

# Nye og innovative ingredienser indeholdende beta-kaseinfragmenter

Sekventielle, plasmininducerede nedbrydning af  $\beta$ -kasein er evalueret i forskningsprojekt, som viser markant mere kompleksitet end forventet.

## Store beta-kaseinfragmenter

$\beta$ -kasein ( $\beta$ -CN, 209 aa) er godt tilpasset til den tidlige ernæring. Under ostemodningsprocessen er nedbrydning af kasein hovedårsagen til ændringerne i tekstur og smag. Ansvarlig er de proteinedbrydende enzymer fra løbe og mælken selv. Plasmin er den mest betydningsfulde protease, der typisk kløver  $\beta$ -CN i to områder. Figur 1 viser de fremherskende  $\beta$ -CN-fragmenter beskrevet i mælk og den varme- og syrestabile fraktion kaldet proteose peptone (PP). Gamma-fragmenterne findes mest i koaglet, imens PP-fragmenterne ofte går med valen. Studier viser, at PP-fragmenter udgør op mod 10% af det totale protein i "sød" valle.

## Projektindhold

Projektet sigtede imod at erhverve god generel og grundlagsskabende viden om dannelse og konsekvens af  $\beta$ -CN-fragment-forekomst i mælk, idet de kan have både tilsigtede og/eller uønskede effekter på smag, konsistens, bioaktivitet og måske osteudbytte. Et andet eksempel er, at der ved mave/tarmfordøjelse dannes en del interessante bioaktive  $\beta$ -CN-fragmenter (med fx gunstig indflydelse på blodtryk samt immun- og nervesystemet).

## Måling af $\beta$ -kaseinfragmentdannelse

For at identificere og spore  $\beta$ -kaseinfragmenter i en blanding har vi fået lavet peptidantistoffer imod Asp40-Gln54, og derpå Glu21-Ser35, Met102-

Val116 og Val173-Pro186 (se figur 1). Dertil indkortes en RP-HPLC-metode til at monitorere fragmentmønstre i diverse blandinger understøttet af analysemetoden Maldi-tof MS og LC-MS – sidstnævnte hjalp Arla Foods Innovation Center med at køre.

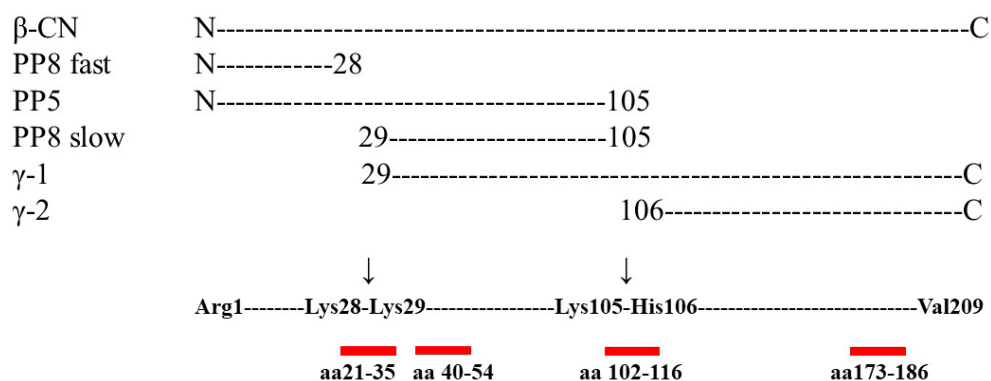
Kronologien i den plasmininducerede nedbrydning blev undersøgt. Kløvning imellem Lys105-His106/Lys107-Glu109 sker lettest, efterfulgt af deling ved Lys28-Lys29. Lys28-Lys29 foretrækkes sammenlignet med Lys29-Ile30. Lys113-Tyr114 er det tredje mest labile kløvnings-site. I kommerciel valle er PP5 mest forekommende efterfulgt af PP8 slow og PP8 fast, hvor sidstnævnte kun findes i lille udstrækning. Det er en væsentlig observation, idet antallet af fragmenter i industrielle fraktioner formentlig er begrænset.

## Separation

Til gavn for individuelle studier af de store  $\beta$ -CN-fragmenter blev en separationsmetode sat op. Ingrediensen Alfa-20 viste sig som et godt udgangsmateriale, men det er nødvendigt at reducere antallet af komponenter ved en forbehandling, hvor proteose-pepton-fraktionen isoleres (100°C i 20 min, pH  $\downarrow$  4,6, centrifugering, dialyse og frysetørring). Separation af store  $\beta$ -CN-fragmenter kan kun foregå under delvist denaturerende betingelser, hvilket vil komplicere indførsel af hensigtsmæssig mejeriindustriel teknologi til isolering eller fjernelse af sådanne fragmenter.



AF JAN TRIGE RASMUSSEN, SENIORFORSKER, INSTITUT FOR MOLEKYLÆRBIOLOGI OG GENETIK, AARHUS UNIVERSITET



Figur 1: Mest forekommende store  $\beta$ -CN-fragmenter og deres nomenklatur. PP8 fast (res 1-28), PP5 (aa 1-105/7), PP8 slow (aa 29-105/7), gamma-1 (aa 29-209), gamma-2 (aa 106-209) og gamma-3 (aa 108-209, ikke vist). Genkendelsesområder for anvendte antistoffer er angivet.

Figur 2: A) Forskel på et stabilt og beskyttende celleglag pga. af gode "tight junctions", og en utæt barriere, som bl.a. ses under sygdom. B) På statistisk vis illustreres effekten af udvalgte fraktioner hen over en periode på 24 dage. C) Måling af elektriske modstand hen over et celleglag angiver øget tæthed ved stigende værdier.

### Funktion og bioaktivitet

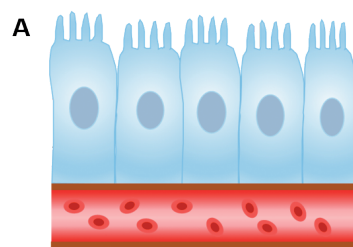
Mulige biologiske effekter af  $\beta$ -CN-fragmenter, primært mave/tarm-relaterede, er blevet undersøgt i de to nedenfor beskrevne modelsystemer.

**Modning af beskyttende tarmcellelag:** Når den elektriske modstand (TEER) hen over celleglaget måles kan man følge celler fra tarmen – de såkaldte CaCo-2 cellers modning og etablering af et tæt beskyttende celleglag (figur 2, panel A). Jo større modstand, desto tættere et celleglag. Eksperimenterne viser, at PP5- og PP8 slow pools, og PP fra Alfa 20 tilsyneladende stimulerer dannelse af et stabilt og tæt celleglag, sammenlignet med andre undersøgte proteiner (figur 2, panel B).

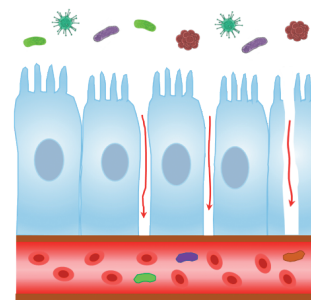
**Binding og transport af mineralet jern:** Vi har etableret en test, hvorved et cellulært optag af mineralet jern kan bestemmes, hvilket bedst gøres med FHs 74 Int celler. I en række meget omfattende eksperimenter har vi forsøgt at vurdere store  $\beta$ -kasein-fragmenters indflydelse på jernoptag. Det er vanskeligt at give en summarisk evaluering af de opnåede resultater. Dog ser det ud som om, at fragmenterne PP8 fast, PP8 slow og PP5 muligvis kan virke fremmede på optag af jern, specielt efter hydrolyse med mave-tarm associerede peptidaser.

### Implementering af resultater i praksis:

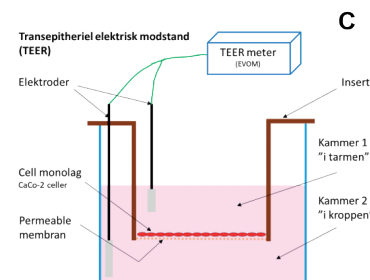
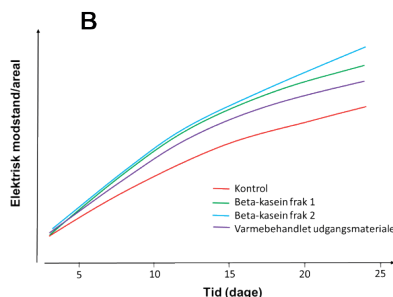
Vores erfaringer er blevet videregivet til bran-



Intakt tarmcellelag



Utæt/betændt tarmcellelag



chen. Den må nu afgøre, om den vil videreudvikle metoder til enten isolation eller fjernelse af de store  $\beta$ -CN-fragmenter. Som antydnet, så er det sandsynligvis forbundet med uforudsete tekniske vanskeligheder, idet fragmenterne udviser meget stabile interaktioner. Man er således nu i det store hele klar over, hvordan det forholder sig med store  $\beta$ -CN-fragmenter, hvilket også kan have betydning for fremtidig produktion af  $\beta$ -CN. Den forretningsmæssige afgørelse vedr. rentabiliteten og indførsel af ny teknik ligger imidlertid hos mejeribranchen, som må evaluere implementeringspotentialet. ●

### Resumé:

Under lagring og ostning af mælk kløves  $\beta$ -kasein i fortrinsvis 5-6 fragmenter. Nedbrydningen foregår mest med protease plasmin. Under vellykket ostning giver nedbrydning den tilstræbte smag og konsistens, mens ukontrolleret nedbrydning er uønsket. Hensigtsmæssige metoder til monitorering af  $\beta$ -kasein-fragmenter blev afprøvet og etableret. Større mængder af store  $\beta$ -kaseinfragmenter blev isoleret til gennemførelse af detaljerede undersøgelser af bl.a. mulige bioaktiviteter. Den sekventielle, plasmininducerede nedbrydning af  $\beta$ -kasein blev evalueret, og viste sig at være markant mere kompleks, end litteraturen antyder. I mejeritekniske fraktioner ses fragmenter af  $\beta$ -kasein meget tidligt i procestrinene, måske allerede inden mælken møder mejeriet. I valle vil tilstedeværelse af  $\beta$ -kasein-fragmentet PP5, og i mindre grad PP8 slow, være fremherskende. Separation af store  $\beta$ -kasein-fragmenter kan kun foregå under delvist denaturerende betingelser, hvilket er vigtig viden før indførsel af formålstjenlig teknologi. Store  $\beta$ -kasein-fragmenter stimulerer tilsyneladende tarmcellers evne til at danne et stabilt og tæt celleglag, og angiveligt fremmer de også et cellulært optag af jern, især efter simuleret mave/tarm-fordøjelse.

### Projekter under Mejeribrugets ForskningsFond

**Titel:** Nye og innovative ingredienser indeholdende beta-kasein-fragmenter – BETAFRAG.

**Projektleder:** Seniorforsker Jan Trige Rasmussen, Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet.

**Projektperiode:** Januar 2017 – december 2020.

**Hovedformål:** At tilvejebringe god generisk og grundlagsskabende viden om dannelse af beta-kasein-fragmenter i mælk, eftersom denne proteolytiske nedbrydning kan have både ønskede og/eller utilsigtede effekter, samt eventuelt influere på osteudbyttet. **Finansiering:** Mælkeafgiftsfonden (45%), Statens "Grønt Udviklings- og Demonstrationsprogram" (35%) og Aarhus Universitet (20%). Information kan rekvireres ved henvendelse til Mejeribrugets ForskningsFond, e-mail: gmo@lf.dk eller ved at læse om projektet på [www.mejeri.dk/forskning](http://www.mejeri.dk/forskning).