

---

Stefan Maksimović

## Karakterizacija beta-laktoglobulina modifikovanog fruktozom

---

*Majlardova reakcija se često koristi za promenu bioloških osobina proteina iz hrane, glikovanjem njihovih amino-kiselina zagrevanjem. Cilj ovog rada je da se ispita postupak izolovanja  $\beta$ -laktoglobulina ( $\beta$ -LG), a zatim okarakteriše konjugat  $\beta$ -LG-a i D-fruktoze nastao Majlardovom reakcijom. Izolovani  $\beta$ -LG je sa državao male količine  $\alpha$ -LA. Majlardova reakcija je dala veliki broj različitih konjugata ovog preparata, koji su pokazali određene antibakterijske osobine. Poređenjem sa Majlardovim proizvodima hromatografski neprečišćene surutke, dolazi se do zaključka da glavno antibakterijsko dejstvo, najverovatnije ima modifikovani  $\beta$ -LG.*

---

### Uvod

$\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG) je jedan od glavnih proteina mleka sisara. Njegova funkcija nije jasno definisana, iako se zna da vezuje neke hidrofobne molekule i učestvuje u njihovom transportu (Kontopidis 2004). Molekulska masa  $\beta$ -LG je 18.4 kDa. Jedan od načina da se izmene osobine proteina hrane je i glikovanje, koje se često odigrava tokom termičke obrade hrane (Ilchmann 2010). Reč je o Majlardovoj reakciji koja je se odigrava između amino-kiselina i redukujućih šećera usled zagrevanja.

Ranija istraživanja su se dosta bavila proizvodima  $\beta$ -laktoglobulina nastalim Majlardovom reakcijom (Oliver *et al.* 2006). Glikovanje može dovesti do promene alergnosti, anitmikrobne aktivnosti, antioksidantnih svojstava, antimutagenih svojstava. Neka istraživanja su ukazala na

to da se reakcijom sa šećerima može maskirati epitop odgovoran za alergnost te supstance (Taheri-Kafrani *et al.* 2009). Osobine koje modifikovani protein poseduje zavisi od prirode same Majlardove reakcije, koja dovodi do promene u konformaciji proteina koja pored toga zavisi i od efekta temperature, vode itd. (Mills *et al.* 2006). Takođe, osobine nastalog kompleksa zavise i od koncentracije šećera kojim je delovano na protein.

D-fruktoza je redukujući pentozni šećer, koji ima važnu ulogu u prehrambenoj industriji. Za razliku od glukoze u većem stepenu se nalazi u acikličnom obliku, tako da se Majlardova reakcija odigrava brže sa fruktozom (Dills 1993).

Cilj ovog rada je da se izoluje  $\beta$ -laktoglobulin iz surutke, a zatim, nakon glikovanja D-fruktozom ispita antimikrobno svojstvo nastalih proizvoda, i uporedi sa neprečišćenom surutkom, takođe prethodno tretiranom D-fruktozom.

### Materijal i metode

U eksperimentu je korišćena prečišćena surutka svežeg, netretiranog kravljeg mleka. Mleko je najpre profiltrirano kroz gazu, a zatim centrifugiranjem odmašćeno. Kazein je istaložen spuštanjem pH vrednosti na 4.6. Tako dobijena surutka prečišćena jonoizmenjivačkom i gel-filtracionom hromatografijom. Tok hromatografije je praćen SDS PAG elektroforezom i određivanjem koncentracije proteina u uzorcima. Modifikacija D-fruktozom izvršena je prema izmenjenom protokolu za Majlardovu reakciju (Jiang 2012). Antibakterijska svojstva ispitana su na podlogama zasejanim bakterijom *E. coli*.

---

*Stefan Maksimović (1995), Zaječar, Štipska 12, učenik 3. Razreda Medicinske škole u Zaječaru*

*MENTOR: Aleksandra Mandić, student master studija biohemije, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu*

## Prečišćavanje $\beta$ -LG iz surutke

Netretirano mleko je profiltrirano kroz gazu, nakon čega je centrifugirano kako bi se otklonile masti iz mleka. Nakon odmaščivanja mleka, pH vrednost je spuštena na 4.6 pri čemu je kazein istaložen. Kazein je od surutke otklonjen centrifugiranjem. Dobijena surutka je dijalizovana preko noći (0.02 M fosfatni pufer pH 6.8) u cilju pripremanja uzorka za jonoizmenjivačku hromatografiju. Koncentracija proteina u uzorku određena je Bradfordovom metodom prema protokolu (Vujčić 2002).

Jonoizmenjivačka hromatografija rađena je na matriksu DEAE Sepharose 100. Kolona je prethodno ekvilibrisana 0.02 M fosfatnim puferom pH 6.8. Nevezani proteini su eluirani sa ekvilibracionim puferom, dok su vezani eluirani puferima sa rastućom koncentracijom natrijum hlorida (od 0.1 do 0.5 M). Po završetku hromatografije dobijeno je 7 frakcija za dalju analizu, od kojih je svaka imala zapreminu 50 mL. Ove frakcije su analizirane SDS-PAG elektroforezom. Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem, 5 min na 100°C, 20  $\mu$ L uzorka sa 80  $\mu$ L PUZ-a. 14% gel je pripremljen prema protokolu (Laemmli 1970).

Gel filtraciona hromatografija je rađena na matriksu Sephadex G-100. Iz frakcija dobijenih prvom gel filtracionom hromatografijom, globulini su taloženi 40% amonijum-sulfatom po protokolu (Vujčić 2002). Dobijeni talog je rastvoren u PBS-u pH 6.8 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) i ponovo razdvojen na matriksu Sephadex G-100. Frakcije su analizirane na SDS-PAGE.

**Majlardova reakcija.** Proteini prečišćene surutke su tretirani D-fruktozom modifikovanom Majlardovom reakcijom (450 mg fruktoze, 0.9 mL rastvora  $\beta$ -LG i 0.6 mL H<sub>2</sub>O), 18 h na 90°C. Uzorci su zatim analizirani na SDS-PAGE.

**Antibakterijski test** je rađen sa koncentrovanim i 10 puta razblaženim uzorkom modifikovane prečišćene surutke. Uzorci su nanošeni u bunare hranljive podloge zasejanom *E. coli*. Pre početka eksperimenta, bakterija je uzgajana u LB tečnoj podlozi tokom noći, pa je 100  $\mu$ L suspenzije zasejano na LA podlogu, gde je ravnomerno utrljano. Podloge su inkubirane na 37°C tokom noći. Zona inhibicije je merena lenjirom.

## Rezultati i diskusija

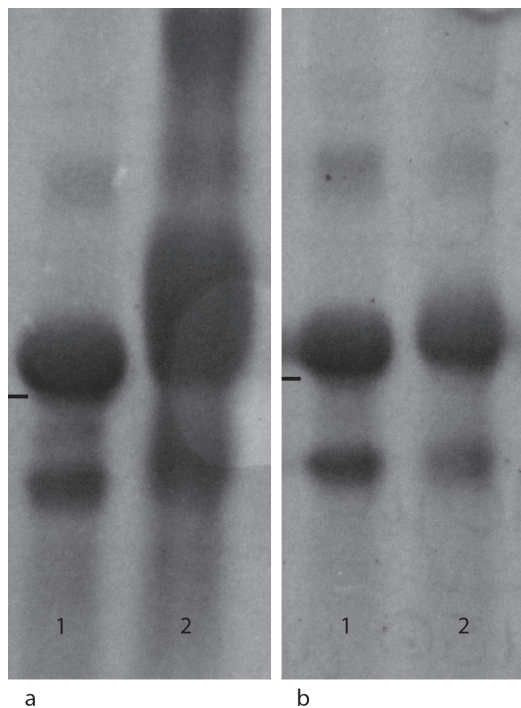
**Izolovanje surutke.** Određena je koncentracija proteina 40 mL dobijene prečišćene surutke. Na talasnoj dužini od 595 nm je izmerena apsorbanca od 0.360. Na osnovu apsorbance 10 puta razblaženog uzorka i jednačine kalibracione prave  $A = 0.001C + 0.0068$  (gde je  $A$  apsorbanca, a  $C$  koncentracija) izračunata je koncentracija proteina u početnom, koncentrovanom uzorku; ova koncentracija je iznosila 35.32 mg/mL. Dobijena koncentracija je znatno manja u odnosu na vrednosti dobijene u ranijim istraživanjima (Li 2008) gde je koncentracija iznosila 143.4 mg/mL. Pretpostavlja se da ovako velika razlika u koncentracijama potiče od različitih matriksa korišćenih za hromatografije.

**Jonoizmenjivačka hromatografija.** Frakcije dobijene jonoizmenjivačkom hromatografijom su analizirane SDS-PAG elektroforezom. Koncentracija  $\beta$ -LG-a je veća u poslednjih pet frakcija, dok je u prve dve frakcije koncentracija znatno manja, što se videlo na gelu. U najvećoj koncentraciji se  $\beta$ -LG nalazio u četvrtoj frakciji i stoga je ona odabrana za dalje prečišćavanje gel-filtracionom hromatografijom.

**Gel-filtraciona hromatografija.** Gel-filtraciona hromatografijom je sakupljeno trideset i sedam frakcija. Pošto je koncentracija proteina u frakcijama bila veoma mala, gel filtracija je ponovljena sa još jednom frakcijom od jonoizmenjivačke hromatografije. Frakcija je prethodno istaložena amonijum-sulfatom u cilju koncentrovanja proteina. Prikupljeno je sto frakcija i urađen SDS-PAGE. Zatim je 37 upotrebljivih frakcija spojeno u grupe na sledeći način: 1-6, 20-25, 42-46, 54-57, 62-66, 77-81, 91-96. Nakon spajanja ovih frakcija, uzorak je ponovo skoncentrovan amonijum sulfatom i centrifugiran, a zatim je podvrgnut Majlardovoj reakciji.

**Majlardova reakcija.** Nakon Majlardove reakcije uzorci su analizirani na SDS-PAGE-u. Na slici 1 su prikazani uzorci nemodifikovanih i modifikovanih proteina surutke (a), odnosno nemodifikovanog i modifikovanog prečišćenog  $\beta$ -LG-a (b).

Praćenjem promene izgleda traka kod uzoraka neprečišćene surutke uočava se da ne postoji bitna razlika između dva kontrolna uzorka (na slici označeni sa 1), dok se uzorak za koji je



Slika 1. SDS-PAG elektroforeza uzoraka.  
 a) Termički tretirana surutka: 1 – kontrola (bez dodatka D-fruktoze) 2 – Majlardovi proizvodi surutke;  
 b) Termički tretiran  $\beta$ -LG: 1 – kontrola (bez dodatka D-fruktoze), 2 – Majlardovi proizvodi  $\beta$ -LG. Crticama je obeležena vrednost od 18.4 kDa.

Figure 1. SDS-PAG electrophoresis patterns.  
 a) Heat-treated whey: 1 – control (without the addition of D-fructose) 2 – Maillard's whey products;  
 b) Heat-treated  $\beta$ -LG: 1 – control (without the addition of D-fructose), 2 – Maillards products  $\beta$ -LG. Dashes marked value of 18.4 kDa.

pretpostavljeno da je Majlardov proizvod značajno razlikuje (2). Kod Majlardovih proizvoda dolazi do povećanja molekulske mase oba glavna proteina surutke uključujući  $\beta$ -LG usled konjugacije sa D-fruktozom. Da ne dolazi do jednake konjugacije vidi se iz pojave širenja proteinskih traka na gelu. Kada se uzorci Majlardovih proizvoda neprečišćene surutke, uporede sa proizvodima gde je surutka prečišćena hromatografski, vidi se da je  $\beta$ -LG zastupljeniji od ostalih proteina, ali da izolovanje nije u potpunosti uspelo jer se i dalje vide tragovi drugih proteina

kao što je  $\alpha$ -LA (kako u nemodifikovanom, tako i u modifikovanom uzorku). Međutim, delimično prečišćeni  $\beta$ -LG pokazuje očekivani trend u porastu molekulske mase nakon konjugacije sa D-fruktozom. Ovaj rezultat nam pokazuje da je Majlardova reakcija uspešno izvršena.

**Antibakterijska aktivnost** modifikovanog  $\beta$ -LG data je u tabeli 1, gde su prikazane vrednosti zona inhibicije.

Tabela 1. Prečnici zone inhibicije kod antibakterijskog testa

	Prečnik zone inhibicije (mm)	
	nerazblaženi uzorak	uzorak razblažen deset puta
Kontrola	0	0
Modifikovani proteini neprečišćene surutke	27	0
Modifikovana prečišćena surutka ( $\beta$ -LG)	25	0

Iz rezultata prikazanih u tabeli može se zaključiti da Majlardovi proizvodi surutke, kao i  $\beta$ -LG imaju antibakterijsko dejstvo. Do pojave zone inhibicije ne dolazi u slučaju kontrolne grupe (netretirana surutka, odnosno netretirani  $\beta$ -LG), dok koncentrovani uzorak dovodi do značajnog smanjenja bakterijskog rasta. Uzorak koji je razblažen deset puta, usled premale koncentracije modifikovanih proteina ne pokazuje antibakterijsko svojstvo. Antimikrobna aktivnost Majlardovih proizvoda proteina surutke i samog  $\beta$ -LG sa bilo kojim šećerima do sada nije pokazana (Chevalier *et al.* 2001). Iz rezultata se takođe može primetiti da je antibakterijsko dejstvo modifikovanih ukupnih proteina surutke gotovo jednako kao i dejstvo rastvora modifikovanog prečišćenog  $\beta$ -LG-a. Ovo govori o mogućnosti da antimikrobno dejstvo prvenstveno potiče od modifikovanog  $\beta$ -LG, dok ostali proteini imaju manji doprinos. Takođe, postoji i mogućnost da antibakterijsko dejstvo potiče i od velike količine termički tretiranog šećera, što je pokazano u nekim radovima (Suortti i Mälkki 1984).

## Zaključak

Prečišćavanje surutke u cilju dobijanja beta laktoglobulina ( $\beta$ -LG) bilo je delimično uspešno, uz pojavu pojedinih glavnih proteina surutke u tragovima. Poboljšanje postupka izolovanja može se poboljšati korišćenjem kvalitetnijih matriksa za hromatografiju. Majlardova reakcija je uspešno izvedena, uz stvaranje velikog broja različitih Majlardovih proizvoda  $\beta$ -LG-a i D-fruktoze. Modifikovani proizvodi pokazuju antibakterijsko dejstvo, vodeći ka zaključku da je modifikovani  $\beta$ -LG najvećim delom zaslužan za ovu osobinu.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se Mariji Jeremić, studentu Medicinskog fakulteta u Beogradu i Marini Vlainić, studentu Biološkog fakulteta u Beogradu (saradnicama na programu biomedicine ISP) na pomoći prilikom realizacije eksperimenta.

## Literatura

- Chevalier F., Chobert J. M., Genot C., Haertlé T. 2001. Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of beta-lactoglobulin glycosylated with several sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (10): 5031.
- Corzo-Martínez M., Soria A. C., Belloque J., Villamiel M., Moreno F. J. 2010. Effect of glycation on the gastrointestinal digestibility and immunoreactivity of bovine B-lactoglobulin. *International Dairy Journal*, **20** (11): 742.
- Dills W. L. 1993. Protein fructosylation: Fructose and the Maillard reaction. *Journal of Clinical Nutrition*, **58**: 779.
- Hilchmann A. 2010. The influence of the Maillard reaction on the immunogenic properties of food allergens (PhD dissertation). Department of Biochemistry, Chemistry and Pharmacy the Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt
- Kontopidis G., Holt C., Sawyer L. 2004. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, **87**: 785.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 630.
- Li X., Luo Z. L., Chen H. B., Cao Y. S. 2008. Isolation and antigenicity evaluation of  $\beta$ -lactoglobulin from buffalo milk. *African Journal of Biotechnology*, **7** (13): 2258.
- Mills E. N. C., Sancho A. I., Moreno J., Kostyra H. 2006. The effects of food processing on allergens. U *Managing allergens in food* (ur. C. Mills, H. Wichers i K. Hoffmann-Sommergruber). Cambridge (UK): Woodhead Publishing, str. 117-133.
- Oliver C. M., Melton L. D., Stanley R. A. 2006. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**: 337.
- Suortti T., Mälkki Y. 1984. Antimicrobial activities of heated glucose and fructose solutions and their elucidation by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, **15** (3): 165.
- Taheri-Kafrani A., Gaudin J-C., Rabesona H., Nioi C., Agarwal D., Drouet M., Chobert J-M., Bordbar A-K., Haertlé T. 2009. Effects of heating and glycation of  $\beta$ -lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 4974.
- Vujčić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Rantec

---

*Stefan Maksimović*

## Characterization of Beta-lactoglobulin Modified with Fructose

Maillard reaction is often used to change the biological properties of food proteins. In previous studies, a lot of various experiments with different Maillard products of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) have been done. The aim of this project was to examine the process of  $\beta$ -LG isolation, and to characterize the Maillard products that are

obtained with isolated  $\beta$ -LG and D-fructose. Through experiments we have confirmed that the  $\beta$ -LG isolation procedure is partially successful, since there are traces of  $\alpha$ -LA left in the end. Also, we confirmed by SDS PAGE that the Maillards reaction gives many different conjugates, since we have the increase of molecular weight and band broadening in the lanes where the products were examined, compared to non modified  $\beta$ -LG. It was also shown that these products have certain antibacterial properties in experiments with *E. coli*. From the results that were obtained, it is possible to come to the conclusion that the main antimicrobial effect actually comes from modified  $\beta$ -LG. 