

Afslutningsrapport

Sialinsyreholdige mælkeproteiner – Relationer
mellem struktur og funktion

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2005-66

Februar 2005



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport

Sialinsyreholdige mælkeproteiner – relationer mellem struktur og funktion.

Projektperiode: 1. januar 2001- 31. juli 2004.

Projektledere:

Lektor Hanne Frøkiær og Lektor Vibeke Barkholt, Biocentrum-DTU

Øvrige deltagere:

Ph.D. studerende, cand.scient. Trine Lohmann Mikkelsen

Laborant Lisbeth Buus Rosholm

Bioanalytiker Charlotte Vajhøj.

Finansieringskilder:

FØTEK 3, Direktoratet for FødevareErhverv

Mejeribrugets ForskningsFond, Mejeriforeningen.

Sammendrag

Mælk indeholder mange forskellige proteiner, hvoraf en stor del har biologiske aktiviteter, og sådanne biologisk aktive proteiner kan potentielt udnyttes kommercielt, f.eks. i funktionelle fødevarer.

Et antal biologisk aktive mælkeproteiner indeholder kulhydratet sialinsyre, og det skulle i dette ph.d. projekt undersøges, hvorledes strukturen af de sialinsyreholdige mælkeproteiner påvirkede proteinernes biologiske aktivitet.

Fire sialinsyreholdige glykoproteiner blev undersøgt for deres immunmodulerende aktiviteter. Alle fire proteiner havde inhiberende effekter på immunstimulerede celler, dog var der store forskelle i styrken og typen af den inhiberende effekt. De to proteiner med stærkest inhiberende effekt var κ -kasein og laktoferrin, og sialinsyreindholdet havde ingen betydning for de to proteins immunmodulerende effekt. Glykomakropeptidet (GMP) som udgør ca. 1/3 af κ -kaseins peptidkæde fra den C-terminale ende, og som fraspaltes ved behandling af mælk med osteløbe, udviste også immuninhiberende aktivitet, dog langt svagere end κ -kasein. Studier af GMPs tilbøjelighed til at aggregere viste, at denne aggregering er afhængig af pH når GMP fraspaltes κ -kasein, og antydede, dog uden det kan fastslås, at kun GMP på monomerform er aktiv. Da industriel isolering af GMP netop baserer sig på størrelsen af GMP, kan disse resultater have betydning for produktionen af GMP til kommerciel anvendelse.

Da GMP i store mængder anvendes i flere næringsmidler, er det vigtigt at undersøge proteinets potentielle allergenicitet. I projektet blev GMPs evne til at inducere et specifikt immunrespons derfor undersøgt. Resultaterne viste, at GMP i sig selv ikke er i stand til at inducere et immunrespons, hvorfor GMP må anses for sikkert i forbindelse med fødevareallergi.

Summary

Milk contains numerous proteins of which several have been shown to hold biological activities. Such biologically active proteins have the potential for commercial exploitation, e.g. in functional foods.

A number of biologically active milk proteins contain the carbohydrate sialic acid, and the aim of the present project was to investigate the role of the structure of sialic acid containing proteins on the biologic activity.

Four sialic acid containing milk proteins; κ -casein, lactoferrin, glycomacropeptide (GMP), and proteose peptone component 3, were investigated for their immunomodulating activities. All the investigated proteins showed inhibitory effects on lipopolysaccharide stimulated murine spleen cells although to a different degree. Of the four proteins, κ -casein and lactoferrin exhibited strongest inhibitory effects, however, it was demonstrated that the sialic acid content of the two proteins does not influence their biologic activities. GMP constituting approximately one third of κ -casein's peptide chain from the C-terminal end, which is liberated from κ -casein upon cleavage with chymosin or pepsin also showed some immune inhibiting effect, though much weaker than the effect of κ -casein. Studies of the underlying factors for GMP's tendency to aggregate demonstrated that the aggregation/deaggregation of GMP is independent of pH whereas the aggregation is dependent on the pH *during* the cleavage of κ -casein. The results furthermore indicated though without directly showing it that monomeric GMP is the only structure holding the biologic activity. As industrial isolation of GMP actually is based on the molecular weight of GMP these results may have impact on the production of GMP for commercial purposes.

As large amounts of GMP are used in certain dietary products, investigation of the potential allergenicity of this protein is important. Accordingly, the capability of GMP to induce a specific immune response was investigated. It was demonstrated that GMP per se is not capable of inducing a specific immune response, and thus may be regarded as safe in the context of food allergy.

Baggrund

Mælk indeholder en række komponenter, der har fysiologisk betydning ud over den rent ernæringsmæssige. En del af disse komponenter er identificeret og deres biologiske effekter er delvist klarlagt, men for andre komponenter gælder, at der kun er etableret argumenter for en sammenhæng uden der er en egentlig forståelse af sammenhæng mellem struktur, biologisk effekt og fysiologisk betydning. Således har man i en række undersøgelser fundet at sialinsyreholdige mælkeproteiner inducerer et cellulært respons, resulterende i et ændret genudtryk eller i stimulering/inhibering af proliferation af celler, men mekanismerne er ikke klarlagt.

Nogle studier peger på at sialinsyre i sialinsyreholdige komponenter spiller en væsentlig rolle for mange biologiske aktiviteter. Vi har tidligere vist, at gangliosider fra mælk udviser varierende inhiberende effekt på mikrobielt stimulerede dendritiske celler (antigenpræsenterende celler), og at styrken af denne effekt afhænger af, om molekylet indeholder en eller to sialinsyreenheder [1]. Ligeledes har sialinsyreholdige oligosaccharider effekter på immunforsvaret og på adhæsion af toksiner og mikroorganismer på tarmen [2]. Der er også beskrevet enkelte studier af sialinsyreholdige mælkeproteiner [3-5], men dette arbejde er ufuldstændigt og kan således ikke danne basis for en egentlig klarlægning af sialinsyreholdige mælkeproteiners aktivitet. Udover at sialinsyre muligvis bidrager til de observerede biologiske aktiviteter hos flere sialinsyreholdige mælkeproteiner, kan sialinsyren også tænkes at bidrage til dannelse af di- eller polymerer eller til en ændret fordøjelighed af proteiner.

Formål

Projektets mål var at undersøge sammenhængen mellem struktur og biologisk funktion af sialinsyreholdige mælkeproteiner, herunder en undersøgelse af, hvilke former, der er biologisk aktive, deres modstandsdygtighed overfor fordøjelse og absorption, stabilitet under processering, og interaktion med andre sialinsyreholdige mælkekomponenter.

Resultater

Arbejdet har været opdelt i fire dele:

1. Etablering af metoder til at måle sialinsyreholdige proteiners biologiske aktivitet.
2. Karakterisering af sialinsyreholdige proteiners immunmodulerende effekter på miltceller og dendritiske celler fra mus, herunder betydningen af sialinsyre for den immunmodulerende effekt.
3. Karakterisering af forskellige strukturer af glykomakropeptidet, af forhold der har betydning for dannelsen af dimere og multimere former af GMP, og hvorledes strukturen af GMP influerer den biologiske aktivitet.
4. Karakterisering af sialinsyreholdige mælkeproteiners fordøjelighed og immunogenicitet.

Etablering af metoder til bestemmelse af den biologiske aktivitet.

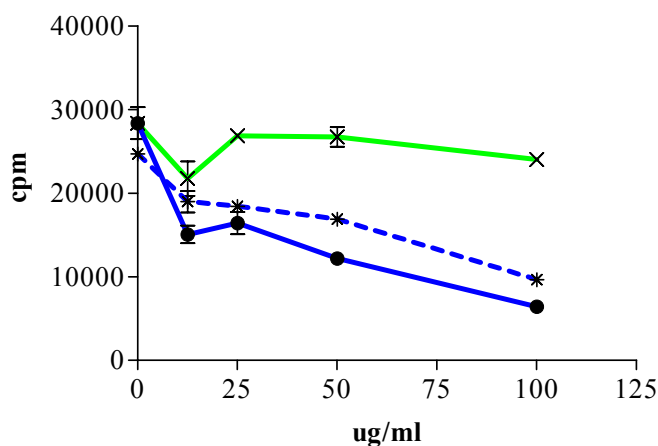
To af de i litteraturen beskrevne biologiske aktiviteter skulle i dette projekt forsøges etableret og videre anvendes til karakterisering af de sialinsyreholdige mælkeproteiners biologiske aktiviteter, nemlig proteinernes mulige aktivitet som inhibitor af choleratoxins binding til tarmceller og proteinernes inhibitorfunktion overfor stimulering af immunforsvarets celler.

Bestemmelse af proteiners binding til cholera toxin.

Cholera toxin binder til gangliosidet GM1 i tarmcellers membran og via denne binding kan dele af toxinet få adgang til cellens cytosol og her udøve den toksiske virkning. Bindingen sker til gangliosidets sialinsyre, og cholera toxin har 6 subunits der binder til gangliosider i cellemembranen. Det kan derfor tænkes, at molekyler indeholdende sialinsyre vil være i stand til at binde til cholera toxin og dermed hindre cholera toxins binding til tarmens celler. En sådan biologisk aktivitet kunne udnyttes til etablering af et *in vitro* assay til bestemmelse af sialinsyreholdige mælkeproteiners biologiske aktivitet. Bindingen til cholera toxin blev indledningsvis forsøgt målt i et ELISA format, hvor bindingen af GMP eller κ -kasein til cholera toxin på forskellig vis blev detekteret. Konklusionen på disse forsøg var, at bindingsstyrken, hvormed de sialinsyreholdige proteiner binder til cholera toxin, er for lav til at det kan udnyttes i et funktionelt assay for den biologiske aktivitet. Den lave bindingsstyrke kan tilskrives det faktum, at cholera toxin for at opnå en høj bindingsstyrke til tarmens overflade skal binde til 6 sialinsyreholdige molekyler, hvorfor binding til det enkelte site med sialinsyre fra proteiners kulhydratdele ikke nødvendigvis er nok til at hæmme cholera toxins mere fordelagtige binding til tarmepitelet.

Der foreligger enkelte publikationer, hvori sådanne binding assays har været anvendt til screening af sialinsyreholdige proteiners biologiske aktiviteter. I alle tilfælde er binding kun angivet som relative værdier, og det er derfor ikke muligt at sammenligne disse resultater med vores bestemmelser.

De ellers planlagte forsøg med at måle de sialinsyreholdige mælkeproteiners inhibering af cholera toxin og andre sukkerbindende molekyler til tarmceller dyrket *in vitro* blev følgelig opgivet da det forventedes at den nødvendige proteinkoncentration der skulle hindre cholera toxins binding til tarmceller ville være meget høj, hvilket ikke er praktisk muligt i disse cellulært baserede *in vitro* forsøg.



Figur 1. Inhiberende effekt af κ -kasein (-●-) glykomakropeptid (GMP) fremstillet ved chymosinbehandling af κ -kasein (-*), og GMP fra Sigma (-x-) på lipopolysakkaridstimulerede murine miltceller. Cellernes proliferation er bestemt ved mængden af inkorporeret tritiummærket thymidin.

Bestemmelse af den immunmodulerende effekt.

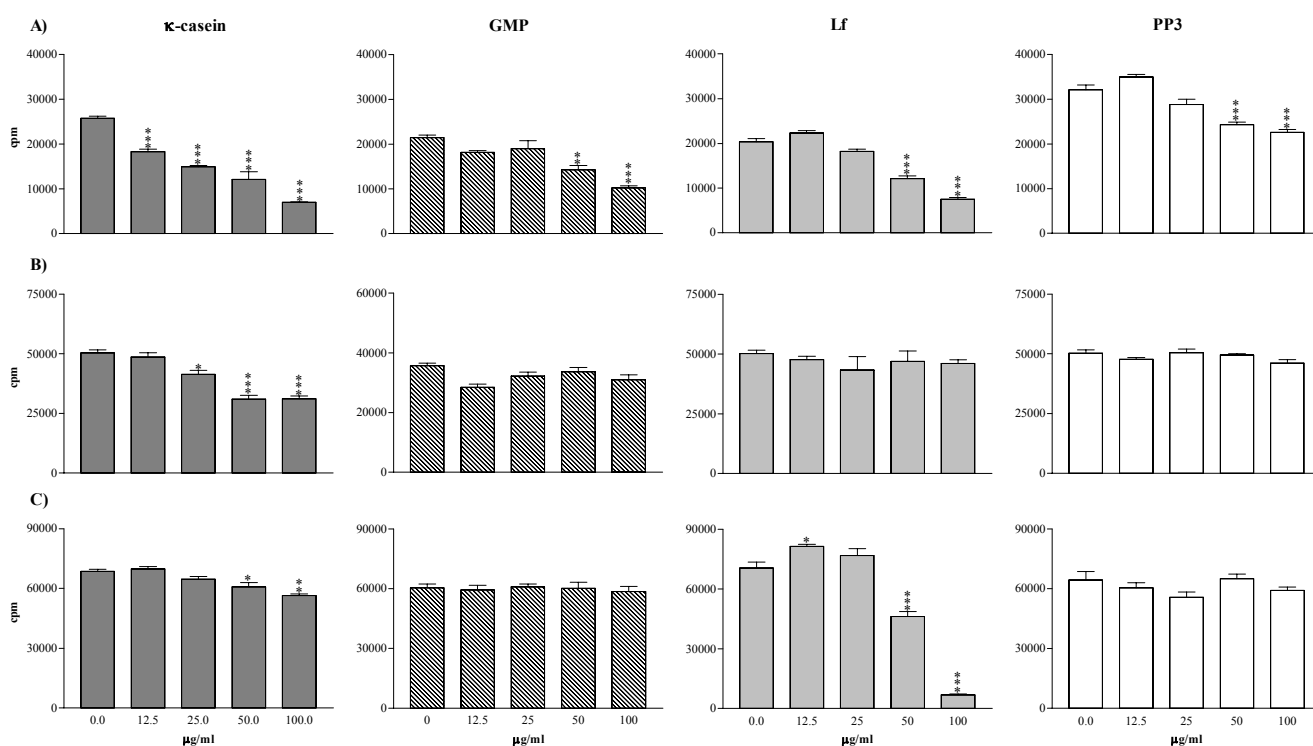
Den anden planlagte metode til bestemmelse af sialinsyreholdige mælkeproteiners biologiske aktivitet var bestemmelse af proteinernes inhiberende effekt på mikrobielt stimulerede murine miltceller. Mange mikrobielle komponenter, fx lipopolysaccharid (LPS) og bakterielle

cellevægskomponenter, stimulerer immunforsvarets celler til celledeling og/eller cytokinproduktion, og nogle sialinsyre- og andre kulhydratholdige molekyler kan inhibere denne stimulerende effekt. Derfor blev LPS stimuleret proliferation af miltceller forsøgt anvendt til bestemmelse af mælkeproteinernes biologiske aktivitet. Et eksempel på κ -kaseins inhiberende effekt på LPS stimulerede miltcellers proliferation ses i figur 1.

Et kritisk punkt ved denne metode til bestemmelse af mælkeproteiners immuninhiberende effekt er at selv ret små udsving i pH og ionstyrke i cellekulturerne fører til en mindsket celleproliferation.

Karakterisering af sialinsyreholdige proteiners immunmodulerende effekter

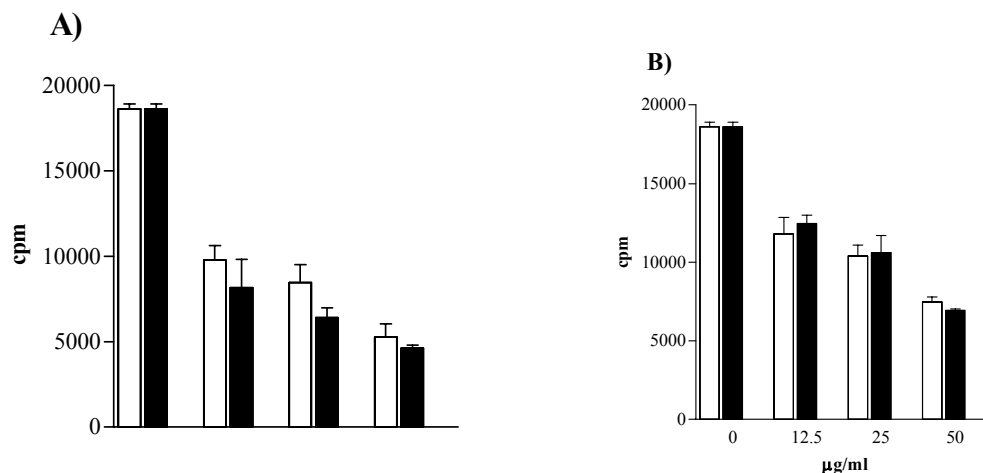
På baggrund af koncentrationer i mælk, tilgængelighed i oprenset form og tidligere beskrevne biologiske aktiviteter blev fire sialinsyreholdige mælkeproteiner udvalgt til en karakterisering af de immunmodulerende effekter på LPS- og mitogenstimulerede miltceller. De fire proteiner, κ -kasein, GMP, laktoferrin og proteose pepton-3 komponent, udviste varierende effekt på LPS stimulerede miltceller, hvor κ -kasein udviste størst inhibering af proliferationen, efterfulgt af laktoferrin, mens GMP og ikke mindst PP3 (proteose pepton) var svagere inhibitorer, se figur 2. Ved stimulering med plantemitogenerne PHA og Con-A sås kun inhibering med κ -kasein, men laktoferrin sås at stimulere ConA stimulerede miltceller yderligere.



Figur 2. Effekt af κ -kasein, glykomakropeptid (GMP), laktoferrin (Lf) og proteosepeptonkomponent 3 (PP3) på proliferationen af murine miltceller stimuleret med lipopolysakkarid (A), phytohaemagglutinin (PHA) (B), eller Concavalin A (C).

Dette resultat viser, at proteinernes aktivitet overfor immuncellerne er rettet mod visse celler og da GMP og PP3 har et højere antal af sialinsyre-enheder per molekyle i forhold til κ -kasein, syntes det ikke at sialinsyre alene bibringer proteinerne den inhiberende aktivitet.

Ved behandling af κ -kasein og laktoferrin med enzymet neuraminidase, der specifikt fraspalter sialinsyre, blev det muligt at sammenligne betydningen af sialinsyre i mælkeproteinerne for den immuninhiberende effekt. For både κ -kasein og laktoferrin sås ingen forskel i den inhiberende effekt for sialinsyreholdigt og sialinsyrefrit protein, se figur 3.



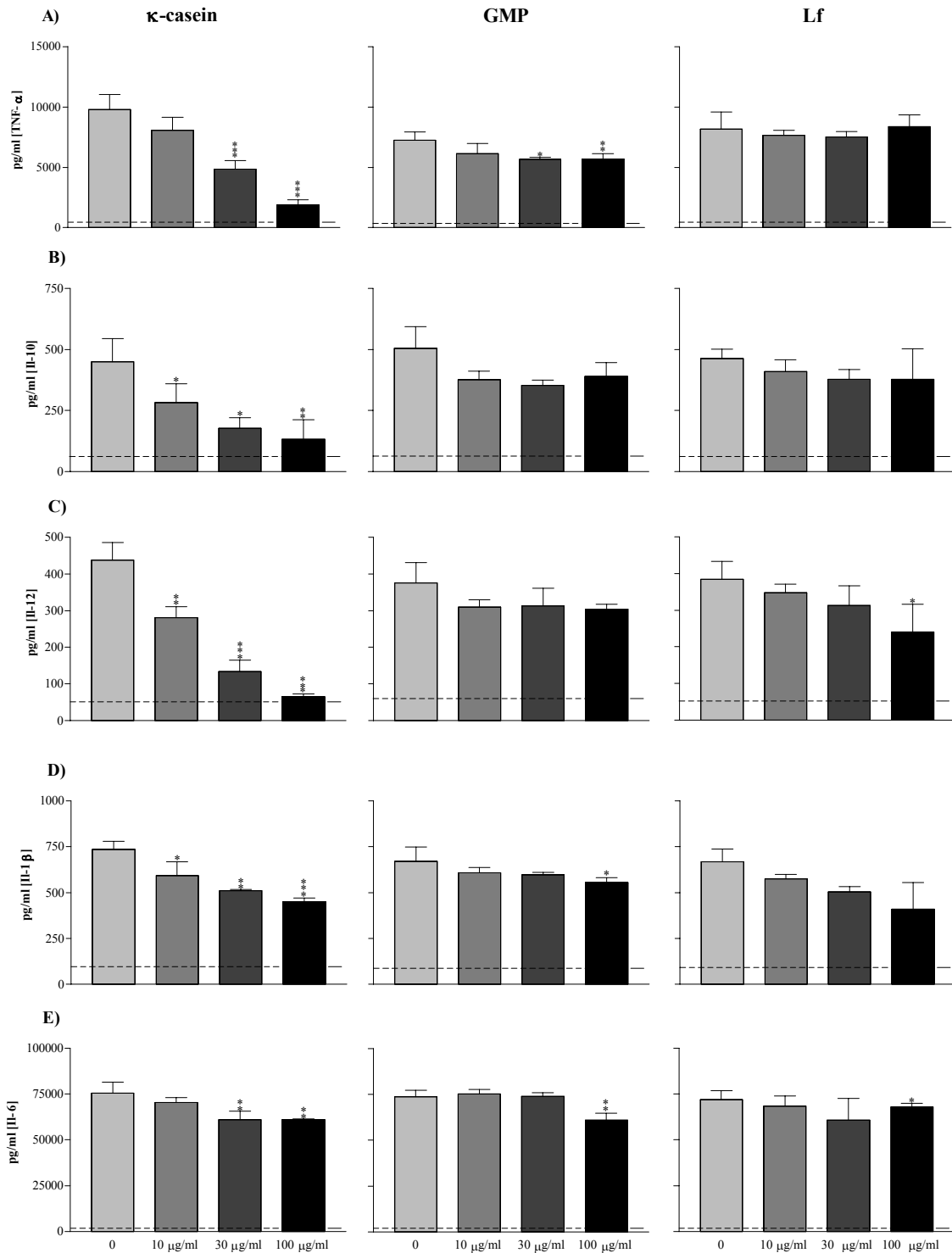
Figur 3. Effekt af nativ (sorte søjler) og neuraminidase behandlet (hvide søjler) κ -kasein (A) og Laktoferrin (B) på proliferationen af lipopolysakkaridstimulerede murine miltceller. Proliferationen bestemmes ved mængden af inkorporeret radioaktiv thymidin måles som counts per minut (cpm).

At proteinernes inhiberende effekt især sås for LPS-stimulerede miltceller antydende, at effekten er på antigenpræsenterede celler. Derfor blev effekten af κ -kasein, GMP og laktoferrin testet på LPS og mælkesyrebakteriestimulerede dendritiske cellers cytokinproduktion. Især κ -kasein inhiberede effekten af LPS, figur 4. Heller ikke i denne type assay sås nogen effekt af proteinernes sialinsyreindhold.

Overordnet viser disse resultater, at der er stor variation mellem sialinsyreholdige proteins immunmodulerende effekt og at denne effekt ikke kan tillægges proteinernes sialinsyreindhold. Da sialinsyreindholdet i proteinernes således ikke blev fundet at have betydning for proteinernes biologiske aktivitet, var undersøgelser af andre sialinsyreholdige komponenters effekt på proteinernes aktivitet ikke relevante.

Karakterisering af forskellige strukturer af glykomakropeptidet

GMP er i litteraturen beskrevet som et bioaktivt peptid, der bl.a. har effekt på appetitregulering og immunforsvarets celler, og kan i oprenset tilstand desuden anvendes til særlige diæter pga. dens særlige aminosyresammensætning. Ifølge litteraturen optræder GMP på monomer form ved pH værdier under 4,5 mens GMP danner aggregater ved højere pH værdier. Denne egenskab udnyttes industrielt til isolering af GMP fra vallekoncentrat.

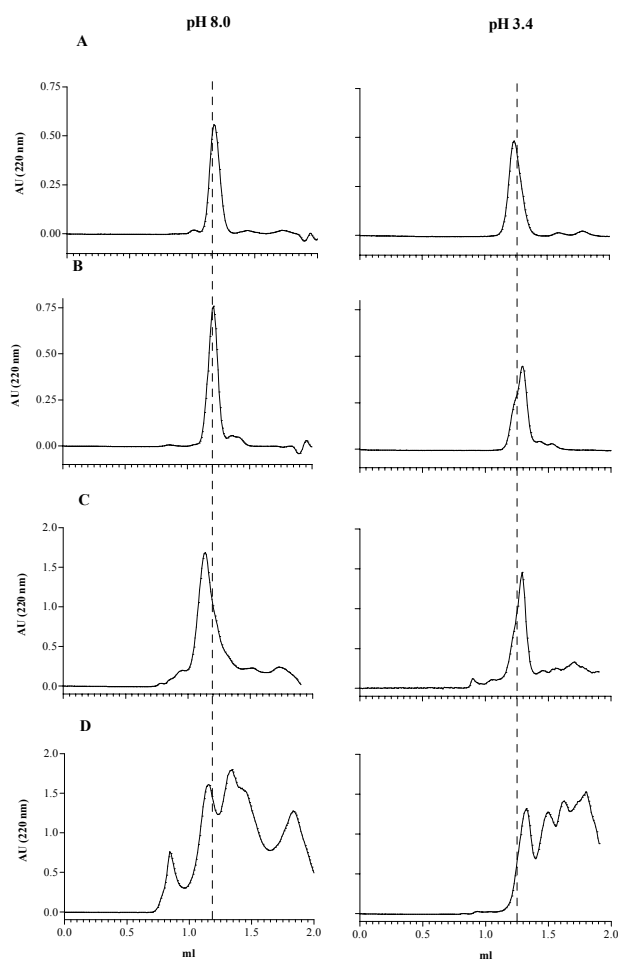


Figur 4. Effekt af κ -kasein, glykomakropeptid (GMP) og laktoferrin (Lf) på cytokinproduktionen i lipopolysakkaridstimulerede murine dendritiske celler. Produktionen af følgende cytokiner blev målt i cellekultursupernatanten vha. ELISA: Tumor nekrosifaktor (TNF)- α , Interleukin (IL-)10, IL-12, IL1 β og IL-6.

I dette projekt blev forskellige præparationer karakteriseret mht. molekylvægt og -struktur, og yderligere blev præparationerne karakteriseret for deres inhiberende aktivitet overfor LPS-stimulerede miltceller.

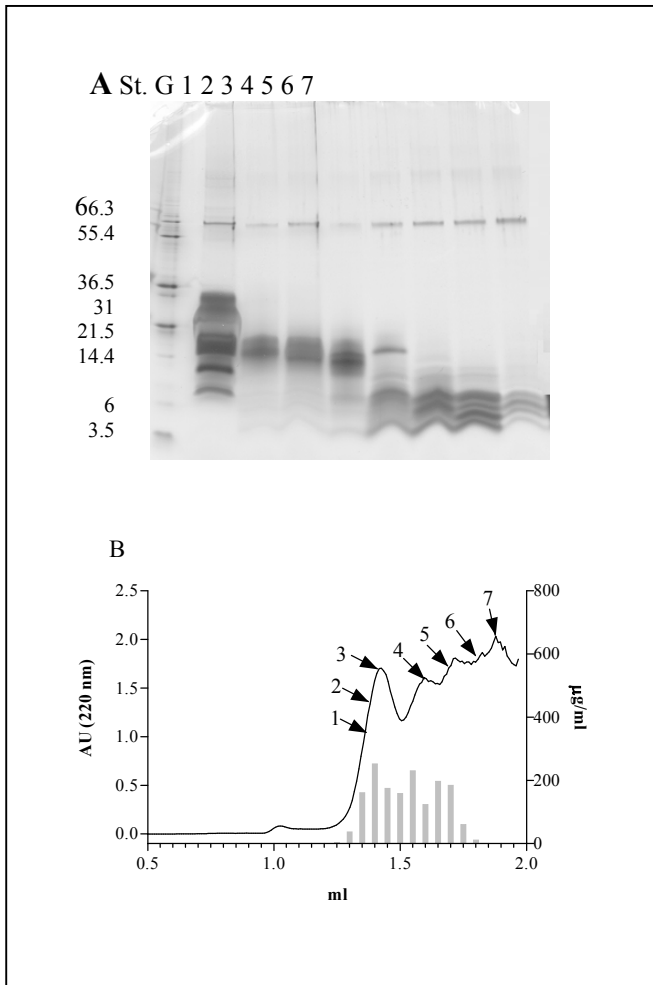
Gelfiltreringsanalyser viste, at aggregater af GMP ikke dissocierede på pH afhængig vis, figur 5, og disse resultater blev understøttet af molekylvægtsbestemmelser og identificering af gelfiltreringsfraktioner indeholdende GMP vha. ELISA, SDS-polyakrylamidgelelektroforese, sekventering og massespektrometri. Et eksempel på denne karakterisering ses i figur 6.

Enzymatiske spaltningforsøg af κ -kasein med pepsin og chymosin ved forskellig pH viste, at hvorvidt GMP er aggregeret efter spaltning af κ -kasein afhænger af om GMP-peptiderne er associeret i κ -kasein under spaltningen og ikke af pH efter spaltningen.



Figur 5. Gelfiltreringskromatogrammer af forskellige præparationer af glykomakropeptid (GMP) elueret fra en Superdex 75 kolonne ved på 8,0 (venstre spalte) eller pH 3,4 (højre spalte). A: GMP fra Sigma Aldrich, B: GMP produceret af Arla Foods, C: κ -kasein hydrolyseret med chymosin ved pH 6,6, og D: κ -kasein hydrolyseret med pepsin ved pH 2,5.

Analyser af molekylvægten af GMP i vallekoncentrat og prøver udtaget under den industrielle oprensningsproces viste, at GMP i vallekoncentratet og alle senere udtagne prøver primært fandtes som tetramer, og dette kan have væsentlig betydning for det endelige udbytte i den industrielle oprensning af GMP.



Pga. det anvendte assay til måling af GMPs biologiske aktivitet er meget følsomt overfor bla. pH-ændringer er det ikke lykkedes indenfor projektets rammer helt at klarlægge, om det er visse former af GMP der er biologisk aktivt. Typisk medfører en adskillelse af enkelte former af GMP så lave koncentrationer, at en tilstrækkelig fortynding af prøverne forud for måling af den biologiske aktivitet, så pH-værdien i cellekulturen ikke påvirkes, ikke er muligt.

Generelt ses κ -kasein at have meget større biologisk effekt per mol end GMP, hvilket antyder at dele af det fri GMP antager strukturer, der i modsætning til det GMP der indgår som en del af κ -kasein, ikke er aktive. Analyser af de isolerede enkelte former af GMP antyder indtil videre, at det primært er GMP-monomeren der har biologisk aktivitet.

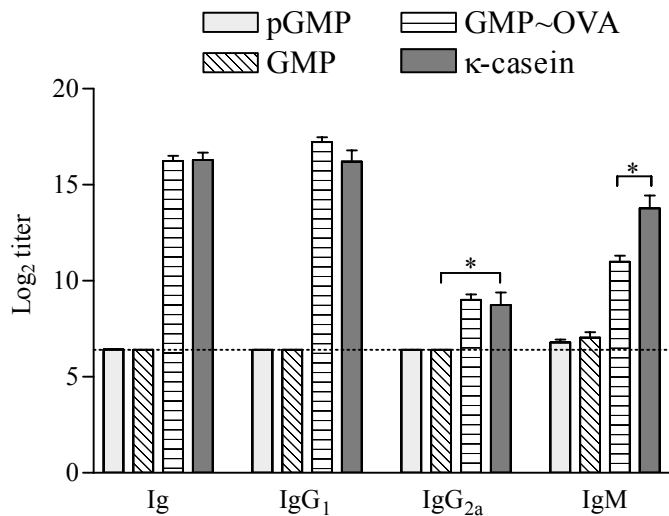
Figur 6. Karakterisering og identificering af GMP i fraktioner fra gelfiltrering af pepsinspaltet κ -kasein. Nederst ses et gelfiltreringskromatogram, hvor de grå søjler angiver fraktionernes indhold af GMP bestemt ved ELISA og tallene med pile henviser til banerne i SDS-PAGEen i øverste figur, hvor molekylvægten i de enkelte fraktioner karakteriseres.

Karakterisering af sialinsyreholdige mælkeproteiners fordøjelighed og immunogenicitet.

Hvis mælkeproteiner med en påstået biologisk aktivitet skal kunne bidrage fysiologisk efter indtagelse i en fødevarer, forudsætter det dels at proteinet er stabilt overfor syre, detergenter og fordøjelsesenzymer i mave-tarmkanalen og evt. bliver absorberet i en aktiv form, dels at proteinet ikke fremprovokerer et uønsket immunrespons i personer, der er disponerede for allergi. Således blev GMP undersøgt for proteinets stabilitet og immunogenicitet.

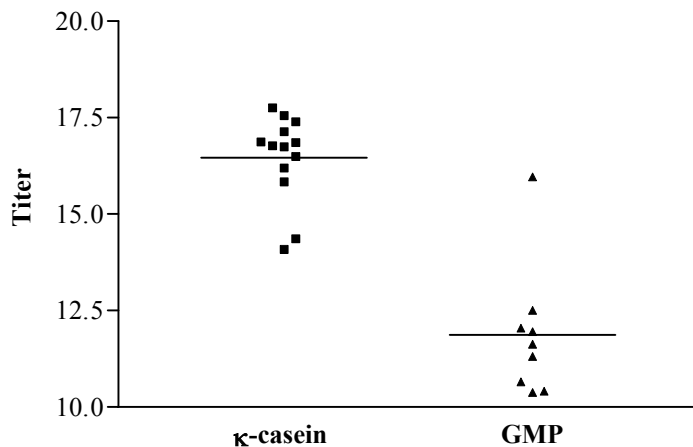
In vitro fordøjelsesforsøg viste, at GMP var ganske stabilt overfor fordøjelsesenzymernes aktivitet. Indledende forsøg på at fremstille antistoffer mod GMP viste at immunisering med GMP sammen med Freund's adjuvant ikke gav anledning til et kraftigt specifikt antistofrespons mod GMP, således som det normalt ses ved immunisering med mælkeproteiner, f.eks. κ -kasein. For at undersøge om GMPs manglende evne til at fremprovokere et immunrespons skyldtes størrelsen eller en manglende evne til at stimulere et T-celle respons blev grupper af mus immuniseret med GMP, polymeriseret GMP, GMP kovalent koblet til ovalbumin (OVA), eller κ -kasein. Hverken GMP eller polymeriseret GMP gav anledning til et væsentligt forhøjet GMP-specifikt immunrespons, hvorimod både κ -kasein og GMP koblet til OVA fremprovokerede et GMP-specifikt respons ved immunisering med adjuvant, figur 7. Dette viser at GMP ikke i sig selv kan stimulere et specifikt T-

celle respons, men når det er kovalent associeret til et peptid, der kan inducere et T-celle respons, dannes der antistoffer mod GMP.



Figur 7. ELISA-bestemmelse af GMP-specifikke antistoffer af isotypen IgG1, IgG2a, IgM eller summen af alle isotyper (Ig) produceret i mus efter immunisering med GMP, polymeriseret (p) GMP, GMP kovalent koblet til ovalbumin (GMP-OVA), eller κ-casein.

For at se om det samme gør sig gældende ved oral indtagelse af GMP, blev frit GMP og κ-casein sammen med cholera toxin indgivet oralt med sonde til mus. Her sås også kun et respons mod GMP i de mus der blev sondefodret med κ-casein, men ikke ved indgivelse af GMP, figur 8. Resultaterne her viste således at GMP ikke er immunogent, hverken ved immunisering eller ved oral indgivelse, og at denne manglende immunogenicitet ikke skyldes størrelsen, men en manglende egenskab hos GMP til at fremkalde et specifikt T-cellerespons.



Figur 8. Bestemmelse af det specifikke antistofrespons (titer-værdi) mod glykomakropeptidet (GMP) efter 5 ugentlige sondefodringer af mus med κ-casein eller GMP samme med små doser af cholera toxin som adjuvant.

Konklusion

Det er i projektet vist, at flere sialinsyreholdige mælkeproteiner har inhiberende effekter på lipopolysakkaridstimulerede immunceller, men sialinsyreindholdet i disse proteiner har ingen betydning for effekten. κ -kasein og laktoferrin udviste de stærkeste inhiberende effekter, mens GMP og proteose pepton komponent 3 havde svagere effekter.

En undersøgelse af proteinernes binding til cholera toxin viste, at bindingen var meget svag og det skønnes at så svage bindinger ikke vil have fysiologisk betydning.

Undersøgelser af GMPs strukturer viste, at aggregering af GMP ikke er en reversibel funktion af pH, men at aggregeringen af GMP er afhængig af pH under spaltningen af κ -kasein med pepsin eller chymosin.

Karakterisering af GMPs immunogenicitet viste, at GMP i sig selv ikke er immunogent, hverken ved injektion eller ved oral administrering, derfor må GMP anses for uden allergent potentiale.

Litteratur

1. Brønnum, H., Seested, T., Brix, S., Hellgren, L. & H. Frøkiær (2005): ... Scand. J. Immunol. In press.
2. Newburg, D. S. (1999): Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Current Medical Chemistry*, 6: 117-127.
3. Kawakami, H. (1997): Biological significance of sialic acid-containing substances in milk and their application. *Rec. Res. Devel. Agric. Biol. Chem.* 1, 193-208.
4. Otani, H., & Futakami, M. (1994): Effects of bovine milk proteins on the phagocytic property and formation of nitrite by mouse peritoneal macrophages. *Anim. Sci. Technol. (Jpn)* 65, 423-431.
5. Kawasaki, Y., Isoda, H., Sinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T., Nakajima, I. (1993): Inhibition by κ -casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutinin. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1214-1215.

Publikationer og offentliggørelser i forbindelse med projektet

Artikler i internationale tidsskrifter

1. Mikkelsen, T.L., Frøkiær, H., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, S.; Picariello, G., Ferranti, P. & V. Barkholt. (2004): The degree and nature of glycomacropeptide association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -casein. Submitted to *J. Dairy Sci.*
2. Mikkelsen, T.L., Bakman, S., Sørensen, E.S., Barkholt, V. & H. Frøkiær (2005): Sialic acid containing milk proteins show differential immunomodulatory activity independent of sialic acid. Submitted to *J. Food Agric. Chem.*
3. Mikkelsen, T.L., Rasmussen, E., Olsen, A., Barkholt, V. & H. Frøkiær (2005): Immunogenicity of κ -casein and glycomacropeptide. Submitted to *J. Dairy Sci.*

Ph.D. rapport

Trine Lohmann Mikkelsen (2004): Sialic acid-containing milk proteins: Relations between structure and function. Ph.D. thesis, Biocentrum-DTU, Biochemistry and Nutrition group, DTU.

Specialerapporter

Annette Olsen (2003): Immunologisk og immunkemisk karakterisering af glykomakropeptid fra mælk. Specialerapport, civilingeniør.

Cecilie Topp (2003): Biologisk effekt af fraktioner af κ -kasein. Specialerapport, levnedsmiddelkandidat.

Suanne Bakmann (2004): Bovin laktoferrins immunmodulerende egenskaber. Specialerapport, levnedsmiddelkandidat.

Rasmus Worziger (2003): Kapillarelektroforese af glykoproteiner. Polyteknisk midtvejsprojekt.

Heidi Blok Frandsen og Maria Hummelshøj Jensen (2003): Karakterisering af GMPs stabilitet i forbindelse med produktion og fordøjelse ved anvendelse af ELISA. Bachelorrapport, levnedsmiddelingenior.

Indlæg ved faglige kongresser, symposier o.lign.

A structural and functional study of GMP. T. L. Mikkelsen. Foredrag ved Proteins Summer Ph.D. School, Spetses, Grækenland, sept. 2002.

Sialic acid containing components in milk – relations between structure and function. T.L. Mikkelsen. Foredrag ved Milk Components: Quality, Health and Nutrition Ph.D. kursus, Ås, Norge, November 2002.

Characterization of the antigenicity of the Immunosuppressive milk Peptide glycomacropeptide. T.L. Mikkelsen, V. Barkholt, A. Olsen & H. Frøkiær. 9th International Symposium on Immunological, Chemical, and Clinical problems of Food Allergy, Budapest, April, 2004 (poster).

Faglige artikler:

Mikkelsen, T.L., Barkholt, V. & H. Frøkiær (2002): Sialinsyreholdige mælkeproteiner – relationer mellem struktur og funktion. Mælkeritidende, 18: 422-425.

Mikkelsen, T.L. (2004). Breast – the indispensable pitstop team? The Nutcracker, no. 11.

Mødeindlæg

A structural and functional study of glycomacropeptide. Foredrag ved studieophold på DISMA, Milano Universitet, marts 2004.

Samarbejdsrelationer

I forbindelse bla. massespektroskopi og hydrofobicitetsanalyser anvendt ved karakterisering af GMPs struktur og funktion er der samarbejde med F. Bonomi og S. Iametti, DISMA, University of Milan og P. Ferranti, university of Napoli.

I forbindelse med undersøgelser af GMPs aktivitet i forskellige prøver udtaget under isolering af GMP fra vallekoncentrat blev der samarbejdet med John Sørensen, Arla Foods Innovation.

Undersøgelser af den biologiske aktivitet af PP3, MUC 1 og MUC 15 var et samarbejde med Esben Skipper Sørensen og Jan Thirge Rasmussen, Laboratoriet for Proteinkemi, Århus Universitet.

Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning

Projektet har bidraget til en afklaring af i litteraturen beskrevne modstridende oplysninger om visse mælkeproteiners biologiske aktiviteter og aggregeringsmønstre. Desuden er der etableret en metode, baseret på fodring af mus, der kan anvendes til at vurdere proteiners potentielle allergenicitet.

De i projektet opnåede resultater kan danne basis for en revurdering af associerings-/dissocieringsmønstre af GMP og dermed overvejelser om ændringer i den industrielle oprensningsproces med målet at opnå et større udbytte af biologisk aktivt protein.

Projektrelationer til andre/nye projekter

Projektet baserede sig i høj grad på metoder til studier af immunmodulerende komponenter i mælk, der blev udviklet i MFF-FØTEK-projektet 'Karakterisering af immunmodulerende komponenter i mælk'. I forbindelse med projektet har vi også testet og fundet immunmodulerende effekter af mælkeproteinerne MUC1 og MUC15 oprenset af Jan Trige Rasmussen, Laboratorium for Proteinkemi, Århus universitet.

Forskeruddannelse

Projektet har inkluderet et ph.d. studium udført af cand. Scient. Trine Lohmann Mikkelsen, der skal forsvare sin afhandling i foråret 2005.

