
Marko Mandić

Ispitivanje bioloških osobina Maillardovih proizvoda proteina surutke i D-ksiloze

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje procesa modifikacije proteina surutke redukujućim šećerom D-ksilozom i biološka karakterizacija dobijenih modifikovanih proteina. SDS-PAGE elektroforezom pokazano je da dolazi do stvaranja različitih modifikovanih proizvoda veće molekulske mase u odnosu na nedomodifikovane proteine. Upravo ti modifikovani proizvodi pokazali su znatnu antibakterijsku aktivnost, za koju se pretpostavlja da potiče od dva najzastupljenija proteina: β -laktoglobulina (β -LG) i α -laktalbumina (α -LA), ali se na osnovu poznatih rezultata može reći da toj antibakterijskoj aktivnosti više doprinosi α -LA. Kao što je očekivano, imunoblotom je pokazano da je modifikacijom došlo do promene alergenosti α -LA. Pretpostavlja se da šećer D-ksiloza onemogućava antitelima da prepoznaju modifikovan protein tako što prekriva epitope α -LA.

Uvod

Maillardova reakcija, koja podrazumeva reakciju koja se dešava između redukujućih šećera i aminokiselina proteina uz zagrevanje se veoma često koristi za menjanje mnogih osobina proteina hrane poput mirisa, ukusa i izgleda. Pored toga, dolazi i do promena bioloških osobina produkata Maillardove reakcije u poređenju sa nedomodifikovanim proteinom, kao što su: alergenost, antioksidantni i antibakterijski potencijal itd. Proteini surutke su među najvažnijim nutrijentima mlečnih proizvoda, ali istovremeno predstavljaju i vrlo značajne alergene mleka.

Alergije na hranu se definišu kao preosetljivost organizma na proteine hrane i pogađaju 8% dece i do 2% odraslih u razvijenijim državama, a broj obolelih se sve više povećava kao i kad je reč o drugim alergijama. Najčešće alergije na hranu obuhvataju alergije na mleko, jaja, kikiriki, soju, orahe, ribu i školjke. Alergije na hranu variraju u zavisnosti od same kulture i populacije (Cianferoni i Spergel. 2009).

Kazeini zajedno sa β -laktoglobulinom (β -LG) i α -laktalbuminom (α -LA) predstavljaju glavne proteine kravljeg mleka, ali ujedno i glavne alergene mleka. S obzirom da su mleko i mlečni proizvodi odlični izvori hranljivih materija za ljude i da se svakodnevno upotrebljavaju, sve više značaja se pridaje problemu alergije na mleko (Li *et al.* 2011).

β -LG je najzastupljeniji protein mleka i čini 10-15% ukupnih proteina mleka. Molekulske masa β -LG je 18.4 kDa (Tantoush *et al.* 2011). α -laktalbumin se sastoji od 123 aminokiseline sa 4 disulfidne veze i ima molekulsku masu 14.2 kDa (Permyakov i Berliner 2000). D-ksiloza je redukujući pentozni monosaharid. Nije svarljiv kod ljudi i nepromenjen se apsorbuje i izbacuje iz organizma (Li *et al.* 2011).

Poznato je da se konjugacijom šećera sa proteinima povećavaju pojedine funkcionalne ili biološke osobine proteina, kao što su rastvorljivost, termostabilnost, sposobnost stabilizacije emulzija, smanjenje alergenosti, antimutagene karakteristike i antioksidativna svojstva (Li *et al.* 2011).

Konjugacija proteina surutke sa glukozom (Bu *et al.* 2009), karboksimetil dekstranima (Kobayashi *et al.* 2001), galaktozom i tagatozom (Corzo-Martinez *et al.* 2010), citozanom

Marko Mandić (1995), Subotica, Jovana Mikića 48, učenik 3. razreda Gimnazije „Svetozar Marković” u Subotici

(Tomomi *et al.* 2006) i maltozom (Li *et al.* 2011) pokazala je značajno smanjenje alergnosti α -laktalbumina, dok je pokazano da konjugacija sa karboksimetil dekstranom smanjuje i alergnost β -LG. Takođe, konjugati D-ksiloze sa proteinima surutke već su pokazali povećanu antioksidativnu vrednost u odnosu na nemodifikovane proteine. (Wang *et al.* 2013)

Cilj ovog rada je biološka karakterizacija produkata Maillardove reakcije proteina surutke i D-ksiloze. Karakterizacija podrazumeva, osim provere uspešnosti Maillardove reakcije, ispitivanje antibakterijskog dejstva novonastalih proizvoda i promenu alergnosti α -LA.

Materijal i metode

Priprema surutke. Surutka je izolovana iz svežeg, netretiranog kravljeg mleka tako što su kazeini istaloženi na pH vrednosti 4.6, a zatim uklonjeni centrifugiranjem. Surutka je sačuvana, a zatim odmašćena korišćenjem ugljentetrahlorida (1/2 = v/v) (Naqvi *et al.* 2010).

Određivanje koncentracije proteina u surutki je urađeno putem Bradfordove metode. (Vujčić 2002).

Maillardova reakcija D-ksiloze i proteina surutke je vršena na 95°C, 24h. Uzorak je pripremljen na sledeći način: 450 mg D-ksiloze je rastvoreno u zapremini od 1.5 mL od čega je 0.9 mL činila surutka, a preostalih 0.6 mL voda. Kontrolni uzorak je pripremljen bez šećera, pod istim uslovima. Provera da li je došlo do modifikacije proteina surutke rađena je SDS-PAG elektroforezom.

SDS-PAG elektroforeza. SDS poliakrilamidna gel (SDS-PAG) elektroforeza uzoraka je rađena po originalnom Laemmli-jevom protokolu (Laemmli 1970). Korišćen je 14 % gel, a uzorci su bili zapremine 50 μ L (10 μ L pufera za uzorke, 40 μ L surutke). Bojenjem gela CBB bojom praćena je modifikacija razdvojenih proteina, prvenstveno na molekulskim masama od 18 kD i 14 kD (β -LG, odnosno α -LA).

Određivanje antibakterijskog potencijala surutke. 10 mL LB podloge je inokulisano *E. coli* i ostavljeno preko noći u inkubatoru na 37°C. Ovom prekonocnom kulturom je zatim, na LA podlozi u Petri šoljama, zasejano po 100 μ L inokulata i ravnomerno utrljano u podlogu ezom

po Drigalskom. Zatim su izbušeni bunari u podlozi u koje je naneto po 100 μ L uzorka – kontrolnog, koncentrovanog i 10 puta razblaženog. Ovako pripremljene Petri šolje su ostavljene preko noći u inkubatoru, na 37°C. Sledeći dan je merena zona inhibicije lenjirom i poređena sa kontrolama (Gojgić-Cvijović i Vrvić 2003).

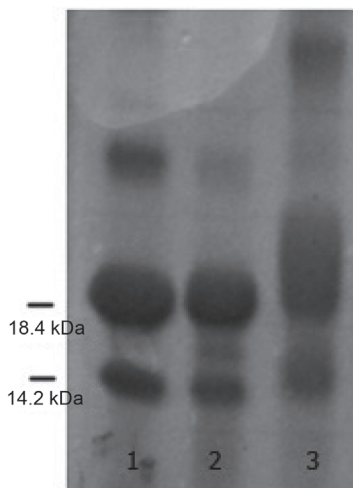
Određivanje promene alergnosti α -LA. Alergenost proteina α -LA je praćena imunoblotom. Imunoblot je rađen nakon SDS PAG elektroforeze, posle polu suvog elektrotransfera proteina sa gela na nitroceluloznu membranu. Transfer je vršen 1 h, dok je jačina struje iznosila 1 mA/cm². Blokiranje membrane je vršeno 4% BSA (3 h), a kao primarno antitelo korišćeno je poliklonsko zečije anti α -LA antitelo (razblaženje 7500 puta), 1 h. Kao sekundarno antitelo korišćeno je mišije anti-zečije antitelo obeleženo alkalnom fosfatazom (razblaženje 5000). Između svakog tretiranja antitelima, membrane je ispirana 3 puta po 10 minuta tTBS puferom (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Antitela su razblaživana u 0.4% BSA u tTBS-u. Imunoreaktivne trake su vizualizovane korišćenjem supstrata za alkalnu fosfatazu: 5-bromo-4-hloro-3-indolil-fosfata (BCIP) i natrijumove nitrobluetetrazolijum soli (NBT).

Rezultati i diskusija

Na osnovu Bradfordove metode određena je koncentracija proteina u suruci i time je potvrđeno da je ona odgovarajućeg opsega (Li *et al.* 2011). Na osnovu apsorbance 10 puta razblaženog uzorka od 0.339 na 595 nm i jednačine prave $y = 0.001x + 0.0068$ (gde je y apsorbancia, a x koncentracija) izračunata je koncentracija proteina u početnom, koncentrovanom uzorku i iznosila je: 2700 μ g/mL.

Modifikacija proteina Maillardovom reakcijom

Na slici 1 je prikazan gel posle SDS-PAG elektroforeze na kojem se, u svim uzorcima, jasno uočavaju trake na oko 14 kDa (α -LA), odnosno na oko 18 kDa (β -LG). Praćenjem promene kod izgleda traka, jasno se uočava da ne postoji bitna razlika između dva kontrolna uzorka, dok se uzorak koji se pretpostavio da je Maillardov proiz-



Slika 1. SDS-PAG elektroforeza uzoraka. 1: kontrola (netretirana surutka), 2: kontrola (termički tretirana surutka bez dodatka D-ksiloze), 3: Maillardovi proizvodi surutke.

Figure 1. SDS-PAG electrophoresis. 1: Control (untreated whey); 2: Control (with heat treatment, without D-xylose); 3: Maillard reaction products.

vod značajno razlikuje. Kao što je i očekivano, kod Maillardovog proizvoda dolazi do povećanja molekulske mase oba glavna proteina surutke – usled konjugacije istih sa D-ksilozom. Da ne dolazi do uniformne konjugacije, odnosno da se ne vezuje uvek jednak broj šećernih ostataka za protein, se vidi iz pojave širenja proteinskih traka na gelu.

Antibakterijsko dejstvo konjugata određena je merenjem prečnika zone inhibicije (tabela 1).

Tabela 1. Prečnik zone inhibicije bakterijskog rasta

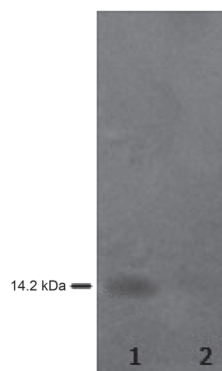
	Početni uzorak	Razblaženje deset puta
Kontrola	0 cm	–
Modifik. proteini surutke	3.1 cm	0 cm

Iz rezultata prikazanih u tabeli 1, može se zaključiti da Maillardovi proizvodi surutke imaju

antibakterijsko dejstvo. Do pojave zone inhibicije ne dolazi u slučaju kontrolne grupe (koja podrazumeva netretiranu surutku), dok koncentrovani uzorak dovodi do značajnog smanjenja bakterijskog rasta. 10 puta razblaženi uzorak, usred premale koncentracije modifikovane surutke ne pokazuje antimikrobno dejstvo. Neki od dosadašnjih radova govore o antimikrobnoj aktivnosti Maillardovih proizvoda različitih proteina i šećera (Chung *et al.* 2011), dok antimikrobna aktivnost Maillardovih proizvoda β -LG i α -LA sa bilo kojim šećerima do sad nije pokazana (Chevalier *et al.* 2001).

Promena alergenosti modifikovanog α -LA

Na slici 2 je prikazan rezultat imunoblota na kojem se jasno uočava razlika između α -LA nemodifikovanog kontrolnog uzorka i uzorka koji predstavlja Maillardove proizvode surutke. Imunoblotom je pokazano da α -LA nemodifikovane surutke (kontrola) poliklonska anti α -LA antitela prepoznaju, dok modifikovan α -LA ne daje imunoreaktivnu traku. Ovaj rezultat odgovara nekim do sad poznatim rezultatima kada je reč o Maillardovim proizvodima α -LA (Li *et al.* 2011).



Slika 2. Imunoblot. 1: kontrola; 2: Maillardovi proizvodi α -LA.

Figure 2. Immunoblot. 1: control; 2: Maillard reaction products (α -LA).

Zaključak

Kao što je i očekivano, Maillardovom reakcijom proteina surutke i D-ksiloze dolazi do stvaranja različitih modifikovanih proizvoda veće molekulske mase u odnosu na nemodifikovane proteine. Maillardovi proizvodi pokazuju antimikrobnu aktivnost te se može pretpostaviti da data aktivnost zapravo potiče od modifikacije dva najzastupljenija proteina surutke – α -LA i β -LG. Na osnovu već poznatih rezultata, može se zaključiti da antimikrobnoj aktivnosti više doprinosi α -LA (Chevalier *et al.* 2001), međutim, nemoguće je isključiti ulogu konjugata β -LG i D-ksiloze, s obzirom da do sada uopšte nije bila ispitana. Promena alergenosti α -LA je u skladu sa očekivanim rezultatima (Li *et al.* 2011), a pretpostavlja se da dolazi do prekrivanja epitopa D-ksilozom što onemogućava antitelima da prepoznaju modifikovani protein.

Literatura

- Bu G., Lu J., Zheng Z., Luo Y. 2009. Influence of Maillard reaction conditions on the antigenicity of bovine α -lactalbumin using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**: 2428.
- Chevalier F., Chobert J. M., Genot C., Heartlé 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.
- Cianferoni A., Spengel J. M., 2009. Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. *Allergology International*, **58**: 457.
- Chung Y. C., Yeh J. Y., Tsai C. F. 2011. Antibacterial characteristics and activity of water-soluble chitosan derivatives prepared by the Maillard reaction. *Molecules*, **16**: 8504.
- Corzo-Martinez M., Soria A. C., Belloque J., Villameil M., Moreno J. F. 2010. Effect of glycation on the gastrointestinal digestibility and immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, **20**: 742.
- Gojčić-Cvijović G., Vrvić M. M. 2003. *Praktikum za mikrobiološku hemiju*. Beograd: Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju.
- Jiménez-Castano L., López-Fandino R., Olano A., Villamiel M. 2004. Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability. *Food Chemistry*, **93**: 689.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (2): 823.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 630.
- Li Z., Luo Y., Feng L. 2011. Effect of Maillard reaction conditions on the antigenicity of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein conjugated with maltose. *European Food Research and Technology*, **233**: 387.
- Naqvi Z., Rizwan H.K., Mohammed S. 2010. A procedure for the purification of beta-lactoglobulin from bovine milk using gel filtration chromatography at low pH. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **40** (4): 326.
- Permyakov E. A., Berliner L. J. 2000. α -lactalbumin: Structure and function. *FEBS Letters*, **473**: 269.
- Tantoush Z., Mihajlović L., Kravić B., Ognjenović J., Jankov R. M., Ćirković Veličković T., Stanić-Vučinić D. 2011. Digestibility of β -lactoglobulin following cross-linking by *Trametes versicolor* laccase and apple polyphenols. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **76** (6): 847.
- Tomomi A. O., Silvia I. S., Tadashi Y. O., Koji T. Akahashi, Makoto H. A. 2006. Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugating with Chitosan. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, **70** (10): 2349.

Vujčić Z. 2002. *Experimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Hemijski fakultet.

Wang W., Bao Y., Chen Y. 2013. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in whey protein isolate and sugars system. *Food Chemistry*, **139** (1-4): 355.

Marko Mandić

Biocharacterization of Maillard Reaction Products from Whey Protein with D-xylose

Whey proteins are very good nutrient resources for humans, but they are also important allergens of milk, which is the exact reason why this problem has been studied so much in the past decades (Li *et al.* 2011). Among whey proteins the most important ones are α -Lactalbumin (α -LA) and β -Lactoglobulin (β -LG). β -LG accounts for about 65% of whey proteins (or 10-15% of total milk proteins), while α -LA accounts for approximately 25% (Tantoush *et al.* 2011). D-xylose is a reducing monosaccharide of the pentose type. It is not digestible by humans and is absorbed and eliminated from the system more or less intact.

The Maillard reaction is a form of a nonenzymatic conjugation between an amino acid and a reducing sugar which happens if the solution is heated. It is used because of its role in changing colors, flavors, textures and other functional

properties in food. It is known that the conjugation of reducing sugars with proteins by Maillard reaction leads to certain changes in biological properties of the protein. Some of those properties are: solubility, heat stability, antioxidant potential, allergenicity, antimutagenic characteristics and etc. (Li *et al.* 2011).

The aim of this study is to analyze the conjugation process by Maillard reaction and further examine the biological properties of the obtained conjugate.

After determining the concentration of proteins in whey by Bradfords' method and confirming that the range of concentrations is good, the Maillard reaction was started. The Maillard reaction was set on 95°C, 24 h. Band broadening that can be seen on SDS-PAGE electrophoresis gel showed that various modified protein products were formed (Figure 1). They also had, as expected, a larger molecular mass than the unmodified ones. Those modified products showed significant antibacterial activity. It is assumed that the source of antibacterial activity comes mostly from the two most common proteins of whey: α -LA and β -LG. Also, considering some already known results, it can be said that α -LA is the protein that has the biggest contribution to the antibacterial activity.

As expected, immunoblot results showed that the allergenicity of the α -LA had been reduced by the Maillard reaction (Figure 2). The antibodies recognized unmodified α -LA, but did not recognize modified α -LA. This result led to the conclusion that D-xylose covered the epitops of α -LA making it impossible for the antibodies to recognize the allergen. 