymuş ve doymamış yağ asitleri ve alifatik hidrokarbonlar gibi pek çok molekülü bağlama yeteneğine sahiptir [31].

Süt proteinleri, özellikle β -LG esansiyel aminoasit içeriği bakımından oldukça zengindir. Ancak β -LG mide sindirimine dirençlidir ve hidrolizi sonucu sindirilememiş β -LG veya yüksek molekül ağırlıklı peptidler açığa çıkar. Bunlar, büyük çoğunlukla yapısı hiç bozulmadan bağırsak mukozasına ulaşabilir ve bağırsak bariyerini aşarak alerjenik reaksiyonları tetikleyebilirler. Bunun

sonucunda esansiyel aminoasitlerden de yeterince yararlanılamaz [13, 27].

β -LG'nin yapısında bulunan alerjenik epitoplara (antijenik determinant) Sel'o ve ark. [32] tarafından 46 alerjik hastanın kanındaki triptik ve sentetik peptidler incelenerek araştırılmıştır. Araştırma sonucunda; β -LG molekülünün bünyesinde sayısız epitopun yaygın bir şekilde bulunduğu ortaya konmuştur. Hastaların % 89, %92 ve % 97'sinin kanında belirlenen en önemli epitoplara sırasıyla (149-162), (41-60) ve (102-124) no'lu peptidlerden oluştuğu görülmüştür. Bununla birlikte, hastaların %52-65'inin kanında ağırlıklı olarak (1-8), (25-40) ve (92-100) no'lu, %40'ında ise (9-14) ve (84-91) no'lu peptidlere rastlanmıştır. β -LG'nin aminoasit dizisini kaplayan sentetik peptidlerin kullanıldığı başka bir araştırmada ise 7 farklı IgE epitopu ve 6 IgG bağlayan bölge tanımlanmıştır [33]. Tanımlanan bu epitoplara Sel'o ve ark. [32] tarafından belirlenen epitoplara büyük oranda benzerlik gösterdiği de saptanmıştır.

α -Laktalbumin

α -Laktalbumin (α -LA) serum proteinlerinin yaklaşık %25'ini oluşturan, lizozim ailesine mensup, kalsiyum bağlayıcı, monomerik, globüler bir proteindir. Molekül ağırlığı 14200 Da olup 123 aminoasitten oluşmuştur. Yapısında 4 disülfid köprüsü bulunduğu nedeniyle 2 disülfid bağına sahip β -LG'ne nazaran sıcaklığa karşı stabilitesi daha yüksektir [14, 34]. Kalsiyuma karşı yüksek afinite gösteren bağları bu proteinin sekonder yapısının stabilitesi üzerine oldukça etkilidir [6]. α -LA süt bezleri tarafından üretilir ve bugüne kadar analiz edilmiş tüm sütte bulunmuştur [7].

α -LA, β -1,4-galaktoziltansferaz enzimi ile reaksiyona girerek, glukoz ve UDP-galaktozdan laktoz sentezine izin veren bu enzimin substrat spesifikliğini modifiye eder. Buna ilaveten, bu protein β -1,4-galaktoziltansferaz enziminin laktoz oluşumundaki fonksiyonu için meme bezlerindeki fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde çok önemli bir role sahiptir [35, 36].

İnek sütünde bulunan α -LA'nın amino asit kompozisyonunun %74'ünün anne sütünde bulunan α -LA'nın aminoasit içeriği ile aynı olduğu ve %6'sının ise kimyasal olarak benzerlik gösterdiği bildirilmektedir [14, 37]. Ancak, bu büyük benzerliğe rağmen inek sütünde bulunan α -LA'nın alerjenik potansiyelinin araştırıldığı çalışmalarda; alerjik hastaların kanında α -LA'ya ait IgE-bağlayıcı epitoplara tespit edilmiş ve 4 farklı lineer IgE-bağlayıcı peptidin 3 farklı IgG-bağlayıcı bölgeyle üst üste bulunduğu ortaya konmuştur [33, 38, 39]. Buna karşın; bu IgE epitoplara hiçbirisi kalıcı inek sütü alerjisi şüphesi taşıyan çocukların kanında teşhis edilmemiştir. Bütün bu yönleriyle α -LA'nın inek sütü alerjisindeki rolü halen tam olarak aydınlatılamamıştır.

Kazein

İnek sütü proteinlerinin %80'ini oluşturan kazein; α_{s1} , α_{s2} , β - ve κ -kazein olmak üzere 4 farklı fraksiyondan meydana gelmiştir. Kazein misellerindeki bu

fraksiyonların oranı sırasıyla %40, 12.5, 35 ve 12.5 şeklindedir. Diğer bir fraksiyon olan γ -kazein ise sütte çok düşük miktarlarda bulunur ve β -kazeinin sütün doğal enzimi olan plazmin tarafından proteolizi sonucu yan ürün olarak oluşur. Kazeinin biyolojik fonksiyonu; kalsiyum ve fosfat taşınımını sağlaması ve midede etkin bir sindirim için pıhtı oluşturmasıdır. En iyi bilinen özelliği pH 4.6'da düşük çözünürlük göstermesi ve çoğunlukla fosfat gruplarının serin aminoasidiyle esterleştiği konjüge bir protein olmasıdır [7]. Ayrıca yapısında disülfid bağı içermeyen kazein; düzenli sekonder yapıların oluşumunu engelleyen ve protein zincirinin sert bükülmesine neden olan prolin aminoasidini yüksek oranda içermektedir. Kazein misellerinin yapısında kalsiyum, fosfor, magnezyum, sodyum, potasyum ve sitraller mevcut olup bu kazeinat kompleksi sütte koloidal bir yapıda bulunmakta ve homojen bir yapı göstermemektedir [2].

α_{s1} -, α_{s2} - ve β -Kazein kümelerinin oluşumu yapılarında bulunan anyonik bölgeler sayesinde olmakta ve bu kümeler Ca^{+2} ve Zn^{+2} içeren metal iyonlarıyla çelât yapabilmektedirler. Bu kümelerin önemi kazeinlerin alerjenik potansiyeli hakkında bilgi edinmek açısından önem taşımaktadır [40]. Kazein fraksiyonları içerisinde α_{s1} -kazein en önemli alerjen olarak görülmektedir [5]. İnek sütü alerjisi olan hastalarda α_{s1} -kazeinin IgE ve IgG bağlayan major bölgelerini tanımlamak amacıyla sentetik peptidlerin kullanıldığı bir çalışmada, α_{s1} -kazein üzerinde 6 major ve 3 minör IgE bağlayan ve bir minör IgG bağlayan epitoplar tespit edilmiştir [41]. Alerjik hastaların büyük çoğunluğunun kazein fraksiyonlarının tümüne karşı duyarlı olduğu, hasta kanlarında kazeine karşı IgE cevaplarının büyük oranda farklılık gösterdiği ve bu durum ise kazein fraksiyonlarının oranlarının farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir. Ayrıca kazeindeki lineer IgE epitoplarının büyüklüğünün kalıcı alerjiye katkıda bulunduğu düşünülmektedir [18, 42]. Vila ve ark. [43] kalıcı alerji belirtileri bulunan alerjik çocukların kanında α_{s1} -kazein (69-78 nolu peptidler) ve β -kazeinden lineer epitoplara kadar spesifik IgE antikorlarının tümünün seviyesinin normal çocuklardan oldukça yüksek olduğunu belirlemiştir. Jarvinen ve ark. [44] ise yaptıkları çalışmada, kalıcı inek sütü alerjisi bulunan hastaların kanında 5 IgE bağlayan epitop tespit etmiş ve bunlardan ikisinin α_{s1} -kazein, birinin α_{s2} -kazein ve birinin ise κ -kazein üzerinde olduğunu saptamışlardır. Farklı bir çalışmada ise, 15 alerjik hastanın kanında α_{s1} -kazein üzerinde (19-30), (86-103) ve (141-150) nolu peptidlerden oluşan üç farklı dizilim tanımlanmış olup bunlardan (86-103) nolu peptidin en fazla immunoreaktif olduğu ortaya konulmuştur [45].

Sığır Serum Albumini

Sığır serum albumini, serum proteinlerinin yaklaşık %5 kadarını oluşturan ve molekül ağırlığı 66.4 kDa olan bir proteindir. Bu protein fiziksel ve immunolojik olarak insan kan serum albuminine çok benzemekle beraber, esas fonksiyonu; metabolizma, taşınım, ligandların dağıtımını ve serbest radikallerden koruma şeklindedir. Yapısında 17 adet disülfid bağı bulunduran sığır serum albumininin bu bağları proteinin çekirdeğinde korunur ve

kolaylıkla ulaşamaz [46, 47]. Bu durum, proteinin denaturasyon şartları altında dahi stabilitesinin oldukça yüksek olduğunun bir açıklaması olabilir. Sığır serum albuminindeki disülfid bağlarının varlığı bu molekülün yapısındaki doğal antijenik determinantların korunmasında önemli bir role sahiptirler [5]. Sığır serum albumininin proteolizi sonucu açığa çıkan fragmentlerin antijenik potansiyelinin araştırıldığı birkaç çalışmada tanımlanan epitopların birbiriyle uyum içinde olmadığı görülmüştür [48-50]. Diğer taraftan, bu proteinin alerji açısından en kritik dizisini (524-542) nolu peptidlerin oluşturabileceği ancak, farklı hayvan türlerinin antikorları kullanıldığında ise epitopik alanların değişebildiği bildirilmiştir [51].

Laktoferrin

Laktoferrin, molekül ağırlığı 76 kDa olan ve miktarı çoğunlukla %1'in altında bulunan demir bağlayan bir süt proteindir. Esas fonksiyonu; bakterilerin gelişimi için gerekli olan demiri ortamdan uzaklaştırmak suretiyle organizmayı enfeksiyonlara karşı korumaktır. Anne sütü ve kolostrumun laktoferrin içeriği inek sütüne kıyasla oldukça yüksektir [52, 53]. Taylor ve ark. [54] laktoferrine özgü IgE bulunduran bazı alerjik bireylerin olmasından dolayı inek sütü kaynaklı laktoferrinin potansiyel alerjenliğini tartışmışlardır. Ancak bu hastaların sütün esas alerjenlerine karşı doğrudan IgE oluşturmaları nedeniyle laktoferrinin alerji oluşturma özelliği hala tartışmalı bir konudur. Buna rağmen süt alerjisi bulunan hastalar bazılarında inek sütünde bulunan laktoferrine karşı oluturulan IgE seviyesinin tespit edilebilir düzeyde olduğu ve böyle laktoferrinin de süt alerjisi olabileceği bildirilmektedir [37]. Bununla birlikte fareler üzerinde yapılan deneylerde de laktoferrine karşı duyarlılık tespit edilmiştir [55]. Ancak yine de bugüne kadar yapılan çalışmalarda laktoferrinin IgE veya T hücreleri epitoplarının mevcudiyeti tespit edilmemiştir [5].

İmmunoglobulinler

Sütün immunoglobulin fraksiyonu toplam süt proteinlerinin %1'ini, serum proteinlerinin ise %6'sını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar; immunoglobulinin temel yapısının molekül içi veya moleküller arası disülfid bağlarıyla bağlı 4 polipeptid zincirinden oluşan Y şeklinde bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. İnek sütünde bulunan immunoglobulinler IgG, IgA ve IgM adı verilen 3 izotoptan oluşmaktadır [56]. Büyükbaş hayvanlarda IgG sınıfına ait IgG1, IgG2, IgG3 olmak üzere üç ayrı tip immunoglobulin tanımlanmıştır [57, 58]. İnek sütünde bulunan immunoglobulinlerin potansiyel alerjenliği ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır. Ancak yapılan bazı çalışmalarda alerjik hastalarda bulunan IgE tarafından IgG'nin bağlanması nedeniyle bu proteinin diğer bir süt alerjisi olduğunu öne sürülmüştür [59, 60]. Fakat IgG'nin T ve B hücreleri epitopları henüz aydınlatılmadığından IgG şimdiki kadar bir süt alerjisi olarak düşünülmemiştir [5].

Proteoz-pepton

Proteoz-pepton fraksiyonu süt proteinlerinin yaklaşık %1.1'ini oluşturan, ısıya son derece dayanıklı, asitte çözünebilir ve önemli fonksiyonel özellikleri bulunan protein fraksiyonudur. Bu protein β -kazeinin proteolizi sonucu oluşmakta ve miktarı plazminin enzimatik aktivitesi sonucu zamanla artmaktadır. Yapılan literatür taraması sonucunda, proteoz-peptonun alerjenik özelliği ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Özetle, inek sütü alerjisinin oluşumundan sadece tek bir protein sorumlu değildir. Tüm süt proteinleri özellikle serum proteinleri ve kazeinler potansiyel alerjenler olarak düşünülmektedir. İnek sütü proteinlerinin üç boyutlu yapısı konformasyonel epitoplara korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Buna ilaveten, inek sütü proteinlerinde bulunan spesifik aminoasit dizilimlerinin büyük bir kısmı B veya T hücreleri olarak bilinmektedir. İnek sütü proteinlerinin merkezine dağılmış olan böyle lineer epitoplara alerjik reaksiyonlardan sorumlu olabilmektedir.

İNEK SÜTÜ ALERJİSİ KONTROL YÖNTEMLERİ

Süt proteinleri alerjisinin tedavisi konusunda medikal tedavi yöntemleri henüz mevcut değildir. Ancak, son zamanlarda süt alerjisinin önlenmesine yönelik ilgi giderek artmaktadır. İnek sütü alerjisinin önüne geçilmesinde mevcut eğitim sütün tamamını diyetten çıkarma yönündedir. Ancak, yaşamın ilk yılında çok önemli bir role sahip temel gıda maddesi olan sütün uzun vadede diyetten çıkarılması bebeklerin gelişimini olumsuz yönde etkileyecektir. Bebekleri inek sütü alerjisinden korumanın en iyi yolu anne sütüyle beslenmeleridir. Fakat bebeklerin ilk 6 aylık döneminde tek başına anne sütüyle beslenmenin yeterli olmadığı durumlarda inek sütünün az alerjenik bir formülasyonunun kullanılması gerekmektedir. Az alerjenik süt ürünlerinin geliştirilmesi amacıyla epitoplara parçalanması ve süt proteinlerinin alerjenliğinin azaltılması yönünde çeşitli işleme teknolojilerine başvurulmaktadır. Bunlar; ısı işlemi, enzimatik hidroliz, maillard reaksiyonu, yüksek basınç ve fermentasyon gibi işlemlerdir.

Isıl İşlem

Isıl işlem, birçok süt ürününün üretiminde kullanılan çok önemli bir süreçtir ve patojenleri yok etmek, böylece ürünün sağlık açısından güvenilirliğini artırmak ve mikroorganizma yükünü azaltarak raf ömrünü uzatmak amacıyla uygulanmaktadır [61]. Ayrıca, ısı işlemi esnasında protein denatürasyonu, agregasyon ve Maillard reaksiyonları gibi önemli yapısal ve kimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler süt proteinlerinin alerjenliği üzerine de bazı etkiler yapabilmektedir.

Süt proteinleri arasında ısı stabilitesi en yüksek olan protein kazeindir. Serum proteinlerinin ısıya duyarlılığı ise sırasıyla immunoglobulinler < sığır serum proteini < β -LG < α -LA şeklindedir. Sütün 120°C'de 15 dakika süreyle ısı işlemine tabi tutulması kazeinin antikor oluşturma

özelliği (antigenicity) üzerine hiçbir etki yapmazken, 70-80 veya 100°C'lerdeki ısı işlemi sığır serum albumini ve Ig'lerin alerji yapma özelliğini (allergenicity) tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmektedir [62].

Baldo [63] tarafından yapılan bir çalışmada, 80 ve 100°C'de 15 dak. ısı işlemi IgE, sığır serum albumini ve β -LG'nin fiksasyonu kapasitesinde bir düşüşe yol açtığı, ancak α -LA ve kazeinde herhangi bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise β -LG solusyonunun veya sütün, 74°C'ye ısıtıldığında β -LG'nin IgE bağlama yeteneğinde çok az düşüş belirlendiği buna karşın 90°C'de daha önemli bir düşüşün olduğu saptanmıştır [64]. Diğer taraftan, β -LG'nin denatürasyonu sonucu bazı yeni epitoplara da ortaya çıktığı gözlenmiştir [65]. Bu ve ark. [66] serum protein izolatlarındaki α -LA ve β -LG'nin antikor oluşturma özelliği üzerine ısı işlemi etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, sıcaklığın 50'den 90°C'ye çıkmasıyla α -LA ve β -LG'nin antikor oluşturma özelliğinin arttığını belirlemişlerdir. Bu artışın ısı işlemi esnasında proteinlerin konformasyonel yapılarındaki açılma sonucu doğal moleküllerin içinde bulunan alerjenik epitoplara açığa çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [67]. Ancak, 90°C'nin üzerine çıkıldığında ise her iki proteinin antikor oluşturma özelliğinde dikkate değer bir azalma kaydedilmiştir. Bu azalma sebebinin ise, ısı işlemi sırasında meydana gelen agregasyon ve sülfidril/disülfid değişimleri sonucunda molekülün yüzeyinde açığa çıkan konformasyonel epitoplara maskelenmesi veya parçalanması olabileceği bildirilmiştir [28]. Diğer taraftan, 120°C'de 20 dakikalık bir ısı işlemi uygulandığında α -LA'nın antijenik özelliğinde başlangıca göre %25'lik bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, daha yüksek ısı şartlarında meydana gelen Maillard reaksiyonu sonucu lineer epitoplara kaybolmasına bağlı olarak antikor oluşturma özelliğinin azalması nedeniyle ortaya çıkmaktadır [65]. Diğer taraftan, bu azalma protein çözünürlüğünün düşmesi nedeniyle de olabilmektedir [68]. Benzer şekilde, Kleber ve Hinrich [28] yaptıkları çalışmada, yağsız süt ve tatlı peyniraltı suyundaki β -LG'nin antikor oluşturma özelliğinin artan ısı işlemi sıcaklığı (50°C'den 80°C'ye) ile birlikte arttığını, 90°C'nin üzerinde ise azaldığını tespit etmişlerdir. Bu durum, inek sütü proteinlerinin antikor oluşturma özelliğinin azaltılmasında yüksek ısı işlemi uygulamasının avantajlı olabileceğini göstermektedir. Bütün bunlara rağmen yapılan farklı araştırmalarda yüksek sıcaklıklarda kazeinlerin antikor oluşturma özelliğinde herhangi bir değişikliğin olmadığı [62], denature β -LG'nin ise doğal β -LG'e nazaran bağırsak mukozasında lokal immunolojik reaksiyonu teşvik ettiği de saptanmıştır [69]. Buna ilaveten, çok yüksek ısı işlemi uygulamalarının süt proteinlerinin alerji yapma özelliğini azaltsa bile, ürünün besin değerinde azalmalara ve duyuşsal özelliklerine (renk, görünüş, tat, koku, kinestetik özellik gibi) istenmeyen değişimlere neden olacağı da unutulmamalıdır. Bu yüzden, inek sütü alerjenleri üzerine ısı işlemi etkilerinin araştırıldığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz süt proteinlerinin alerji yapma özelliğinin azaltılmasında ve alerjenik epitopların parçalanmasında kullanılan etkili yöntemlerden birisidir [70-72]. Enzim hidrolizi tarafından alerjenliğin azalması proteinlerin küçük peptid moleküllerine ve aminoasitlere parçalanması sonucu sağlanır. Buna ilaveten, proteolitik proteinlerin çözünürlük, emülsiyon kapasitesi, köpürme ve jel oluşturma kapasiteleri gibi fonksiyonel özelliklerini de iyileştirir. Proteolitik enzimler hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda geniş ölçüde mevcut olup, bazı gıda kaynaklı proteinazlar antikor oluşturma özelliği azaltılmış serum protein hidrolizatlarının üretiminde kullanılmaktadır.

Araştırmacılar, serum proteinlerinin antikor oluşturma özelliğinin tripsin hidrolizi ile azalabileceğini ortaya koymuşlardır [73]. Bununla birlikte, antikor oluşturma özelliğinin azaltılmasında papain ve nötraz veya alkalaz veya proteaz S gibi enzim kombinasyonlarının kullanımının tek başına enzim kullanımına nazaran daha etkili olduğunu saptamışlardır [74]. Ancak enzimatik işlem gören ürünlerde proteoliz sonucu açığa çıkan peptid ve aminoasitler nedeniyle gelişen acı ve istenmeyen lezzet gıdanın kabul edilebilirliğini azaltmaktadır. Aynı zamanda, böyle ürünlerin proteolitik sindirimi esnasında da yeni antijenik gruplar oluşabilmektedir [15]. Bununla ilgili olarak yapılan bir çalışmada, alerjik hastaların kanında inek sütünün pepsin veya pepsin+tripsin enzimlerince kısmi sindirimi sonucu IgE'ye bağlanan peptidler tespit edilmiştir [71].

Hidroliz işleminde enzim çeşidinin farklı oluşu, hidroliz modeli ve derecesi gibi faktörler tat ve aromanın yanı sıra, peptid kompozisyonu ve kalıntı hidrolizatın antikor oluşturma özelliği üzerine etkili olabilmektedir. Ena ve ark. [75] tarafından yapılan çalışmada, serum protein hidrolizatlarında molekül ağırlığı 3400 Da'dan düşük peptidlerin alerjenik reaksiyon oluşturmadığı ortaya konulmuştur. Benzer şekilde, Van Hoeyveld ve ark. [76] yaptıkları çalışmada ultrafiltre edilmiş serum hidrolizatlarında molekül ağırlığı 2600 Da'dan daha büyük peptidlerin IgE'ye bağlanmayı önlediğini ve cilt üzerine pozitif etki sağlandığını, ancak molekül ağırlığı 1400 Da'dan daha düşük peptidlerin aynı etkiyi göstermediğini saptamışlardır. Bazı araştırma sonuçları ise serum proteinlerinin kalıntı antikor oluşturma özelliği üzerine moleküler ağırlık ve hidroliz derecesinden ziyade enzim spesifikliğinin daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, proteinlerin antikor oluşturma özelliğinin azaltılmasında antijenik epitoplara spesifikliği bulunan uygun enzimlerin seçilmesinin önemli olduğu vurgulanmaktadır. Enzimatik hidroliz ve ısı uygulamasının kombine edildiği çalışmalarda ise tripsin ve peptidaz enzimlerinin etkisiyle oluşan hidrolizin α -LA ve β -LG'nin alerjenik özelliğini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu durumun, ısı denaturasyonu protein bağlarının kırılmasını teşvik ederek proteolize duyarlılığının artmasıyla açıklanabileceği bildirilmektedir [77, 78].

İnek sütünün alerjik hastaların diyetinden çıkarılması durumunda, hastaların normal gelişimleri

sürdürebilmeleri için besinsel gereksinimlerini karşılayabilecek ve inek sütünün yerini alabilecek formulasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. İnek sütü proteinlerinin alerjenik özelliğinin azaltılmasına yönelik olarak hidrolizat formulasyonları geliştirilmektedir. Bu amaçla geliştirilmiş olan ilk hidrolize formulasyon 1985 yılında Nestle (Beba HA, Good Start, NAN HA, Nestlé) tarafından üretilmiştir. Hâlihazırda marketlerde serum proteinleri ve kazeinin kısmi veya tam hidrolize edilmiş az alerjenik formulasyonları mevcuttur. Tam hidrolize kazein hidrolizat formulasyonlarının alerjik çocukların beslenmesinde rahatlıkla kullanılabileceği [79] ve sadece tam hidrolize formulasyonların inek sütü alerjisinin önemli derecede önüne geçtiği bildirilmektedir [80]. Bununla birlikte, kısmi hidrolizatların da daha üstün lezzet ve besinsel özellikleri nedeniyle yüksek alerji riski taşıyan bebeklerin inek sütü alerjisinden korunmalarını sağlamak amacıyla beslenmelerinde kullanılabileceği klinik deneyler sonucu ortaya konmuştur [6, 81, 82].

Maillard Reaksiyonu

Maillard reaksiyonu indirgen şekerlerle aminoasitler arasında genellikle gıdaların işlenmesi sırasında meydana gelen enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarından biridir. Bu reaksiyon proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin etkili bir şekilde iyileştirilmesini sağlamakla beraber gıda proteinlerinin alerjenliğinin giderilmesinde de tavsiye edilen bir metod olarak düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar Maillard reaksiyonu sonucu laktoza bağlanmış β -LG'nin epitop alanının değiştiğini [83] ve IgE bağlama yeteneğinin azaldığını, bu azalmanın da bağlanma derecesi ve modifiye aminoasit gruplarının miktarı ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur [84]. Bununla birlikte, β -LG'nin asidik oligosakkaritlerle konjugasyonunun ısı stabilitesini artırdığı, antikor oluşturma özelliğini azalttığı ve bu durumun konjugasyon sonucu epitopların örtülmesi nedeniyle olduğu bildirilmiştir [85].

Maillard reaksiyonu tarafından proteinlerin antikor oluşturma özelliğinin azalmasında proteinlere bağlanan şekerlerin miktarı ve molekül ağırlığı büyük önem arz etmektedir. Wróblewska ve Jedrychowski [86] serum proteinlerinin poletilen glikol ile konjugasyonu sonucu artan polietilen glikol miktarının serum proteinlerinin immuno reaktif özelliklerini azalttığını tespit etmişlerdir. Hattori ve ark. [87] β -LG'nin karboksi metil dekstran ile konjugasyonunda karboksi metil dekstran içeriğinin artmasıyla β -LG'nin alerjenliğinin azaldığı sonucuna varmışlardır. Benzer sonuç Kobayashi ve ark. [88] tarafından da saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak miktarı ve molekül ağırlığı yüksek şekerlerle konjugasyonun proteinlerin antikor oluşturma özelliğinin azaltılmasında oldukça etkili olabileceği söylenebilir.

Maillard reaksiyonunun derecesi ve reaksiyon koşulları da süt proteinlerinin alerjenik özellikleri üzerine etkilidir. β -LG ve α -LA'nın antijenitesi üzerine Maillard reaksiyonu koşullarının etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, serum protein izolatlarının glukozla konjugasyonunun optimum reaksiyon şartlarında %90'ın üzerinde antikor oluşturma özelliğini azalttığı görülmüştür. Ayrıca, bu azalmanın

şeker/protein oranı, sıcaklık ve reaksiyon süresi gibi üç bağımsız reaksiyon koşulunun düzenlenmesiyle sağlanmış olabileceği bildirilmiştir [89].

Yapılan araştırmalar ışığında kontrollü Maillard reaksiyonu koşullarında süt proteinlerinin alerjenliğinin azaldığı söylenebilir. Ancak, Maillard reaksiyonunun potansiyel dezavantajları (renk ve lezzet değişimleri, lizin aminoasidinde meydana gelen kayıplar vs.) ve konjugasyon yüzünden yeni epitoplara oluşabilme ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır.

Yüksek Basınç

Yüksek basınç uygulaması; gıda üretimi, işlenmesi ve korunmasında geleneksel ısı işlemlere alternatif olarak uygulanan en yeni teknolojik yöntemlerden birisidir [90, 91]. Bu yöntem ile mikrobiyal popülasyonun azaltılması, duyu ve besinsel özelliklerin korunması, sıcaklığa duyarlı vitaminler gibi bileşenlerin korunması gibi faydalar sağlanmaktadır [92]. Yüksek basınç uygulaması aynı zamanda süt proteinlerinde denaturasyon ve β -LG agregatlarının oluşumu gibi yapısal değişikliklere de neden olarak süt proteinlerinin alerjenik potansiyeli üzerine etkili olabilmektedir [93]. Proteinlerin basınçla denaturasyonu çok kompleks bir olay olmakla beraber prensip olarak hidrofobik bağların ve tuz köprülerinin yıkımını takiben meydana gelmektedir. Ayrıca, yüksek basınç sonucu proteinlerde bir takım değişikliklerin meydana gelmesi, proteinin doğal yapısının yanı sıra iyonik kuvvetler, sıcaklık, pH ve uygulanan basıncın şiddetine bağlıdır [93, 94]. Buna ilaveten, yüksek hidrostatik basıncın proteinlerin enzimatik hidrolizini hızlandırarak hidrolizatların antikor oluşturma özelliğinin azalmasını sağladığı bildirilmektedir [95]. Yapılan çalışmalar, 0.1 MPa'dan 300 MPa'a kadar uygulanan basıncın β -LG'nin pepsin, kimotripsin ve termolisin enzimleri tarafından hidrolizini artırdığını ortaya koymuştur [92, 96, 97, 98]. Bununla birlikte, 500 MPa'dan daha yüksek bir basınç uygulamasının β -LG'nin konformasyonel yapısının tamamen açılmasına [99] ve çözünür disülfid bağlı moleküller arası agregatların oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir [100].

Yüksek basınç (600 MPa) ile ısı işleminin (50 °C'de 60 dak.) birlikte kullanıldığı bir çalışmada; β -LG'nin β -tabakalı yapısının α -heliks yapıya dönüştüğü saptanmıştır [101]. Enzimatik hidroliz ile yüksek basınç uygulamasının kombine edilmesiyle de serum protein hidrolizatlarının alerjenik özelliklerinin etkili bir şekilde bertaraf edilmesi sağlanmaktadır [102, 103]. Proteinlerin konformasyonel yapısında değişikliklere sebep olan yüksek basınç uygulaması, serum proteinlerinin birçok enzim tarafından hidrolizini de artırmakta ve hidrolizatların antikor oluşturma özelliklerini azaltmaktadır. Penas ve ark. [104] tarafından yapılan çalışmada, enzimatik hidroliz öncesi veya enzimatik hidroliz esnasında uygulanan yüksek basınç (300 MPa) uygulamasının inek serum protein hidrolizatlarının korolaz PN-L ve nötraz enzimleri tarafından hidrolizi sonucu alerji yapma özelliklerini azalttığı tespit edilmiştir. Bu azalma, potansiyel olarak immunojenik hidrofobik bölgelere enzimin ulaşılabilirliğinin yüksek hidrostatik

basınç sayesinde artması ile açıklanabilir [102]. Diğer taraftan, başka bir çalışmada, farklı sıcaklık (30-68 °C) ve farklı yüksek basınç (200-300 MPa) uygulamalarının tatlı peyniraltı suyu ve yağsız sütün serum protein izolatlarındaki β -LG'nin antikor oluşturma özelliğini artırdığı belirlenmiştir. Bu durumun doğal protein molekülü içerisinde bulunan epitoplara açığa çıkması ve yüksek basınç sayesinde açılma ve kümeleşmenin teşvik edilmesi sonucu bu epitoplara antikorlar için ulaşılabilirliğini kolaylaştırılmasıyla açıklanabileceği bildirilmiştir [67]. Özetle, süt proteinlerinin hidrolizi esnasında yüksek basınç uygulanması az alerjenik serum protein hidrolizatlarının üretimi için etkili bir yöntem olarak düşünülebilir.

Fermantasyon

Fermantasyon; kısaca şekerlerin mikroorganizmalar tarafından parçalanması olarak tanımlanmaktadır. Fermente gıdalar; özellikle mikroorganizmalar tarafından proteinlerin parçalanması sonucu açığa çıkan biyoaktif peptidler nedeniyle insan sağlığı üzerine yararlı etkileri bulunan gıdalardır [105, 106]. Laktik asit bakterilerinin proteozlar, peptidazlar ve transport sistemlerden oluşan kompleks bir proteolitik sisteme sahip oldukları bilinmektedir. Süt proteinlerinin alerji yapma özelliğini azaltmada önerilen metotlardan birisi de laktik asit fermantasyonudur. Fermantasyon esnasında süt proteinlerinin hidrolizi sonucu süt sindirimi ve biyoaktif bileşiklerin oluşumu üzerine sağlanan olumlu etkilerin yanı sıra bazı epitoplara parçalanması ve böylece alerjenliğin azaltılması da söz konusu olabilmektedir [107, 108]. Bununla birlikte, fermantasyon işleminin yalnızca probiyotik laktik asit bakterilerinin kullanılması durumunda proteinlerin alerjenliğini azaltmada yararlı olabileceği bildirilmektedir [5]. Araştırmacılar, *Lactobacillus* GG gibi probiyotik bakterilerin atopik dermatit ve gıda alerjisi olan hastaların iç bariyer mekanizmasını harekete geçirerek ve bağırsak iltihabını hafifleterek gıda alerjisi tedavisinde faydalı olabileceğini göstermişlerdir [109]. Bu ve ark. [110] yaptıkları çalışmada, laktik asit fermantasyonunun yağsız sütteki α -LA ve β -LG'nin antijenliğini önemli derecede azalttığını ve ayrıca *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus* suşlarının birlikte kullanılmasının hem α -LA (inhibisyon oranı %87), hem de β -LG'nin (inhibisyon oranı %95) antikor oluşturma özelliklerinin azaltılmasında çok daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Tzvetkova ve ark. [111] tarafından yapılan bir çalışmada, yoğurttan izole edilen 21 laktobasil suşunun elektroforez ve RP-HPLC sonucu α -LA ve β -LG'ye karşı farklı proteolitik aktivite gösterdikleri ve laktobasil fermantasyonunun süt alerjenlerinin yıkımını teşvik ettiği saptanmıştır. Farklı bir çalışmada ise, sterilize inek sütündeki serum proteinlerinin fermantasyondan sonra antikor oluşturma özelliklerinin çiğ süte kıyasla %99'un üzerinde azaldığı, ancak alerji oluşturma özelliklerinin fazla değişmediği tespit edilmiştir [112]. Bu çalışmalarda proteinlerin antijenik özelliklerinin azaltılmasında saptanan farklılıklar, kullanılan laktik asit bakterisi suşlarının proteoz enzimi spesifliği ve hidroliz yeteneklerinin çeşitliliğinden kaynaklanmış olabilir.

SONUÇ

Süt proteinleri alerjisinin tedavisi konusunda tıbbi yöntemler henüz mevcut olmadığından dolayı, alerjenliğin azaltılması için çeşitli işleme teknolojileri uygulanarak antijenik özellikleri azaltılmış süt ürünlerinin üretilmesi mümkün olabilir. Bununla birlikte, farklı işleme teknolojilerinin kombine kullanımı alerjenliğin azaltılmasında daha etkili olabilmektedir. Ancak, çok yüksek ısı işlem ve diğer teknolojik uygulamaların süt proteinlerinin alerji yapma özelliğini azaltmasının yanında, ürünün besin değerinde azalmalara, protein denatürasyonu, agregasyon ve Maillard reaksiyonları gibi önemli yapısal ve kimyasal değişiklikler ile duyu özelliklerinde (renk, görünüş, tat, koku, kinestetik özellik gibi) istenmeyen değişimlere neden olacağı unutulmamalıdır. Buna ilaveten, yeni antijenik özelliğe sahip maddelerin oluşabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, inek sütünün alerjenik özelliğinin azaltılması konusunda daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Bock, S.A., Sampson, H.A., Atkins, F.M., Zeiger, R.S., Lehrer, S., Sachs, M., Bush, R.K., Metcalfe, D.D., 1988. Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge (Dbpcfc) as an Office Procedure - a Manual. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82 (6): 986-997.
- [2] Kavas, G., 2008. İnek sütü proteinlerine bağlı alerji olgusu. *Hasad Gıda* 24 (278): 26-31.
- [3] Wilson, N.W., Hamburger, R.N., 1988. Allergy to Cow's Milk in the 1st Year of Life and Its Prevention. *Ann. Allergy* 61 (5): 323-328.
- [4] Isolauri, E., 1997. Cow-milk allergy. *Environ Toxicol Phar* 4 (1-2): 137-141.
- [5] Monaci, L., Tregoat, V., Hengel, A.J., Anklam, E., 2006. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *Eur. Food Res. Tech.* 223 (2): 149-179.
- [6] Exl, B.M., Fritsche, R., 2001. Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention. *Nutrition* 17 (7-8): 642-651.
- [7] Fiocchi, A., Brozek, J., Schunemann, H., Bahna, S.L., von Berg, A., Beyer, K., Bozzola, M., Bradsher, J., Compalati, E., Ebisawa, M., Guzman, M.A., Li, H., Heine, R.G., Keith, P., Lack, G., Landi, M., Martelli, A., Rance, F., Sampson, H., Stein, A., Terracciano, L., Vieths, S., 2010. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 21 Suppl 21: 1-125.
- [8] Dreborg, S., 1995. Allergen Levels Causing Sensitization, Bronchial Hyperreactivity and Asthma. *Pediat. Allerg. Imm.* 6: 22-26.
- [9] Isolauri, E., Turjanmaa, K., 1996. Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 9-15.
- [10] Guo, B.H., 2001. *Dairy Chemistry*. Beijing: China Light Industry Press.
- [11] Fox, P.F., 2003. *Advanced Dairy Chemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Press.
- [12] Sawyer, L., Kontopidis, G., 2000. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482: 136-148.
- [13] Reddy, I.M., Kella, N.K.D., Kinsella, J.E., 1988. Structural and conformational basis of the resistance of beta-lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *J. Agric. Food Chem.* 36: 737-741.
- [14] Wal, J.M., 2001. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 56: 35-38.
- [15] El-Agamy, E.I., 2007. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Res.* 68: 64-72.
- [16] Goldman, A.S., Anderson, D.W., Sellers, W.A., Saperstein, S., Kniker, W.T., Halpern, S.T., 1963. Milk allergy. I. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics* 32: 425-443.
- [17] Docena, G.H., Fernandez, R., Chirido, F.G., Fossati, C.A., 1996. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 51 (6): 412-416.
- [18] Bernard, H., Creminon, C., Yvon, M., Wal, J.M., 1998. Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115 (3): 235-244.
- [19] Busse, P.J., Jarvinen, K.M., Vila, L., Beyer, K., Sampson, H.A., 2002. Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha (S2) casein in cow's milk allergic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129(1): 93-96.
- [20] Cocco, R.R., Jarvinen, K.M., Sampson, H.A., Beyer, K., 2003. Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in alphas1-casein, a major cow's milk allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112(2): 433-437.
- [21] Spies, J., 1973. Milk allergy. *J. Milk Food Technol.* 36: 225-231.
- [22] Wal, J.M., 2002. Cow's milk proteins/allergens. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89: 3-10.
- [23] Kleber, N., Krause, I., Illgner, S., Hinrichs, J., 2004. The antigenic response of α -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. *Eur. Food Res. Technol.* 219: 105-110.
- [24] Sharma, S., Kumar, P., Betzel, C., Singh, T.P., 2001. Structure and function of proteins involved in milk allergies. *J. Chromatogr. B* 756: 183-187.
- [25] Fritsche, R., 2003. Role for technology in dairy allergy. *Aust. J. Dairy Technol.* 58: 89-91.
- [26] Pittia, P., Wilde, P.J., Husband, F.A., Clark, D.C., 1996. Functional and structural properties of β -lactoglobulin as affected by high-pressure treatment. *J. Food Sci.* 61(6): 1123-1127.
- [27] Pescuma, M., Hebert, E.M., Dagalarrondo, M., Haertle, T., Mozzi, F., Hobert, J.M., Valdez, G.F., 2009. Effect of exopolysaccharides on the hydrolysis of β -lactoglobulin by lactobacillus acidophilus crlin an in vitro gastric/pancreatic system. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5571-5577.
- [28] Kleber, N., Hinrichs, J., 2007. Antigenic response of β -lactoglobulin in thermally treated bovine skim milk and sweet whey. *Milchwissenschaft* 62: 121-124.

- [29] Sawyer, L., Barlow, P.N., Boland, M.J., Creamer, L.K., Denton, H., Edwards, P.J.B., Holt, C., Jameson, G.B., Kontopidis, G., Norris, G.E., Uhrinova, S., Wu, S.Y., 2002. Milk protein structure-what can it tell the dairy industry? *Int. Dairy J.* 12: 299–310.
- [30] Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C., Sawyer, L., 1997. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5: 481–495.
- [31] Breiteneder, H., Mills, E.N., 2005. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 115:14–23.
- [32] Selo, I., Clement, G., Bernard, H., Chatel, J.M., Creminon, C., Peltre, G., Wal, J., 1999. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin. Exp. Allergy* 29: 1055–1063.
- [33] Järvinen, K.M., Chatchatee, P., Bardina, L., Beyer, K., Sampson, H.A., 2001. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126: 111–118.
- [34] Hinrichs, J., Rademacher, B., 2005. Kinetics of combined thermal and pressure-induced whey protein denaturation in bovine skim milk. *Int. Dairy J.* 15: 315–323.
- [35] McKenzie, H.A., 1996. Alpha-lactalbumins and lysozymes. *EXS* 75: 365–409.
- [36] Brew, K., Grobler, J., 1992. α -Lactalbumin. In: Fox P (ed) *Advances in Dairy Chemistry*, Elsevier Applied Sciences, NewYork, pp. 191–229.
- [37] Wal, J.M., 1998. Cow's milk allergens. *Allergy* 53: 1013–1022.
- [38] Adams, S.L., Barnett, D., Walsh, B.J., Pearce, R.J., Hill, D.J., Howden, M.E., 1991. Human IgE-binding synthetic peptides of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin. In vitro cross-reactivity of the allergens. *Immunol. Cell Bio.* 69: 191–197.
- [39] Maynard, F., Jos, R., Wal, J.M., 1997. Human IgE binding capacity of tryptic peptides from bovine α -lactalbumin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113: 478–488.
- [40] Bernard, H., Meisel, H., Creminon, C., Wal, J.M., 2000. Phosphorylation is a posttranslational event which affects IgE binding capacity of caseins. *FEBS Lett.* 467:239–244.
- [41] Chatchatee, P., Jarvinen, K.M., Bardina, L., Beyer, K., Sampson, H.A., 2001. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on α _{s1}-casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 379–383.
- [42] Sicherer, S.H., Sampson, H.A., 1999. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin. Exp. Allergy* 29:507–512.
- [43] Vila, L., Beyer, K., Jarvinen, K.M., Chatchatee, P., Bardina, L., Sampson, H.A., 2001. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin. Exp. Allergy* 31:1599–1606.
- [44] 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 533 allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110: 293–297.
- [45] Spuerger, P., Mueller, H., Walter, M., Schiltz, E., Forster, J., 1996. Allergenic epitopes of bovine α _{s1}-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy* 51: 306–312.
- [46] Carter, D.C., Ho, J.X., 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45:153–203 63.
- [47] Restani, P., Ballabio, C., Cattaneo, A., Isoardi, P., Terracciano, L., Fiocchi, A., 2004. Characterization of bovine serum albumin epitopes and their role in allergic reactions. *Allergy* 59:21–24.
- [48] Peters, T., Feldhoff, R.C., Reed, R.G., 1977. Immunochemical studies of fragments of bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* 252:8464–8468.
- [49] Atassi, M.Z., Habeeb, A.F., Lee, C.L., 1976. Immunochemistry of serum albumin-II. Isolation and characterization of a fragment from the first third of bovine serum albumin carrying almost all the antigenic reactivity of the protein. *Immunochemistry* 13:547–555 68.
- [50] Karjalainen, J., Martin, J.M., Knip, M., Ilonen, J., Robinson, B.H., Savilahti, E., Akerblom, H.K., Dosch, H.M., 1992. A bovine serum albumin peptide as a possible trigger of insulin dependent diabetes mellitus. *N. Engl J. Med.* 327:302–307.
- [51] Beretta, B., Conti, A., Fiocchi, A., Gaiaschi, A., Galli, C.L., Giuffrida, M.G., Ballabio, C., Restani, P., 2001. Antigenic determinants of bovine serum albumin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126:188–195.
- [52] Schanbacher, F.L., Goodman, R.E., Talhouk, R.S., 1993. Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J. Dairy Sci.* 76:3812–383172.
- [53] Indyk, H.E., Filonzi, E.L., 2005. Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis. *Int. Dairy J.* 15:429–438;
- [54] Taylor, S.L., Hefle, S.L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S.A., Burks, A.W., Christie, L., Hill, D.J., Host, A., Hourihane, J.O., Lack, G., Metcalfe, D.D., Moneret-Vautrin, D.A., Vadas, P.A., Rance, F., Skrypec, D.J., Trautman, T.A., Yman, I.M., Zeiger, R.S., 2002. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 24–30.
- [55] Adel-Patient, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Creminon, C., Wal, J., 2005. Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy* 60:658–664.
- [56] Knight, K.L., Becker, R.S., 1987. Isolation of genes encoding bovine IgM, IgG, IgA and IgE chains. *Vet. Immunol Immunopathol.* 17:17–24.
- [57] Heyermann, H., Butler, J.E., Frangione, B., 1992. The heterogeneity of cattle IgG2. V. Differences in the primary structure of cattle IgG2 allotypes. *Mol. Immunol.* 29:1147–1152.
- [58] Rabbiani, H., Brown, W., Butler, J., Hammarstrom, L., 1997. Genetic polymorphism of the *IGHG3* gene in cattle. *Immunogenetics* 46:326–331.
- [59] Lefranc-Millot, C., Vercaigne-Marko, D., Wal, J.M., Lepretre, A., Peltre, G., Dhulster, P., Guillochon, D.,

1996. Comparison of the IgE titers to bovine colostral G immunoglobulins and their F(ab')₂ fragments in sera of patients allergic to milk. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110:156–162.
- [60] Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Peltran, A., Garoffo, L.P., Valentini, S., Fabris, C., Bertino, E., Coscia, A., Conti, A., 2004. Cow's milk allergens identification by twodimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Mol. Nutr. Food Res.* 48:363–369.
- [61] Oldfield, D.J., Singh, H., Taylor, M.W., 2005. Kinetics 577 of heat-induced whey protein denaturation and aggregation in skim milks with adjusted whey protein concentration. *J. Dairy Res.* 72: 369–378.
- [62] Hanson, L.A., Mansson, I., 1961. Immune electrophoretic studies of bovine milk and milk products. *Acta Paediatr.* 50: 480–484.
- [63] Baldo, B.A., 1984. Milk allergies. *Aust. J. Dairy Tech.* 39: 120–128.
- [64] Ehn, B.M., Ekstrand, B., Bengtsson, U., Ahlstedt, S., 2004. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1398–1403.
- [65] Davis, P.J., Williams, S.C., 1998. Protein modification by thermal processing. *Allergy* 53: 102–105.
- [66] Bu, G.H., Luo, Y.K., Zheng, Z., Zheng, H., 2009. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate. *Food Agric. Immunol.* 20: 195–206.
- [67] Kleber, N., Maier, S., Hinrichs, J., 2007. Antigenic response of bovine β -lactoglobulin influenced by ultra-high pressure treatment and temperature. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 8: 39–45.
- [68] Mierzejewska, D., Kubicka, E., 2006. Effect of temperature on immunoreactive properties of the cow milk whey protein β -lactoglobulin. *Milchwissenschaft* 61: 69–72.
- [69] Rytönen, J., Karttunen, T.J., Karttunen, R., Valkonen, K.H., Jenmalm, M.C., Alatosava, T., Björkstén, B., Kokkonen, J., 2002. Effect of heat denaturation on beta-lactoglobulin-induced gastrointestinal sensitization in rats: Denatured β -LG induces a more intensive local immunologic response than native β -LG. *Pediatr. Allergy Immunol.* 13: 269–277.
- [70] Heyman, M., 1999. Evaluation of the impact of food technology on the allergenicity of cow's milk proteins. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 587–592.
- [71] Haddad, Z.H., Kalra, V., Verma, S., 1979. IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digest of α -lactoglobulin: significance in food hypersensitivity. *Ann. Allergy* 42: 368–371.
- [72] Alting, A.C., Meijer, R.J., van Beresteijn, E.C., 1998. Selective hydrolysis of milk proteins to facilitate the elimination of the ABBOS epitopes of bovine serum albumin and other immunoreactive epitopes. *J. Food Prot.* 61 (8): 1007–1012.
- [73] Pahud, J.J., Monti, J.C., Jost, R., 1985. Allergenicity of whey protein: its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4: 408–413.
- [74] Nakamura, T., Sado, H., Syukunobe, Y., Hirota, T., 1993. Antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by combination of two proteases. *Milchwissenschaft* 48: 667–670.
- [75] Ena, J.M., Van Beresteijn, E.C.H., Robben, A.J.P.M., Schmidt, D.G., 1995. Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatin combination. *J. Food Sci.* 60: 104–110.
- [76] Van Hoeyveld, E.M., Escalona-Monge, M., De Swert, L.F.A., Stevens, E.A.M., 1998. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula. *Clin. Exp. Allergy* 28: 1131–1137.
- [77] Bertrand-Harb, C., Baday, A., Dalgalarondo, M., Chobert, J.-M., Haertle, T., 2002. Thermal modifications of structure and co-denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. *Nahrung* 46: 283–289.
- [78] Peyron, S., Mouécoucou, J., Frémont, S., Sanchez, C., Gontard, N., 2006. Effects of heat treatment and pectin addition on beta-lactoglobulin allergenicity. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5643–5650.
- [79] Terheggen-Lagro, S.W., Khouw, I.M., Schaafsma, A., Wauters, E.A., 2002. Safety of a new extensively hydrolysed formula in children with cow's milk protein allergy: a double blind crossover study. *BMC Pediatr.* 2: 10.
- [80] Businco, L., Bruno, G., Giampietro, P.G., 1999. Prevention and management of food allergy. *Acta Paediatr. Suppl.* 88: 104–109.
- [81] Chan, Y.H., Shek, L.P.C., Aw, M., Quak, S.H., Lee, B.W., 2002. Use of hypoallergenic Formula in the prevention of atopic disease among Asian children. *J. Paediatr. Child. Health* 38: 84–88.
- [82] Blecker, U., 1997. Role of hydrolyzed formulas in nutritional allergy prevention in infants. *South Med. J.* 90: 1170–1175.
- [83] Morgan, F., Bouhallab, S., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.L., Léonil, J., 1998. Lactolation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry. *Int. Dairy J.* 8: 95–98.
- [84] Taheri-Kafrani, A., Gaudin, J.C., Rabesona, H., Nioi, C., Agarwal, D., Drouet, M., Chobert, J.M., Bordbar, A.K., Haertlft, T., 2009. Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *J. Agric. Food Chem.* 57 (11):4974–4982.
- [85] Hattori, M., Miyakawa, S., Ohama, Y., Kawamura, H., Yoshida, T., To-o, K., Kuriki T, Takahashi K. 2004. Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4546–4553.
- [86] Wróblewska, B., Jedrychowski, L., 2002. Effect of conjugation of cow milk whey protein with polyethylene glycol on changes in their immunoreactive and allergic properties. *Food Agric. Immunol.* 14: 155–162.
- [87] Hattori, M., Nagasawa, K., Ohgata, K., Sone, N., Fukuda, A., Matsuda, H., Takahashi, K., 2000. Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Bioconjugate Chem.* 11: 84–93.

- [88] Kobayashi, K., Hirano, A., Ohta, A., Yoshida, T., Takahashi, K., Hattori, M., 2001. Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran differing in molecular weight. *J. Agric. Food Chem.* 49: 823–831.
- [89] Bu, G.H., Luo, Y.K., Lu, J., Zhang, Y., 2010. Reduced antigenicity of β -lactoglobulin by conjugation with glucose through controlled Maillard reaction conditions. *Food Agric. Immunol.* 21: 143–156.
- [90] Trujillo, A.J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R., Guamis, B., 2002. Application of high hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3: 295–307.
- [91] Lanciotti, R., Patrignani, F., Lucci, L., Saracino, P., Guerzoni, M.E., 2007. Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of proteolytic and fermentative activities of some *Lactobacillus* species. *Food Chem* 102: 542–550.
- [92] Peñas, E., Préstamo, G., Baeza, M.L., Martínez-Molero, M.I., Gomez, R., 2006. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *Int. Dairy J.* 16: 831–839.
- [93] Lametti, S., Transidico, P., Bonomi, F., Vecchio, G., Pittia, P., Rovere, P., Dall'Aglio, G., 1997. Molecular modifications of β -lactoglobulin upon exposure to high pressure. *J. Agric. Food Chem.* 45: 23–29.
- [94] Dumay, E.M., Kalichevsky, M.T., Cheftel, J., 1994. High pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and the baroprotective effects of sucrose. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1861–1868.
- [95] Shriver, S.K., Yang, W.W., 2011. Thermal and nonthermal methods for food allergen control. *Food Eng. Rev.* 3: 26–43.
- [96] Chobert, J.M., Briand, L., Dufour, E., Dib, R., Dalgalarondo, M., Haertle, T., 1997. How to increase β -lactoglobulin susceptibility to peptic hydrolysis. *J. Food Biochem.* 20: 439–462.
- [97] Dufour, E., Herve, G., Haertle, T., 1995. Hydrolysis of β -lactoglobulin by thermolysin and trypsin under high hydrostatic pressure. *Biopolymers* 35: 475–483.
- [98] Stapelfeldt, H., Petersen, P.H., Kristiansen, K.R., Qvist, K.B., Skibsted, L.H., 1996. Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of β -lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *J. Dairy Res.* 63 (1): 111–118.
- [99] Considine, T., Singh, H., Patel, H.A., Creamer, L.K., 2005. Influence of binding of sodium dodecyl sulfate, alltrans retinol and 8-anilino-1-naphthalensulfonate on the high-pressure induced unfolding and aggregation of β -lactoglobulin B. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8010–8018.
- [100] Funtenberger, S., Dumayn, E., Cheftel, J.C., 1997. High-pressure promotes β -lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions. *J. Agric. Food Chem.* 45: 912–921.
- [101] Yang, J., Dunker, K., Powers, J.R., Clark, S., Swanson, B.G., 2001. β -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3236–3244.
- [102] Bonomi, F., Flocchi, A., Frøkiaer, H., Gaiaschi, A., lametti, S., Poiesi, C., Rasmussen, P., Restani, P., Rovere, P., 2003. Reduction of immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *J. Dairy Res.* 70: 51–59.
- [103] Beran, M., Klubal, R., Molik, P., Strohalm, J., Urban, M., Klaudivova, A.A., Prajzlerova, K., 2009. Influence of high-hydrostatic pressure on tryptic and chymotryptic hydrolysis of milk proteins. *High Pressure Res.* 29: 23–27.
- [104] Peñas, E., Snel, H., Floris, R., Préstamo, G., Gomez, R., 2006. High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates. *Int. Dairy J.* 16: 969–975.
- [105] Bianchi-Salvadori, B., Camaschella, P., Cislighi, S., 1995. Rapid enzymatic method for biotyping and control of lactic acid bacteria used in the production of yogurt and some cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 253–261.
- [106] Law, J., Haandrikman, A., 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7: 1–11.
- [107] Bertrand-Harb, C., Ivanova, I.V., Dalgalarondo, M., Haertle, T., 2003. Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. *Int. Dairy J.* 13: 39–45.
- [108] Cross, M.L., Stevenson, L.M., Gill, H.S., 2001. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int. Immunopharmacol.* 1: 891–901.
- [109] Majamaa, H., Isolauri, E., 1997. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99: 179–185.
- [110] Bu, G.H., Luo, Y.K., Zhang, Y., Chen, F.S., 2010. Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2015–2020.
- [111] Tzvetkova, I., Dalgalarondo, M., Danova, S., Iliev, I., Ivanova, I., Chobert, J-M., Haertle, T., 2007. Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts. *J Food Biochem* 31: 680–702.
- [112] Jedrychowski, L., Wroblewska, B., 1999. Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic acid fermentation. *Food Agric. Immunol.* 11: 91–99.