

Proteiner som antioxidanter i mælk

Modsat tidligere antagelser viser det sig, at proteiner i mælk har stor betydning for mælks holdbarhed

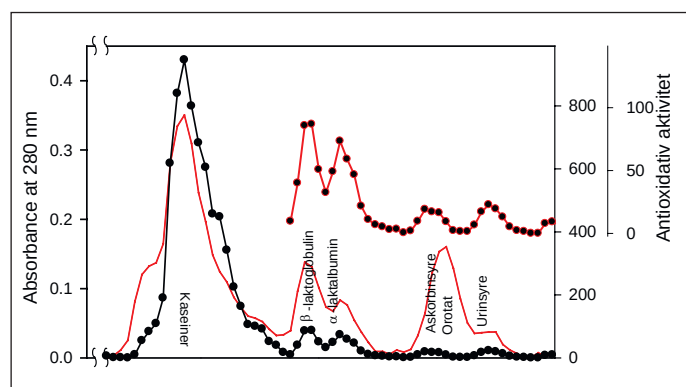
Af Morten Rahr Clausen og Trine Kastrup Dalsgaard. Institut for Fødevarerforskning, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet

Oxidationsprocesser i mælk manifesterer sig i lang række effekter, som dannelse af flygtige aromakomponenter, ændringer i struktur af proteiner og nedbrydning af vigtige mikronæringsstoffer. Kontrol af disse processer er derfor vigtig. Proteinernes betydning som antioxidanter er ikke tilstrækkeligt undersøgt, og vi beskriver her resultater, der viser, at den tertiære struktur har betydning for deres aktivitet som antioxidanter.

Oxidation af mælk

Oxidation af mejeriprodukter har været beskrevet i mere end 100 år. Det blev tidligt vist, at oxidation af mælkefedt førte til fejlsmag i mælken som følge af dannelse af lavmolekylære aromakomponenter.

Oxidation af mælk kan være metalion-induceret (specielt Cu(II)), enzymkatalyseret eller induceret af fotosensibilisatoren riboflavin. Fotooxidation menes at have størst betydning for oxidation i mælk og resulterer f.eks. i dannelse af peroxider, som kan nedbrydes til frie alkoxy- eller peroxyradikaler. De kan abstrahere et hydrogenatom fra umættede fedtsyrer og danne nye peroxyradikaler. Dermed startes en kædereaktion, som fører til nedbrydning af fedt, proteiner og lavmolekylære



Figur 1. Antioxidativ aktivitet af mælkekomponenter. Størrelseskromatografi (grå profil) kombineret med bestemmelse af den antioxidative aktivitet (•) i ORAC-assayet. Den indsatte graf repræsenterer en forstørrelse af de lavmolekylære komponenters antioxidative aktivitet [1].

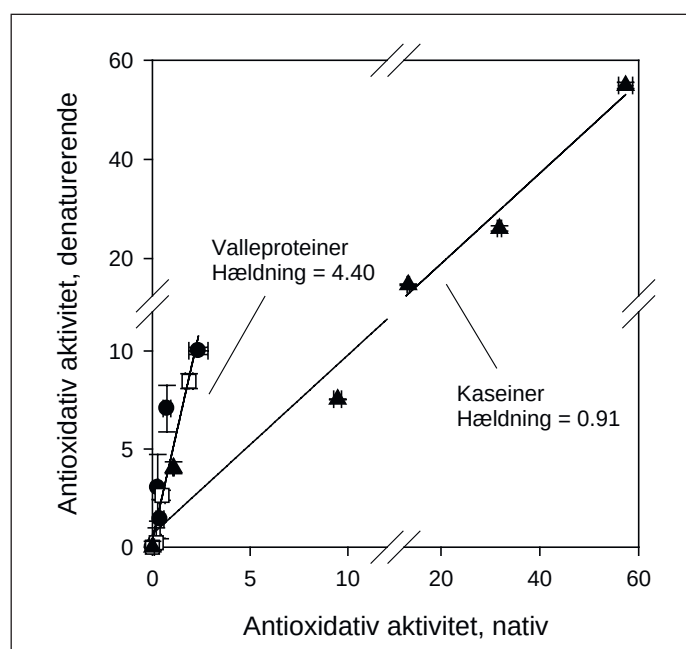
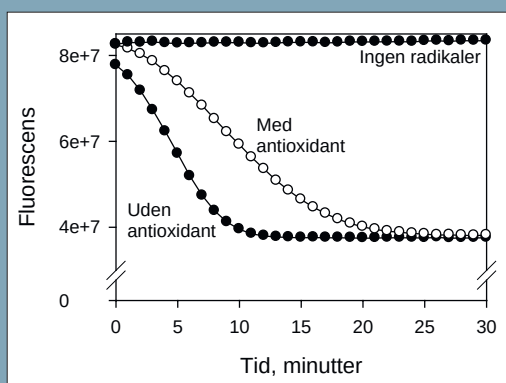
næringsstoffer. Nedbrydningen kan bremses ved tilstedeværelse af antioxidanter.

Antioxidanter i mælken

Lavmolekylære forbindelser som tokoferol, askorbinsyre og urinsyre anses for at være de vigtigste antioxidanter i mælk. Ved anvendelse af ORAC-assayet (boks 1), hvor evnen til at donere et hydrogenatom anvendes som mål for antioxidativ

Boks 1. ORAC-assay

Azoforbindelser ($R-N=N-R$), der bruges som radikaldannere, henfalder spontant under dannelse af frie radikaler ($R^{\bullet}$) og frit nitrogen. Radikalerne reagerer med oxygen ved en difusionskontrolleret reaktion ($k = 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) under dannelse af peroxyradikaler ($ROO^{\bullet}$). De bleger fluorescein og giver anledning til et fald i fluorescensintensitet. Ved tilstedeværelse af en antioxidant (AH) bremses fluoresceinhenfaldet, og dette bruges som et indirekte mål for den antioxidative aktivitet, se figur.



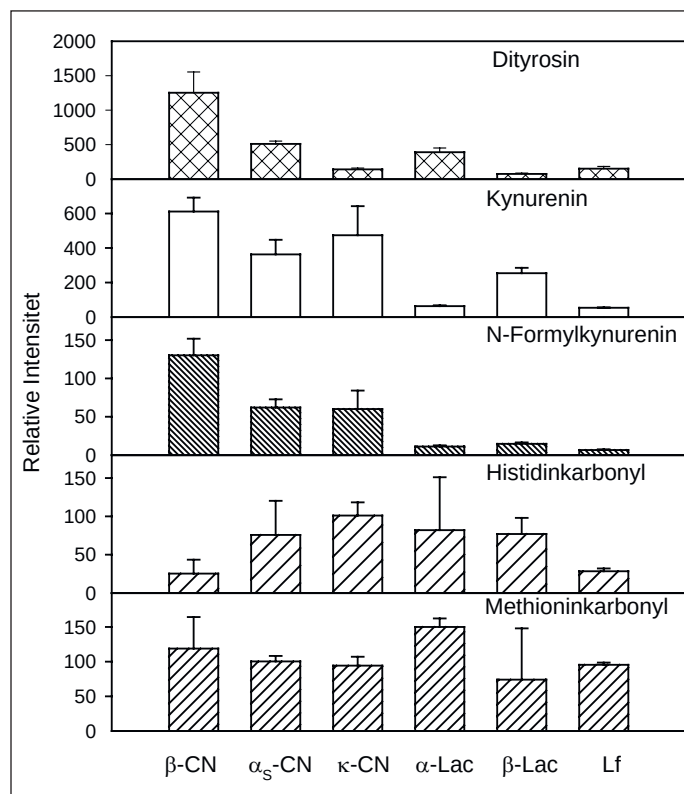
Figur 2. Sammenhæng mellem antioxidativ aktivitet af mælkeproteiner under denaturerende og ikke denaturerende omstændigheder. Valleproteinerne udfoldes under denaturerende omstændigheder og giver en øget antioxidativ aktivitet (hældning > 1). Kaseinernes fleksible tertiærstruktur gør aminosyrerne med antioxidativ aktivitet tilgængelige, selv i de native proteiner, og der er derfor ingen effekt af denaturering. Dette resulterer i en hældning ≈ 1 [1].

aktivitet, ses det, at askorbin-syre og urinsyre kan donere et hydrogenatom til peroxyradikaler (figur 1). Det fremgår tydeligt af samme figur, at proteinerne har en langt højere antioxidativ aktivitet: Kaseinerne er kvantitativt de dominerende antioxidanter i mælk. Men hvor disse opfører sig som en blanding af de aminosyrer, som de er opbygget af, udviser valleproteinerne, β -lactoglobulin og α -lactalbumin, langt lavere antioxidativ aktivitet. Dette kan formodentlig relateres til forskellen i proteinernes struktur. Kaseinerne har en mindre veldefineret tertiærstruktur og er derfor mere fleksible. Dermed bliver aminosyrerne, som kan donere et hydrogenatom til peroxyradikaler, mere eksponerede. I valleproteinerne, som har en globular struktur, er de antioxidative aminosyrer delvist gemt i proteinets indre, og dette hindrer dem i at virke som antioxidanter. Når ORAC-assayet udføres under denaturerende betingelser, ser vi derfor en 4-fold stigning i aktivitet for valleproteinerne, mens kaseinerne ikke påvirkes (figur 2).

Når proteiner virker som antioxidanter, bliver de ofte selv oxiderede, hvilket resulterer i ændringer i primærstrukturen (boks 2). Ved riboflavinmedieret fotooxidation af mælkeprotei-



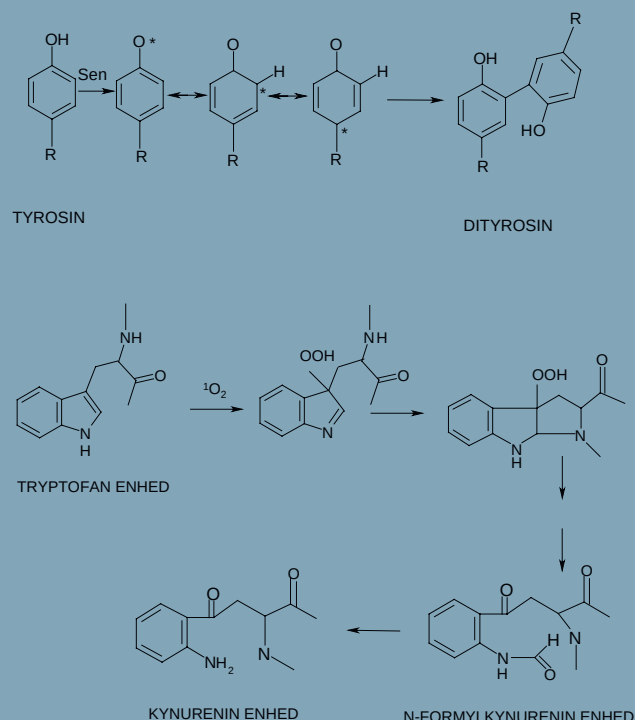
www.sxc.hu



Figur 3. Ændringer i primærstruktur af mælkeproteiner ved fotooxidation (44 timer) under tilstedeværelse af riboflavin ($1,75 \mu\text{g/mL}$). Dityrosin blev kvantificeret ved omvendt fase HPLC og fluorescensdetektion. N-formylkynurenin blev målt med fluorescensspektroskopi, mens kynurenin, og karbonylgrupperne i histidin og methionin blev målt med LC-MS/UV-detektion efter derivatisering med 2,4-dinitrofenylhydrazin. Ændringerne i intensiteterne for de individuelle komponenter blev beregnet relativt til det molære indhold af den enkelte aminosyrerest i hvert protein. Forkortelser β -CN: β -casein, α -CN: α -casein, κ -CN: κ -casein, α -Lac: α -laktalbumin, β -laktoglobulin, Lf: lactoferrin [2].

Boks 2. Protein oxidationsprodukter

Ved fotooxidation af mælkeproteiner oxideres aminosyrerne tyrosin, tryptofan, histidin, methionin og cystein. Nogle oxidationsprodukter fra tyrosin og tryptofan er blevet identificeret ved oxidation af mælkeproteiner og har følgende strukturer.



ner dannes forskellige karbonylforbindelser og dityrosin (figur 3). Oxidative ændringer af de to mest hydrofobe aminosyrer (tyrosin og tryptofan) var afhængig af proteinstrukturen, hvor dannelse af dityrosin fra tyrosin og kynurenine samt N-formylkynurenine fra tryptofan var højere i kaseinerne end i de globulære valleproteiner. Der blev ikke konstateret signifikante forskelle i oxidation af de mere hydrofile aminosyrer histidin og methionin.

Forskellen i oxidation af hydrofobe og hydrofile aminosyrer indikerer, at de globulære valleproteineres antioxidative aktivitet primært skyldes de hydrofile aminosyrerester, mens den antioxidative aktivitet af kaseiner afhænger af både hydrofobe og hydrofile aminosyrer. Konklusionen er, at proteinstrukturen har afgørende betydning for proteinoxidation og for, hvorledes proteiner virker som antioxidanter.

E-mail-adresser:

Morten Rahr Clausen: MortenR.Clausen@agrsci.dk

Trine Kastrop Dalsgaard: Trine.Dalsgaard@agrsci.dk

Referencer

1. Clausen, MR.; Skibsted, LH.; Stagsted, J. Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. In Press
2. Dalsgaard, TK. and Larsen, LB. Effect of photo-oxidation of major milk proteins for protein structure and hydrolysis by chymosin. *International Dairy Journal*. In press.