



Napredni načini izrabe potenciala sirotke: prehod iz okoljskega problema v dragocen naravni vir



Hranilne, funkcionalne in bioaktivne lastnosti siotkinih proteinov

Jernej Oberčkal, Bojana Bogovič Matijašić

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Inštitut za mlekarstvo in probiotike, Domžale, Slovenija

jernej.oberckal@bf.uni-lj.si



Sirotkini proteini

- Hranilne lastnosti, biološka aktivnost
- vir bioaktivnih peptidov: antioksidativni, antihipertenzivni, protimikrobní: ob zaužitju prinašajo številne koristi za zdravje.
- funkcionalne lastnosti omogočajo raznoliko uporabo: sredstva za mikrokapsulacijo, nosilni materiali za bioaktivne spojine, emulgatorji, uporaba v užitni embalazi.



Sirotka

- 92% voda
- 3,2 – 5,1 % laktosa, laktat
- 0,05 – 0,5% maščobe
- 0,5 – 1,4% proteini
- 0,3 – 0,8% minerali (Ca, P, K, Na, Cl)
- Vitamini B (barva: vitamin B2)

Proteini v mleku	Kravje	Humano
	g/L	g/l
Kazeini	26,0	2,7
Sirotkini porteini	6,3	6,7
β-laktoglobulin	3,2	/
α-laktalbumin	1,2	1,9
Imunoglobulini	0,7	1,3
Laktoferin	0,1-0,2	1,5-3,0
Serumski albumin	0,4	0,4
laktoperoksidaza	0,03	1,5
Lizocim	0,0004	0,4
Manjše frakcije	0,8	1,1
Proteose-pepton	1,2	
(Glikomakropeptid)	(1,2)	

Hranilne lastnosti sirotkinih proteinov

- Proteini: polimeri aminokislin, ki so povezane s peptidnimi vezmi. **Prebava:** večina proteinov se razgradi na **aminokisline** ali majhne **peptide**, ki se absorbirajo. Aminokisline, ki se absorbirajo in ne oksidirajo, so gradniki novih proteinov. Peptidi lahko imajo **različne učinke**.
- **Levcin** (uravnavanje izgradnje proteinov, popravljanje mišičnih poškodb)
- **Triptofan** (metabolizem serotoninina, vplivi na živčni sistem)
- **Cistein** (nastanek glutationa, glutamina: oksidativni stres in imunski system), razmerje med Cys in Met
- **Razvezjane AK** (levcin, izolevcin, valin)
- **Mlečne formule:** problem vsebnost specifičnih AK. Zagotavljanje zadostne količine AK pomeni višjo vsebnost proteinov, kar otroku škodi. Klinične študije: boljši izidi v otrocih, ki so prejeli mlečne formule s sirotkonimi proteini, ker imajo te bolj primerno vsebnost AK in lahko imajo nižjo koncentracijo proteinov.



Napredni načini izrabe potenciala sirotke: prehod iz okoljskega problema v dragocen naravni vir, Ljubljana, 15.2.2022
Zaključna konferenca projekta LIFE for Acid Whey - LIFE16 ENV/SI/000335 <http://lifeforacidwhey.arhel.si>



Table 1 Amino acid composition of isolated proteins

Amino acid	Milligrams of amino acid per gram of protein						
	α -LA ^a	Whey ^b	Casein	Egg ^c	Beef ^d	Soy	Wheat
Histidine	30	22	25	26	34	19	20
Isoleucine	60	55	47	56	44	49	42
Leucine	108	122	89	94	82	78	68
Lysine	109	112	76	76	90	51	26
Methionine	10	23	26	39	29	13	17
Cysteine	48	30	3	26	11	12	22
Phenylalanine	41	36	51	66	39	43	58
Threonine	43	45	44	45	44	38	28
Tryptophan	48	27	12	17	12	13	9
Valine	43	52	59	73	46	47	43

Abbreviation: α -LA, α -lactalbumin.

^a α -Lactalbumin from Agropur Ingredients, Eden Prairie, Minnesota.

^bWhey protein isolate from Agropur Ingredients, Eden Prairie, Minnesota.

^cEgg white, USDA Nutrient Composition Databases.⁴

^dBeef sirloin, USDA Nutrient Composition Databases.⁴

Layman et al. 2018



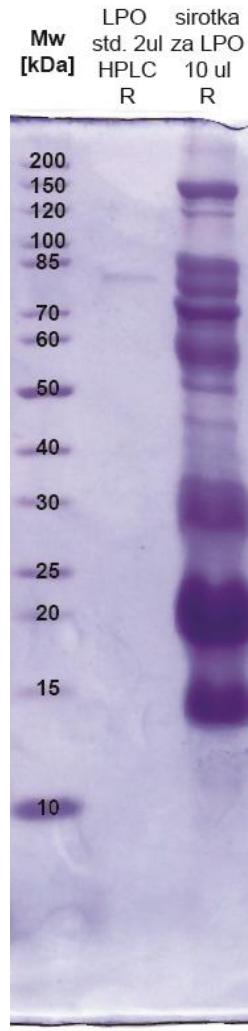
Bioaktivni proteini v sirotki



4 funkcije bioaktivnih proteinov v mleku

Function	Bioactivity	References
Immune modulation and antimicrobial activity	Lactoferrin	29, 30, 113
	Secretory IgA	36, 114
	Osteopontin	38, 43
	Cytokines	53, 54
	Lysozyme	57
	κ -Casein	59
	Lactoperoxidase	61, 62
	Haptocorrin	64
	α -Lactalbumin	70
Digestive function	Bile salt-stimulated lipase	79
	Amylase	81
	α 1-antitrypsin	86
Gut development	Growth factors	91
	Lactoferrin	94
Carriers for other nutrients	Lactoferrin	96
	Haptocorrin	99
	Folate-binding protein	105, 106
	α -Lactalbumin	107
	β -Casein	111, 112

Haschke et al. 2016



Proteini, ki imajo poleg hranične še druge (pozitivne) fiziološke funkcije v osebku, ki jih zaužije (Walther in Sieber, 2011)



Proteini v mleku	Kravje	Humano
	g/L	g/l
Kazeini	26,0	2,7
Sirotkini porteini	6,3	6,7
β -laktoglobulin	3,2	/
α -laktalbumin	1,2	1,9
Imunoglobulini	0,7	1,3
Laktoferin	0,1-0,2	1,5-3,0
Serumski albumin	0,4	0,4
Iaktoperoksidaza	0,03	1,5
Lizocim	0,0004	0,4
Manjše frakcije	0,8	1,1
Proteose-pepton	1,2	
(Glikomakropeptid)	(1,2)	

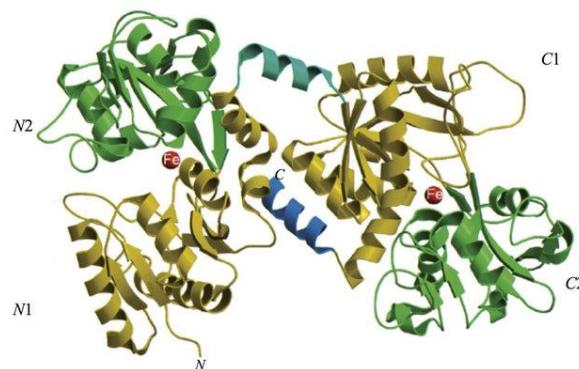
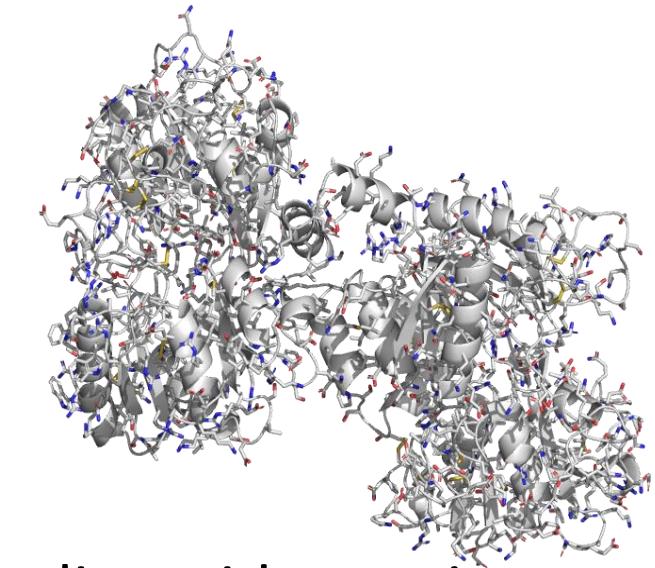
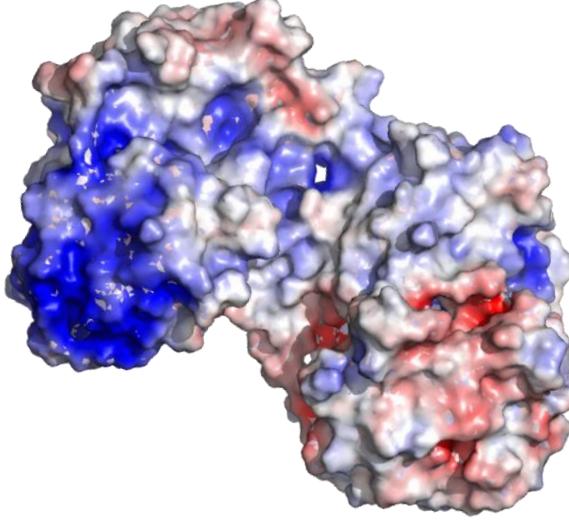
Laktoferin

Humano mleko:

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

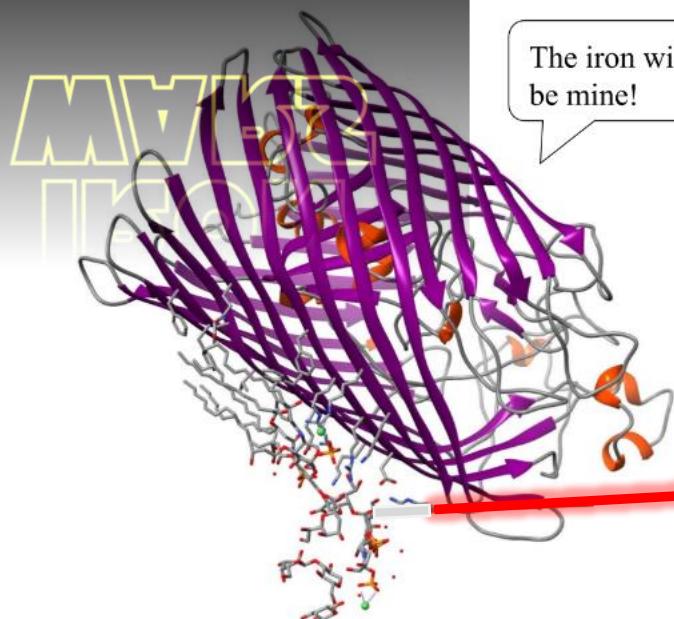
Berlutti et al. 2011

$$K_d = \frac{[A]^x [B]^y}{[A_x B_y]} = \frac{\text{zmnožek c (prosti proteini)}}{c (\text{kompleks})}$$



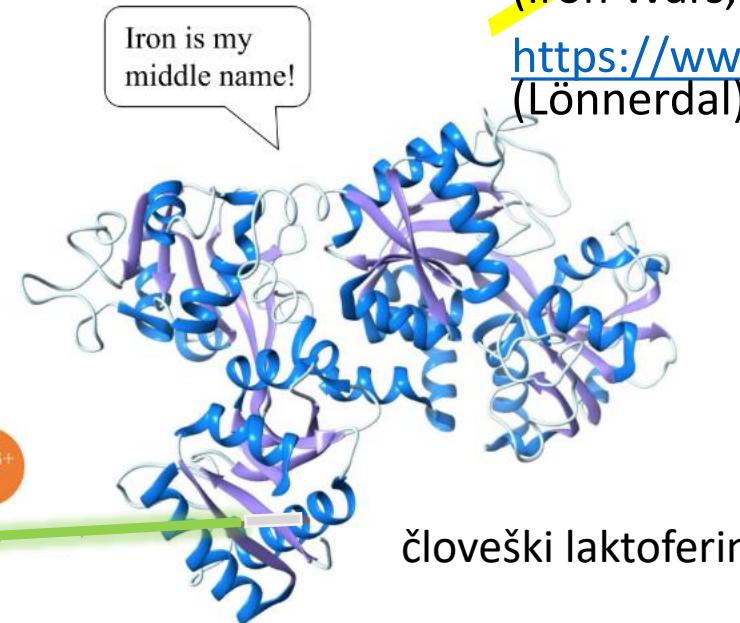
- Ena polipeptidna veriga
- 689 AK (kravji), 80-84 kDa
- Glikoziliran
- Veže 2 Fe³⁺ ($K_D \sim 10^{-30} \text{ M}$), barva
- Vir bioaktivnih peptidov
- Bazičen protein, veže polianione: heparin, LPS, lizocim, Ig (IgA), kazein, DNA

IRON WARS

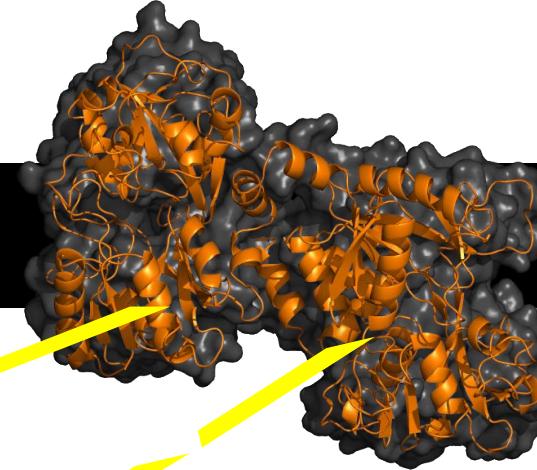


E. Faecalis siderophore (bakterijski kelator Fe^{3+})

Laktoferin



človeški laktoferin



<https://youtu.be/rqHp0NyxlhY?t=97>

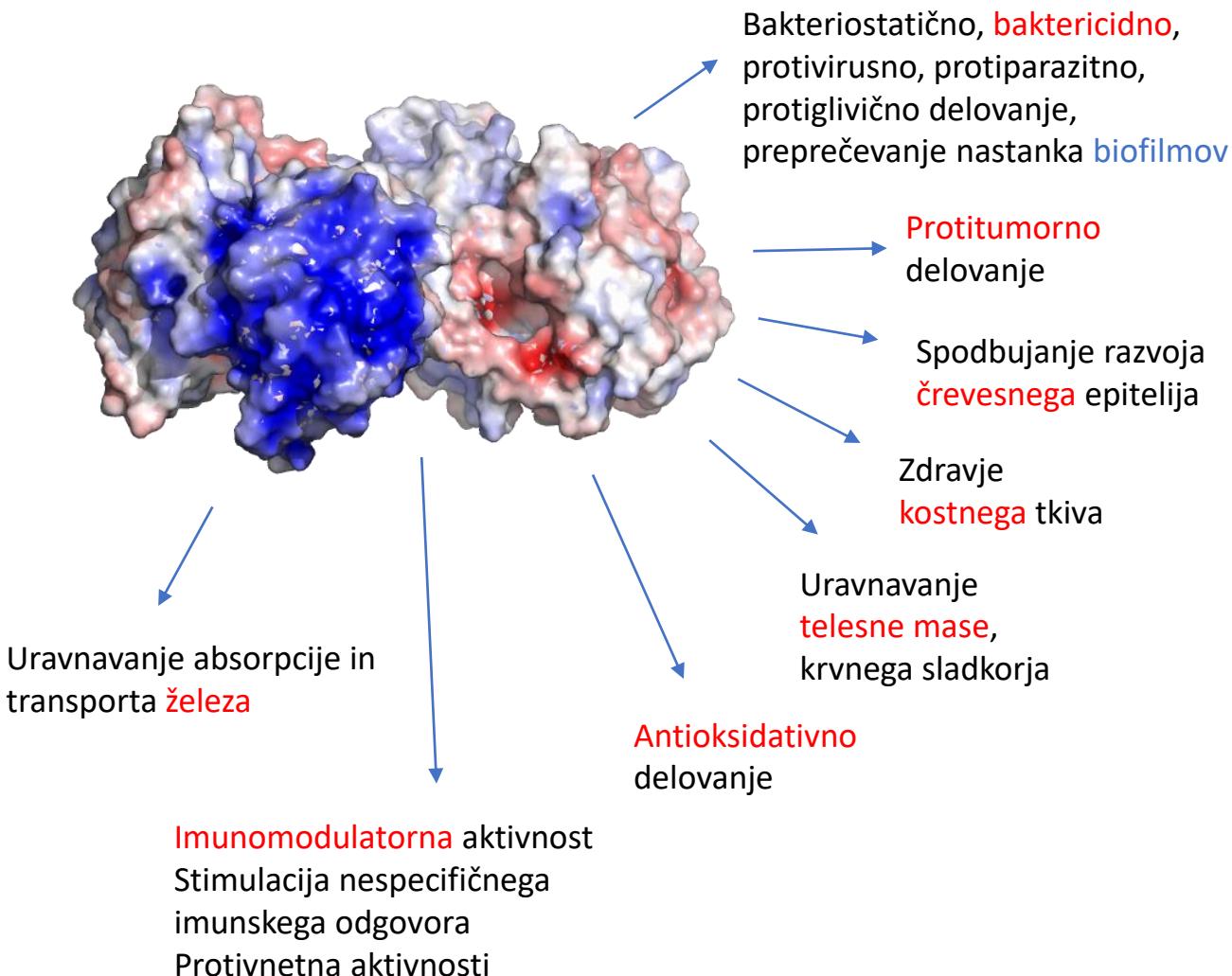
(Iron Wars, sekvestracija Fe^{3+})

<https://www.youtube.com/watch?v=efaT3RODS8>

(Lönnardal)

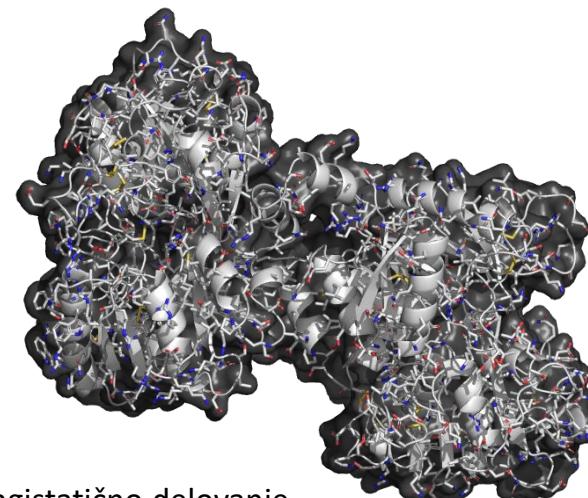
- Veže 2 Fe^{3+} ($K_D \sim 10^{-30} \text{ M}$)
- $c(\text{Fe}^{3+})$ pade pod 10^{-18} M
- velika večina železa v mleku vezana na LF -> selekcija mlečnokislinskih bakterij

Laktoferin – biološke aktivnosti

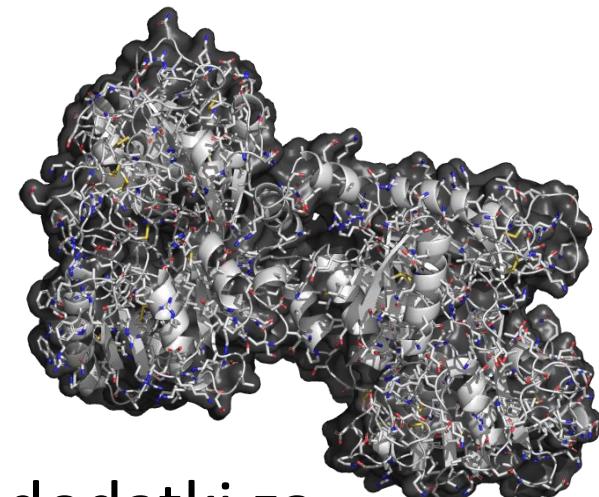


Protimikrobovo delovanje

- Vezava železa – bakterio- in fungistatično delovanje (enteropathogenic *E. coli* (EPEC), *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Bacillus*, *Streptococcus* and *Candida albicans*...), **preprečevanje nastanka biofilmov**, sinergistično delovanje z drugimi protimikrobnimi proteini.
- Vezava na membrano: N-konec – motnje celičnih procesov: baktericidno in fungicidno delovanje (npr. *Candida*): **laktofericin** – višja protimikroba aktivnost, neodvisno od kelacije železa
- Proteazna aktivnost (Ser-proteaza) – podobna specifičnost kot tripsin: deluje na mikrobe virulenčne faktorje (*H. influenzae*)
- Indukcija apoptoze v okuženih celicah gostitelja
- Preprečevanje okužbe gostiteljskih celic z virusi (herpes simplex viruses, hepatitis B and C viruses, human cytomegalovirus, hantavirus, HIV, respiratory syncytial virus, rotavirus, poliovirus, adenoviruses, human papillomavirus...)
- Vezava na celično steno gliv – protiglavno delovanje
- Aktivacija neutrofilcev in „natural killer“ celic: posredni protimikrobi učinek



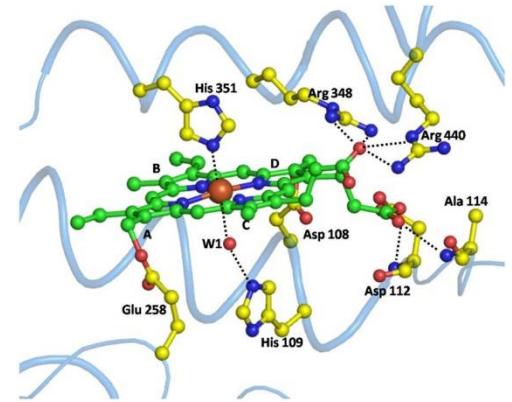
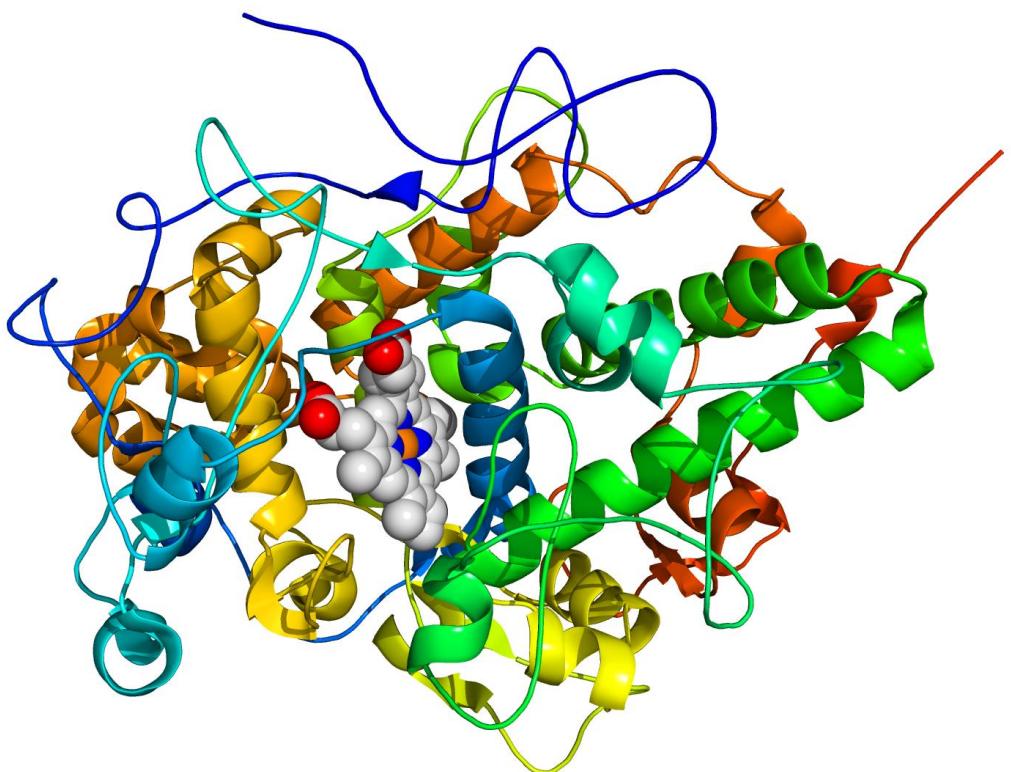
Laktoferin - uporaba



- Laktoferin: podaljševanje **obstojnosti hrane**, prehranski dodatki za krepitev zdravja, **otroške mlečne formule**, krma za ribe, zdravila in zdravstvo, izdelki za ustno higieno, kozmetika
- US FDA: **GRAS**
- Možen problem: **rezistenca (*S. aureus*, *E. coli*)** -> rezistenca proti človeškemu imunskemu sistemu



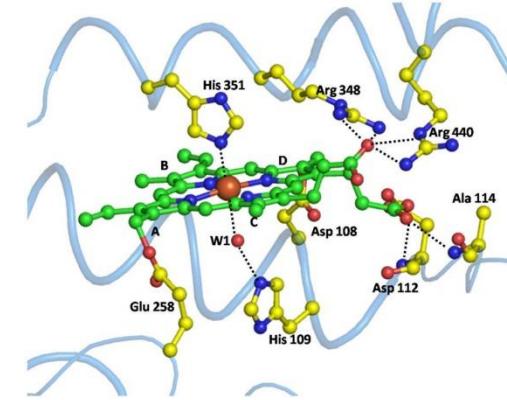
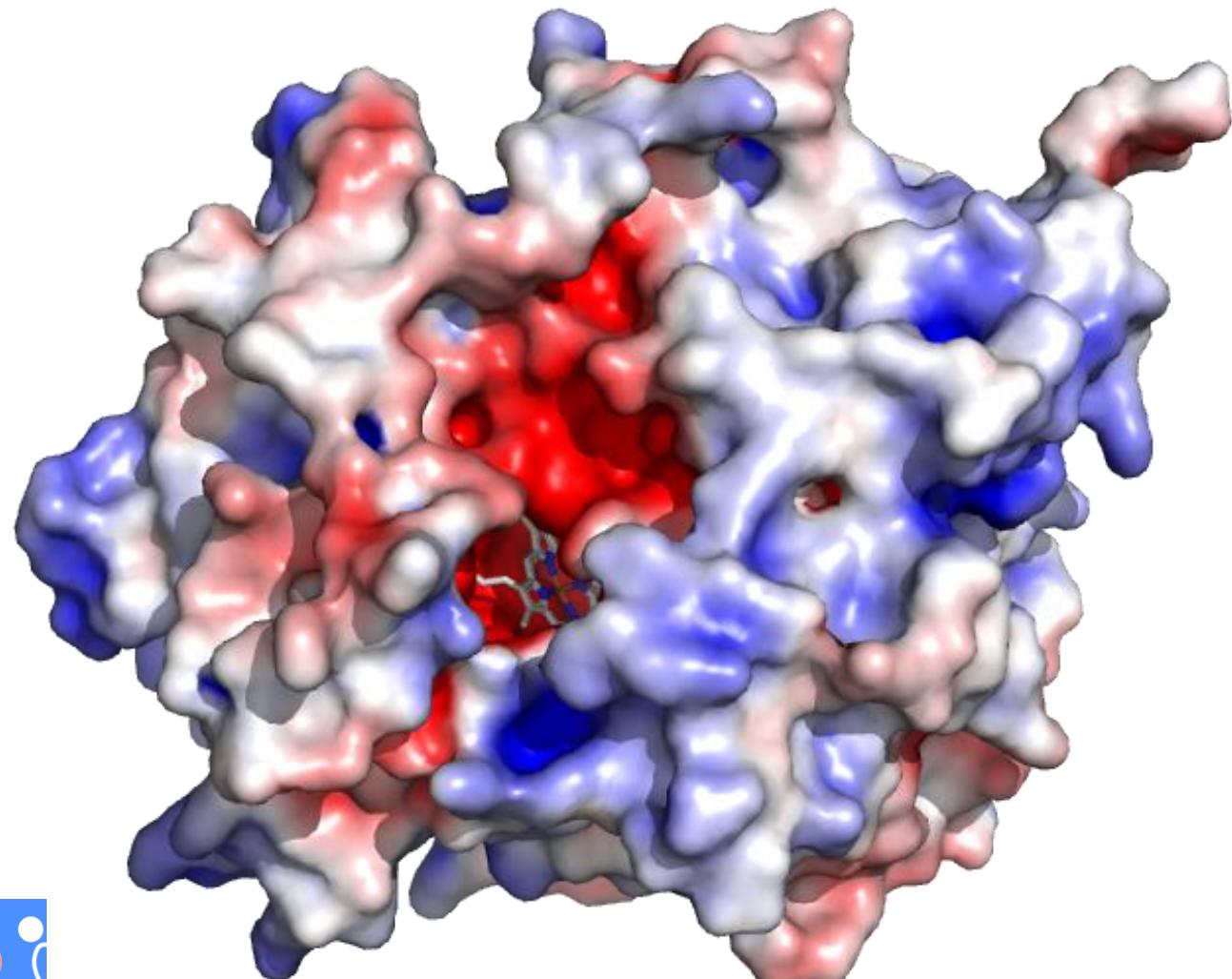
Laktoperoksidaza



- Ena polipeptidna veriga
- 78 kDa
- Glikozilirana
- **Bazični protein:** pl 9,6 (kravja), pl 7,5 (humana)
- 1 hem: Veže 1 Fe, spremenjena geometrija zaradi kovalentnih vezi z AK: **barva**
- Vsebuje **Ca²⁺: stabilizacija strukture** LPO, v kislem izguba aktivnosti zaradi disociacije Ca²⁺
- Poleg ksantin-oksidaze najbolj pogost encim v mleku

Bafort et al. 2014

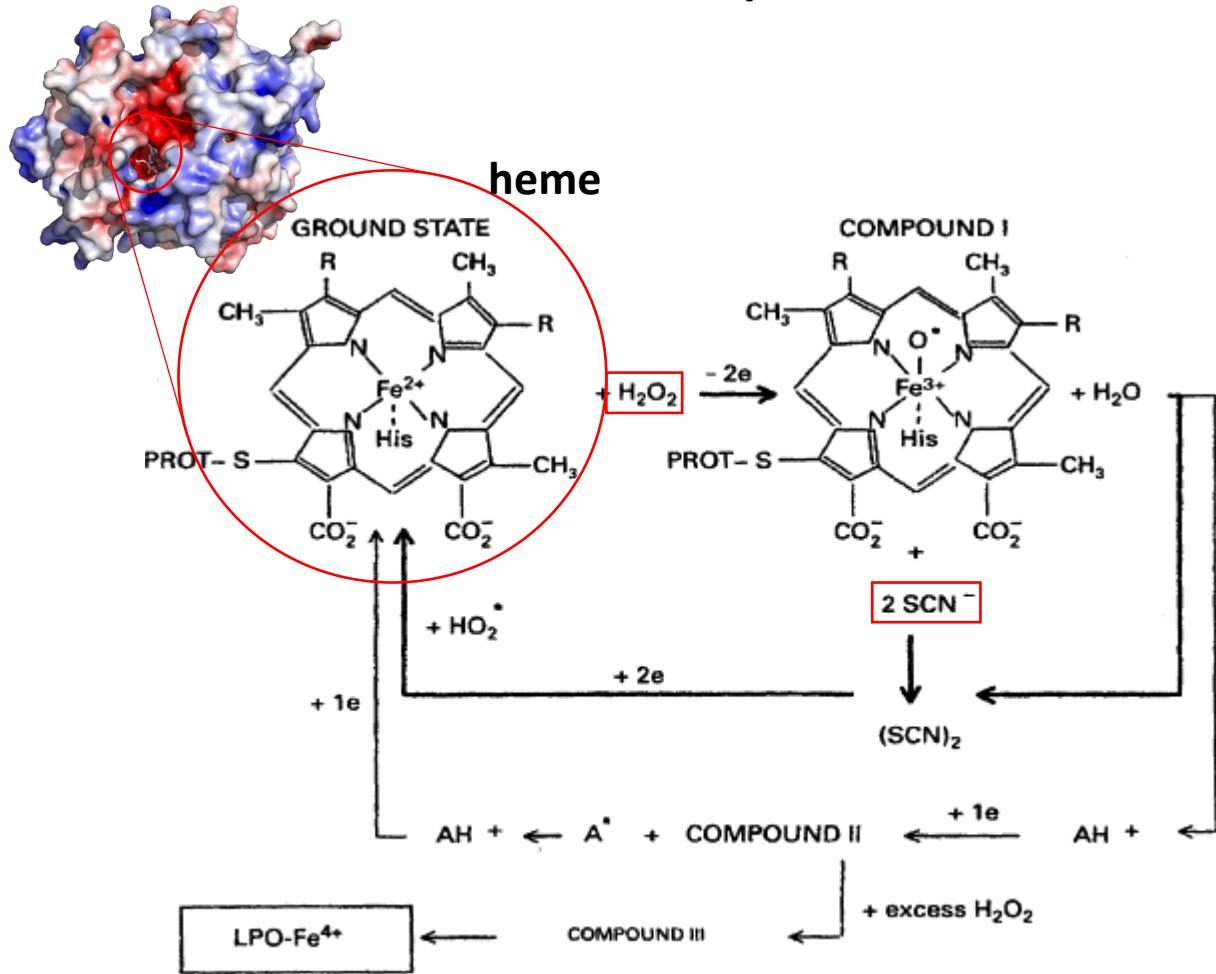
Laktoperoksidaza



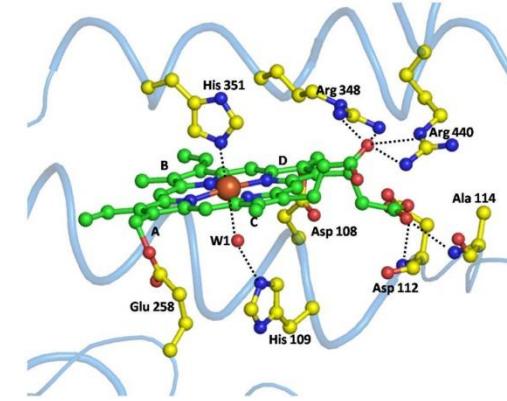
- Mleko vseh sesalcev: 0.03 g/L & 10 U/mL (kravje), humano: 1-1.5 U/mL
- Obramba gostitelja: LPO ščiti pred patogenimi organizmi – laktoperoksidazni sistem (mlečna žleza, intestinalni trakt novorojenca)
- Gram- bolj kot Gram+ (*Salmonella*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni*)
- Degradacija karcinogenov, zaščita pred peroksidativnimi efekti
- Mleko, solze, slina, dihala, želodčni sok

Seifu et al. 2005

Laktoperoksidazni sistem

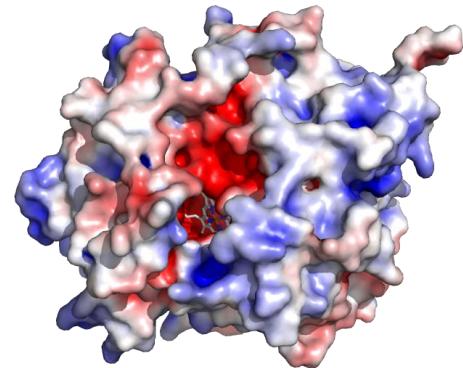


Seifu et al. 2005



- $\text{LPO} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{SCN}^-$
- OSCN⁻ hipotiocianit: protimikrobo delovanje
- Deluje kot antioksidant, zaščita pred ROS
- Reakcije niso nevarne za sesalske celice

laktoperoksidaza - uporaba

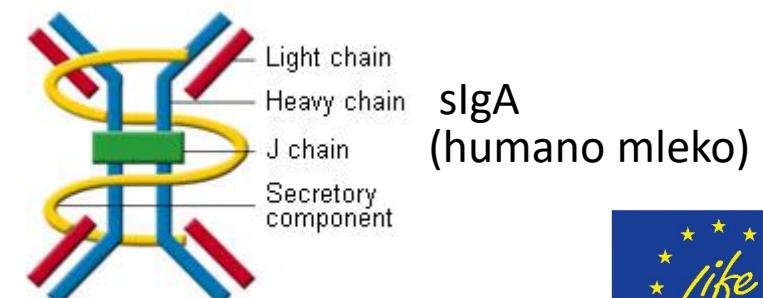
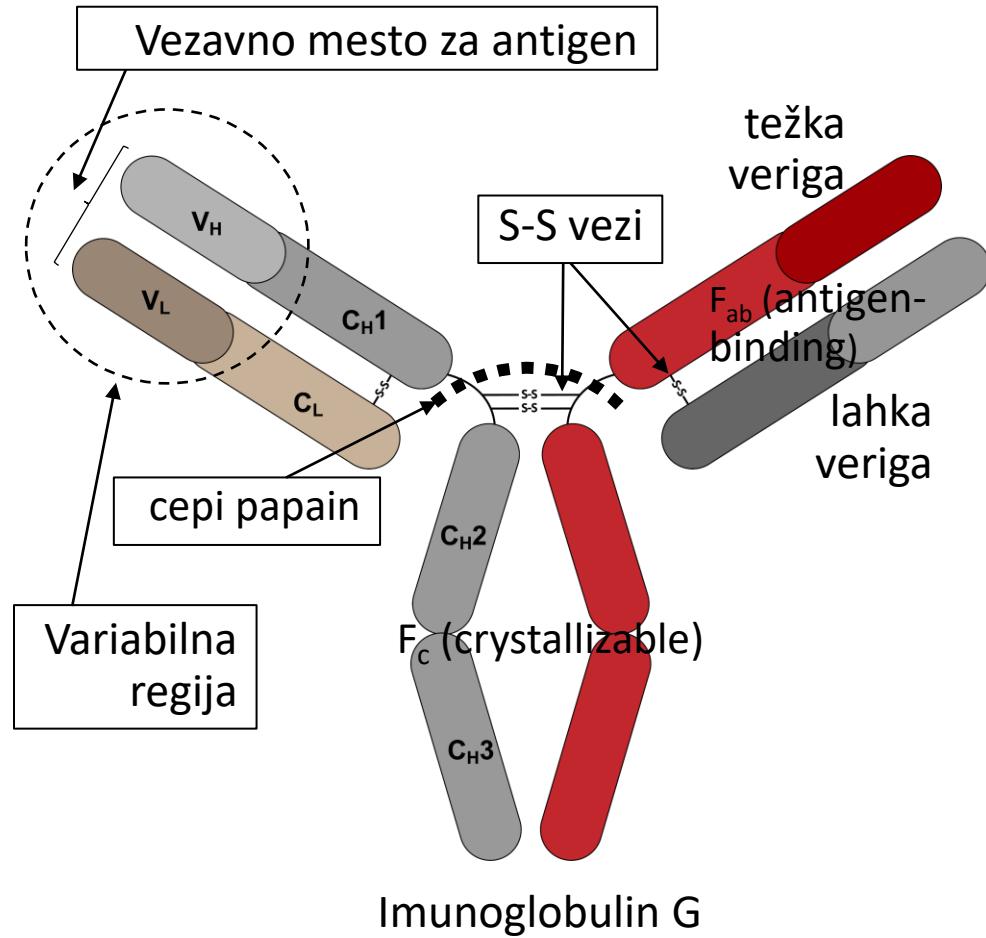
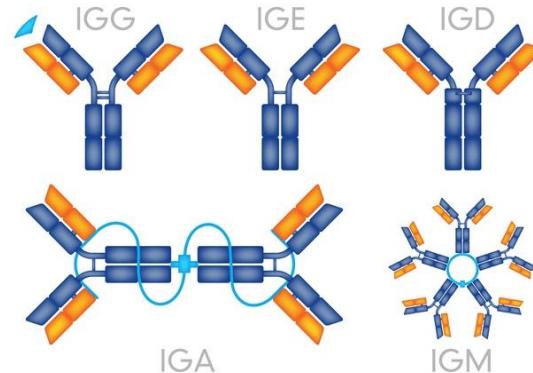


- Laktoperoksidaza: efektivno protimikrobnو sredstvo: **obstojnost hrane, kozmetike in oftalmoloških raztopin, zdravljenje zob in ran, zobna pasta, možna uporaba kot protitumorsko in protivirusno sredstvo, otroške mlečne formule.**
- LPO sistem: **podaljšanje stabilnosti mleka pri transportu**
 - če ni možnosti hlajenja
 - dodatek H_2O_2 do 10 mg/L, ker v mleku premalo
 - Skupen sistem delovanja s ksantin-oksidazo v mleku



Imunoglobulini

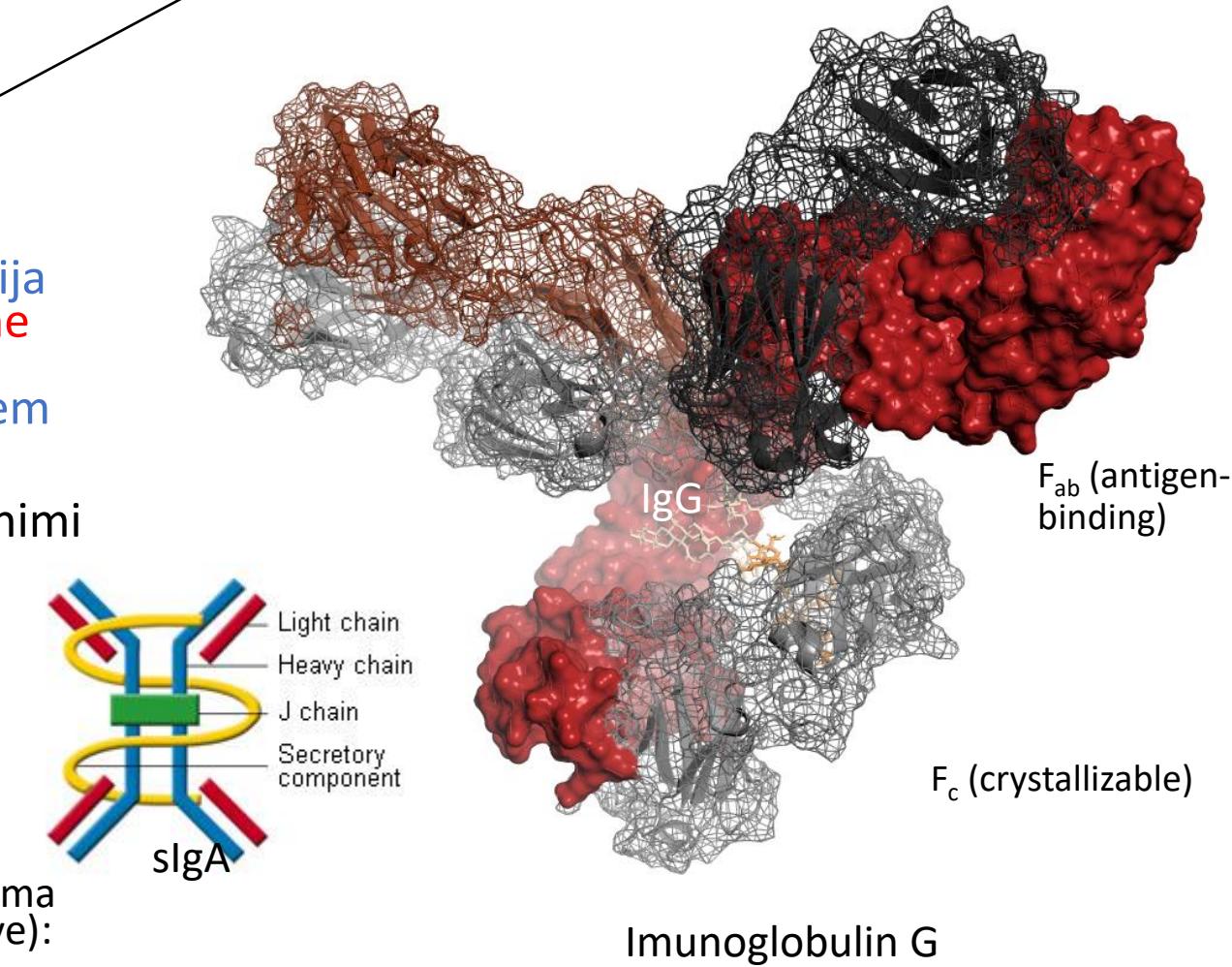
- IgG, IgM, IgA
- V kravjem mleku glavni imunoglobulin IgG1, manj je IgG2, IgG3, IgA in IgM.
- **70-80 % vseh proteinov** v kravjem kolostromu: IgA 3.9 g/L, **IgG 32 – 212 g/L**, IgM 4.2 g/L.
- Zrelo mleko: IgA 0,01-0,1 g/L, **IgG 0,6 g/L**, IgM 0,1 g/L, **kisla sirotka IgG ~ 0.13 g/L**
- Zaščita mlečne žleze
- Zaščita teleta pred okoljskimi patogeni in toksini, ko še nima razvitega imunskega sistema
- **Disulfidne** vezi, cepitveno mesto za **papain**: Fab, Fc
- Vezava na antogene: **Fab**, vezava na receptorje: **Fc**



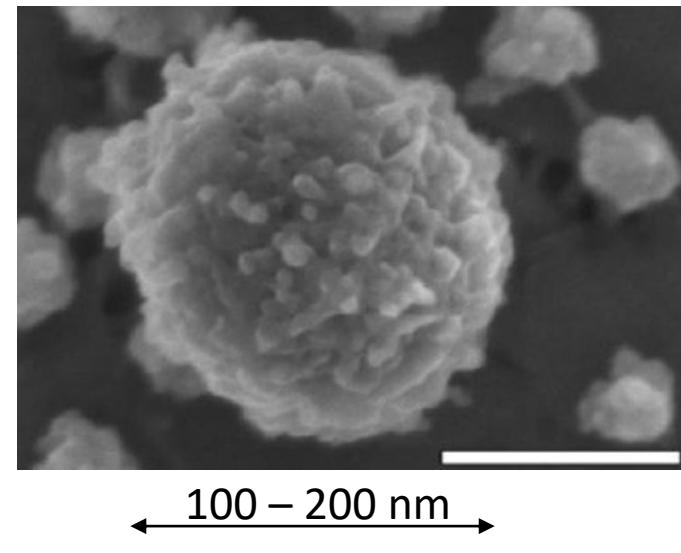
Imunoglobulini

- Vezava na antogene: Fab ($K_d \sim 10^{-15}$), vezava na receptorje: Fc
- Opsonizacija, aktivacija komplementa, aglutinacija bakterij, preprečevanje adhezije bakterij na stene endotelija in epitelija in mukozne membrane, inhibicija bakterijskega metabolizma z blokiranjem encimov, nevtralizacija virusov in toksinov
- Sinergistični učinki z nespecifičnimi protimikrobnimi snovmi – LF, lisozim, LPO sistem
- Niso odporni na proteolizo s prebavnimi encimi. Izjema: sekrecijski IgA. Rešitev: enkapsulacija z želatino.
- Uporaba – izdelki na trgu:
 - dodatek krmi za živino.
 - Prehranska dopolnila: koncentrati kravjega kolostruma (ni zadostnih kliničnih dokazov za zdravstvene trditve): Amazon ipd.

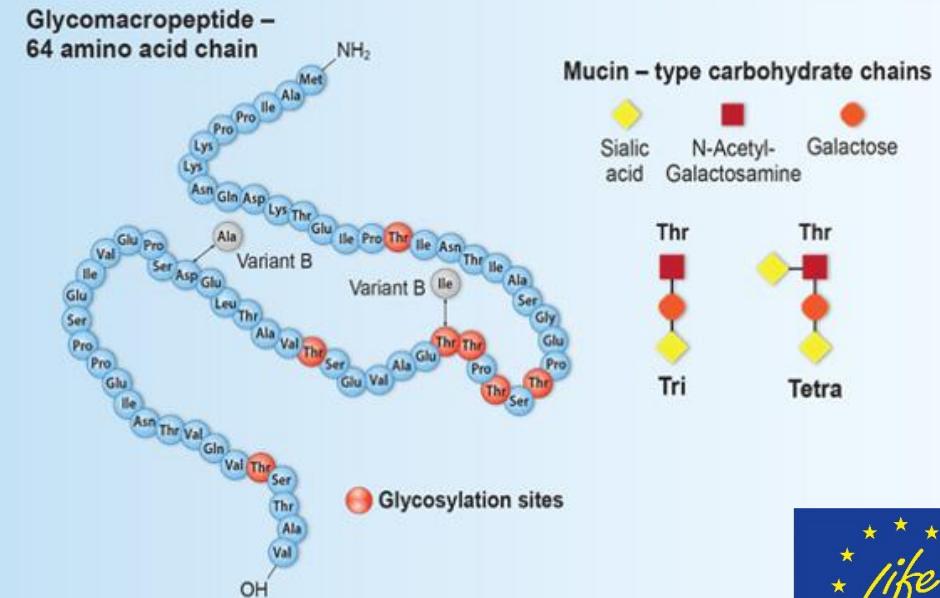
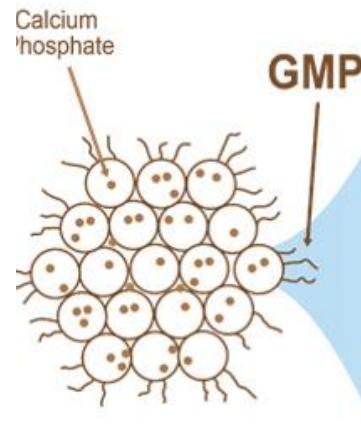
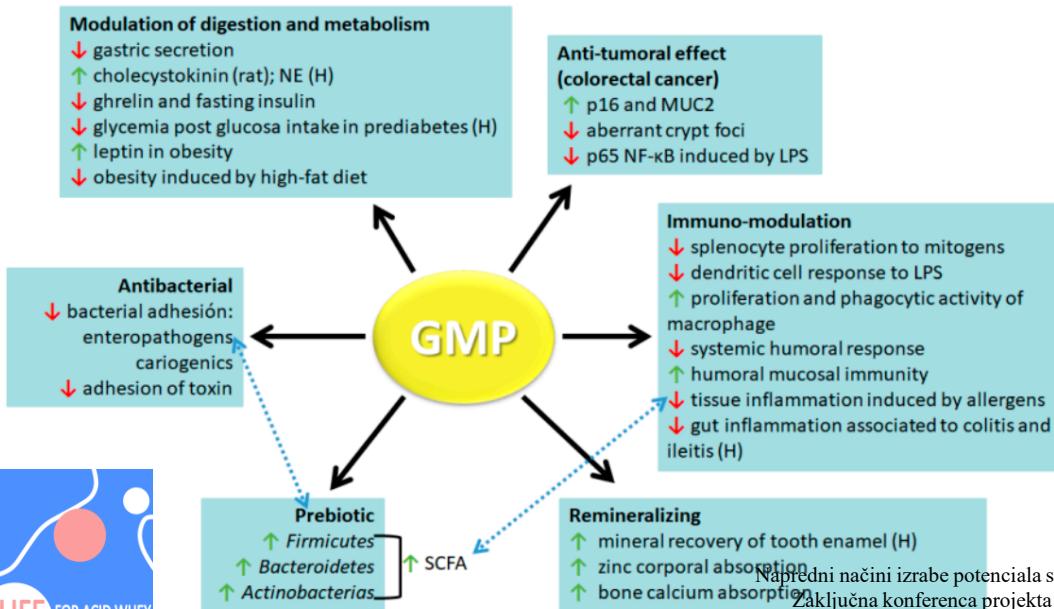
kompleks x proteinov A in y proteinov B: $K_d = \frac{[A]^x [B]^y}{[A_x B_y]} = \frac{\text{zmnožek c prost. proteinov}}{\text{c kompleksa}}$



Glikomakropeptid

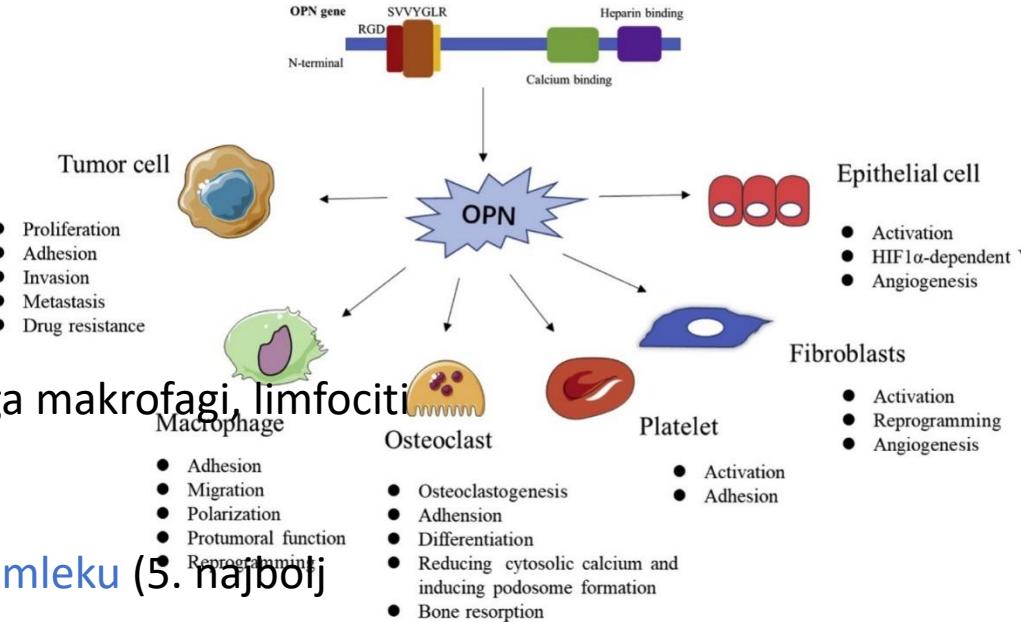


- Iz **κ-kazeina** s proteolizo, 64 AK, glikoziliran, nestrukturiran.
 - bioaktivni peptid: **protibakterijsko** delovanje, uravnavanje **prebave in presnove, protitumorni** učinki, uravnavanje **imunskega sistema**, prebiotični učinek, antikariogeni učinek.
 - 20 – 25 % vseh proteinov v sladki sirotki.
 - Termostabilen.
 - Uporaba: prehrana ljudi s **fenilketonurijo (ne vsebuje Phe)**, emulzifikacija, penjenje.



Osteopontin

- 262 AK, 30,9 kDa (+ glikozilacija), nestrukturiran.
- Pleiotropen **citokin** (isti protein ima več zelo različnih učinkov), izločajo ga makrofagi, limfociti T, epitelne celice
- **V skoraj vseh** telesnih tekočinah
- Kravje mleko: **0,018 g/l**, humano mleko: **0,14 g/l**: Visoka koncentracija v mleku (5. najbolj pogost v humanem), do pred kratkim neznana funkcija v mleku.
- mineralizacija kosti, pritrjevanje in migracija celic, uravnavanje imunskega sistema, tumorigeneza, razvoj zarodka
- Tvori komplekse z laktoperinom: 1 OPN:3 LF. (Liu et al., 2019)
- Močno **fosforiliran**. Veže **kalcij**. **Glikoziliran**.
- Odporen na proteolizo: verjetno večina pride nerazgrajenega skozi želodec in črevo.
- Jiang & Lonnerdal, 2016: Mlečni OPN vpliva na **imunski sistem in razvoj čревa** v novorojenčku in na **razvoj možgan** v mišjem modelu. Dodatek kravjega OPN v mlečno formulo lahko **pripomore k razvoju otrok** do podobnih karakteristik kot jih imajo dojeni otroci.
- Jiang & Lonnerdal, 2019: **randomizirano kontrolirano klinično preskušanje** je pokazalo, da dodatek kravjega OPN v mlečno formulo privede do **boljših kliničnih izidov v otrocih**.
- Na trgu: **dodatek za mlečne formule**: Lacprodan® OPN-10, Arla Foods Ingredients, Danska

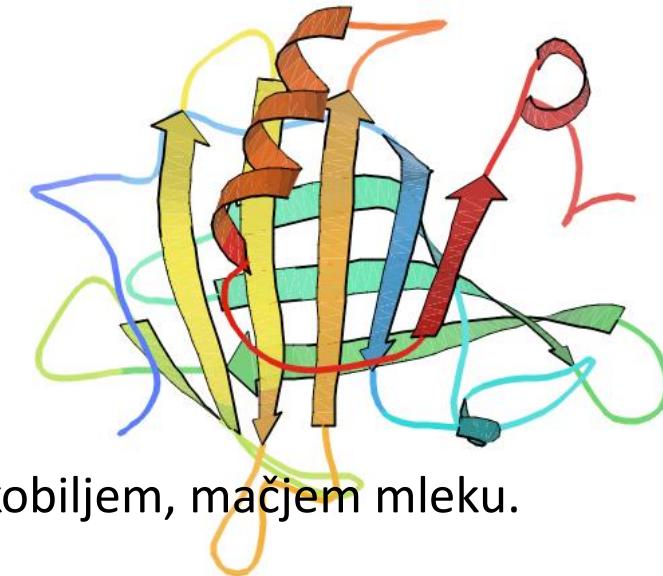


24	Phosphoserine	1 Publication
26	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
27	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
62	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
63	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
66	Phosphothreonine	1 Publication
76	Phosphoserine	1 Publication
78	Phosphoserine	by Similarity
81	Phosphoserine	1 Publication
99	Phosphoserine	1 Publication
102	Phosphoserine	1 Publication
105	Phosphoserine	1 Publication
108	Phosphoserine	1 Publication
117	Phosphoserine	1 Publication
120	Phosphoserine	1 Publication
123	Phosphoserine	1 Publication
126	Phosphoserine	1 Publication
129	Phosphoserine	1 Publication
134	O-linked (GalNAc β) threonine	1 Publication
138	O-linked (GalNAc β) threonine	1 Publication
143	O-linked (GalNAc β) threonine	1 Publication
147	O-linked (GalNAc β) threonine	1 Publication
152	O-linked (GalNAc β) threonine	1 Publication
185	Phosphothreonine	1 Publication
190	Phosphothreonine	by FAM20C 1 Publication
191	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
193	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
215	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
219	Phosphoserine	by FAM20C Combined sources 2 Publications
224	Phosphoserine	by FAM20C Combined sources 2 Publications
225	Phosphothreonine	1 Publication
228	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
234	Phosphoserine	by FAM20C Combined sources 2 Publications
237	Phosphothreonine	by FAM20C 1 Publication
259	Phosphoserine	by FAM20C 1 Publication
243	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
254	Phosphoserine	by FAM20C Combined sources 2 Publications
258	Phosphoserine	by FAM20C 1 Publication
263	Phosphoserine	by FAM20C 2 Publications
267	Phosphoserine	by FAM20C
270	Phosphoserine	by FAM20C
275	Phosphoserine	by FAM20C
280	Phosphoserine	by FAM20C
291	Phosphoserine	by FAM20C
302	Phosphoserine	by FAM20C
308	Phosphoserine	by FAM20C
310	Phosphoserine	by FAM20C
311	Phosphoserine	by FAM20C



β -laktoglobulin

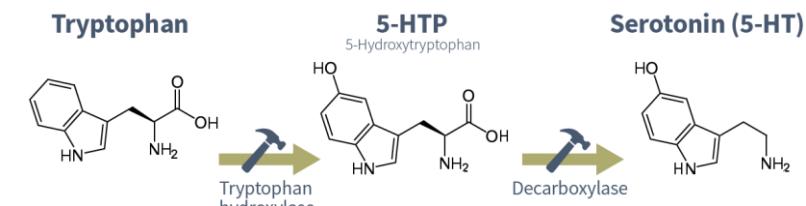
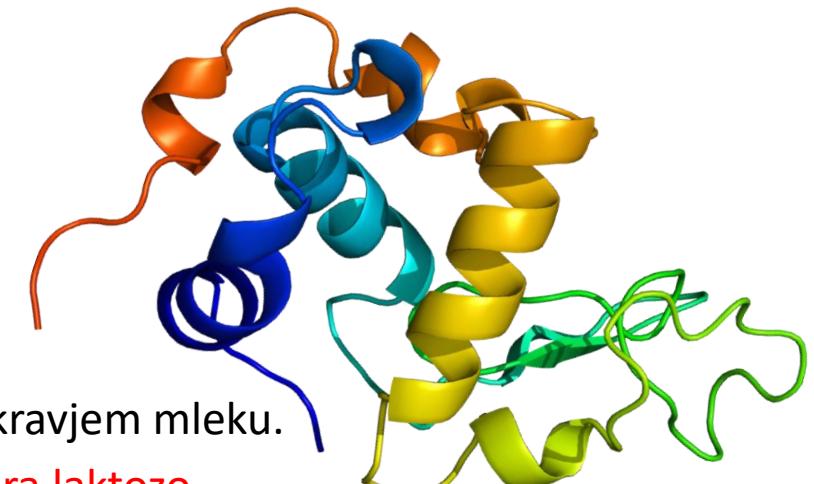
- Najbolj pogost protein v kravji sirotki, 3,2 g/L, **~50 % vseh sirotkinih proteinov**
- Ni v **humanem mleku**, poleg kravjega prisoten tudi pri drugih prežvekovalcih, v kobiljem, mačjem mleku. Predvidena vloga kot vir aminokislin.
- 162 aminokislin, 18,3 kDa
- Visoka vsebnost razvezjanih AK
- **Lipofilen**: na površini hidrofobna mesta: **prenašalec** maščobnih kislin, retinola, vitamina D2, verjetno vpleten v absorbcijo in metabolizem nekaterih maščobnih kislin
- Vir **bioaktivnih peptidov**: antihipertenzivno, antioksidativno, protimikrobeno, imunostimulativno, opioidno delovanje
- Protimikrobeno, protirakovo delovanje, niža holesterol, preprečuje pritrjevanje patogenih mikroorganizmov
- Uporaba v funkcionalnih živilih: dobre fiz.-kem. lastnosti: **penjenje, želiranje**, potencialna uporaba za **mikrokapsulacijo** (slabo topni nutracevtiki)



Hernandez-Ledesma et al. 2008

α -laktalbumin

- 123 aminokislin, 14 kDa.
- 20-25% vseh proteinov v humanem mleku - glavni sirotkin protein. 2 – 5 % v kravjem mleku.
- V mlečni žlezi: del kompleksa (skupaj z β -1,4-galaktoziltransferazo), ki sintetizira laktozo.
- Vsebuje dosti esencialnih aminokislin.
- Del se dobro presnovi, preostanek: protimikrobnii bioaktivni peptidi: večinoma gram+.
- Prenašalec Ca^{2+} in Zn^{2+} (morda Fe: peptidi), absorbcija mineralov
- Vsebuje dosti triptofana: morda učinki na metabolizem serotoninina.
- Varuje trebušni epitelij, ima protivnetne lastnosti.
- Stimulacija rasti probiotikov (*Bifidobacteria*)
- Povzroča apoptozo 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 priomore pri uravnavanju krvnega sladkorja.
- Priomore pri uravnavanju telesne mase.
- Uporaba: mlečne formule, prehrana odraslih.



Layman et al. 2018

Funkcionalne lastnosti sirotkinih proteinov

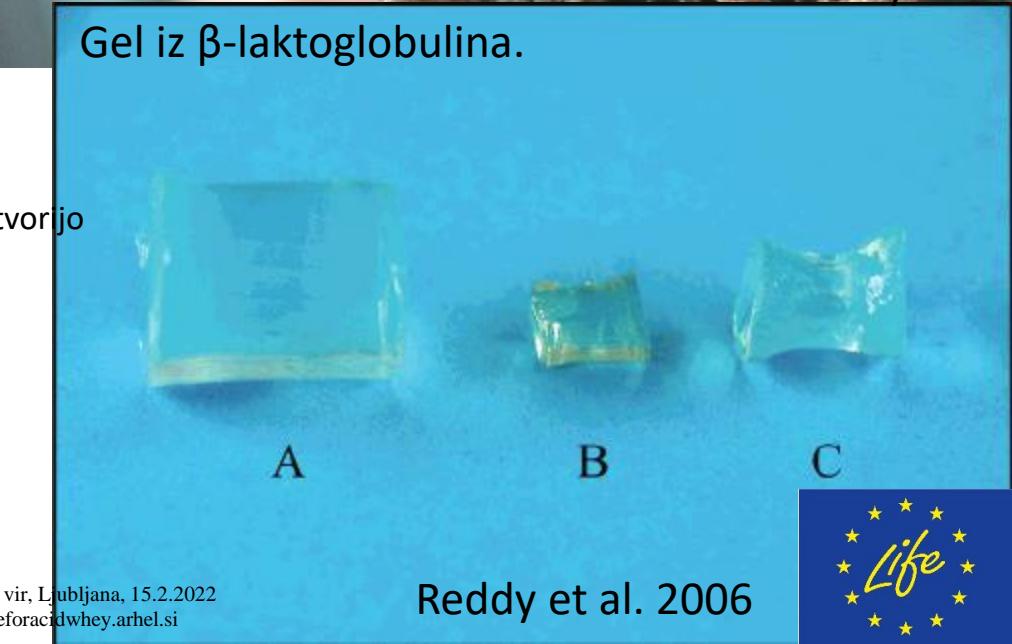
- Fiz.-kem. lastnosti, ki vplivajo na obnašanje proteinov, ko se jih doda v hrano
- Obnašanje pri **segrevanju**:
 - Denaturacija in **obarjanje** proteinov (agregacija zaradi izpostavljanja hidrofobnih površin)
 - **Želiranje** β -laktoglobulina (in drugih proteinov s tiolnimi skupinami, npr. BSA)
 - Segrevanje pri pH < 3: denaturacija proizvede zelo **viskozne** proteine, pri ohlajanju tvorijo mehak koagulum.
 - α -laktalbumin se lahko **renaturira** (80 – 90 %) pri ohlajanju
- **Topnost** in stabilnost koloidov
 - Sirotkini proteini **topni v visokih koncentracijah** v vodnih raztopinah
 - Uporaba v **napitkih**
- **Reološke** lastnosti
 - Dodajanje v jogurte in sladice za **povečanje viskoznosti**.
 - Dodajanje v sladice za **povečanje elastičnosti**.
- **Penjenje**
 - Tvorijo zelo **stabilne pene**
 - Uporaba v sladicah (čokolada, kreme)
- **Želiranje**
 - segrevanje β -laktoglobulina nad 50 – 60 st. C: izpostavi se **tiolna skupina**, pri ohlajanju se tvorijo intermolekularni disulfidi (če dovolj visoka koncentracija proteinov) in s tem gel.
 - Tvorijo gele z **visokim deležem vode**.
 - Uporaba v **jogurtih, sladoledu**
 - Uporaba za **enkapsulacijo** bioaktivnih snovi
- **Emulzifikacija**
 - Odvisna od hidrofobnosti površine proteinov. Pada s termično denaturacijo B-LG in BSA.
 - Uporaba v **juhah, otroški hrani, solatnih prelivih**

Minj et al. 2020, Batista et al., 2018

Napredni načini izrabe potenciala sirotke: prehod iz okoljskega problema v dragocen naravni vir, Ljubljana, 15.2.2022
Zaključna konferenca projekta LIFE for Acid Whey - LIFE16 ENV/SI/000335 <http://lifeforacidwhey.arhel.si>

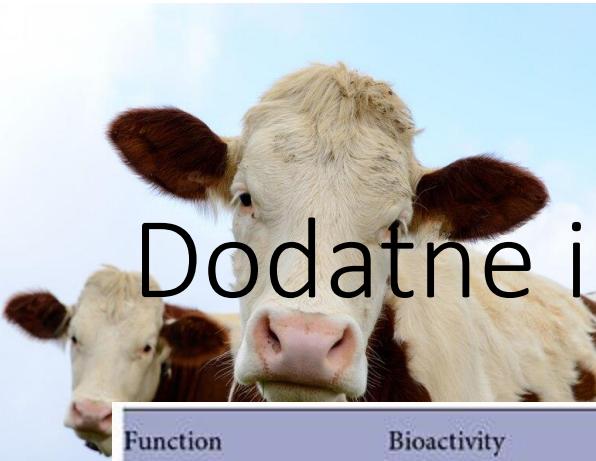


Gel iz β -laktoglobulina.



Reddy et al. 2006

Dodatne informacije



Function	Bioactivity	References
Immune modulation and antimicrobial activity	Lactoferrin Secretory IgA Osteopontin Cytokines Lysozyme κ -Casein Lactoperoxidase Haptocorrin α -Lactalbumin	29, 30, 113 36, 114 38, 43 53, 54 57 59 61, 62 64 70
Digestive function	Bile salt-stimulated lipase Amylase α 1-antitrypsin	79 81 86
Gut development	Growth factors Lactoferrin	91 94
Carriers for other nutrients	Lactoferrin Haptocorrin Folate-binding protein α -Lactalbumin β -Casein	96 99 105, 106 107 111, 112

Haschke et al. 2016

- De Wit 1997: Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products
- Ha & Zemel (2003): Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people
- 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
- Patel 2015: Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead
- Haschke et al. (2016): Nutritive and Bioactive Proteins in Breast Milk
- Lonnerdal et al. (2016): Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breastmilk: a developmental perspective
- Batista et al. (2018): Whey and protein derivatives: Applications in food products development, technological properties and functional effects on child health
- Auestad et al. (2021): Dairy bioactive proteins and peptides: a narrative review