

*Agata Górską, Ewa Ostrowska - Ligęza,
Joanna Bryś, Magdalena Wirkowska*

WPŁYW SKŁADU KOMPLEKSÓW β - LAKTOGLOBULINY Z WITAMINĄ D_3 NA PRZEBIEG KRZYWYCH DSC

Zakład Chemii Żywności, Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik Katedry: dr hab. *E. Bialecka-Florjańczyk*, prof. SGGW

W artykule scharakteryzowano kompleksy β -laktoglobuliny z witaminą D_3 i mieszaninami cukrów: laktozą, trehalozą i maltodekstryną przy użyciu aparatu DSC. Uzyskane krzywe DSC charakteryzowały się przebiegiem i kształtem zależnym od składu surowcowego kompleksów. Na krzywych DSC obserwowano endotermiczne piki o wyraźnym przebiegu. Przemiany endotermiczne jakim podlegają kompleksy świadczą o zmianach w strukturze badanych substancji. Przemiany fazowe kompleksów β -laktoglobuliny z witaminą D_3 świadczą o utworzeniu połączeń białko – cholekalcyferol.

Hasła kluczowe: β -laktoglobulina, witamina D_3 , DSC
Key words: β -lactoglobulin, vitamin D_3 , DSC

Białka serwatkowe mleka tj. α -laktoalbumina (α -LA) i β -laktoglobulina (β -LG) stanowią przedmiot wielu badań. Są one powszechnie cenione ze względu na swoje właściwości odżywcze i funkcjonalne. Stanowią 0,6-0,7% białka ogólnego, w tym około 75% przypada na albuminy, tj. α -LA i β -LG (1,2). Głównym białkiem frakcji serwatkowej mleka krowiego (3 g/l; 50% białek serwatkowych) jest β -laktoglobulina. Odgrywa ona istotną rolę antyoksydacyjną w mleku dzięki obecności aminokwasów siarkowych oraz możliwości syntezy glutationu (3). Bydłęca laktoglobulina jest składającym się ze 162 aminokwasów białkiem globularnym, posiadającym masę 18,4 kDa. Posiada w swej budowie 5 reszt siarkowych, z czego 4 są zaangażowane w tworzenie wewnątrzcząsteczkowych mostków disiarczkowych (4). W strukturze β -laktoglobuliny zawarte są centra kielichowe, które powodują wbudowanie (zamknięcie) witaminy D w kompleks z białkiem oraz struktury zewnętrzne, które również są zdolne przyłączyć (związać) witaminę D. Jednakże biologiczne funkcje β -laktoglobuliny w transporcie witaminy D nie zostały jeszcze dostatecznie wyjaśnione (5).

Badania wskazują na podobną strukturę i konformację β -laktoglobuliny z ludzkim białkiem wiążącym retinol (RBP, ang. retinol binding protein) (6). Wykazano, że β -laktoglobulina wykazuje zdolność wiązania hydrofobowych związków, tj. retinolu, kwasów tłuszczowych, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, cholesterolu itp. (7). Umożliwia to wykorzystanie jej do transportowania wybranych

składników odżywczych w układach pozbawionych tłuszczu. Wzbogacanie żywności w witaminę D_3 ze względu na fakt jej rozpuszczania w tłuszczach, odbywa się zazwyczaj z zastosowaniem nośników będących pochodnymi tłuszczów. Jednak rosnąca świadomość żywieniowa i zdrowotna konsumentów powoduje, że coraz częściej sięgają oni po produkty z obniżoną zawartością tłuszczu lub beztłuszczowe. Równocześnie wymagają oni, aby spożywana przez nich żywność była uzupełniana składnikami odżywczymi. Sprostanie takim wymaganiom stanowi niełatwe wyzwanie dla przemysłu spożywczego poszukiwania nowych możliwości wzbogacania żywności w witaminę D_3 (4).

Celem badań było określenie wpływu składu kompleksów β -laktoglobuliny z witaminą D_3 na ich właściwości termiczne. Badanie właściwości termicznych materiału wykonuje się m. in. aby stwierdzić jaki jest stopień czystości danej próbki. W przypadku kompleksów β -laktoglobuliny z witaminą D_3 , krzywe DSC pozwalają na obserwację skuteczności tworzenia kompleksów. W zależności od wysokości temperatury pików endotermicznych można wnioskować o jakości wytworzonego kompleksu β -laktoglobuliny z witaminą D_3 .

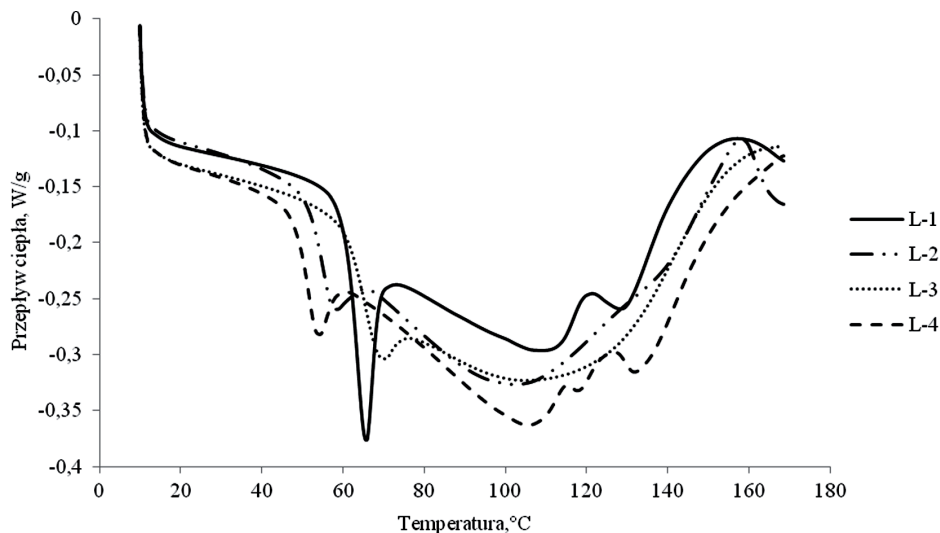
MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto β -laktoglobuliny otrzymanej od firmy Davisco Foods International (Le Sueur, Minnesota). Cholekalcyferol pochodził z firmy Sigma - Aldrich. Badania obejmowały syntezę kompleksów β -laktoglobuliny z cholekalcyferolem w stosunku molowym 1:2. W tym celu do wodnego, homogenicznego 2% roztworu β -laktoglobuliny dodawano stopniowo cholekalcyferol (rozpuszczony uprzednio w minimalnej objętości etanolu). Następnie roztwór mieszano przez 2 h w temp. 40 °C. Tak otrzymane połączenia przeprowadzono w formę proszków metodą suszeniasublimacyjnego (liofilizacji). Jako substancji stabilizujących kompleksy używano mieszanin cukrów: maltodekstryny i laktozy oraz maltodekstryny i trehalozy. Przed procesem liofilizacji badany roztwór zamrażano w zamrażarce komorowej w ciągu 24 h w temp. -70°C. Następnie badany materiał poddawano liofilizacji w liofilizatorze ALPHA1-4 LDC-1m firmy Christ, z kontaktowym ogrzewaniem surowca. Proces prowadzono przy stałych parametrach: ciśnienie 63 Pa, ciśnienie bezpieczeństwa 103 Pa, czas 24 h oraz temperatura pólek grzejnych liofilizatora 30°C. Kontrola temperatury materiału w czasie suszenia odbywała się przy użyciu termopary. Badane kompleksy β -laktoglobuliny z witaminą D_3 były analizowane przy użyciu skaningowego kalorymetru różnicowego – DSC, Q200, TA Instruments. Kalorymetr został skalibrowany przez sprawdzenie standardowych temperatur topnienia przy użyciu indu o wysokiej czystości. Wszystkie pomiary dla każdej próby wykonywano w atmosferze azotu jako medium chłodzącego. Próba odniesienia było puste naczynko aluminiowe niehermetycznie zamknięte, używane podczas każdego eksperymentu. Masa proszku wynosiła 10 – 15 mg, próbki były schładzane do temperatury 10°C i utrzymywane w tej temperaturze przez 5 minut. Krzywe DSC proszku otrzymywano w wyniku ogrzewania próbki od temperatury 10°C do temperatury 170°C z szybkością 5°C/min. W wyniku badań otrzymano

krzywe DSC przepływu ciepła (W/g) w zależności od temperatury ($^{\circ}\text{C}$). Próby wykonywano w trzech powtórzeniach (8).

WYNIKI ICH OMÓWIENIE

Przedmiotem badań były kompleksy β -laktoglobuliny z cholekalcyferolem (witaminą D_3) z dodatkami mieszanin cukrów. Mieszanina laktozy i maltodekstryny w stosunkach masowych odpowiednio 9:1 i 7:3 zostały wykorzystane w kompleksach L-1 i L-2. W kompleksach L-3 i L-4 zostały wykorzystane mieszaniny trehalozy i maltodekstryny w stosunkach masowych 9:1 i 7:3. Krzywe DSC otrzymane dla poszczególnych kompleksów przedstawiono na rysunku 1. Wszystkie cztery krzywe DSC charakteryzują się pikami endotermicznymi w zakresie temperatur od około 53 do 70°C (Ryc.1).



Ryc. 1. Krzywe DSC kompleksów β -laktoglobuliny z witaminą D_3 .
Fig. 1. The DSC curves complexes of β -lactoglobulin with vitamin D_3 .

Najwyraźniejszą przemianę endotermiczną zaobserwowano dla kompleksu L-1. Temperatura tego pik wyniosła około 65°C . Dla pozostałych kompleksów również wystąpiły podobne przemiany endotermiczne. Miały one znacznie łagodniejszy przebieg. Temperatury tych przemian wynosiły odpowiednio dla kompleksu L-2 – około 58°C , dla L-3 – około 70°C i dla L-4 – około 53°C . Najostrzejszym pikiem endotermicznym charakteryzował się kompleks L-1, w którego składzie oprócz β -laktoglobuliny i witaminy D_3 były obecne laktoza i maltodekstryna (9:1). Pik o najłagodniejszym przebiegu został zaobserwowany dla kompleksu L-2 o podobnym składzie surowcowym jak kompleks L-1 różniącym się tylko od niego stosunkiem masowym laktozy do maltodekstryny (7:3). Dla wszystkich kompleksów zaobserwowano wyższe temperatury pików endotermicznych dla substancji o stosunku

masowym cukrów 9:1, tak dla mieszanin maltodekstryny z laktozą czy trehalozą. Występowanie endotermicznych pików w tak niskich temperaturach może być związane ze zmianami jakimi pod wpływem podwyższonej temperatury ulega β -laktoglobulina. *De Wit* i *Swinkels* (9) wykazali, że w przedziale temperatur od 40 do 100°C β -laktoglobulina ulega agregacji, co powoduje częściową zmianę struktury białka. Zaobserwowane w niniejszej pracy temperatury pików endotermicznych są temperaturami, w której białka zaczynają ulegać agregacji, co wpływa na ich dalsze przemiany. Natywna β -laktoglobulina występuje w postaci dimerów dwóch identycznych podjednostek. Podwyższenie pH, temperatury, ciśnienia i inne czynniki środowiska mogą wpłynąć na wystąpienie szeregu zmian jakim może ulec laktoglobulina. W zakresie pH pomiędzy 3,5 a 5,2 β -laktoglobulina odwracalnie tworzy formy tetramerów/oktamerów. Takie przemiany warunkują występowanie endotermicznych pików w wyżej wymienionym zakresie temperatur. W zakresie temperatur od około 80 do 114°C obserwowano szerokie piki o łagodnym przebiegu. Najwyższą temperaturą dla tego przejścia fazowego charakteryzował się kompleks L-3 – około 110°C, najniższą kompleks L-2 – około 101°C. Porównanie temperatur drugiej przemiany endotermicznej dla początkowych substratów oraz kompleksów pomiędzy β -laktoglobuliną a witaminą D₃ świadczy o utworzeniu połączeń białko – cholekalcyferol. Przejścia fazowe zachodzące w takich zakresach temperatur świadczą o przemianach zachodzących w β -laktoglobulinie. Takie łagodne przejścia fazowe są charakterystyczne dla polimerów. Krzywa DSC kompleksu L-1 charakteryzowała się niewielkim pikiem endotermicznym, w zakresie temperatur 119 - 124°C. Kompleks L-1 zawierał największą ilość laktozy. Przemiana fazowa rozpoczynająca się w takiej temperaturze może świadczyć o obecności laktozy w kompleksie. Dla kompleksu L-4 obserwowano dwa niewielkie piki endotermiczne. Pierwszy w zakresie temperatur 114-120°C, drugi w zakresie 124-132°C. Składnikami tego kompleksu były trehaloza i maltodekstryna w stosunku wagowym 7:3. Obecność dwóch przemian endotermicznych świadczy o większej zawartości maltodekstryny w kompleksie L-4. Dodatek laktozy do kompleksów L-1 i L-2 spowodował przegięcie krzywej DSC w końcowym zakresie temperatur. Laktoza obecna w kompleksach rozpoczęła proces topnienia. Tak charakterystycznego przegięcia nie obserwowano dla kompleksów L-3 i L-4, w których składzie występowała trehaloza. Na podstawie uzyskanych krzywych DSC stwierdzono wpływ składu badanych kompleksów na ich kształt. Obniżenie zawartości maltodekstryny spowodowało wzrost temperatury pierwszych przemian endotermicznych badanych kompleksów.

WNIOSKI

Skład surowcowy kompleksów β -laktoglobuliny z witaminą D₃ miał wpływ na kształt i przebieg krzywych DSC. Pierwsze przemiany endotermiczne świadczą o przemianie białek β -laktoglobulin. Druga przemiana fazowa obserwowana dla wszystkich kompleksów wskazuje na wytworzenie kompleksów β -laktoglobuliny z witaminą D₃. Dodatek mieszanin cukrów miał wpływ na kształt i przebieg krzywych DSC. Uzyskane wyniki świadczą o możliwości wykorzystania techniki DSC do oceny skuteczności tworzenia kompleksów białko – cholekalcyferol.

A. Górską, E. Ostrowska – Ligęza, J. Bryś, M. Wirkowska

THE INFLUENCE OF COMPOSITION OF COMPLEXES B-LACTOGLOBULIN WITH VITAMIN D_3 ON DSC CURVES

Summary

In the study complexes β -lactoglobulin with vitamin D_3 and sugar mixtures: lactose, trehalose and maltodextrin were characterized by using DSC. DSC curves obtained were characterized by the shape and course depending on the composition on complexes. The DSC curves were observed endothermic peaks. The changes in structures of the investigated samples were shown for endothermic peaks. Phase transitions of complexes β -lactoglobulin with vitamin D_3 indicated to establish binds protein – cholecalcyferol.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bordin G., Cordeiro Raposo F., De la Calle B., Rodriguez A. R.*: Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography, *J. Chrom. A*, 2001; 928(1): 63-76.-2. *Jameson G., Adams J., Creamer L.*: Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin. *Intern. Dairy J.*, 2002; 12: 319-329. – 3. *Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B., Amigo L.*: Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 588-593. -4. *Górska A., Ostrowska-Ligęza E., Wirkowska M.*: β - laktoglobulina – potencjalny nośnik witaminy D. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44(3): 535-538.-5. *Ming Chi Yang, Nai Chi Chen, Chun-Jung Chen, Chin Yun Wu, Mao S.*: Evidence for β -lactoglobulin involvement in vitamin D transport in vivo – role of the c-turn (Leu-Pro-Met) of β -lactoglobulin in vitamin D binding. *FEBS J.* 2009; 276: 2251–2265. -6. *Blaner W.*: Retinol binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr. Rev.* 1989; 10(3): 308-316. -7. *Perez M., Calvo M.*: Interaction of β -Lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review. *J. Dairy Sci.* 1995; 78(5): 978-988. -8. *Ostrowska – Ligęza E., Szulc K., Lenart A.*: Przemiany fazowe składników odżywek w proszku dla niemowląt. *Zesz. Probl. Pos. Nauk Roln.* 2010; 553: 171-182.-9. *De Wit J., Swinkels G.*: A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin. *Thermal behaviour at temperatures up to 100°C.* *Biochim Biophys Acta.* 1980; 624: 40-50.

Adres: ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Badania były finansowane ze środków budżetowych na naukę w latach 2010-2012 jako projekt badawczy nr N N312 068639