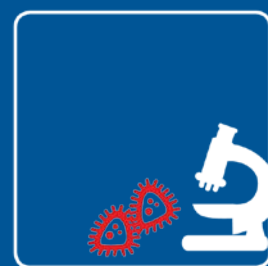


Modifikation af mælkeproteiner ved reaktion med reducerende sukkerarter



Slutrapport for Mejeribrugets

ForskningsFond:

Modifikation af mælkeproteiner ved reaktion med reducerende sukkerarter

Projektleder: Professor Leif H. Skibsted

Institut for Fødevarervidenskab, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C

Projektperiode: 15. maj 2005 til 28. februar 2009

Projektdeltagere:

Det Biovidenskabelige Fakultet

Københavns Universitet

e-mail: ls@life.ku.dk

Tlf. 3533 3221

Deltagende forskere: Adjunkt Marianne K. Thomsen, IFV

Lektor Karsten Olsen, IFV

Lektor Jeanette Otte, IFV

Lektor Jes C. Knudsen, IFV

Videnskabelig assistent Sisse Jongberg, IFV

Videnskabelig assistent Michael Rasmussen, IFV

Øvrige finansieringskilder: Forskningsrådet for Teknik og Produktion

SEPTEMBER 2009

Sammendrag

Lactose og andre reducerende sukkerarter vides at reagere med frie aminogrupeer i proteiner. Denne reaktion er undersøgt for valleproteinet β -lactoglobulin. Reaktionen er vist at foregå hurtigere i fast tilstand (frysetørrede blandinger af de to reaktanter) end i vandig opløsning. Kinetikken for reaktionen er undersøgt for varierende temperatur, vandaktivitet og pH i opløsningen forud for frysetørring for frysetørrede blandinger. Reaktionshastigheden øges meget med stigende temperatur (50-70 °C undersøgt), mindre med stigende vandaktivitet (a_w 0,51 og 0,64 undersøgt) og stigende pH (pH 5; 6 og 7 undersøgt). Lactosyleringen er vist at foregå i to faser adskilt af en glasovergang. Lactosyleringen er vist at foregå ved en første-ordens reaktion der fører til dannelse af monolactosyleret β -lactoglobulin. Hastigheden for denne reaktion var generelt hurtigere end næste trin, der fører til dannelse af dilactosyleret β -lactoglobulin. De lactosylerede former af β -lactoglobulin har modificerede funktionelle egenskaber og kontrol af tørringstemperatur og hurtigere sænkning af vandaktivitet anbefales for at optimere procesbetingelserne. For at sikre at sådanne præparater ikke indeholder toksiske advanced glycation end products (AGE), blev reaktionsblandingerne undersøgt for dannelse af Maillard-produkter.

Dannelsen af sene Maillard produkter under lagring af β -lactoglobulin /laktose blev undersøgt ved at inkubere prøver ved 60 °C, pH 7 og vandaktivitet 0,65 og analysere disse til udvalgte tider op til 48 timer. SDS-PAGE analyse viste dannelsen af krydsbindende Maillard produkter efter 8 timer. Dannelsen af sene Maillard produkter, monitoreret ved ELISA med et polyklonalt antistof mod sene Maillard produkter, kunne observeres allerede efter en times inkubation med stigende udvikling til et maksimum ved 12 timer, hvorefter yderligere inkubation ikke gav forøgelse af signalet. Dannelsen af et specifikt Maillard produkt, N^e-carboxymetyllysin (CML), blev bestemt ved RP-HPLC. Dannelsen af CML viste maksimum efter ~36 timers inkubation, ved ~5 mol CML/mol protein, svarende til at gennemsnitlig 5 ud af 15 lysinrester i β -lactoglobulin er blevet omdannet til CML.

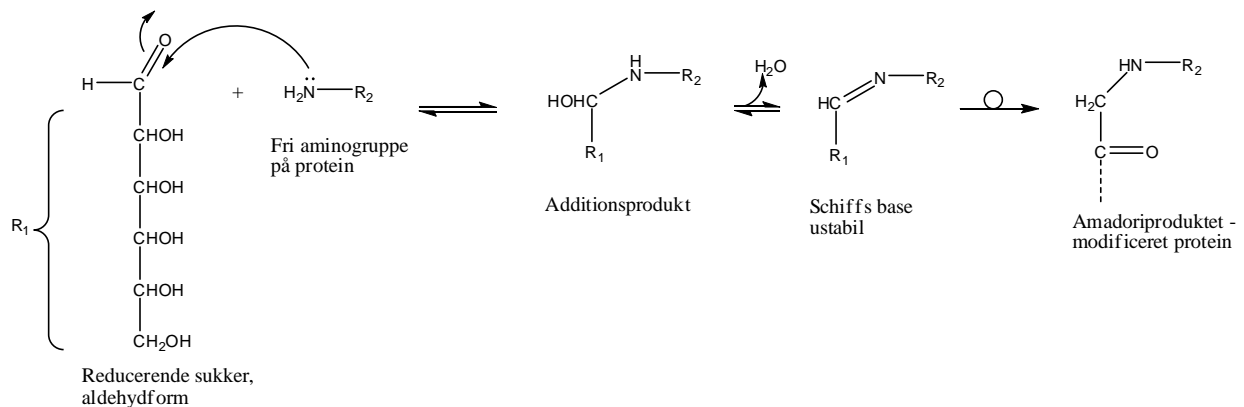
English Summary

Non-enzymatic glycation is the major modification of whey proteins occurring during manufacture of whey protein products. In this study, the reaction between β -lactoglobulin and lactose (1:100) was studied under conditions prevailing during spray drying with respect to temperature, water activity and pH. The rate of the overall lactosylation and the average lactosylation degree were highly influenced by temperature, increasing from 50 to 70 °C. Increasing water activity from 0.51 to 0.64 positively influenced the reaction rate and tended to reduce the activation energy. Increasing pH of the reaction mixture before drying slightly increased the reaction rate. The lactosylation reaction seemed to occur in two phases, the transition between which was related to a lowering of the glass transition temperature of the system. Detailed kinetic analysis of the initial lactosylation step showed that the pseudo first-order rate constants for the formation of mono-lactosylated β -lactoglobulin in general were higher than the formation of di-lactosylated β -lactoglobulin as a consequence of varying reactivity of the exposed lysine residues. However, the temperature dependencies of the two reaction steps were equal. In conclusion, lactosylation of the major whey protein may be controlled by decreasing the temperature used for drying, and to a lesser degree by reducing the pH before drying and by quickly lowering the water activity to ≤ 0.5 . In order to ensure that toxic products are not formed using the optimized reaction conditions, reaction mixtures were analyzed for advanced glycation end products (AGEs). N^ε-carboxymethyllysine (CML) was detected at a maximal concentration of 36 hours of incubation. Furosine was detected in rather low concentration using polyclonal anti-AGE antibody.

1 Baggrund og formål

Modificering af mælkeproteiner med forskellige sukkerarter er en reaktion der fremmes ved høje temperaturer og i koncentrerede produkter ved inddampning af valleproteinfraktioner og mælk og efterfølgende spraytørring til specialpulvere til fødevareindustrien. Reaktionen mellem mælkeprotein og reducerende sukkerarter styres tillige af procesbetingelser som pH, fugtighed og tid, hvilke er kritiske parametre for videre lagring af mælkepulver og proteinkoncentrater. Reaktion mellem mælkeprotein og forskellige sukkerarter påvirker mælkeproteiners funktionelle egenskaber, specielt deres evne til geldannelse, vandbinding, stabilisering af emulsioner og skum.

Reaktionen mellem lactose og valleprotein β -lactoglobulin i et tørt system viste sig ekstremt effektiv i forhold til reaktionen i et opløst system, så derfor blev alle forsøg gennemført ved tør-lactosylering af β -lactoglobulin. Reaktionen blev beskrevet ved de indledende trin i Maillard-reaktionen, hvor frie aminogrupeer – dvs. lysin-sidekæder i proteinet – reagerer med den åbne form af kulhydratet og danne et intermediært kondensationsprodukt, en Schiff's base, der vil omlægges til det såkaldte Amadori produkt (Figur 1). Der er 15 lysin-sidekæder i β -lactoglobulin, med forskellig reaktivitet.

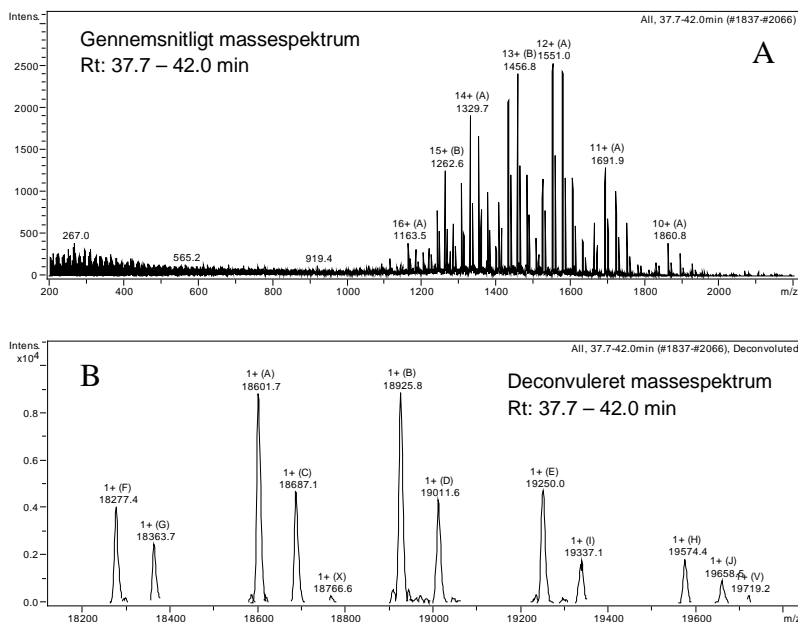


Figur 1. De tidlige trin i reaktionen mellem en reducerende sukker og en fri aminogruppe på et protein.

Projektets formål var at opklare mekanismerne bag modificering af mælkeproteiner ved reaktion med reducerende sukkerarter, samt kvantitativt at beskrive proteiners omdannelse under forskellige betingelser med det sigte at finde skånsomme fremstillingsmetoder af varmebehandlede protein- og sukkerholdige mejeriprodukter samt anviser muligheder for udvikling af nye skræddersyede modificerede mælkeproteiner uden at der dannes ernæringsmæssigt betænkelige stoffer – de såkaldte 'advanced glycation end products' (AGEs) - i processen eller ved senere lagring af produktet.

2 Resultater

Tør-lactosyleringen af β -lactoglobulin blev foretaget ved forskellige reaktionsbetingelser (pH, vandaktivitet a_w og temperatur T) ved at protein og lactose blev opløst i en buffer, hvorefter opløsningen blev frysetørret til et tørt, amorf pulver, der blev lagret til forskellige reaktionstider afhængig af temperatur og vandaktivitet. Efter lagring blev lactosyleringsgraden bestemt ved en nyudviklet LC-MS metode, som kan kvantificere indholdet af umodificeret β -lactoglobulin og β -lactoglobulin modificeret med hhv. 1, 2, 3, osv. lactosemolekyler i en given prøve. Metoden bygger på at der laves ét massespektrum for et givet tidsafsnit i den kromatografiske analyse. Ved at deconvulere dette gennemsnitlige massespektrum opnås et spektrum som viser samtlige lactosylerings-former af begge genetiske varianter af β -lactoglobulin i prøven. Ved at udtage prøver fra forskellige behandlinger til forskellig tid opnås et meget detaljeret billede af de ændringer, der sker. (Se Figur 2).

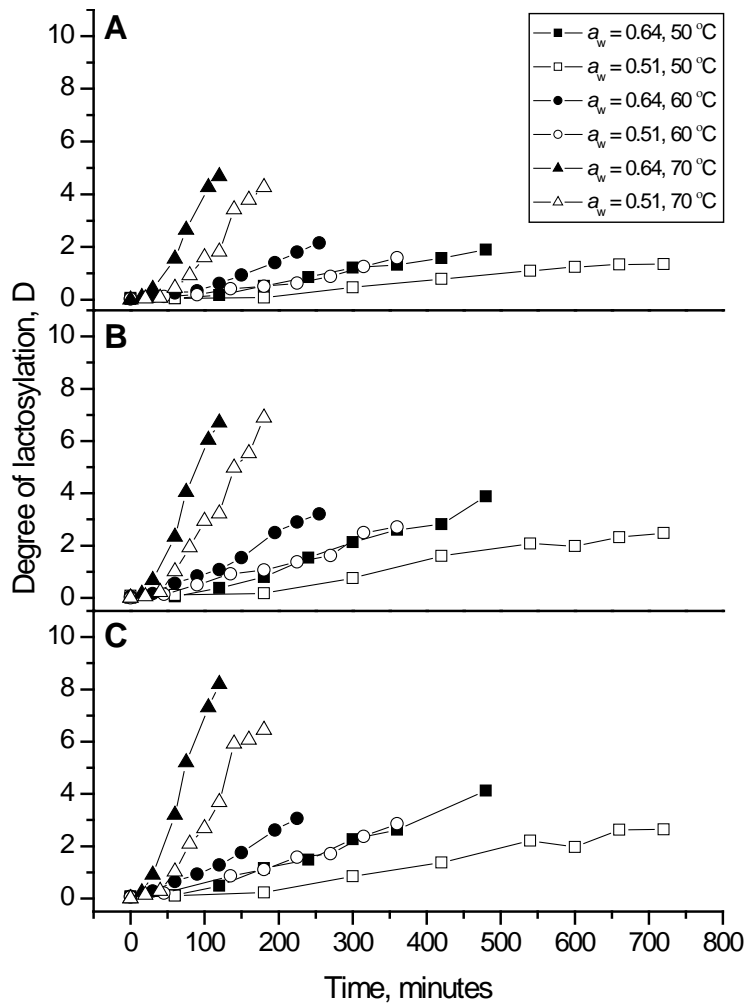


Figur 2. Eksempel på analyse af LC/MS-data. (A) Der fremstilles et gennemsnitligt massespektrum for et udvalgt område på kromatogrammet. Det samme område benyttes til alle data, hvorfor det er muligt at sammenligne resultaterne. (B) Massespektret deconvuleres og intensiteten, samt forholdet mellem de forskellige lactosylerede former, bestemmes.

Ud fra de deconvulerede massespektre kan den gennemsnitlige lactosyleringsgrad beregnes og følges med tiden i de forskellige prøver. Desuden kan den detaljerede kinetik følges i de første reaktionstrin mellem β -lactoglobulin og lactose, dvs. hvordan mængden af nativt β -lactoglobulin forsvinder efterhånden som den mono-lactosylerede form bliver dannet, og hvordan denne igen forsvinder fordi former med flere lactosemolekyler bliver dannet (via en konsekutiv kinetikmodel). I denne sammenhæng skal det bemærkes at massespektret med f.eks. tre gange

lactosyleret β -lactoglobulin indeholder en blanding af protein, der formodentlig er lactosyleret på forskellige lysiner i proteinet. Desuden blev det fundet at de genetiske former af β -lactoglobulin A og B reagerede ens i forhold til lactosylering og den kinetiske analyse bygger derfor på summen af intensiteterne fra de to proteinformer. Denne metode blev brugt til at bestemme den gennemsnitlige grad af lactosylering af β -lactoglobulin i det tørre system under forskellige reaktionsbetingelser [Thomsen et al., 2009].

I figur 3 er den gennemsnitlige lactosyleringsgrad af β -lactoglobulin afbildet ved fastholdt pH og varierende temperatur og a_w .



Figur 3. Den gennemsnitlige lactosyleringsgrad af β -lactoglobulin i tørt system ved pH 5 (A), pH 6 (B) og pH 7 (C) som funktion af reaktionstiden.

Det ses i figur 3 at lactosyleringsgraden generelt øges med stigende pH, temperatur og vandaktivitet. Især temperaturen påvirker lactosyleringsgraden, hvor reaktionshastigheden stiger betydeligt fra 60 °C til 70 °C. Den overordnede lactosyleringshastighed for det gennemsnitlige antal lactose der bindes til β -lactoglobulin blev bestemt ved lineær regression af kurverne i figur

3 og ud fra hastighederne opnået ved de tre temperaturer blev aktiveringsenergien, E_a , bestemt ved forskellig pH og a_w [Thomsen et al., 2009].

Selvom der ikke er signifikante forskelle på aktiveringsenergiene ved de forskellige betingelser kan der noteres nogle tendenser angående pH og a_w . Reaktionsblandinger fremstillet ved pH 5 blev markant mindre laktosyleret sammenlignet med prøver ved pH 6 og 7, hvilket kan skyldes at pH 5 er meget tæt på pI-værdien af β -lactoglobulin, hvor protein-protein vekselvirkninger er dominerende samtidig med at reaktiviteten af de frie aminogruupper er begrænset ved lavt pH pga. protonisering af aminogruppen på lysin. Øget pH vil gøre proteinoverfladen mere negativ og skabe frastødning samt øge mængden af reaktive frie aminogruupper.

Laktosyleringshastigheden steg betydeligt når vandaktiviteten blev øget fra 0,51 til 0,64, hvilket kan skyldes en lavere aktiveringsenergi ved høj a_w , hvor der er større mobilitet af reaktanterne. Effekten kan dog udkonkurreres ved at sænke temperaturen, som det fremgår af de overlappende resultater ved "50 °C, høj a_w " og "60 °C, lav a_w " (Figur 4, alle pH-værdier). Laktosyleringsmønstret er i øvrigt helt identisk og den eneste reelle forskel er at laktosyleringsgraden som beskrevet ovenfor stiger med stigende pH.

Ovenstående laktosyleringsforsøg med β -lactoglobulin blev suppleret med bestemmelse af et andet Amadori-produkt *furosine* i prøverne efter sur hydrolyse, som udtryk for laktosyleringsgraden. Her blev det vist at mængden af furosine bestemt ved HPLC korrelerede med laktosyleringsgraden bestemt ved LC-MS, hvilket viser at furosine-metoden også kan anvendes til at påvise at lactose har været kovalent bundet til proteinet og ikke er dannet uafhængigt i den tørre forsøgsmatrice.

Den fysiske tilstand af det tørre system synes generelt at være uafhængig af den pH-værdi som prøven er fremstillet i og således er der ingen fysiske barrierer, f.x. glastilstand med amorft lactose, der kan forklare hvorfor laktosyleringsreaktionen ved 50 °C og pH 5 (figur 3) forløber i to tempi – reaktionen er meget langsom i starten indtil et bestemt tidspunkt, hvorefter laktosyleringen forløber næsten lineært med tiden. Ved at anvende differential scannings kalorimetri til at måle glasovergangstemperaturer for prøveblandinger udtaget ved 50 °C og $a_w = 0,51$ blev det vist, at de tørre reaktionsblandinger forblev i glastilstanden gennem hele forsøgsserien [Thomsen et al., 2009]. Glasovergangstemperaturen faldt dog betydelig efter 180 min svarende til afslutning af den observerede nølefasen, hvilket kan forklares med vandabsorption af glastilstanden og øget mobilitet af reaktanterne som følge af det frigivne vand ved dannelsen af Schiff basen (figur 1).

Laktosylering af β -lactoglobulin foregår via en række konsekutive reaktioner, hvor den første reaktion sker mellem det native protein (β -LG) og lactose under dannelse af et enkelt-laktosyleret protein (β -LG1). Ud fra resultaterne i dette forsøg var det ikke muligt at udtale sig om hvilken af de 15 lysiner, der reagerede, da reaktionsproduktet eluerede i samme top og vejede det samme. Den anden reaktion er dannelsen af dobbelt-laktosyleret β -LG2 ved reaktion mellem de enkelt-

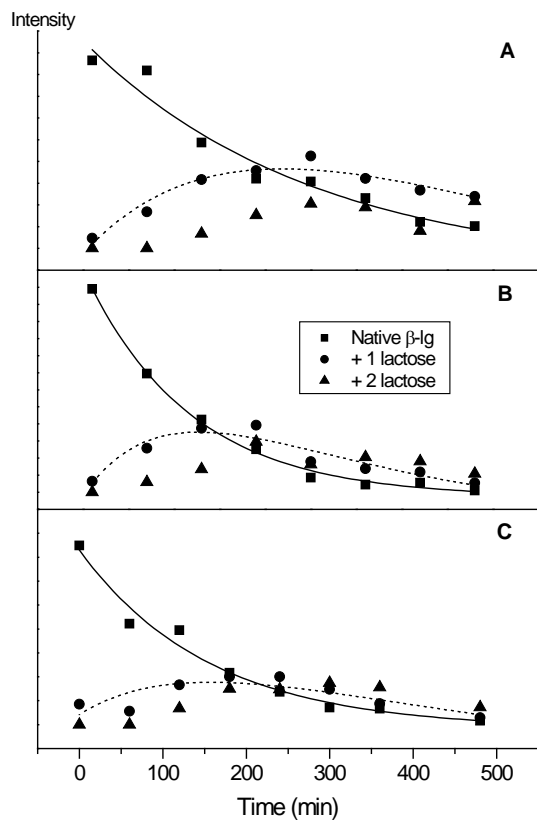
lactosylerede proteiner og lactose. Her gælder de samme forbehold som nævnt omkring den første reaktion, og serien af reaktioner fortsætter ved reaktion mellem lactose og de intermediært lactosylerede proteiner. For at beregne hastighedskonstanter og andre kinetiske parametre opstilles en konsekutiv kinetisk model, hvor kun dannelsen af det dobbelt-lactosylerede protein er medtaget, da antallet af punkter i datamaterialet herefter er for begrænset. Desuden er det rimeligt at antage at reaktionerne er irreversible og forløber via pseudo-1. ordens reaktioner, da $[\text{lactose}] \gg [\beta\text{-lactoglobulin}]$.



$$t = 0 \quad C_{\beta\text{-LG}}^0 \quad 0 \quad 0$$

$$t = t \quad C_{\beta\text{-LG}} \quad C_{\beta\text{-LG1}} \quad C_{\beta\text{-LG2}}$$

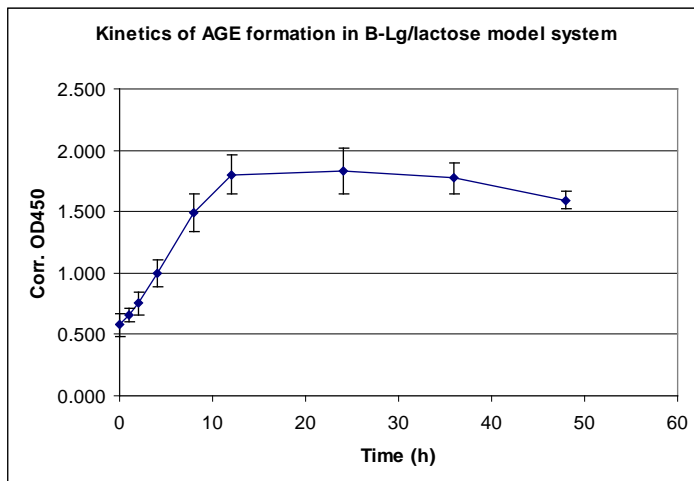
Hastighedskonstanterne $k_{\text{obs},1}$ og $k_{\text{obs},2}$ blev bestemt ved at fitte de matematiske udtryk for kinetikmodellen til de eksperimentelle data, der er udtrykt som intensiteten (\sim koncentrationen) fra de deconvulerede massespektre vs. tiden (figur 4) og de resulterende hastighedskonstanter $k_{\text{obs},1}$ og $k_{\text{obs},2}$ er angivet i [Thomsen et al., 2009].



Figur 4. Eksperimentelle værdier og modeltilordning for forsvindning af nativt β -lactoglobulin (■), og dannelsen af det enkelt-lactosylerede β -lactoglobulin (●) som function af tiden, i reaktionsblandinger ved pH 5 (A), pH 6 (B) og pH 7 (C) og opbevaret ved 50 °C og $a_w = 0,64$. Dannelsen af dobbelt-lactosyleret β -lactoglobulin (▲) er også vist.

Generelt viste den kinetiske analyse af de indledende lactosyleringstrin, at hastighedskonstanterne for dannelse af mono-lactosyleret β -lactoglobulin var større end dannelsen af di-lactosyleret β -lactoglobulin formodentlig på grund af varierende reaktivitet af de eksponerede lysinrester. Temperaturafhængigheden af de to trin syntes imidlertid at være ens inden for usikkerhedsintervallerne.

Fremstilling af modificerede mælkeproteiner uden dannelse af sundhedsskadelige stoffer kræver at man kontrollerer reaktionsbetingelserne allerede under spraytørring af produktet, så Maillard reaktionerne ikke forløber videre og danner de sene Maillard produkter (AGE) ved lagring af produktet. Der blev således udviklet en kvalitativ ELISA metode til bestemmelse af AGE og prøver fra ovenstående kinetikforsøg blev analyseret med denne metode. Dannelsen af AGE ved inkubation af frysetørret β -lactoglobulin/lactose over tid (1:100 molar ration; a_w 0,62; pH 7,0; $T=60^\circ\text{C}$) målt ved ELISA er vist i figur 5.



Figur 5: Dannelse af AGE målt ved ELISA i β -lactoglobulin/lactose system

Dannelsen af AGE målt ved ELISA topper efter 12 timers inkubation af β -lactoglobulin med lactose. Ved yderligere inkubation udover 48 timer blev det observeret at ELISA-signalet faldt igen, hvilket kan skyldes videre omdannelse af de AGE-produkter assayet er specifikt overfor til andre AGE-produkter, der ikke detekteres grundet anti-AGE antistoffets specificitet eller dårlig opløselighed af de videregående AGEs. Korrelation mellem AGE-produkternes dannelse og forekomst af et specifikt Maillard produkt, N^{ϵ} -carboxymethyllysin (CML), blev bestemt ved HPLC. Dannelsen af CML udviste et maksimum efter ca. 36 timers inkubation, omkring 5 mol CML/mol protein, svarende til at gennemsnitlig 5 ud af 15 lysinrester i β -lactoglobulin blev omdannet til CML.

3 Konklusioner

Samlet har projektet vist, at reaktionen mellem mælkeproteiner og reducerende sukkerarter foregår effektivt under betingelser som almindeligvis kan være gældende ved spraytørring af proteinpulvere, hvilket giver mulighed for udvikling af nye skræddersyede modificerede mælkeproteiner uden at der dannes ernæringsmæssigt betænkelige stoffer i produktet. Det er lykkedes kvantitativt at beskrive de indledende trin i lactosyleringen af β -lactoglobulin og opstille en reaktionsmodel som redegør for reaktiviteten af frie aminogruupper overfor lactose.

Modificering af β -lactoglobulin med lactose i et tørt system ved forskellige reaktionsbetingelser (pH, vandaktivitet og temperatur) blev karakteriseret vha. LC-MS og indholdet af nativt protein samt mono-, di- og multi-lactosylerede proteinformer blev kvantificeret til forskellige tider. Resultaterne viste at hastigheden af lactosyleringen og den gennemsnitlige lactosyleringsgrad steg kraftigt når temperaturen blev øget fra 50-70 °C. Der kunne ikke påvises nogen signifikante forskelle på aktiveringsenergiene ved de forskellige betingelser, dog syntes lactosyleringen ved 50 °C, pH 5 og $a_w = 0,51$ at være i en slags nølefasen i begyndelsen af reaktionen indtil mobiliteten af reaktanterne blev større som følge af det frigivne vand i det indledende reaktionstrin. Højere vandaktivitet resulterede ligeledes i større mobilitet og lactosyleringshastigheden steg betydeligt når a_w blev øget til 0,64, hvilket også reducerede aktiveringsenergien for reaktionen. Øget pH i reaktionsblandingen før tørring resulterede i større lactosyleringshastigheder ved pH 6 og 7 i forhold til pH 5, hvilket kan skyldes at protein-protein vekselvirkninger er dominerende nær β -lactoglobulins isoelektriske punkt.

Reaktionsmodellen for lactosyleringen af β -lactoglobulin blev vist at forløbe via en række konsekutive reaktioner og analysen af de indledende trin viste at pseudo-1. ordens hastighedskonstanterne for dannelse af mono-lactosyleret β -lactoglobulin generelt var større end dannelsen af di-lactosyleret β -lactoglobulin som konsekvens af varierende reaktivitet af overfladeeksponerede lysinrester. Temperaturafhængigheden af de to første trin synes dog at være ens.

Modificering af mælkeproteiner med forskellige sukkerarter kan generelt kontrolleres ved at sænke temperaturen under tørring, og i mindre grad ved at reducere pH før tørring og ved hurtigt at sænke fugtigheden i systemet under 50 %.

Liste over publikationer i internationale tidsskrifter med censur

Thomsen, M.K.; Olsen, K.; Otte, J.; Sjøstrøm, K.; Werner, B.B.; Skibsted, L.H. Effect of water activity, temperature, and pH on solid state lactosylation of β -lactoglobulin. Indsendes til *J. Agric. Food Chem.*

Rasmussen, M.; Jongberg, S.; Olsen, K.; Skibsted, L.H. Formation of AGE products during dry-way storage of β -lactoglobulin with lactose. *Indsendes til J. Agric. Food Chem.*

Liste over andre publikationer og offentliggørelser

Artikler i tidsskrifter:

Thomsen, M.K.; Skibsted L.H. Modifikation af mælkeproteiner med reducerende sukkerarter. *Mælkeritidende* **2003**, 250-253.

Konferencebidrag:

Thomsen, M.K. deltog i Cost Action 927 –IMARS ”The Maillard Reaction in Food and Medicine” 24-27 maj i Napoli, Italy.

Thomsen, M.K.; Olsen, K.; Otte, J.; Knudsen, J.; Skibsted L.H. Milk protein modification by reducing sugars. Poster præsentation: Arla Foods og MFF forskningsseminar d. 6/12-2007, Århus.

Thomsen, M.K.; Olsen, K.; Otte, J.; Skibsted L.H. Kinetics of the lactosylation of β -lactoglobulin in a dry system. Poster præsentation: IDF Dairy Science and Technology conference 2008, Quebec, Canada

Studenterprojekter i forbindelse med projektet:

Bachelorprojekter:

Werner, B.B.: Indflydelse af pH og vandaktivitet på den fysiske tilstand af frysetørret protein/laktose pulver. **2008**

Udvekslingsstuderende:

Pagés, B. Impact on Maillard type lactosylation on the β .lactoglobulin-stabilized emulsions.
2007. Erasmus-studerende fra Department of Biochemistry, Agrocampus Rennes, Frankrig.