

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

## WPŁYW PH NA ZDOLNOŚĆ WIĄZANIA CHOLEKALCYFEROLU PRZEZ β-LAKTOGLOBULINĘ

Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności  
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: dr hab. *E. Białecka-Florjańczyk*, prof. SGGW

*W artykule zbadano wpływ pH na zdolność wiązania przez β-laktoglobulinę hydrofobowego ligandu - cholekalcyferolu. Poziom witaminy D<sub>3</sub> w badanych kompleksach β-laktoglobulina-witaminy D<sub>3</sub> był różnicowany i wahał się od 120 μg/g do 1682 μg/g w próbkach otrzymanych w buforze fosforanowym o pH wynoszącym odpowiednio 5,0 oraz 9,0. Stwierdzono istotny wpływ pH na możliwość wnikania ligandów do wnętrza baryłki β-laktoglobuliny, a zatem na właściwości wiążące β-laktoglobuliny.*

Hasła kluczowe: β-laktoglobulina, cholekalcyferol, pH, właściwości wiążące  
Key words: β-lactoglobulin, cholecalciferol, pH, binding properties

β-laktoglobulina to główne białko frakcji serwatkowej mleka krowiego (3 g/l; 50% białek serwatkowych) (1, 2). Wołowa β-laktoglobulina jest składającym się ze 162 aminokwasów białkiem globularnym o masie 18,4 kDa (3, 4). Sekwencja aminokwasów w łańcuchu β-laktoglobuliny oraz wyniki badań struktury przestrzennej pozwalają na zakwalifikowanie tego białka do rodziny lipokalin. Cechą wspólną lipokalin jest obecność w strukturze β-baryłki z hydrofobowym wnętrzem, otoczonym przez elastyczne pętle. Zdolność do wiązania w β-baryłce ligandów jest zależna od pH, którego wartość decyduje o osiągnięciu przez ruchome pętle konformacji blokującej i otwierającej dostęp do baryłki. Wykazano, że β-laktoglobulina posiada zdolność wiązania hydrofobowych związków, tj. retinol, kwasy tłuszczowe, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, cholesterol itp. (5, 6). Ligandy są wiązane przez β-laktoglobulinę z dużym powinowactwem, natomiast specyficzność oddziaływań jest niska (7). Za naturalne ligandy, o najwyższym powinowactwie do β-laktoglobuliny, uznaje się retinol oraz kwasy tłuszczowe. Białko wiąże również inne cząsteczki, tj. fosfolipidy, triacyloglicerole, pochodne związków alifatycznych (estry, aldehydy, ketony, węglowodory), choć ze znacznie niższym powinowactwem (8, 9, 10). Wykazano również, że β-laktoglobulina może wiązać cząsteczki leków, np. leki antydepresyjne lub leki stosowane w leczeniu nowotworów (11). Mechanizm wiązania ligandów przez białko nie został do końca poznany. Na podstawie wyników badań można wnioskować, że główną rolę w oddziaływaniu β-laktoglobulina -ligand odgrywiają niespecyficzne

oddziaływania hydrofobowe. Opisane właściwości  $\beta$ -laktoglobuliny stwarzają możliwości wykorzystanie jej do wiązania i transportowania cholekalcyferolu w układach o obniżonej zawartości tłuszczu. Wzbogacanie żywności w witaminę  $D_3$ , ze względu na fakt jej rozpuszczania w tłuszczach, odbywa się zazwyczaj z zastosowaniem nośników będących pochodnymi tłuszczów. Rosnąca świadomość żywieniowa i zdrowotna konsumentów powoduje, że coraz częściej sięgają oni po produkty z obniżoną zawartością tłuszczu lub beztłuszczowe. Konsekwencją stosowania takiej diety może być niebezpieczne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu ograniczenie spożycia witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Opisane właściwości  $\beta$ -laktoglobuliny stwarzają możliwości wykorzystanie jej do wiązania i transportowania niektórych składników odżywczych, tj. np. rozpuszczalnej w tłuszczach witaminy  $D_3$ .

Celem podjętych badań było określenie wpływu pH na zdolność wiązania przez  $\beta$ -laktoglobulinę hydrofobowego ligandu - cholekalcyferolu. Badane kompleksy  $\beta$ -laktoglobulina - cholekalcyferol otrzymano w postaci proszku z użyciem suszenia rozpyłowego jako najczęściej stosowanej metody do suszenia substancji termolabilnych. Następnie w uzyskanych kompleksach określono poziom witaminy  $D_3$  metodą HPLC.

## MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań była  $\beta$ -laktoglobulina otrzymana od firmy Daisco Foods International (Le Sueur, Minnesota). Analiza chromatograficzna (HPLC) wykazała brak witaminy  $D_3$  w próbce białka. Cholekalcyferol oraz pozostałe odczynniki pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, Minnesota). Badania obejmowały syntezę kompleksów  $\beta$ -laktoglobuliny z cholekalcyferolem w stosunku molowym 1:2. W tym celu w 400 ml buforu fosforanowego o pH wynoszącym odpowiednio 3,0; 5,0; 6,8; 7,4; 9,0 rozpuszczano 8 g  $\beta$ -laktoglobuliny do uzyskania roztworu homogenicznego, dodawano stopniowo 0,36 g cholekalcyferolu (rozpuszczonego uprzednio w minimalnej objętości etanolu). Następnie roztwór mieszano przez 2 h w temp. 40 °C. Tak otrzymane połączenia przeprowadzono w formę proszków metodą suszenia rozpyłowego. Każdorazowo do suszenia rozpyłowego przygotowywano 400 ml roztworu. Roztwory poddawano homogenizacji w homogenizatorze Ultra Turrax T 25 basic IKA Labortechnik, wyprodukowanym w Niemczech, przez 90 s przy 11000 rpm, a następnie suszono rozpyłowo. Suszenie otrzymanych roztworów prowadzono w suszarce rozpyłowej firmy Anhydro (Dania), przy prędkości dysku rozpyłowego, wynoszącej 39000 obr/min (średnica dysku 63,42 mm) i przy strumieniu podawania surowca: 51,4 cm<sup>3</sup>/min. Suszenie odbywało się współprądowo, a temperatura powietrza wlotowego wynosiła 120°C. Zawartość witaminy  $D_3$  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 ICH OMÓWIENIE

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń otrzymano kompleksy  $\beta$ -laktoglobuliny z cholekalcyferolem w postaci proszku, co jest szczególnie istotne ze względu na wygodę i uniwersalność zastosowania w przemyśle spożywczym, stabilność przechowalniczą, łatwość dozowania oraz mniejszą objętość (w odniesieniu do produktu płynnego). Połączenia pomiędzy białkiem a witaminą utworzono w pH wynoszącym od 3,0 do 9,0.  $\beta$ -laktoglobulina zachowuje swoją natywną strukturę w szerokim zakresie pH. W pH pomiędzy 2 a 3 występuje w postaci monomerów, pomiędzy 5,7-5,2 asocjuje w oktamery. W warunkach zbliżonych do fizjologicznych występuje w formie dimerów. Utworzenie się dimerów stabilizowanych wiązaniami wodorowymi następuje w wyniku asocjacji monomerów za pośrednictwem  $\beta$ -wstęgi. W pH ok. 11 następuje alkaliczna denaturacja białka. Badania opisane w literaturze wskazują, że monomer  $\beta$ -laktoglobuliny wiąże jedną cząsteczkę ligandu (12). W zsyntezowanych połączeniach białko-witamina określono zawartość witaminy D<sub>3</sub>. Badania wykazały istotny wpływ wartości pH na zdolność wiązania cholekalcyferolu przez  $\beta$ -laktoglobulinę. Poziom witaminy D<sub>3</sub> w kompleksach był zróżnicowany i wynosił od 120  $\mu\text{g/g}$  do 1682  $\mu\text{g/g}$  w próbkach otrzymanych w buforze fosforanowym odpowiednio o pH 5,0 oraz pH 9,0. Kompleksy otrzymane w roztworach buforów fosforanowych o pH 6,8; 7,4 oraz 9,0 charakteryzowały się wysoką zawartością witaminy D<sub>3</sub> (tabela 1).

Tabela 1. Zawartość witaminy D<sub>3</sub> w kompleksach  $\beta$ -laktoglobulina-cholekalcyferol w zależności od pH roztworu buforu fosforanowego

Table 1. Vitamin D<sub>3</sub> quantity in  $\beta$ -lactoglobulin-cholecalciferol complexes depending on pH values of phosphate buffer solution

wartość pH roztworu buforu fosforanowego	zawartość witaminy D <sub>3</sub> w kompleksach $\beta$ -laktoglobulina-cholekalcyferol [ $\mu\text{g/g}$ ]; $x \pm \text{SD}$
3,0	600 $\pm$ 8
5,0	120 $\pm$ 4
6,8	1468 $\pm$ 12
7,4	1326 $\pm$ 11
9,0	1520 $\pm$ 14

Najniższy poziom cholekalcyferolu wykazano dla połączeń utworzonych w pH wynoszącym 3,0 oraz 5,0, odpowiednio 600 oraz 120  $\mu\text{g/g}$ . Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami badań Kontopidisa (1). Wykazał on, że wartość pH decyduje o konformacji elastycznej pętli, otwierającej i zamykającej dostęp do wnętrza baryłki znajdującej się w strukturze  $\beta$ -laktoglobuliny i odpowiedzialnej za wiązanie ligandów. Struktury krystaliczne  $\beta$ -laktoglobuliny opisane dla pH 6,2 oraz 7,1 potwierdzają różnice w konformacji ruchomej pętli (13). W pH poniżej 6,2 pętla występuje w konformacji stabilizowanej poprzez wiązania wodorowe i przez to utrudniającej dostęp do baryłki. Uważa się, że zmiany konformacyjne pętli powodujące zamknięcie dostępu do baryłki chronią niewielkie ligandy przed denaturacją w czasie trans-

portu przez żołądek. W pH 7,1 możliwe jest wnikanie ligandu do wnętrza baryłki. Następuje wówczas zerwanie wiązań wodorowych i otwieranie ruchomej pętli (14). Obniżanie wartości pH powoduje uwalnianie ligandów z wnętrza baryłki. Badania nad oddziaływaniem kwasu palmitynowego z  $\beta$ -laktoglobuliną wykazały silne związanie ligandu przez białko w zakresie pH 5,9-8,4 (15). Spadek pH powodował uwalnianie kwasu z miejsca wiązającego.

Szczególne zalety kompleksów  $\beta$ -laktoglobuliny z cholekalcyferolem w postaci proszków mogłyby być wykorzystywane w celu wzbogacania żywności o obniżonej zawartości tłuszczu lub beztłuszczowych w spełniającą istotną funkcję w organizmie witaminę  $D_3$  oraz cechujące się wysokimi właściwościami odżywczymi i funkcjonalnymi białka serwatkowe.

## WNIOSKI

1. Badania wykazały możliwość otrzymania kompleksów pomiędzy  $\beta$ -laktoglobuliną a cholekalcyferolem w postaci proszku.
2. Istotnym parametrem decydującym o dostępie ligandów do wnętrza baryłki, a zatem wpływającym na właściwości wiązające  $\beta$ -laktoglobuliny była wartość pH.
3. Poziom witaminy  $D_3$  w kompleksach był zróżnicowany i wynosił od 120  $\mu\text{g/g}$  do 1682  $\mu\text{g/g}$ .
4. Najwyższą zawartością witaminy  $D_3$  charakteryzowały się kompleksy otrzymane w roztworach buforów fosforanowych o wysokim pH.

A. Górská, E. Ostrowska-Ligęza, M. Wirkowska, J. Bryś

### THE INFLUENCE OF PH ON THE $\beta$ -LACTOGLOBULIN CAPABILITY TO BIND CHOLECALCIFEROL

#### Summary

The amino acids sequence and the results of the  $\beta$ -lactoglobulin 3-dimensional structure suggest that it possesses the ability to bind and transport a variety of ligands, many of which are lipophilic nutrients. In the study the influence of pH on the  $\beta$ -lactoglobulin capability to bind hydrophobic ligand - cholecalciferol was presented. Results obtained show the significant effect of pH on binding properties of  $\beta$ -lactoglobulin. The highest amount of vitamin  $D_3$  was quantified in the complexes obtained in the phosphate buffer solution of pH 6,8; 7,4 and 9,0. The pH value determines the conformation of elastic loop in  $\beta$ -lactoglobulin structure, which acts as a gate over the binding site. If it is in the closed position (low pH) the binding is inhibited or impossible, at high pH when it is open, ligands are allowed to penetrate into the hydrophobic binding site. The binding properties of  $\beta$ -lactoglobulin can be implemented to deliver vitamin  $D_3$  without the presence of the fat in which it normally associates

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

## PIŚMIENNICTWO

1. *Kontopidis G., Holt C., and Sawyer L.*: Invited review:  $\beta$ -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *J.Dairy Sci.*, 2004; 87(4): 785-796.- 2. *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.-3. *Lucena M.E., Alvarez S., Menendez C., Riera F.A., Alvarez R.*: Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates: Production of milk derivatives as a base for infant formulas. *Separ. Purif. Tech.*, 2006; 52(2): 310-316.-4. *Panick G., Malessa R., Winter, R.*: Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A, B, and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small-angle X-ray scattering. *Biochem.*, 1999; 38: 6512-6519.-5. *Blaner W.S.*: Retinol binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr. Rev.*, 1989; 10(3): 308-316.-6. *Perez D.M., Calvo M.*: Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *J. Dairy Sci.*, 1995; 78: 978-988.-7. *Konuma T., Sakurai K., Goto J.*: Promiscuous binding of ligands by  $\beta$ -lactoglobulin involves hydrophobic interactions and plasticity. *J. Mol. Biol.*, 2007; 368(1): 209-218.-8. *Martins P.A., Gomes F, Vaz W.L., Moreno M.J.*: Binding of phospholipids to beta-lactoglobulin and their transfer to lipid bilayers. *Biochim.Biophys.Acta*, 2008; 1778(5): 1308-1315.-9. *Andriot I., Harrison M., Fournier N., Guichard E.*: Interaction between methyl ketones and beta-lactoglobulin; sensory analysis, headspace analysis, and mathematical modeling. *J.Agric.Food Chem.*, 2000; 48(9): 4246-4251.-10. *Marin I., Relkin P.*: Interaction properties of  $\beta$ -lactoglobulin and benzaldehyde and effect on foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Chem.*, 2000; 71(3): 401-406.
11. *Dodin G., Andrieux M., al Kabbani H.*: Binding of ellipticine to beta-lactoglobulin. A physico-chemical study of the specific interaction of the antitumor drug with a transport protein. *Eur.J.Biochem.*, 1990; 193(3): 697-700.-12. *Zimet P., Livney Y.D.*: Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloid.*, 2009; 23(4): 1120-1126.-13. *Ragona L., Colombo G., Catalano M., Molinari H.*: Determinants of protein stability and folding: Comparative analysis of beta-lactoglobulins and liver basic fatty acid binding protein. *Proteins*, 2005; 61(2): 366-376.- 14. *Sakurai K., Kunuma T., Yagi M., Goto Y.*: Structural dynamic and folding of  $\beta$ -lactoglobulin probed by heteronuclear NMR. *Biochim.Biophys.Acta*, 2009; 1790(6): 527-537.- 15. *Ragona L., Fogolari F., Zetta L., Pérez D.M., Puyol P., De Kruif K., Löhr F., Rüterjans H., Molinari H.*: Bovine  $\beta$ -lactoglobulin: interaction studies with palmitic acid. *Protein Sci.*, 2000; 9(7): 1347-1356.

Adres: 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166.