

AGATA GÓRSKA, KAROLINA SZULC, EWA OSTROWSKA-LIGĘZA,
MAGDALENA WIRKOWSKA

WYKORZYSTANIE WŁAŚCWOŚCI B-LAKTOGLOBULINY DO WIĄZANIA CHOLEKALCYFEROLU

Streszczenie

Wzbogacanie żywności w witaminę D₃ (cholekalcyferol), ze względu na jej rozpuszczalność w tłuszczach, odbywa się zazwyczaj z zastosowaniem nośników będących pochodnymi tłuszczów. Sekwencja aminokwasów w łańcuchu β-laktoglobuliny oraz wyniki badań struktury przestrzennej pozwalają na zakwalifikowanie jej do rodziny lipokalin. Stwarza to możliwości wykorzystania β-laktoglobuliny jako nośnika witaminy D₃ w produktach o zmniejszonej zawartości tłuszczu.

Zakres pracy obejmował uzyskanie połączeń kompleksowych β-laktoglobulina – witamina D₃ i otrzymanie preparatu w postaci proszku. Zastosowano suszenie rozpyłowe oraz suszenie sublimacyjne, jako metody najczęściej zalecane w przemyśle spożywczym do suszenia substancji termolabilnych. Następnie określono poziom witaminy D₃ w uzyskanych kompleksach metodą HPLC i oceniono wpływ zastosowanego procesu technologicznego na zawartość witaminy w produktach. Badania potwierdziły możliwość utworzenia kompleksów β-laktoglobuliny z witaminą D₃. Poziom cholekalcyferolu w próbkach suszonych rozpyłowo był zbliżony do zawartości witaminy D₃ w próbce liofilizowanej. Stwierdzono istotny wpływ strumienia podawania surowca oraz brak wpływu temperatury procesu suszenia rozpyłowego na zawartość witaminy D₃ w otrzymanych kompleksach.

Słowa kluczowe: β-laktoglobulina, witamina D₃, suszenie rozpyłowe, suszenie sublimacyjne

Wprowadzenie

Białka serwatkowe są cenione ze względu na właściwości odżywcze i funkcjonalne. Stanowią 0,6 - 0,7 % białka ogólnego, w tym około 75 % przypada na albuminy, tj. α-laktoalbuminę (α-LA) i β-laktoglobulinę (β-LG) [3, 6]. Białka te odgrywają istotną rolę w żywieniu człowieka jako wyjątkowo bogate i zbilansowane źródło aminokwasów. Jako substancje biologicznie aktywne stosowane są do produkcji żywności funkcjonalnej, wpływającej pozytywnie na organizm człowieka [9, 14]. Wzbudzają

Dr A. Górską, dr inż. E. Ostrowska-Ligęza, dr inż. M. Wirkowska, Katedra Chemii, dr inż. K. Szulc, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

zainteresowanie wśród konsumentów znacznie częściej sięgających po produkty wykazujące właściwości prozdrowotne. Głównym białkiem frakcji serwatkowej mleka krowiego (3 g/l; 50 % białek serwatkowych) jest β -laktoglobulina. Badania wskazują na podobną strukturę i konformację β -laktoglobuliny z ludzkim białkiem wiążącym retinol (RBP, ang. retinol binding protein) [2]. Sekwencja aminokwasów w łańcuchu oraz wyniki badań struktury przestrzennej pozwalają na zakwalifikowanie β -laktoglobuliny do rodziny lipokalin [8]. Wykazano, że β -laktoglobulina wykazuje zdolność wiązania hydrofobowych związków, tj. retinolu, kwasów tłuszczowych, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, cholesterolu itp. [11]. Umożliwia to wykorzystanie jej do transportowania wybranych składników odżywczych w układach pozbawionych tłuszczu. Wzbogacanie żywności w witaminę D₃, ze względu na jej rozpuszczalność 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 ze zmniejszoną zawartością tłuszczu lub beztłuszczowe. Równocześnie oczekują, że spożywana przez nich żywność będzie wzbogacona w składniki odżywcze. Opisanie właściwości β -laktoglobuliny stwarza możliwości wykorzystanie jej do wiązania i transportowania niektórych składników odżywczych, np. rozpuszczalnej w tłuszczach witaminy D₃ w układach o zmniejszonej zawartości tłuszczu.

Celem pracy było uzyskanie połączeń kompleksowych β -laktoglobulina – witamina D₃ i doprowadzenie preparatu do postaci proszku nie tylko ze względu na wygodę i uniwersalność zastosowania w przemyśle spożywczym, ale również ze względu na stabilność przechowalniczą, łatwość dozowania oraz mniejszą objętość (w stosunku do produktu płynnego), co jest szczególnie istotne w czasie transportu, jak i magazynowania.

Material i metody badań

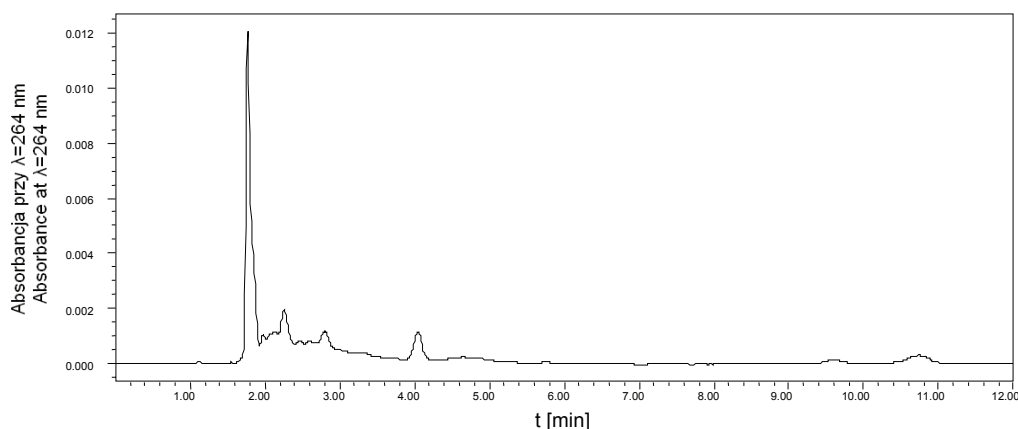
Przedmiotem badań była β -laktoglobulina otrzymana od firmy Davisco Foods International (Le Sueur, Minnesota). Analiza chromatograficzna (HPLC) wykazała brak witaminy D₃ w próbce białka. Cholekalcyferol oraz pozostałe odczynniki pochodziły z firmy Sigma-Aldrich. Badania obejmowały syntezę kompleksów 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). Roztwór mieszano przez 2 h w temp. 40 °C. Następnie zsyntetyzowane kompleksy suszono rozpyłowo lub sublimacyjnie do uzyskania preparatów w formie proszków. Metody ten są najczęściej stosowane w przemyśle spożywczym do suszenia substancji termolabilnych [5, 7]. Każdorazowo do suszenia rozpyłowego przygotowywano 300 ml roztworu. Roztwory poddawano homogenizacji w homogenizatorze Ultra Turrax T 25 basic IKA Labor-

technik (RFN), przez 90 s przy 11000 rpm, a następnie suszono rozpyłowo. Suszenie otrzymanych roztworów prowadzono w suszarce rozpyłowej firmy Anhydro (Dania), przy jednej prędkości dysku rozpyłowego, wynoszącej 39000 obr./min (średnica dysku 63,42 mm) i dwóch strumieniach podawania surowca: 15 oraz 25 cm³/min. Suszenie odbywało się współprądowo, a temperatura powietrza wlotowego wynosiła odpowiednio 120 °C lub 150 °C. Każde suszenie, przy określonych parametrach procesu, powtarzano dwukrotnie. Próbkę w postaci proszków uzyskano także metodą suszenia sublimacyjnego (liofilizacji). 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 półek grzejnych liofilizatora 30 °C. Kontrola temperatury materiału w czasie suszenia odbywała się przy użyciu termopary. Zawartość witaminy D₃ w próbkach, po ekstrakcji heksanem, oznaczano metodą HPLC z użyciem chromatografu cieczowego Waters połączonego z detektorem spektrofotometrycznym UV-Vis. Do analizy stosowano kolumnę RP C18 o wymiarach 150 x 4,6 mm. Fazę ruchomą stanowił układ: acetonitryl: octan etylu: chloroform (88:8:4). Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min. Analizę każdej próbki powtarzano trzykrotnie.

Wyniki i dyskusja

W badaniach podjęto próbę zastosowania β -laktoglobuliny do utworzenia kompleksów z witaminą D₃. Opisane w literaturze badania wskazują na zdolność tego białka serwatkowego do tworzenia połączeń z substancjami lipofilowymi [11]. Analiza chromatograficzna stosowanej w badaniach β -laktoglobuliny wykazała brak witaminy D₃ w składzie próbki (rys. 1). Otrzymane wyniki potwierdziły możliwość otrzymania kompleksów pomiędzy β -laktoglobuliną a witaminą D₃ (rys. 2 i 3, tab. 1). Badania przeprowadzone w różnych warunkach suszenia rozpyłowego (temperatura powietrza wlotowego – 120 °C lub 150 °C; strumień podawania surowca – 15 ml/min lub 25 ml/min) wykazały brak wpływu temperatury na zawartość witaminy D₃ w kompleksach (tab. 1). Poziom witaminy D₃ w próbkach suszonych rozpyłowo (temperatura powietrza wlotowego 120 °C lub 150 °C, strumień podawania surowca 25 ml/min) był zbliżony do zawartości witaminy D₃ w próbce liofilizowanej, w której materiał nie był poddawany działaniu podwyższonej temperatury. Jedną z istotnych przyczyn takiego rezultatu może być proces towarzyszący suszeniu rozpyłowemu – tzw. „efekt chłodzący odparowania”. Znaczna ilość ciepła dostarczanego do komory suszenia ze strumieniem gazu suszącego jest zużywana na proces odparowania. Z suszonych cząstek pobierane jest ciepło przemiany fazowej parującej wody, co powoduje spadek temperatury materiału suszonego. Przyjmuje się, że temperatura powierzchni suszonych cząstek

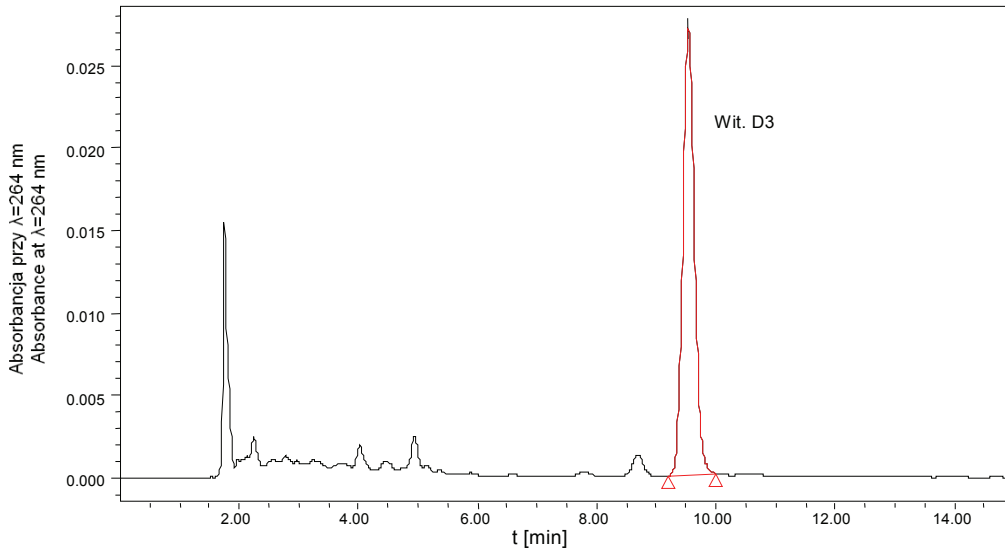
osiąga temperaturę termometru mokrego powietrza wylotowego [1, 4, 13, 15, 17]. Umożliwia to wykorzystanie tej metody do suszenia materiałów o małej odporności na podwyższoną temperaturę. Metodą, która w znacznym stopniu umożliwia wyeliminowanie wpływu podwyższonej temperatury jest suszenie sublimacyjne. Proces ten polega na usunięciu wody z materiału poprzez jej zamrożenie, a następnie sublimację lodu do pary wodnej. Zaletą tej metody suszenia jest zachowanie w produkcie pierwotnych biologicznych cech surowca, ze względu na to, że materiał nie jest poddawany działaniu podwyższonej temperatury. Wadami są długi czas oraz wysokie koszty procesu [10, 13, 16]. Zastosowanie liofilizacji, a zatem wyeliminowanie podwyższonej temperatury w procesie suszenia, nie przyczyniło się do zwiększenia zawartości cholekalcyferolu w próbce. Może to tłumaczyć rozwinieciem powierzchni w czasie suszenia sublimacyjnego, tj. większą powierzchnią kontaktu kompleksu β -laktoglobuliny i cholekalcyferolu z tlenem, który wykazuje wrażliwość na ten czynnik [12].



Rys. 1. Chromatogram β -laktoglobuliny.

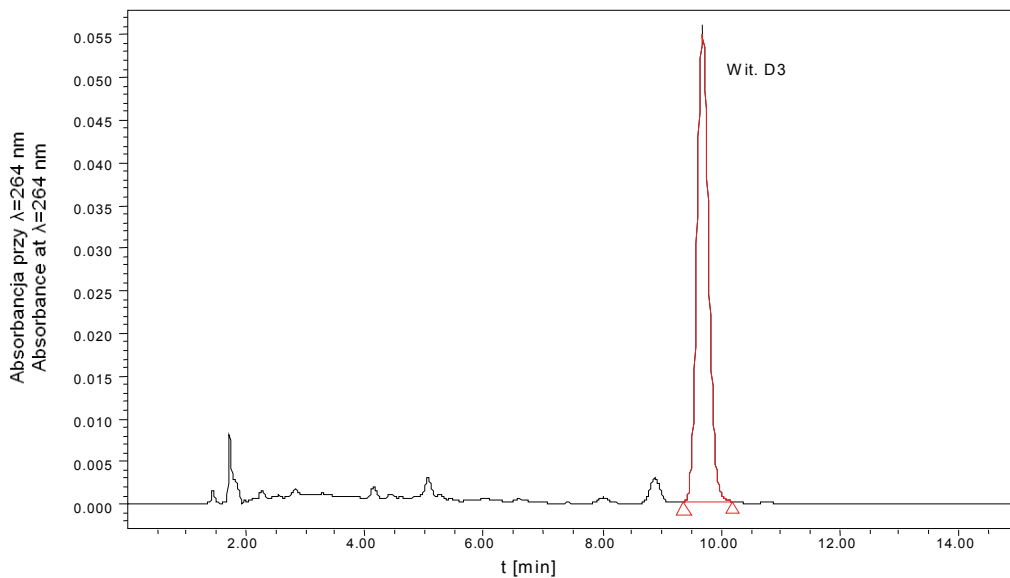
Fig. 1. Chromatogram of β -lactoglobulin.

Badania wykazały brak wpływu temperatury (120 i 150 °C) w czasie suszenia rozpyłowego na zawartość witaminy D₃ w próbce (tab. 1). Przyczyną takiego efektu jest najprawdopodobniej odporność witaminy D₃ na działanie podwyższonej temperatury. Jest ona również stosunkowo trwała w środowisku zasadowym, natomiast wykazuje wrażliwość na działanie kwasów, promieniowania ultrafioletowego i tlenu [12]. Istnieje zatem potrzeba kontynuowania badań w celu określenia wpływu innych parametrów procesu, np. pH roztworu na zawartość witaminy D₃ w kompleksach. Parametrem, który istotnie wpływał na zawartość witaminy D₃ w badanych kompleksach był strumień podawania surowca. Stwierdzono większą zawartość cholekalcyferolu



Rys. 2. Chromatogram próbki wyizolowanej z kompleksu β -laktoglobulina – witamina D₃, suszonej rozpyłowo (temp. powietrza wlotowego 150 °C, strumień podawania surowca 25 ml/min).

Fig. 2. Chromatogram of sample extracted from spray-dried complex compound of β -lactoglobulin with vitamin D₃ (inlet air temperature: 150 °C; material feed flux: 25 ml/min.).



Rys. 3. Chromatogram próbki wyizolowanej z kompleksu β -laktoglobulina – witamina D₃, suszonej sublimacyjnie (ciśnienie 63 Pa, temperatura półek grzejnych liofilizatora 30 °C).

Fig. 3. Chromatogram of sample extracted from freeze-dried complex compound of β -lactoglobulin with vitamin D₃ (pressure: 63 Pa; temperature of heating shelves in freeze dryer: 30 °C).

Tabela 1

Zawartość witaminy D₃ w sproszkowanych preparatach zawierających kompleks β-laktoglobulina – witamina D₃, otrzymanych podczas suszenia rozpyłowego lub sublimacyjnego.

Content of vitamin D₃ in powdered preparations containing complex compound of β-lactoglobulin with vitamin D₃ and produced during spray-drying or freeze-drying processes.

Warunki procesu suszenia Conditions of drying process	Zawartość witaminy D ₃ w kompleksach β-laktoglobulina – witamina D ₃ [μg/g]; $\bar{x} \pm s$ Content of vitamin D ₃ in complex compounds of β-lactoglobulin with vitamin D ₃ [μg/g]; $\bar{x} \pm SD$; n = 3
Suszenie rozpyłowe, temperatura powietrza wlotowego 120 °C, strumień podawania surowca 15 ml/min. Spray drying; inlet air temperature: 120 °C; material feed flux: 15 ml/min.	180 ± 8
Suszenie rozpyłowe, temperatura powietrza wlotowego 120 °C, strumień podawania surowca 25 ml/min. Spray drying; inlet air temperature: 120 °C; material feed flux: 25 ml/min.	120 ± 4
Suszenie rozpyłowe, temperatura powietrza wlotowego 150 °C, strumień podawania surowca 15 ml/min. Spray drying; inlet air temperature: 150 °C; material feed flux: 15 ml/min.	200 ± 6
Suszenie rozpyłowe, temperatura powietrza wlotowego 150 °C, strumień podawania surowca 25 ml/min. Spray drying; inlet air temperature 150 °C; material feed flux: 25 ml/min.	120 ± 5
Suszenie sublimacyjne; ciśnienie 63 Pa, temperatura półek grzejnych liofilizatora: 30 °C Freeze drying; pressure: 63 Pa, temperature of heating shelves in freeze dryer: 30 °C	110 ± 4

w próbkach suszonych rozpyłowo przy strumieniu podawania surowca wynoszącym 15 ml/min w porównaniu z procesem prowadzonym przy strumieniu podawania surowca 25 ml/min.

Wnioski

1. Potwierdzono możliwość utworzenia kompleksów β-laktoglobuliny z witaminą D₃.
2. Poziom witaminy D₃ w próbkach suszonych rozpyłowo był zbliżony do zawartości witaminy D₃ w próbce liofilizowanej.
3. Stwierdzono brak wpływu temperatury procesu suszenia na zawartość witaminy D₃ w produkcie. Zastosowanie liofilizacji, a zatem wyeliminowanie podwyższonej temperatury w procesie suszenia, nie przyczyniło się do większej zawartości cholekalcyferolu w próbce.

4. Stwierdzono istotny wpływ strumienia podawania surowca na poziom cholekalcyferolu w uzyskanych połączeniach.

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

Literatura

- [1] Adamiec J, Kamiński W, Markowski A.S., Strumiłło C.: Drying of biotechnological products. In: Handbook of Industrial Drying. Ed. AS Mujumdar. Marcel Dekker Inc., New York 1995, vol. 2, p. 775.
- [2] Blaner W.S.: Retinol binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr. Rev.*, 1989, **10**, 308.
- [3] 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.
- [4] Brennan J.G.: Spray drying. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Eds. B Caballero, LC Trugo, PM Finglas. Academic Press Elsevier Science Ltd., Oxford, UK, 2003.
- [5] Champagne C.P., Fustier P.: Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18** (2), 184.
- [6] Chatterton D.E. W., Smithers G., Roupas P., Brodkorb A.: Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. Technological implications for processing. *Intern. Dairy J.*, 2006, **16**, 1229.
- [7] Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A. Saurel R.: Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, 2007, **40** (9), 1107.
- [8] Kontopidis G., Holt C., Sawyer L.: Invited review: β -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 785.
- [9] McIntosh G.H., Royle P.J., Le Leu R.K., Regester G.O., Johnson M.A., Grinsted R.L., Kenward R.S., Smithers G.W.: Whey proteins as functional food ingredients. *Int. Dairy J.*, 1998, **8**, 425.
- [10] Mellor J.D., Bell G.A.: Freeze-drying. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Eds. B Caballero, LC Trugo, PM Finglas. Academic Press Elsevier Science Ltd., Oxford, UK, 2003.
- [11] Perez Dolores 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**, 978.
- [12] Petritz E, Tritthart T, Wintersteiger R.: Determination of phyloquinone and cholecalciferol encapsulated in granulates formed by melt extrusion. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2006, **69** (1-2), 101.
- [13] Pijanowski E, Dłużewski M, Dłużewska A, Jarczyk A.: Ogólna technologia żywności. WNT, Warszawa 1996.
- [14] Stahl K, Claesson M, Lilliehorn P, Lindén H, Bäckström K.: The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. *Int. J. Pharm.*, 2002, **233**, 227.
- [15] Świdorski F., Waszkiewicz-Robak B.: Bioaktywne peptydy i białka jako składniki żywności funkcjonalnej i dietetycznej. XXXI Sesja Nauk. KTiChŻ PAN, Poznań 2000, s. 95.
- [16] Witrowa-Rajchert D., Samborska K.: Metody suszenia mikroorganizmów i produktów syntezy mikrobiologicznej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2002, **2** (31), 5.
- [17] Van Arsdel W.B.: Properties of water, water vapor and air. In: Food Dehydration. Eds. WB Van Arsdel, MJ Copley, The Avi Publishing Company, Westport, 1963.

USING BINDING FEATURE OF B-LACTOGLOBULIN TO BIND CHOLECALCYFEROL**S u m m a r y**

Fortifying food with a fat-soluble vitamin D₃ (cholecalciferol) is usually carried out using some carriers that are fat derivatives. Based on the amino-acid sequence in β -lactoglobulin (β -LG) chain and on the results of research into its 3-dimensional structure, the β -lactoglobulin can be classified into a family of lipocalins. Consequently, it is possible to use β -lactoglobulin as a carrier of vitamin D₃ in food products with a reduced fat content. Under the scope of study, complex compounds of β -lactoglobulin with vitamin D₃ were developed and a preparation in the form of powder was produced. Spray drying and freeze drying processes were applied since those two methods are most frequently recommended in food industry to dry thermo-changeable substances. Next, using an HPLC analysis, the content of vitamin D₃ was determined in the complex compounds developed, and the assessment was performed of the effect of the technological process applied on the content of vitamin D₃ in the products. The research results confirmed the potential of producing complexes of β -lactoglobulin with cholecalciferol. The level of cholecalciferol in the spray-dried samples was comparable to the level of D₃ in the freeze-dried sample. It was found that the material feed flux impacted the content of vitamin D₃ in the complex compounds developed, whereas the process temperature during spray-drying was found to have no impact on the content of vitamin D₃ therein.

Key words: β -lactoglobulin, vitamin D₃, spray drying, freeze drying ☒