

Universitet v Ljubljani Biotehniška fakulteta ULBIO

Bioaktivni proteini v mleku

Jernej Oberčkal et al.
jernej.oberckal@bf.uni-lj.si

INSTITUT ZA MLEDARSTVO IN PROBIOTIKE
INSTITUTE OF DAIRY SCIENCE & PROBIOTICS

BF Živilstvo, 8. 11. 19

1

Bioaktivni proteini

- Proteini, ki imajo poleg nutritivne še druge (pozitivne) fiziološke funkcije v osebku, ki jih zaužije.
- Največ narejenega na proteinih v (kravjem) mleku – poceni, lahko dostopni vir, proteini v visokih koncentracijah, fiziološko pomembni (vsi sesalci, razvoj otroka, prehrambena industrija), metode frakcionacije mleka so dodelane.

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

2

Kazalo predavanja

- Frakcionacija mleka
- Pregled **bioaktivnih proteinov** v mleku, njihovih funkcij in uporabe
- Pridobivanje bioaktivnih proteinov
- V teku: Projekta Life for acid whey in LAKTIKA

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

3

Mleko

- Mleko zdravih krav: 3,5% proteinov (kazeini: sirotkini = 80:20)
- Če ga pustiš, se dvigne maščoba.
- Lahko ga centrifugiraš. Maščoba, kazeini, serum.
- Serum ali sirotka: kromatografija – size exclusion, ionsko-izmenjevalna, RP-HPLC: polovič frakcije – N-terminalno sekvenciranje, MS, karakterizacija, SDS-PAGE.

Kislota sirotka: SDS-PAGE

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

4

Mleko

- Kislota sirotka in čisti mlečni proteini: SDS-PAGE

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

5

Bioaktivni proteini v mleku

- Kazeini
- Sirotkini proteini: več v kolostrumu

Funkcija	Barve	Referenca
Imunno reaktivne	Latentne	23, 24, 26, 123
immuno-aktivne	Sekretorika	26, 27, 13
aktivnosti	Cytokin	33, 34
	Opštine	32
	l-Cistein	39
	l-Glutamid	42, 43
	l-Histidin	44, 45
	l-Tryptofan	46
Digestivne funkcije	Proteolitične/protease	79
	Atpazil	81
	Alkalopeptidaz	81
Gut barrier/protective	Gastro-intest.	81
	Antimikrobi	84
Centri za obrabo	Laktotrien	98
nahrano	Hipoxantin	99
	Interfazna proteina	100
	l-Tetrahidrofol	107
	l-Tetrahydrofol	111, 112

Haschke et al. 2016

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

6

Bioaktivni proteini v mleku

- Kazeini
- Sirotkini proteini: več v kolostrumu

Funkcije	Blatni sir	Rdeči sir
Imunna modulacija / Mat. ekstrakti	Laktotransferrin 26, 30, 33 Laktotransferrin 26, 33 Oligopeptidi 30, 43 Laktotransferrin 33, 34 Luteozin 37 Heparinskač 41, 42 Laktotransferrin 41, 42	Laktotransferrin 26, 30, 33 Oligopeptidi 30, 43 Luteozin 37 Heparinskač 41, 42 Laktotransferrin 41, 42
Digestivne funkcije	Ribonuklease Inhibitor 25 Antitrombin 61 Antitrombin 61 Antitrombin 61	
Gut sekvenciranje	Growth factors 81 Laktotransferrin 91	
Ciljanje in drugi mehanizmi	Lysozyme 90 Hepatocritin 95 Laktotransferrin 102, 106 Laktotransferrin 107 β-Cestek 111, 112	

Haschke et al. 2016

Večina dokaj odpornih na proteolizo s prebavnimi encimi

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

7

Bioaktivni proteini v mleku

- Laktoferin, rdeča frakcija mleka

PDB ID: 1bif; vizualizacija s Pymol

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

8

Bioaktivni proteini v mleku

- Na kakšen način lahko protein deluje?

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

9

Bioaktivni proteini v mleku

- Na kakšen način lahko protein deluje?
 - Strukturalna funkcija: citoskelet
 - Interakcija s tarčnim proteinom / receptorjem -> kaskade, aktivator, inhibitor
 - Interakcija z manjšimi molekulami: prenāšalec
 - Olažja kemijske reakcije: encim
 - Spreminjanje konformacije

Mechanism of enzyme activity

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

10

Laktoferin

Biological fluids	Concentration (g/l)
Colostrum	8
Milk	1.5-4
Tears	2
Saliva	0.008
Joint fluid	0.001
Vaginal secretion	0.008
Seminal fluid	0.112
Cerebrospinal fluid	Undetectable
Plasma	0.0004

Berluti et al. 2011

- Ena polipeptidna veriga
- 689 AK (kravji), 80-84 kDa
- Glikoziliran
- Veže 2 Fe³⁺ ($K_D \sim 10^{-30}$)
- Interakcije s proteini
- Pri ph 7 pozitiven, veže polianione: heparin, LPS, lizocim, Ig (IgA), kazein, DNA
- Ser proteaza

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

11

Laktoferin

IRON WARS

E. faecalis siderophore

The iron will be mine!

Iron is my middle name!

<https://www.youtube.com/watch?v=rQhp0nyxhY>

<https://www.youtube.com/watch?v=eFaT3RODS8>

- Veže 2 Fe³⁺ ($K_D \sim 10^{-30}$)
- c(Fe) pada pod 10^{-18} mol/l

Human lactoferrin

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

12

13

14

 INSTITUT ZA HRANU IN PREHRANSKO INDUSTRIJO
INSTITUT ZA HRANU IN PREHRANSKO INDUSTRIJO

Izdelki na trgu – lakoferin

- Lakoferin: **food preservation**, health-promoting supplements, **infant milk formula**, fish feeds, pharmaceuticals, **healthcare**, oral hygiene products, cosmetics
- US FDA: GRAS
- US FDA: 2% LF sprej – prezervativ za govedino
- LAKTIKA: kapsule z lakoferinom s podaljšanim sproščanjem, kreme s sirotko
- Možen problem: **rezistenca** (*S. aureus*, *E. coli*) -> rezistenca proti človekovemu imunskemu sistemu

15

Laktoperoksidaza

- Ena polipeptidna veriga
- 78 kDa
- Glikozilirana
- 1 hem: Veže 1 Fe
- Bazični protein
- Poleg ksantin-oksidaze najbolj pogost encim v mleku
- Mleko, solze, slina, dihala, želodčni sok

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

16

Laktoperoksidaza

- Mleko vseh sesalcev: 0.03 g/l & 10 U/ml (kravje), humano: 1-15 U/ml
- Ščiti pred patogenimi organizmi – laktoperoksidazni sistem
- Gram+ in gram-
- Degradacija karcinogenov, zaščita pred peroksidativnimi efekti

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

17

The diagram illustrates the Lipoxygenase-Peroxidase (LPO) system. It shows a complex protein structure containing a heme group (labeled 'heme'). The heme is involved in two main processes:

- LPO + H₂O₂ + SCN⁻**: This reaction leads to the formation of **PROTO-I** (a radical form of the enzyme), **SCN⁻**, and **H₂O. The SCN⁻ is labeled as **Protimikrobo delovanje** (Antimicrobial action).**
- Deluje kot antioksidant, zaščita pred ROS**: This indicates that the enzyme acts as an antioxidant, protecting cells from reactive oxygen species.
- Reakcije niso nevarne za sesalne celice**: This statement is in red and suggests that the reactions are not harmful to phagocytic cells.

Below the protein structure, a detailed chemical mechanism is shown for the conversion of **COMPOUND II** to **PROTO-I**:

$$\text{COMPOUND II} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}_2} \text{PROTO-I} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SCN}^-$$

The mechanism involves the reduction of **COMPOUND II** by **H₂O₂** to form **PROTO-I** (a radical form of the enzyme). This process also releases **H₂O₂** and **SCN⁻**.

At the bottom, the reduced form of the enzyme is labeled **LPO-Fe²⁺**.

Seifu et al. 2005

18

Izdelki na trgu – laktoperoksidaza

- Laktoperoksidaza: efektiven protimikroben agens: preserving **food, cosmetics, and ophthalmic solutions, dental and wound treatment** (Amazon: zobna pasta za pse in otroke 2-8 let), potential application as **anti-tumor and anti viral agent**.
- LPO sistem: **podaljšanje stabilnosti mleka pri transportu**

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11, 19

19

Imunoglobulini

- IgG, IgM, IgA, sekrecijski IgA
- V kravjem mleku glavni imunoglobulin IgG1, manj je IgG2, IgG3, IgA in IgM.
- 70-80 % vseh proteinov v kravjem kolostrumu: IgA 3.9 mg/mL, **IgG 47.6 mg/mL**, IgM 4.2 mg/mL.
- Zrelo mleko: IgA 0,01-0,1 mg/mL, **IgG 0,6 mg/mL**, IgM 0,1 mg/mL.
- Zaščita mlečne žleze
- Zaščita otroka pred okoljskimi patogeni in toksini, ko še nima razvitega imunskega sistema
- Veza na antigenje: Fab, vezava na receptorje: Fc

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11, 19

20

Imunoglobulini

- Veza na antigenje: Fab ($K_d \sim 10^{-15}$), vezava na receptorje: Fc
- opsonizacija, komplement fixation, agglutination of bacteria, prevention of bacterial adhesion to endothelial and epithelial cell lining or mucous membranes, inhibition of bacterial metabolism by blocking enzymes, neutralization of viruses and toxins
- Sinergetični učinek z nespecifičnimi protimikrobnimi snovmi – LF, lizocim, LPO sistem

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11, 19

21

Imunoglobulini

- Niso odporni na proteolizo s prebavnimi encimi. Izjema: **sekrecijski IgA**. Rešitev: **enkapsulacija z želatino**.
- Uporaba – izdelki na trgu:
 - dodatek krmi za živilo.
 - Prehranska dopolnila: koncentrati kravjega kolostruma (ni zadostnih kliničnih dokazov...).
 - Medicina: peroralne imunske (hiperimunske) preparacije: uspešna preventiva infekcij (EPEC, *C. albicans*, *Clostridium difficile*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus mutans*, *Cryptosporidium parvum*, *H. pylori*).
 - Znanost & diagnostika: mAb, pAb: detekcija (makro)molekul.

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11, 19

22

Lizocim

- Muramidaza: „Peptidoglycan N-acetylmuramoyl hydrolaza“
- 15 kDa
- Protimikroba aktivnost: Gram+, bacilli in clostridia, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*
- Sinergetični učinek z laktoperinom in prototeli
- Inaktivacija virusov, protivnetri učinki, aktivacija imunske celic, protitumorova aktivnost.
- Odpor na prebavne encime: peroralna administracija
- humano mleko: 0,4 g/l, kravje mleko: 0,0004 g/l
- Razširjen. Mleko, solze, slina; izložki živali, rastlin, bakterij
- Uporab: medicina: virusne kožne infekcije?; živilstvo: prezervativ (fermentiran sir); znanost: liza bakterijskih celic: ekstrakcija proteinov ali DNA.

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11, 19

23

Rastni faktorji in citokini

- Signalizacija med celicami: regulacija, rast, zorenje, popravljanje celic
- Največ v kolostrumu v prvih urah po telitvi ($ug/l - mg/l$)
- Stimulacija razvoja črevesnih in skeletnih mišic v novorjenčnicih, **stimulacija imunskega sistema**, delovanje epitelija, celjenje ran...
- GF: EGF, beta-celulin, TGF, IGF, PDGF, FGF
- Citokini: IL-1 β , TNF- α , interferon- γ , soluble IL-1 receptor agonist

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11, 19

24

Osteopontin

- Pleiotropen citokin, izločajo ga makrofagi, limfociti T, epitelne celice
- V skoraj vseh telesnih tekočinah
- Kravje mleko: 0,018 g/l, človeško mleko: 0,14 g/l
- bone mineralization, bone remodeling, cellular adhesion, immune modulatory functions, tumor metastasis, migration, embryonic development
- Vsička koncentracija v mleku (5. najbolj pogost v človešnem mleku), do pred kratkim nezna funkcija v mleku.
- Tvori kompleks z laktotferinom: 1 OPN:3 LF. (Liu et al., 2019)
- Velik kalcij.
- Odporen na proteolizo: verjetno večina pride neregrajenega skozi želodec in žrevo.
- Jiang & Lönnerdal, 2016: „Milk OPN may be unique function in breastmilk development. In the newborn as well as in the adult, OPN may play a role in a mouse model. Addition of bovine milk OPN to infant formula may improve the performance of formula-fed infants and make them more similar to breast-fed infants. Due to its multiple functions, milk OPN is also used for various adult applications.“
- Jiang & Lönnerdal, 2019: „...randomized clinical trial showed that supplementing infant formula with bovine milk OPN (bOPN) resulted in better immune outcomes.“
- Na trgu: dodatek za mlečne formulе: Lacprodan® OPN-10, Arla Foods Ingredients, Viby, Denmark

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

25

Kazeini

- Prenašalci Ca^{2+} in PO_4^{2-} .
- Imunomodulacijske lastnosti: regulacija proliferacije limfocitov, proizvodnja protiteles in citokinov
- Vir bioaktivnih peptidov
- K-kazein: *H. pylori*
- Beta-kazomorfin 7 (iz beta-kazeina) – nakazovalo se povisano tveganje za avtizem, diabetes 1, kardiovaskularne bolezni (do sprostitev BCM-7 ne pride pri A2 varianti b-CN). Na podlagi kliničnih študij EFSA (2009) zaključila, da ni vzročne povezave.

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

26

Haptokorin

- 0,003- 0,005 g/l
- Mleko, slina.
- Večinoma odporen na proteolizo s prebavnimi encimi
- Prenašalec B12, ščiti B12 pred kislino v želodcu.
- Protimikroben delovanje proti nekaterim sevom; *E. coli*, *Bifidobacterium breve*

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

27

Folat-vezavni protein

- 0,01 g/l v kravjem mleku
- Prenašalec: Veže skoraj vso folino kislino (B9) v (kravjem in človešnem) mleku; ščiti folino kislino pred oksidacijo v prebavnem traktu.
- Odporen na prebavne encime. Skupaj s folino kislino se absorbira skozi čревno steno novorjencev, ko še ni tesnih stikov med celicami.
- Uporaba: dostava zdravil v tarčno tkivno (Rachel et al., 2015).

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

28

Alfa-laktalbumin

- 123 aminokislin, 14 kDa
- 20-25% vseh proteinov v človešnem mleku - glavni sirotkin protein. 2-5% v kravjem mleku
- V mlečni žlezzi: koencim za sintezo laktoze.
- Vsebuje dosti esencialnih aminokislin.
- Del se dobro presnovi, preostanek: protimikroben bioaktivni peptidi: večinoma gram+.
- Prenašalec Ca^{2+} .
- Vsebuje dosti triptofana: morda učinkni na metabolizem serotonina.
- Vzročnik trebuhni epitelij, ima protivne lastnosti.
- Povzroča pogonoto tumorskih celic: če se zvije v določeno konformacijo in veže proste maščobne kisline -> sposobnost pobijati tumorske in nezrele celice - povzroči apoptozo, zdravih diferenciranih celic pa ne.
- Vsebuje dosti cisteina, kar verjetno pripomore pri uravnavanju krvnega sladkorja.
- Pripomore pri uravnavanju telesne mase.

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

29

Preostali bioaktivni proteini

- Beta-laktoglobulin: ni v človešnem mleku. Prenašalec maščobnih kislin, retinola, vitamina D2. Vir bioaktivnih proteinov. Uporaba v funkcionalnih živilih.
- Serinski albumin (0,4 g/l): prenašalec: Veže kovinske ione, proste maščobne kisline, lipide.
- Funkcije v prebavi: BSSL, amilaza, proteinaze: plazmin, katepsin D; lipoprotein lipaza
- Druge encimi: alkalna fosfataza, ksanthin oksidaza, glutation peroksida
- Druge proteini: kalmodulin, alfa1-antitripsin...
- ...okoli 1000 različnih proteinov identificiranih v mleku

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8. 11. 19

30

Pridobivanje mlečnih bioaktivnih proteinov

- Izolacija iz mleka
- Izolacija iz odpadnih produktov v mlečni industriji
- Izolacija iz drugih virov
- Rekombinantno v mleku, rekombinantno v mikroorganizmih – problem GSO (...)
- (De novo sinteza – peptidi)

Haschke et al. 2016

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

31

Izolacija mlečnih bioaktivnih proteinov

- Katero lastnost tega proteina lahko izkoristim za ločitev od drugih komponent?
- Topnost, gostota, velikost, naboj, interakcije
- Laktoferin in laktoperoksidaza: + naboj
- LF: pI = 8,5, LPO: pI = 9,8

Whey protein	Concentration (g L ⁻¹)	Mw (kDa)	pI	Td (°C)	Number of amino acid residues
Total	7	18.3	5.2	71.9	163
β -Lactoglobulin	3.3	14.3	6.2	64.3	123
Whey albumin	1.7	150-400	6.2	64.3	123
Immunoglobulins	0.4	60-80	6.2	64.3	123
Beta-lactoglobulin	0.4	60-80	6.2	64.3	123
Lactoperoxidase	0.1	17.0	7.0	72.0-74.0	583
Lactoferrin	0.007-0.03	17.0	8.5	72.0-74.0	700
Lactalbumin	0.01-0.03	17.0	8.5	72.0-74.0	613 and 98.8
LAKTOFERIN	0.007-0.03	17.0	9.8	70.0	700
LAKTOPEROKSIDAZA	0.01-0.03	17.0	9.8	70.0	612

Note: - = Variable value.

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

32

Pridobivanje mlečnih bioaktivnih proteinov

• Laktoferin in laktoperoksidaza v kisli sirotki: kationsko-izmenjevalna kromatografija (HPLC: CIMac™-COOH-0,1, pH 7,5, B=2M NaCl)

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

33

High-performance protein extraction

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Monolithic ion exchange chromatographic column

- One-step extraction needed (single whey load to elute several proteins)
- Simple manipulation due to fixed monolithic carrier
- Low consumption of buffers and water
- Maximum extraction efficiency
- High convection flow rates enable high extraction speeds, without losing selectivity!
- Single piece homogeneous polymer material
- Uniform interconnected channels
- Convective flow
- Scalable size

The process that does not alter the chemical properties of the whey (preserved pH, removed unwanted microorganisms and only wanted target proteins), which can be further usefully applied in any process.

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

34

LIFE FOR ACID WHEY

Life for acid whey for the extraction of bioactive proteins with high added value

<http://lifeforacidwhey.arhel.si/>

ARHEL projektorije in inženiring d.o.o.

Universita v Ljubljani Fakulteta za farmacijo

FAKULTET ZA MATERIJALNE IN PROSTORNE INVESTIGACIJE

LAKTIKA

Fracijoniranje in implementacija sirotkih proteinov ter izraba preostanka za oblikovanje novih funkcionalnih živil in prehranskih dopolnil

Universita v Ljubljani Biotehnoško fakulteta

35

Kisla sirotka – široke možnosti izrabe

Fiziokemički procesi

Biotehnoški procesi

! sladka sirotka

Elektroliza in izločja posameznih sestavnin preostanka: L, LPO, IgG, a-i akcijski faktor, taktoglobulin, ...

Proizvodnja mikrotaktilnih staršarskih kultur, probiotikov, in silhovih prehranskih dopolnil, bakterocič.

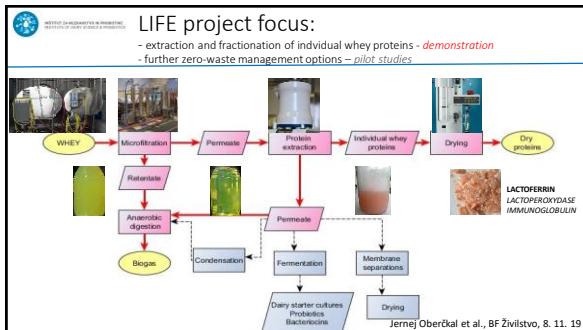
Proizvodnja sladkih, mladih, žit, žitne, ... voda

Proizvodnja vitaminov, karotenoidov, hibernantnih, bioaktivnih, ... in kozmetičnih proteinov, ...

Proizvodnja nigerke (biorazred, biodisel, voda, biopl.), rastlinska gnojila

Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11. 19

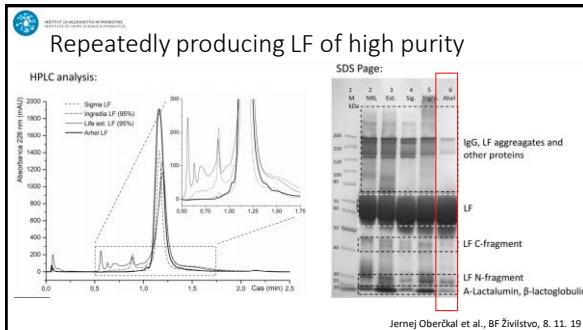
36



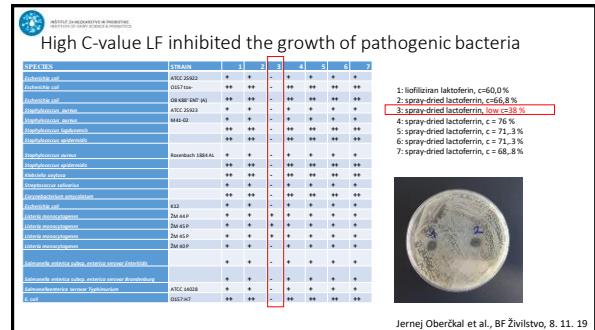
37



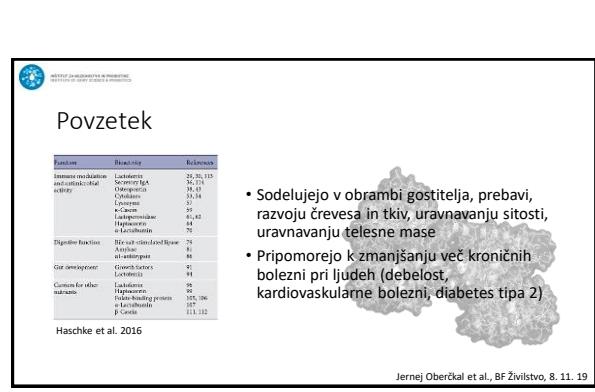
39



40



41



45



Povzetek

Kontrola	Bioaktivne	Relevančnost
Immunomodulacij in antioksidant efekt	Laktotrenin Sekretorji IgA Laktotrenin Cytokine Laktotrenin β-Casozin Laktotrenin Hyaluroninska in heparanska	25, 30, 115 36, 214, 140 35, 14 33, 34 23 23 81, 82 84 70
Bioteknološke funkcije	Beta-1,4-glikanidazni lipaze	75
Gut-aktivatorje	α1-antitripsin	88
Carri za druge nutriente	Laktotrenin Growth factor's Proteini	98 91 98
	Rola-kondenzacijski proteini β-Casozin	105, 106 127 111, 112

Haschke et al. 2016

- Funkcionalna živila
- Mlečni nadomestki za otroke (mlečne formule)
- Medicina, farmacevtski proizvodi
- Kozmetika
- Uporaba v znanosti

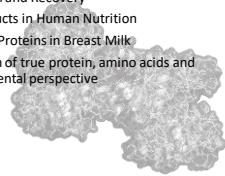
Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 11, 19

46



Dodatne informacije

- Kitts & Weiler, 2003: Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery
- Park & Haenlein (2013): Milk and Dairy Products in Human Nutrition
- Haschke et al., 2016: Nutritive and Bioactive Proteins in Breast Milk
- Lønnerdal et al., 2016: Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breastmilk: a developmental perspective
- <http://lifeforacidwhey.arhel.si/>
- <http://laktika.arhel.si/>



Jernej Oberčkal et al., BF Živilstvo, 8, 10, 19

47