

UNIwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy
im. Jana Długosza w Częstochowie



Wydział Nauk Ścisłych, Przyrodniczych i Technicznych

Tomasz Głąb

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Chemiczne modyfikacje kazeiny
w kapsułkowaniu czynników aktywnych biologicznie**

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem
prof. dr hab. inż. Janusza Boratyńskiego

Częstochowa 2021

STRESZCZENIE

Kazeina to zbiorcza na nazwa rodziny białek mleka. Obecnie kazeina to nie tylko białko dietetyczne. W jego właściwościach leżą obietnice nowych niespodziewanych zastosowań w nauce, farmacji i żywności funkcjonalnej. Jednym z takich zastosowań jest kapsułkowanie substancji prozdrowotnych w matrycach kazeinowych. W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat właściwości kazeiny oraz jej zastosowania w nano- i mikrokapsułkowaniu, a także wyniki autorskich badań. Zakres badań obejmował wykorzystanie kazeiny jako matrycy zdolnej do immobilizacji bakteriofagów, kompleksowania leków, stabilizowania labilnej witaminy K oraz koniugacji z kwasem liponowym.

W doktoracie zademonstrowano zdolność kazeiny do precypitacji pod wpływem kationów Ca, Sr, i Ba. Stosując CaCl_2 przygotowano precypitaty kazeiny według metodyki podobnej do stosowanej w przypadku alginianu. Zoptymalizowana metoda pozwoliła na uzyskanie gładkich kulistych sfer. Potencjał takich sfer jako nośników zademonstrowano immobilizując w nich bakteriofagi T4 z wydajnością 81,93%.

Parametrem decydującym o przydatności kazeiny jako nośnika bakteriofagów jest jej czystość mikrobiologiczna. W pracy przetestowano kilka metod ograniczania liczebności mikroorganizmów z których największą skuteczność wykazywało naświetlanie wiązką elektronową oraz referencyjna sterylizacja w autoklawie. W przeciwieństwie do metody referencyjnej, sterylizacja wiązką elektronów nie wywoływała zmian w masie cząsteczkowej kazeiny, bez względu na zastosowaną dawkę promieniowania (2-25 kGy).

W badaniach nad kompleksowaniem leków wykorzystano ibuprofen, paracetamol i loperamid, które miały charakter modelowych związków chemicznych różniących się od siebie budową cząsteczki i działaniem, lecz mających wspólną cechę jaką jest niska rozpuszczalność w wodzie. Opracowana procedura może znajdować zastosowanie do kompleksowania leków, których stosunek dawki do aktywności biologicznej jest niski. Jeden z użytych leków – loperamid, wydaje się spełniać ten wymóg.

Zbliżoną procedurę zastosowano wobec witaminy K2. Pozwoliła ona na związanie wysokich ilości witaminy K2, a formułacje uzyskane z udziałem kwasu cytrynowego i askorbinowego zachowywały stabilność przez 7 dni przy wilgotności względnej powietrza 56,2% i przez 6 miesięcy przechowywania w warunkach zwiększonej wilgotności powietrza (40-60%).

W celu skoniugowania kwasu α -liponowego z kazeiną posłużono się reakcją acylacji opartą o użycie aktywnego estru *N*-hydroksysukcynoimidu. Koniugaty poddano redukcji w celu otwarcia pierścienia ditiolowego oraz umożliwiono im sieciowanie przez reoksydację po oddializowaniu czynnika redukującego. Postęp reakcji monitorowano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Uzyskane wyniki wskazują na powstawanie cząsteczek o bardzo wysokiej masie molekularnej. Reakcja zachodziła najlepiej w pH 8, ale zastosowanie wysokich stężeń aktywnego estru umożliwiło przeprowadzenie jej nawet w pH 6.

ABSTRACT

Casein is a collective term for a family of milk proteins. At present, casein is not just a dietary protein. In its properties lie the promise of new, unexpected applications in science, pharma and functional food industries. One of such is encapsulation of health-related substances in casein matrices. Work presents current state of knowledge about casein properties and its application in nano- and microencapsulation as well as results of own research. The scope of work included utilisation of casein as a matrix capable of bacteriophage immobilisation, complexation of drugs, stabilisation of labile vitamin K and conjugation with lipoic acid.

Thesis demonstrated the ability of casein to precipitate under the influence of Ca, Sr and Ba cations. Using CaCl₂ casein precipitates were prepared according to methodology similar to that used for alginate. The optimised method allowed obtaining smooth, round spheres. Carrier potential of such spheres was demonstrated by immobilisation of T4 bacteriophage with an efficiency of 81,93%.

The parameter determining usefulness of casein as bacteriophage carrier is its microbiological purity. Several methods for limiting microorganism count were tested in the study, of which the greatest effectiveness was demonstrated for electron beam irradiation and reference autoclave sterilisation. Contrary to the reference method, electron beam sterilisation did not cause changes in molecular weight of casein, regardless of the radiation dose used (2-25 kGy).

In the research on drug complexation, ibuprofen, paracetamol and loperamide were used as model chemical compounds that differ in molecular structure and activity, but similar in low water solubility. The developed procedure may be applicable to complexation of drugs with a low dose-to-bioactivity ratio. One of the utilised drugs, loperamide, appears to meet this requirement.

A similar procedure was applied to vitamin K₂. It allowed for the binding high amounts of vitamin K₂, and the formulations obtained with citric and ascorbic acid retained stability for 7 days at relative humidity of 56,2% and 6 months of storage in elevated humidity (40-60%) conditions.

In order to conjugate α -lipoic acid with casein, an acylation reaction, based on utilisation of N-hydroxysuccinimide active ester was used. The conjugates were subject to reduction in order to open the dithiol ring and allowed to cross-link by re-oxidation after dialysis of the reducing agent. Reaction progress was monitored by SDS-PAGE electrophoresis. The obtained results indicate formation of molecules with a very high molecular weight. The reaction carried best at pH 8, but the use of high active ester concentrations allowed it to be carried out even at pH 6.

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	7
1.1. CEL PRACY	7
1.2. WSTĘP	7
1.2.1. Właściwości fizykochemiczne kazeiny	7
1.2.2. Biochemia kazeiny	10
1.3. ZASTOSOWANIA KAZEINY	11
1.3.1. Znaczenie przemysłowe	12
1.3.2. Nośniki kazeinowe	13
1.3.2.1. Nanonośniki	14
1.3.2.2. Mikronośniki	22
2. WYNIKI I Dyskusja	26
2.1. IMMOBILIZACJA BAKTERIOFAGÓW	26
2.1.1. Wyniki	27
2.1.1.1. Strącanie kazeinianu sodu	27
2.1.1.2. Interakcja z jonami metali ziem alkalicznych	27
2.1.1.3. Przygotowanie niewypełnionych sfer	29
2.1.1.4. Sterylizacja kazeiny	29
2.1.1.5. Immobilizacja bakteriofaga T4	31
2.1.2. Dyskusja	31
2.2. WIĄZANIE ZWIĄZKÓW NISKOCZĄSTECzkOWYCH Z KAZEINĄ	35
2.2.1. Wyniki	37
2.2.1.1. Zastosowanie kazeiny w kompleksowaniu wybranych leków	38
2.2.1.2. Zastosowanie kazeiny w kompleksowaniu witaminy K	40
2.2.2. Dyskusja	46
2.3. KONIUGACJA KAZEINY Z KWASEM ALFA-LIPONOWYM	49
2.3.1. Wyniki	54
2.3.1.1. Elektroforeza koniugatów	54
2.3.1.2. Elektroforeza koniugatów o zmiennym stopniu posieciowania	58
2.3.1.3. Badania spektroskopowe koniugatów w podczerwieni	61
2.3.2. Dyskusja	64
3. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	69
4. MATERIAŁY I METODY	72
4.1. MATERIAŁY	72
4.1.1. Odczynniki	72
4.1.2. Aparatura	74

4.2. METODY	74
4.2.1. Wyznaczanie współczynnika zobojętniania kazeiny	75
4.2.2. Średnia masa molowa kazeiny	75
4.2.3. Imobilizacja bakteriofagów	75
4.2.3.1. Strącanie kazeiny solami metali	75
4.2.3.2. Badanie interakcji kazeiny z jonami metali ziem alkalicznych	76
4.2.3.3. Sterylizacja kazeiny	77
4.2.3.4. Przygotowanie niewypełnionych sfer	79
4.2.3.5. Namnażanie bakteriofagów	79
4.2.3.6. Oznaczanie liczebności bakteriofagów	80
4.2.3.7. Imobilizacja bakteriofaga T4	80
4.2.4. Wiązanie związków niskocząsteczkowych z kazeiną	81
4.2.4.1. Odtłuszczenie kazeiny	81
4.2.4.2. Kompleksowanie leków	81
4.2.4.3. Kompleksowanie witaminy K2 MK-7	82
4.2.4.4. Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC	83
4.2.5. Koniugacja kazeiny z kwasem alfa-liponowym	84
4.2.5.1. Analiza składu aminokwasowego kazeiny bydłowej	84
4.2.5.2. Synteza aktywnego estru kwasu α -liponowego	85
4.2.5.3. Synteza koniugatów	85
4.2.5.4. Sieciowanie koniugatów	85
4.2.5.5. Koniugacja i sieciowanie przy różnych stężeniach czynnika sieciującego	86
4.2.5.6. Badania spektroskopowe koniugatów w podczerwieni FTIR	86
4.2.6. Elektroforeza w żelu poli(akrylamidowym) w obecności dodecylosiarczanu sodu SDS-PAGE	87
LITERATURA	88
SPIS RYSUNKÓW I TABEL	106
DOROBEK NAUKOWY	108
OŚWIADCZENIE AUTORSKIE	109

1. WPROWADZENIE

1.1. CEL PRACY

Celem pracy było przedstawienie własnej analizy dotyczącej wykorzystania fizyko-chemicznych właściwości kazeiny jako matrycy kompleksującej leki i witaminę K oraz przydatności kazeiny w makrokapsułkowaniu wirusów bakteryjnych – bakteriofagów, a także koniugacji z kwasem α -liponowym.

Zakres pracy obejmował otrzymanie i zbadanie właściwości preparatów zawierających wymienione czynniki terapeutyczne. Badania realizowane w ramach doktoratu dotyczą różnych zagadnień, ale praca skupia się na właściwościach chemicznych.

1.2. WSTĘP

Białka są biopolimerami odgrywającymi decydującą rolę w wielu procesach biologicznych. Pod względem pełnionej funkcji jest to jedna z najbardziej zróżnicowanych grup związków organicznych w żywych organizmach. Odzwierciedla się to w postaci ich właściwości chemicznych i fizycznych.

Białka zyskały znaczenie żywieniowe i technologiczne. Jednym z takich białek jest kazeina, występująca w mleku ssaków w postaci miceli utworzonych wokół zgrupowań fosforanu wapnia. Biologiczne funkcje kazeiny określane są przez jej skład i elastyczną strukturę oraz to jak łańcuchy peptydów kazeinowych wzajemnie oddziałują ze sobą. Te same właściwości wpływają na zachowanie kazeiny podczas produkcji nabiału oraz wytwarzania innych produktów.

Wysoka zawartość w mleku i łatwy dostęp do tego surowca powodują, że kazeina jest relatywnie tania. Metody wytwarzania są nieskomplikowane, znane od bardzo dawna i dobrze dopracowane. Elastyczna struktura kazeiny sprawia, że jest odporna na denaturację, co jest korzystne podczas przetwarzania. Dodatkowo ze względu na swoją rolę dietetyczną jest powszechnie uważana za bezpieczną (ang. *Generally Recognised as Safe*, GRAS) oraz może zapewniać biokompatybilność, biodegradowalność i bioresorbowalność z układu pokarmowego. Te cechy sprawiają, że jest ona obiecującym materiałem do stabilizacji wielu czynników aktywnych biologicznie.

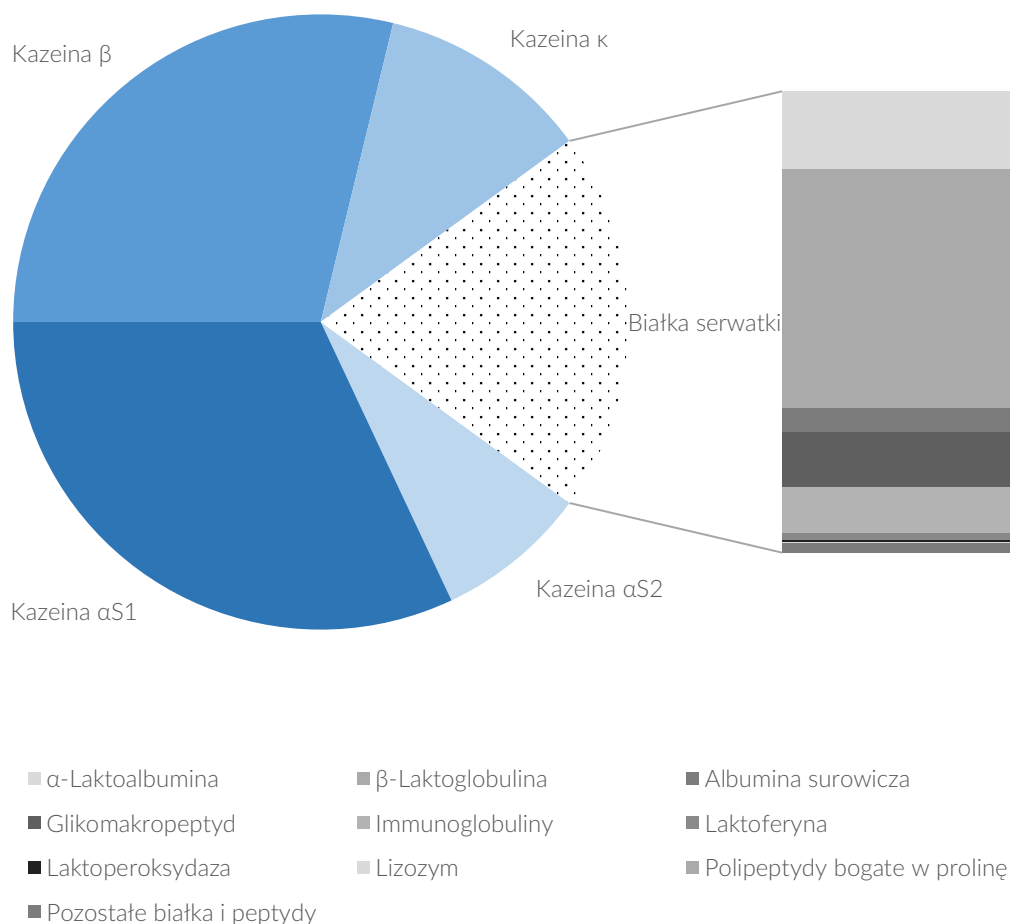
Wbrew pozorom kazeina jest białkiem o ciekawych właściwościach. Ważne jest bliższe poznanie jego właściwości i użycie uzyskanych informacji w wykorzystaniu kazeiny jako matrycy zdolnej do makro- i mikro-kapsułkowania bakterii, bakteriofagów i związków niskocząsteczkowych.

Współczesne poglądy na kazeinę w kontekście zastosowań w chemii, biotechnologii i farmacji zebrano w publikacji „Casein as a carrier for biologically active agents” na łamach „Topics in current chemistry” nr 375 (wolny dostęp) [1]. Aby uniknąć autoplagiatu we wprowadzeniu do doktoratu przedstawiono również niedostępne wcześniej informacje i komentarze.

1.2.1. Właściwości fizykochemiczne kazeiny

Kazeina (od łac. *caseus* – ser) [2] to zbiorcza nazwa białek wydzielniczych z rodziny fosfoprotein wiążących wapń, które występują w mleku ssaków [3]. Dlatego też bardziej poprawne jest mówienie o „kazeinach” zamiast „kazeinie”. W przeciwieństwie do drugiej grupy białek mleka –

białek serwatki, kazeiny są postrzegane jako nierozpuszczalne i stanowią łącznie 80% wszystkich białek w mleku (Ryc. 1) [4, 5].



Ryc. 1. Standardowa zawartość białek w mleku krowim.

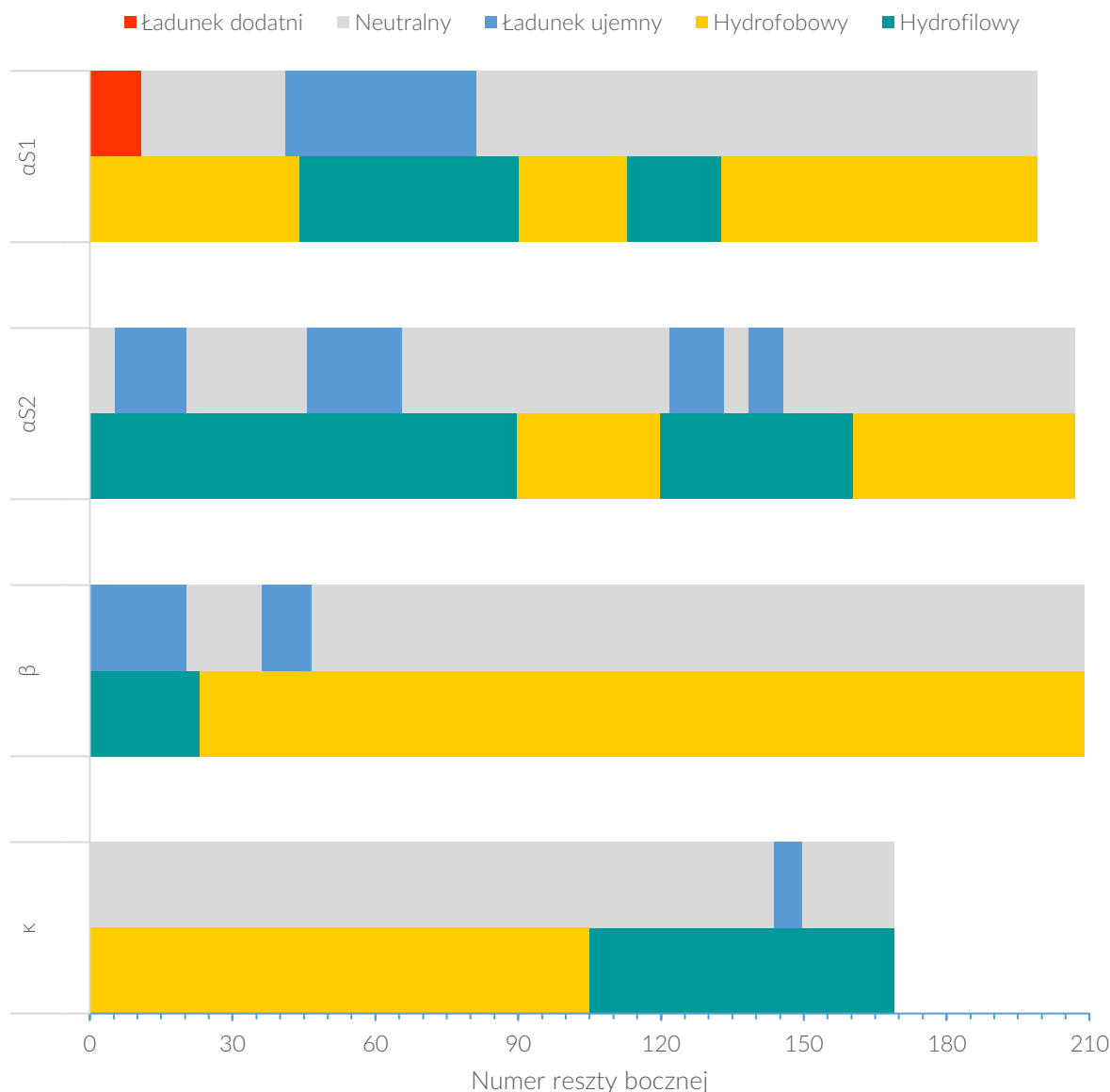
Pomimo, że białka serwatki stanowią bardziej różnorodną grupę to kazeiny przeważają ilościowo. Sporządzono na podstawie [4].

W mleku większości ssaków występują produkty od trzech do pięciu genów kodujących peptydy kazeinowe zwane dalej także frakcjami. W mleku krowim występują produkty czterech z nich: kazeina α_{S1} , α_{S2} , β i κ w stosunku wagowym ok. 4:1:4:1 [3, 6]. Przy czym mleko poszczególnych ras krów może charakteryzować się różnymi proporcjami kazein [7]. Cechą wspólną wszystkich kazein jest amfifilowość (Ryc. 2), podczas gdy różnice przejawiają się w zawartości aminokwasów, grup fosforanowych i sacharydowych (Tab. 1) [6, 8].

Tab. 1. Różnice w wybranych właściwościach molekularnych peptydów kazeinowych.

Frakcja	Numer dostępowy Swiss Prot/TrEMBL	Masa cząsteczkowa (kDa)	Liczba aminokwasów	Liczba cystein w łańcuchu	Liczba fosfoseryn w łańcuchu
α_{S1}	P02662	22,975	199	0	9
α_{S2}	P02663	24,349	207	2	13
β	P02666	23,583	209	0	5
κ	P02668	18,974	169	2	4

Dane pochodzą z bazy UniProtKB [9–12].



Ryc. 2. Schematyczny diagram liniowego rozłożenia ładunków oraz regionów hydrofobowych i hydrofilowych najbardziej powszechnych wariantów genetycznych kazein w fizjologicznym pH mleka – 6,6. Sporządzono na podstawie [17, 18].

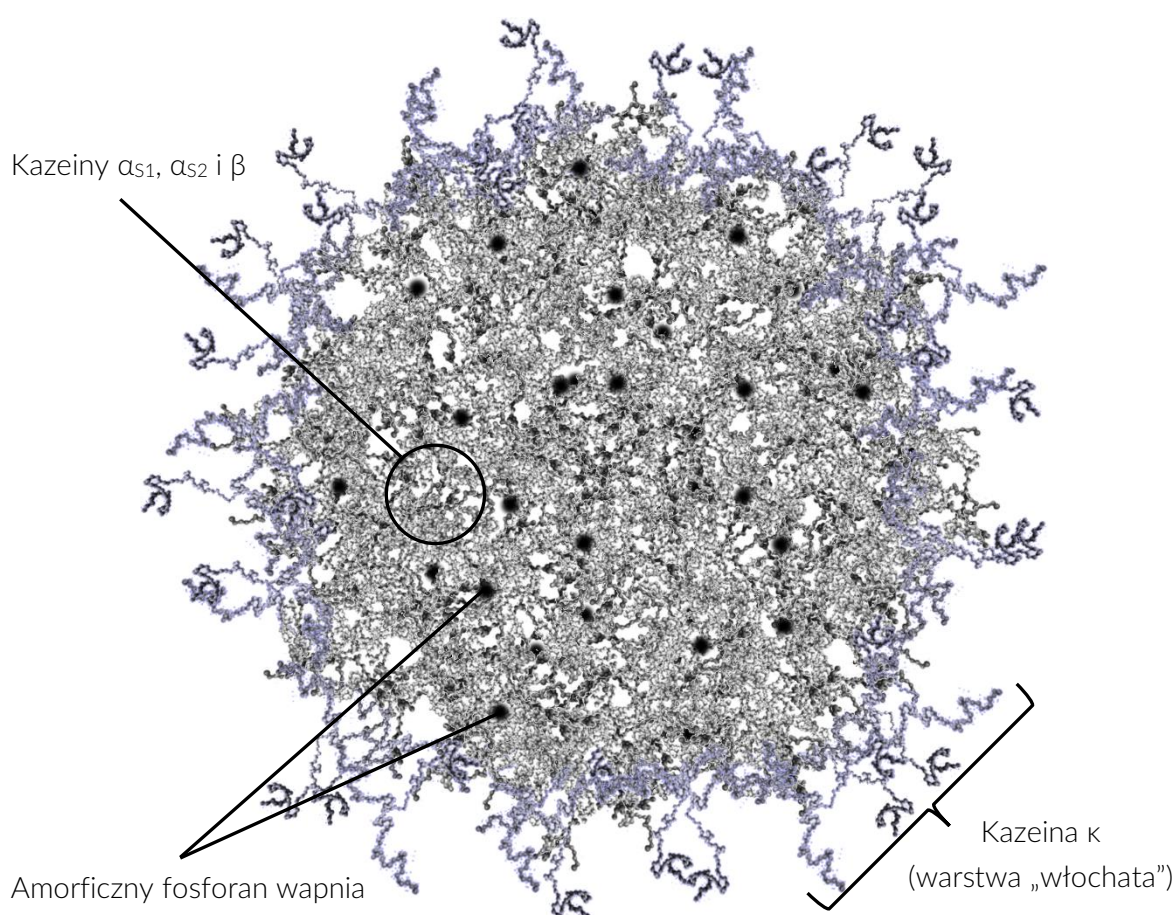
Wyłącznie kazeina κ zawierająca dwie cysteiny jest w stanie tworzyć mostki disiarczkowe [13, 14]. Dodatkowo struktury drugorzędowe takie jak α -helisy i β -harmonijki występują w kazeinach dość rzadko co sprawia, że są nieusztynionymi, elastycznymi, niezwinętymi (lub zwiniętymi losowo) peptydami zdolnymi do interakcji międzycząsteczkowych – elektrostatycznych, wodorowych i hydrofobowych [3, 15]. Dlatego też kazeiny przyjmują w roztworach wiele różnych konformacji – takich które w danej chwili są energetycznie optymalne [14]. Taka zmienność konformacyjna może tłumaczyć wysoką odporność kazein na denaturację w wyniku np. cieplnej obróbki mleka [16].

Kazeiny wykazują aktywność podobną do małych białek szoku cieplnego – w tym przypadku jedna cząsteczka kazeiny działa jako białko opiekuńcze (fr. *chaperon*) w stosunku do cząsteczki innej frakcji kazeiny lub innego białka zapewniając stabilizację białku docelowemu i zapobiegając nadmiernej agregacji [3]. Kazeiny oddziałują z obecnymi w mleku białkami serwatki, a nawet białkami nie pochodzącymi z mleka (np. lizozym jaja kurzego). Dobrze opisane w tym kontekście są oddziaływania kazeiny z laktoferyną [19].

1.2.2. Biochemia kazeiny

W odpowiednich warunkach kazeiny występują w postaci stabilnej, amorficznej struktury supramolekularnej zwanej micelą kazeinową (z łac. *mica* – okruch, odrobina) [16] o średnicy 50-500 nm i masie 10^3 - 3×10^6 kDa [14]. Co ciekawe taki szeroki rozkład występuje tylko w mleku pulowanym, podczas gdy rozmiary miceli są cechą indywidualną danej krowy i nie ulegają zmianie w trakcie laktacji oraz dojenia, w przeciągu wielu lat [20]. Wewnętrzna struktura miceli w obrazie mikroskopowym uzyskanym techniką cryo-TEM charakteryzuje się porowatością z nieregularnymi kanałami (o średnicy ponad 5 nm) i kryptami o średnicy 20-30 nm [21].

Kazeiny posiadają sekwencje bogate w prolinę i glutaminę odpowiadające za ich międzycząsteczkowe powinowactwo oraz zdolność do wiązania fosforu i wapnia [3, 5]. Typowa micela kazeinowa zawiera tysiące cząsteczek kazein, które składają się na ok. 94% suchej masy miceli. Większość z nich tworzy stabilne termodynamicznie kompleksy z amorficznym fosforanem wapnia stanowiącym ok. 6% miceli [3, 6]. Amorficzny fosforan wapnia występuje w postaci sferycznych nanoklasterów o średnicy 3,5-5,0 nm oddalonych od siebie o ok. 18 nm [22]. Grupy fosforanowe związane są z tym białkiem przy udziale łańcuchów bocznych fosfoseryny [23]. Enzymem odpowiedzialnym za fosforylację kazein jest kinaza aparatu Golgiego znana jako Fam20C, której nie należy mylić z kinazami kazeinowymi 1 i 2¹ [24].



Ryc. 3. Poglądowa graficzna reprezentacja przekroju miceli kazeinowej. Opracowano zgodnie z modelem zaproponowanym przez Holta i wsp. [28].

¹ Ich nazwa pochodzi od modelowego substratu użytego do ich identyfikacji jakim była kazeina.

W strukturze miceli kazeinowej peptydy α_{s1} , α_{s2} i β budują głównie jej wnętrze, podczas gdy frakcja κ stanowi „włochatą” warstwę zewnętrzną, która zapewnia miceli stabilizację steryczną [6]. Stabilizacja tego typu jest możliwa dzięki temu, że kazeina κ posiada glikozyłowany hydrofilowy ogon, znany także jako glikomakropeptyd, który skierowany jest do otaczającego środowiska wodnego [25, 26]. Co ciekawe warstwa „włochata” rozłożona jest nierównomiernie i pokrywa powierzchnię miceli tylko częściowo [27].

Właściwa wewnętrzna struktura miceli kazeinowej wciąż nie jest do końca poznana, a poszczególne modele opisują ją w odmienny sposób [20]. Ze względu na fakt, że kazeina jest wydzielana przez komórki nabłonka gruczołu sutkowego [29], Holt i wsp. zaproponowali, że struktura miceli wynika wprost z ewolucyjnej funkcji biologicznej – fosforan wapnia jest sekwestrowany we wnętrzu miceli by zapobiec jego precypitacji, a cząsteczki kazein są zaglomerowane wokół niego tak, aby nie mogły odkładać się w postaci włókien amyloidowych w tkance sutkowej [3]. Zawartość kazein w mleku zależy od ciśnienia osmotycznego, które regulowane jest przez stężenie laktozy [30]. Dzięki temu matka może bezpiecznie dla siebie karmić potomstwo.

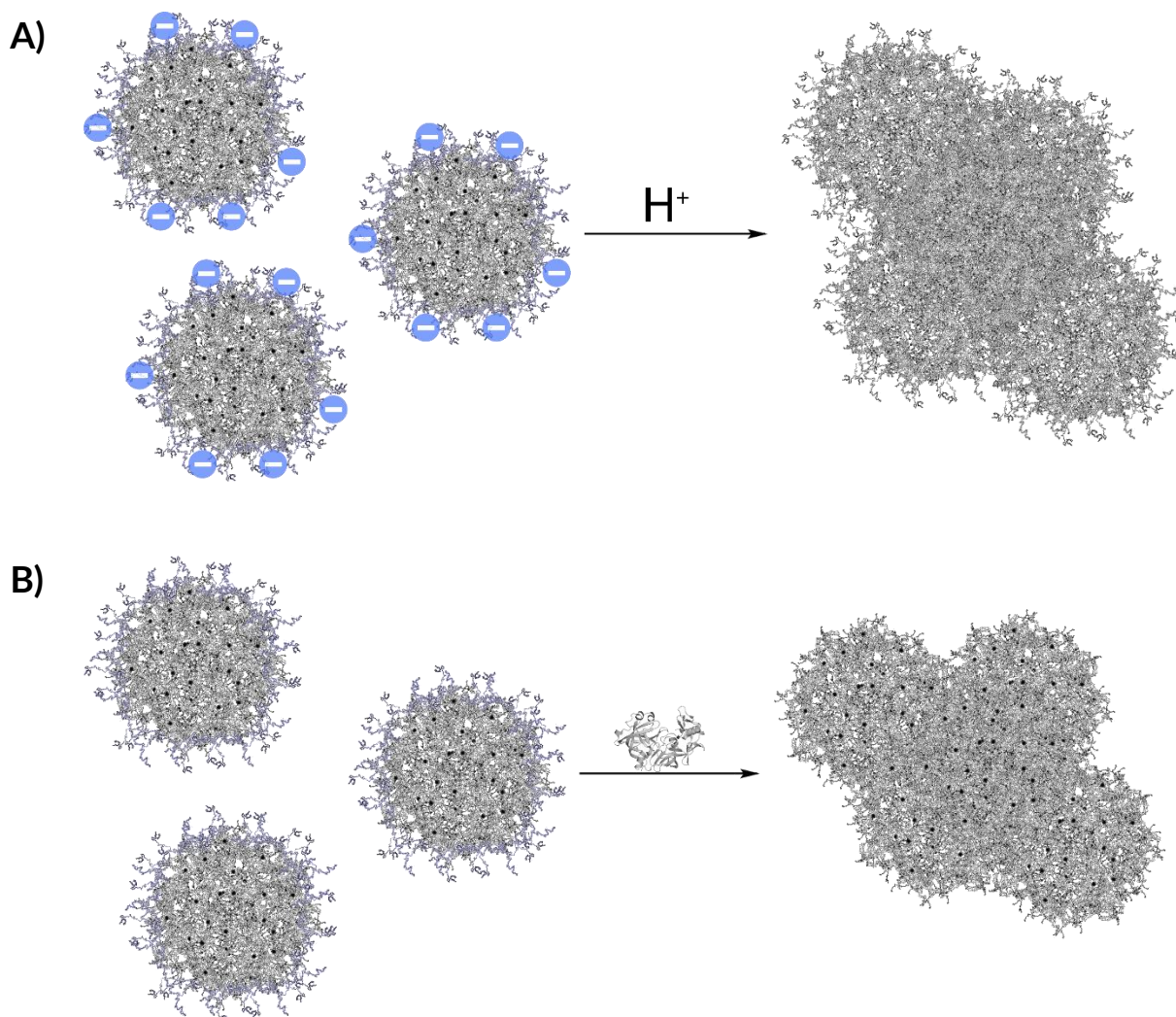
Micelle kazeinowe wykazują zachowanie zależne od pH – kurczą się wraz ze spadkiem pH i zwiększają objętość ze wzrostem pH [31, 32]. Potencjał zeta miceli kazeinowych wynosi -8 mV w pH obojętnym, a przy niskim pH spada do 0 mV. Po osiągnięciu stanu w którym micelle stają się niestabilne ciężko jest oszacować potencjał, ale prawdopodobnie poziom 0 mV osiągany jest przy pH~4,8, a przy jeszcze niższym pH potencjał przyjmuje wartości dodatnie [33]. Nabrzmiwanie miceli można tłumaczyć zmianami pH, które prowadzą do wzrostu liczby ładunków ujemnych. Wywołuje to do elektrostatyczne odpychanie się cząsteczek kazein, a w efekcie rozluźnianie struktury miceli i wzrost jej rozmiarów [32]. Z kolei kurczenie wynika ze zmniejszenia ilości ładunków ujemnych wraz ze spadkiem pH.

Obniżenie pH poniżej punktu izoelektrycznego (pH 4.6-4.8) wywołuje agregację i precypitację miceli kazeinowych połączoną z uwalnianiem jonów wapnia [6, 34, 35], wskazując na ważną rolę kationów w formowaniu się miceli. Badania przeprowadzone na kazeinianach sodu i wapnia [36, 37] oraz kazeinie [38] pokazują, że kationy wpływają na strukturę miceli w złożony sposób. Z kolei badania dotyczące wiązania cynku, przez pojedyncze frakcje sugerują, że mechanizm wiązania może być inny dla każdej frakcji [39]. Oddziaływania z solami nieorganicznymi prawdopodobnie modulują agregację kazein w sposób bezpośredni, a efekt zaburzenia „struktury wody” pod wpływem soli (chaotropowy i kosmotropowy) można uznać za pomijalny [40].

1.3. ZASTOSOWANIA KAZEINY

Kazeina posiada wiele pozytywnych cech wliczając w to niską cenę i nieskomplikowane procesy produkcji. Peptydy kazeinowe stanowią łącznie 80% wszystkich białek w mleku (Ryc. 1) [4, 5], co przekłada się na 2,75% pełnego składu mleka. Przemysłowe wytwarzanie kazeiny opiera się na procesie koagulacji prowadzonym na dwa sposoby – precypitację enzymatyczną lub kwasową (Ryc. 4), podobnie jak ma to miejsce w serowarstwie [15, 41]. Pierwsza metoda opiera się na obniżeniu pH do poziomu pI (4,6) używając kwasów nieorganicznych (np. HCl) lub organicznych (np. kwas mlekowy) [42]. Metoda enzymatyczna wykorzystuje chymozynę (główny enzym podpuszczki), która hydrolizuje wiązanie Phe₁₀₅-Met₁₀₆ w kazeinie, co prowadzi do koagulacji [43].

Wyłącznie kazeina kwasowa może zostać ponownie rozpuszczona. W tym celu neutralizowana jest przy użyciu określonego wodorotlenku [15, 36]. Stosuje się wodorotlenki amonu, potasu, sodu, wapnia lub odpowiednie węglany czy fosforany [42, 44]. Zneutralizowana kazeina występuje w postaci odpowiedniej soli – kazeinianu.



Ryc. 4. Mechanizmy metod używanych do strącania kazeiny.

A) obniżenie pH do poziomu pI (4,6) używając kwasu prowadzące do neutralizacji ładunku powierzchniowego, a następnie precypitacji; **B)** metoda enzymatyczna wykorzystująca chymozynę, która hydrolizuje kazeinę κ , co prowadzi do destabilizacji miceli i koagulacji.

1.3.1. Znaczenie przemysłowe

Kazeina znajduje szereg zastosowań w niemalże wszystkich produktach mlecznych. Spotykana jest głównie w składzie serów, gdzie stanowi główny komponent odpowiadający za ich konsystencję [43]. Światowa produkcja serów naturalnych (z wyłączeniem produktów przetworzonych) przekracza 20 mln ton rocznie [45], co nadaje kazeinie ogromne wręcz znaczenie przemysłowe. Szacuje się, że na świecie istnieje pomiędzy 400, a 1000 gatunków serów [46]. Mimo to nie istnieje ich ścisła klasyfikacja. Stosuje się m.in. podział ze względu na rodzaj procesu koagulacji kazeiny (kwasowe, podpuszczkowe, kwasowo-podpuszczkowe), procesu dojrzewania (nie DOJRZEWAJĄCE, DOJRZEWAJĄCE) i grupy mikroorganizmów biorących udział w tym procesie (bakterie, pleśnie) czy nawet twardość lub zawartość tłuszczu [46, 47].

Kazeina, obok białek serwatki, jest stosowana również jako suplement diety zapewniający źródło aminokwasów osobom prowadzącym wzmożoną aktywność fizyczną [48].

Ze względu na zalety przetwórcze kazeina znalazła zastosowanie także w innych technologiach jak produkcja papieru, klejów, farb, tworzyw i włókien tekstylnych [15, 49]. Modyfikowana formaldehydem kazeina, znana jako galalit, pełniła rolę jednego z pierwszych tworzyw

pólsyntetycznych wykorzystywanego do produkcji przedmiotów imitujących kość słoniową, rogi oraz szylkret [50]. Obecnie tworzywo to ma niewielkie znaczenie rynkowe.

Od czasów starożytnego Egiptu kazeina stosowana jest jako klej do drewna i papieru. Mimo, że tego typu kleje zostały w dużej mierze wyparte przez syntetyczne produkty, to obecnie powraca się do badań nad nimi ze względu na przyjazność wobec środowiska i biodegradowalność [51, 52].

Inne zastosowania to kazeinowe włókna regenerowane, znane jako Qmilk, Lactofil, Cargan, Fibrolane, Aralac czy Caslen. Mimo, że nie są ciągle popularne, to można oczekiwać ich renesansu. Obecnie powraca się do badań nad użyciem kazeiny do produkcji włókien w mieszance z innymi materiałami [53–55].

Kazeina może być stosowana także jako wysoce skuteczny dodatek technologiczny do cementowych wylewek samopoziomujących [56]. Nawet pomimo tego, że jej zawartość może hipotetycznie prowadzić do wydzielania się amoniaku na drodze aktywności metabolicznej mikroorganizmów [57]. Obecnie bowiem możliwe jest wprowadzenie substancji ograniczających to zjawisko.

Z kolei w stomatologii zastosowanie znajdują produkty hydrolizy kazeiny. Komercyjnie dostępne kompleksy fosfopeptydu kazeiny z amorficznym fosforanem wapnia powstałe w wyniku trawienia trypsyną wykazują pozytywny wpływ na mineralizację szkliwa [58, 59]. Mleko i kazeina mogą również ulegać adsorpcji na powierzchni błonki obecnej na szkliwie, co daje potencjał na ich wykorzystanie w preparatach zapobiegających erozji szkliwa przez bakterie [60].

Kazeina jest od lat stosowana także do blokowania nieswoistych oddziaływań przeciwciał w immunochemicznym teście ELISA² rutynowo wykonywanym w medycznych laboratoriach analitycznych [61].

1.3.2. Nośniki kazeinowe

Kwaśne środowisko w soku żołądkowym i obojętne środowisko w dwunastnicy [62] mogą modyfikować zachowanie miceli kazeinowych. Zjawisko to może być korzystne przy kontrolowanym uwalnianiu substancji podawanych doustnie. Dodatkowo kazeiny są zdolne do przenikania przez membrany biologiczne w sposób niezależny energetycznie [63], co może poprawiać wchłanianie przez komórki jelit. Z kolei niezwinięta struktura kazein czyni je łatwo dostępnymi dla enzymów proteolitycznych [14], zapewniając dobre uwalnianie w przewodzie pokarmowym. Właściwości te sprawiają, że kazeina stanowi obiecującą matrycę do kapsułkowania.

Nośniki kazeinowe można rozróżnić na podstawie rodzaju i rozmiarów. Zgodnie z definicją IUPAC, można wyróżnić sfery (kuliste cząstki bez otoczki ani odrębnej warstwy zewnętrznej), w których zamykana substancja jest rozdyspergowana w matrycy, a także kapsułki czyli twory powstałe przez precypitację otoczki w postaci warstwy na zewnątrz rdzenia utworzonego przez docelową substancję [64]. Wielu autorów nieprecyzyjnie używa pojęcia „kapsułkowanie” także w odniesieniu do sfer.

W przypadku cząstek zakresie 0,1-100 μm stosuje się przedrostek „mikro-”, podczas gdy cząsteczki o rozmiarze 1-100 nm określa się przedrostkiem „nano-”, [64]. Przy czym granica pomiędzy mikro- i nano- wciąż jest objektem pewnych kontrowersji.

² (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

We wszystkich wymienionych kategoriach kazeina została już wykorzystana jako matryca do kapsułkowania. Zakapsułkowane zostały różnorodne substancje o znaczeniu żywieniowym, prozdrowotnym i farmaceutycznym. Mimo, że podejścia stosowane do kapsułkowania substancji odżywczych i nutraceutyków mogą być różne od tych wykorzystywanych do kapsułkowania farmaceutyków, to formułacje takie są wciąż interesujące i mogą w przyszłości zaistnieć również w farmacji. Duża część preparatów użytych wstępnie do kapsułkowania nutraceutyków ostatecznie zostało użytych do kapsułkowania leków.

1.3.2.1. Nanonośniki

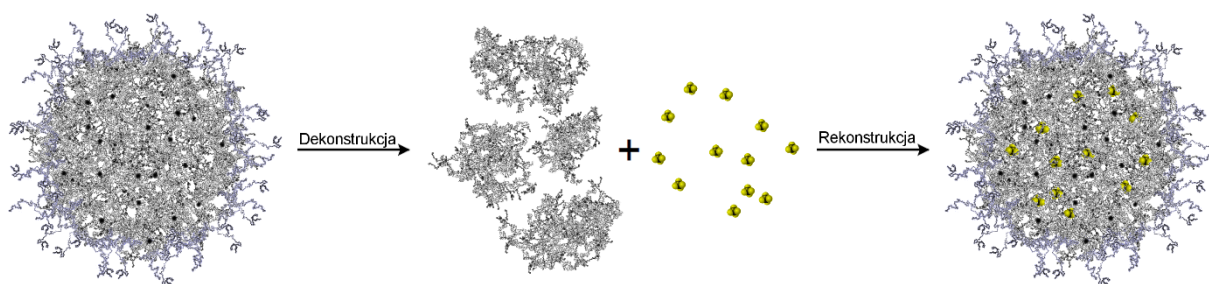
Wiele płynów biologicznych zawiera przekraczające granicę rozpuszczalności stężenia fosforanów i wapnia, które stabilizowane są przez białka [22]. Kazeiny w mleku realizują tę rolę przez naturalną zdolność do samoczynnego konstruowania miceli w obecności fosforanu wapnia [65]. Zjawisko to może być opisane jako kapsułkowanie wykreowane przez samą przyrodę. Stężenie wolnych cząsteczek kazein przy którym powstają micelle – krytyczne stężenie micelizacji (ang. *Critical Micelle Concentration*, CMC) przyjmuje się jako 1,0 mg/cm³ [31], lecz różne czynniki mogą wpływać na micelizację kazeiny w odmienny sposób.

Dodatkowo kazeiny, podobnie jak inne białka inherentnie nieuporządkowane, mogą oddziaływać z substancjami hydrofobowymi obecnymi w środowisku [66]. Właściwości takie mogą zostać wykorzystane do tworzenia syntetycznych nanocząstek nośnikowych.

Zrekonstruowane micelle

Pierwsze doniesienia traktujące micelle kazeinowe jako nanokapsułki zostały opublikowane przez Semo i wsp. Autorom udało się zamknąć rozpuszczalną w tłuszczach witaminę D2 w hydrofobowych regionach zrekonstruowanych miceli kazeinowych [67]. Niemniej jednak dwa inne artykuły traktujące o wiązaniu związków lipofilowych do hydrofobowych regionów kazeiny zostały opublikowane w podobnym okresie [68, 69]. Dało to pole do rozwoju innych prac na temat kapsułkowania związków hydrofobowych w zrekonstruowanych micelach kazeinowych, w których zastosowano różne rozwiązania technologiczne, lecz ogólna idea pozostaje podobna.

Pierwszym krokiem jest rozbitcie struktury micelarnej, które osiągnąć można stosując np. wysokie ciśnienie, ultradźwięki lub wykorzystując kazeiniany (od początku nieposiadające struktury micelarnej) [67, 70, 71]. Następnie dodaje się substancje lipofilowe rozpuszczone w rozpuszczalnikach organicznych takich jak etanol. Etanol ma dysocjacyjny wpływ na kazeinę, przypuszczalnie przez wzrost rozpuszczalności kazein w wyniku redukcji sieciowania fosfoserynowego i wzrostu hydrofobiczności białka [72]. W następnym etapie czynniki zaburzające i rozpuszczalniki organiczne zostają usunięte, związki lipofilowe wiążą się z hydrofobowymi regionami kazein, a micela ulega samoczynnej rekonstrukcji (Ryc. 5). W przypadku gdy użyty zostaje kazeinian, do odtworzenia struktury micelarnej niezbędny jest jeszcze jeden krok polegający na przywróceniu składu frakcji mineralnej mleka, który osiągany jest poprzez dodatek odpowiednich soli [67].



Ryc. 5. Graficzne przedstawienie ogólnej zasady tworzenia zrekonstruowanych miceli kazeinowych. Struktura micelarna jest zaburzana, lipofilowe związki docelowe rozpuszczone w rozpuszczalnikach organicznych wiążą się do hydrofobowych regionów kazein, a następnie kazeiny łączą się ponownie tworząc nanocząstki nośnikowe zawierające substancję docelową.

Substancje kapsułkowane w zrekonstruowanych micelach mają znaczenie zarówno żywieniowe jak i terapeutyczne, wliczając w to chemoterapeutyki (Tab. 2). Niemniej jednak w micelach można zamykać również substancje o znaczeniu technologicznym takie jak np. ferulan etylu, który wykazuje pozytywny wpływ na maskowanie niepożądanych posmaków w mleku UHT powstających w wyniku obróbki termicznej [73].

Nanokapsułki zawierające witaminę D3 na bazie zrekonstruowanych miceli kazeinowych zapewniają biodostępność Witaminy D porównywalną z preparatem na bazie polisorbata 80 [87, 88] i skutecznie przeszły testy kliniczne oferując biodostępność podobną do tej w tłuszczach [89] mimo, że modelowe komórki Caco-2 użyte w kolejnych badaniach przyswajały preparat w dość niewielkim stopniu [100].

Nanocząstki kazeinowe mają funkcję ochronną przed takimi czynnikami jak przechowywanie w warunkach chłodniczych, wysoka temperatura, paskalizacja, utlenianie i promieniowanie UV [67, 87, 90, 93, 97].

Nanocząstki kazeinowe zgodnie z oczekiwaniami charakteryzują się niską toksycznością. Badania mające na celu określenie poziomu toksyczności nanokapsułek kazeinowych przyjmowanych doustnie przeprowadzono według wytycznych OECD nr 408 na szczurach rasy Wistar w warunkach zgodnych z GLP³. Nanokapsułki pozostawały w przewodzie pokarmowym i nie wykazywały toksycznego wpływu na organizmy szczurów. Parametr NOAEL⁴ określono na 150 mg/kg masy ciała/dzień podczas gdy LOEL⁵ na 500 mg/kg masy ciała/dzień [101].

Co więcej zrekonstruowane cząstki kazeinowe są podatne na trawienie przez proteazy układu pokarmowego [92, 93, 96]. Jest to korzystne mając za cel uwalnianie w żołądku, lecz jeśli celem jest jelito, to do nośników muszą zostać wprowadzone dodatkowe czynniki tak, aby ograniczyć proces trawienia w żołądku.

³ Dobra Praktyka Laboratoryjna (ang. *Good Laboratory Practice*).

⁴ Poziom niewywołujący dającego się zaobserwować skutku (ang. *No Observed Adverse Effect Level*).

⁵ Najniższy poziom wywołujący dający się zaobserwować skutek (ang. *Lowest Observed Effect Level*).

Tab. 2. Metody rekonstruowania miceli kazeinowych.

Kategoria	Substancja	Wyjściowa postać kazeiny	Metoda	Literatura	
Terapeutyki	Triklosan	Kazeina micelarna (izolowana z mleka)	Homogenizacja wysokociśnieniowa	[71]	
	Flutamid	Kazeina micelarna (preparat techniczny)	Suszenie rozpyłowe	[75, 76]	
	Celekoksyb	Kazeinian sodu	Przywrócenie składu mineralnego mleka	[74]	
	Paklitaksel	Kazeinian sodu	Przywrócenie składu mineralnego mleka	[77]	
	Tarkwidar				
Nutraceutyki	Kurkumina	Kazeinian sodu	Suszenie rozpyłowe	[78]	
			Zmiana pH	[79]	
			Przywrócenie składu mineralnego mleka	[82]	
	Kwercetyna	Kazeina micelarna (izolowana z mleka)	Obróbka wysokim ciśnieniem	[80]	
			Kazeina (rodzaj niesprecyzowany)	Suszenie rozpyłowe	[81]
	Kwercetyna	Kazeinian sodu	Przywrócenie składu mineralnego mleka	[82, 83]	
	Ergokalcysterol (witamina D2)	Kazeinian sodu	Przywrócenie składu mineralnego mleka i homogenizacja wysokociśnieniowa	[67]	
			Kazeina micelarna	Obróbka wysokim ciśnieniem	[84, 85]
			Kazeina micelarna (izolowana z mleka)	Zmiana pH i suszenie rozpyłowe	[86]
		Zmiana pH i liofilizacja			
	Cholekalcyferol (witamina D3)	Kazeinian sodu	Przywrócenie składu mineralnego mleka i homogenizacja wysokociśnieniowa	[87–89]	
	β-karoten (prowitamina A)	Kazeinian sodu	Zamiana rozpuszczalnika	[68]	
			Emulsyfikacja i odparowanie	[69]	
			Przywrócenie składu mineralnego mleka i homogenizacja wysokociśnieniowa	[90]	
			Przywrócenie składu mineralnego mleka i suszenie rozpyłowe	[91]	
			Homogenizacja wysokociśnieniowa	[92]	
			Przywrócenie składu mineralnego mleka	[93]	
	Palmitynian retinyłu (witaminy A)	Kazeinian sodu	Przywrócenie składu mineralnego mleka i homogenizacja wysokociśnieniowa	[94, 95]	
	Kwas foliowy (witamina B9)	Kazeinian sodu	Koacercja i suszenie rozpyłowe	[96]	
	Wielonienasycone kwasy tłuszczowe ω-3	Kazeinian sodu	Przywrócenie składu mineralnego mleka i homogenizacja wysokociśnieniowa	[97]	
Fukoksantyna	Kazeinian sodu	Przywrócenie składu mineralnego mleka i suszenie rozpyłowe	[98]		
Mirycetyna	Kazeina (rodzaj niesprecyzowany)	Obróbka ultradźwiękami	[99]		
Substancje odżywcze	Olej sojowy	Kazeina micelarna (mleko odtuszczone)	Zmiana pH i obróbka ultradźwiękami	[70]	
	Olej rzepakowy				
	Olej rybi				

Micelle frakcji β

Zdolność do spontanicznej aglomeracji przejawiają także pojedyncze frakcje kazeiny jak kazeina β , która tworzy kuliste micelle o średnicy hydrodynamicznej 7-14 nm składające się z 15-60 cząsteczek [102, 103]. Produkcja kazeiny β składa się z trzech kroków – separacji całkowitej kazeiny z mleka, izolacji kazeiny β (poprzez zaburzenie struktury miceli na drodze zakwaszenia, chelatowania lub chłodzenia) i oczyszczania (przemywanie, precypitacja i separacja) [104]. Opracowano także metodę opierającą się na oddzieleniu frakcji κ poprzez precypitację izoelektryczną w obecności CaCl_2 i wirowanie, a następnie rozdzielanie frakcji α i β przez ekstrakcję na zimno i ponowne wirowanie. Rozdzielone frakcje wytrącano kwasem mlekowym [105]. Co ciekawe kazeina zubożona o frakcję β zachowuje większość właściwości „pełnej” kazeiny [106], co daje szansę na wykorzystywanie frakcji β bez konsekwencji utylizowania potencjalnie mniej wartościowej pozostałości. Dzięki temu możliwy jest scenariusz w którym kazeina β będzie wykorzystywana w preparatach specjalistycznych podczas gdy pozostałe frakcje będą trafiały do mniej wymagających technologicznie produktów spożywczych.

Kazeina β tworzy micelle w pH powyżej pI (5,33) i w temperaturze 15-30 °C, lecz po obniżeniu temperatury do poziomu 0-8 °C występuje w formie monomerów [8, 107], co powoduje, że takie przejścia konformacyjne mogą być kierowane zmianą temperatury. W temperaturze 24°C i pH 2,6 (poniżej pI) kazeina β występuje w postaci okrągłych aglomeratów w kształcie zbliżonym do dysku o szerokości 3-4 nm i średnicy 20-25 nm [108]. CMC kazeiny β wynosi 0,3-0,7 mg/cm³ i zależy od pH, temperatury i siły jonowej [103].

Cząsteczki kazeiny β posiadają hydrofilowe regiony na końcach N (por. Ryc. 2), których wzajemne odpychanie elektrostatyczne w połączeniu z wzajemnym łączeniem się regionów hydrofobowych stanowi podstawę mechanizmu ich micelizacji [103]. Przeważająca część hydrofilowych grup bocznych tworzy otoczkę, podczas gdy grupy hydrofobowe w większości znajdują się w rdzeniu miceli β -kazeinowej [109], co w dużej mierze przypomina micelizację polimerów dwublokowych [110].

Podobnie do „pełnej” kazeiny, również kazeina β zapewnia ochronę przed niskimi temperaturami panującymi podczas liofilizacji [111]. Kontrolowana termicznie micelizacja sprawia, że ten peptyd posiada potencjał do stosowania w przemysłowej praktyce podczas produkcji preparatów farmaceutycznych. Zdolność do wiązania substancji hydrofobowych powoduje dodatkowo, że frakcja β może być wykorzystywana do stabilizowania substancji trudno rozpuszczalnych w środowisku wodnym. Dlatego też kazeina β była wykorzystywana do kapsułkowania wielu hydrofobowych substancji terapeutycznych w tym preparatów przeciwnowotworowych (Tab. 3).

Kazeina β wykorzystana w wymienionych pracach była pochodzenia bydłęcego, lecz kazeina wydzielana przez inne zwierzęta również może być wykorzystywana. Esmaili i wsp. zakapsułkowali kurkuminę w nanonośnikach na bazie kazeiny β wielbłąda [122]. Niemniej jednak szersze zastosowania takiego preparatu mogą być ograniczone ze względu na niską dostępność mleka wielbłąda.

Tab. 3. Substancje terapeutyczne kapsułkowane w rekonstruowanych micelach β -kazeinowych.

Kategoria	Grupa	Substancja	Literatura
NLPZ ⁶	Pirazole	Celekoksyb	[111-113]
	Pochodne propionianu	Ibuprofen	[114]
Antybiotyki	Antracykliny	Mitoksantron	[115, 116]
Nutraceutyki	Flawonoidy	Naringenina	[117, 118]
	Stilbenoidy	Resweratrol	[119]
Chemosensybilizatory	Pochodne antranilamidu	Tarikwidar	[77, 120]
Chemoterapeutyki	Taksany	Paklitaksel	[121]
		Docetaksel	[107]
	Alkaloidy barwinka	Winblastyna	
	Kamptotecyny	Irynotekan	

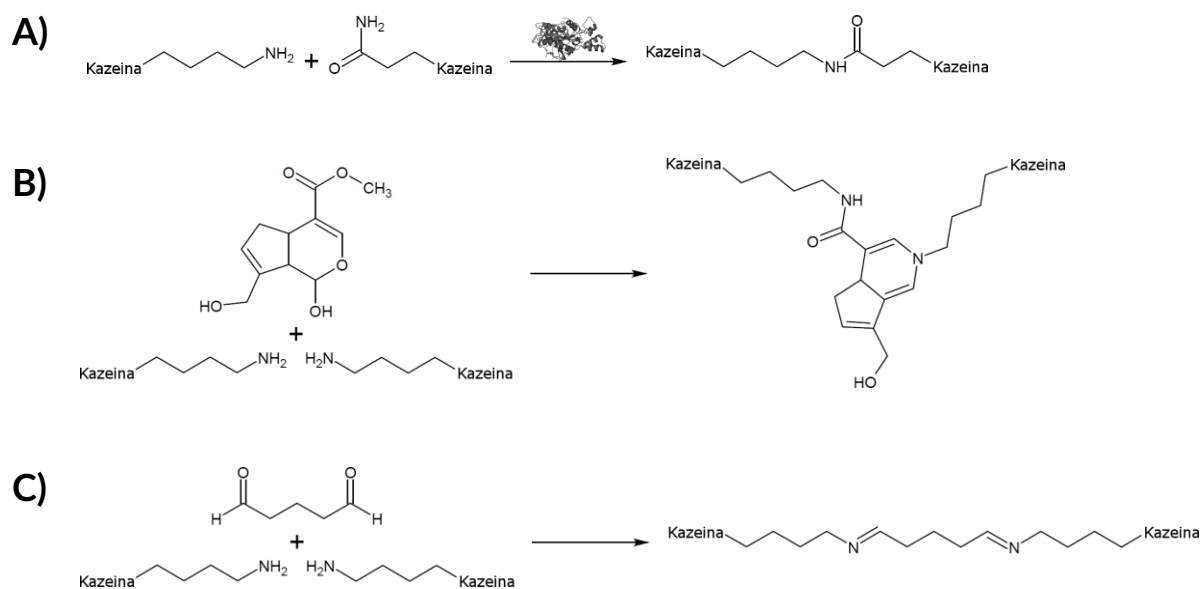
Koniugaty kazeiny

Na drodze reakcji Maillarda możliwe jest uzyskanie łańcuchów peptydowych kazeiny modyfikowanych sacharydami. Oprócz tego nanonośniki kazeinowe mogą być modyfikowane poprzez sieciowanie zachodzące z udziałem grup aminowych. Stosowanymi czynnikami sieciującymi są glutaraldehyd, genipina i transglutaminaza (Ryc. 6).

Kazeina modyfikowana chemicznie za pomocą reakcji glikacji również zachowuje zdolność do spontanicznego łączenia się w micelle. Przykładem takiej modyfikacji jest kopolimer kazeina-graft-dekstran wykazujący zachowanie zależne od pH oraz spontaniczną micelizację zachodzącą w pH równym pI kazeiny, a także powinowactwo do substancji hydrofobowych [126]. Kopolimer ten został wykorzystany do kapsułkowania prowitaminy A. β -karoten został zamknięty w sferyczne nanokapsułki, zbudowane z β -karotenu jako rdzenia otoczonego cząsteczkami kazeiny z łańcuchami dekstranu skierowanymi na zewnątrz. Uzyskane nanokapsułki były rozpuszczalne w wodzie, chroniły β -karoten przed utlenianiem oraz zmianami pH i siły jonowej, a pod wpływem trawienia trypsyną lub pepsyną uwalniały zawartość [127].

Doniesienia te zostały potwierdzone w kolejnej pracy, gdzie koniugaty kazeina-dekstran, powstałe na drodze przegrupowania Amadoriego, również okazały się skuteczne w tworzeniu miceli. Podobnie jak poprzednio wewnątrz miceli formowała kazeina, a zewnętrzną część łańcuchy polisacharydu. Produkt wykorzystano do nanokapsułkowania kurkuminy [128].

⁶ Niesteroidowe Leki PrzeciwZapalne.



Ryc. 6. Reakcje z wykorzystaniem różnych reagentów sieciujących kazeinę.

A) Reakcja acylacji pomiędzy grupą γ -karboksamidową glutaminy, a ϵ -aminą lizyny katalizowana przez transglutaminazę prowadzi do powstania wiązania izopeptydowego [123]; B) Sieciowanie genipiną wynika z nukleofilowego ataku pierwszorzędowej grupy aminowej na pierścień genipiny, a następnie nukleofilowej substytucji grupy estrowej [124]; C) Reakcja glutaraldehydu z grupami ϵ -aminowymi reszt bocznych białek prowadzi do powstania skoniugowanej zasady Schiffa w następstwie nukleofilowego ataku na grupy aldehydowe. Dodatkowo w roztworach alkalicznych glutaraldehyd może polimeryzować i dopiero reagować z białkami [125].

W innej pracy, przy wykorzystaniu reakcji Maillarda, otrzymano koniugaty z dekstranem. Stopień podstawienia wpływał na rozmiary miceli i polarność mikrośrodowiska w ich wnętrzu. Parametr ten zależał od czasu prowadzenia reakcji osiągając optimum po 20-24 h. Uzyskane preparaty posłużyły do kapsułkowania koenzymu Q_{10} i były stabilne nawet w pH kazeiny co pozwala na ich wykorzystanie w produktach o obniżonym pH [129].

Reakcje Maillarda wykorzystano do skoniugowania kazeiny także z maltodekstryną. Preparaty stworzone z tego materiału chroniły zakapsułkowaną w nich witaminę D2 przed środowiskiem przypominającym sok żołądkowy (2h w pH 2,5), jednakże podczas symulowanego trawienia czerwien Nilu, użyta jako model substancji hydrofobowej, nie została uwolniona. W związku z tym autorzy zasugerowali potencjał do wykorzystania dojelitowego, lecz takie podejście nie zostało przebadane [130].

Glutaraldehydu użyto do posieciowania nanoosników złożonych z kazeiny i fibroiny jedwabiu. Nośniki przed syntezą optymalizowano stosując metody *in silico*. Do prefabrykowanych nanoosników dodano karwedilol, po czym sonikowano i dializowano. Zoptymalizowana formuła charakteryzowała się sferycznym kształtem cząstek i podczas badań *in vivo* prowadzonych na szczurach wykazywała 6,87-krotny wzrost biodostępności i 2-krotny wzrost maksymalnego stężenia w osoczu w porównaniu z wodnym roztworem [131].

W innej pracy kazeina sieciowana glutaraldehydem została użyta do kapsułkowania cząstek magnetycznych [132]. Metanolowy roztwór doksorubicyny wymieszano z magnetycznymi nanocząstkami tlenku żelaza pokrytymi kopolimerem maleinianu i oktadekenu oraz inkubowano w celu inkorporacji leku do hydrofobowej warstwy polimeru. Następnie cząstki powlecano przez depozycję cząsteczek kazeiny i sieciowanie glutaraldehydem. Nanoosniki pokryte kazeiną wykazywały poprawioną wchłanianiałość w porównaniu z niepowleczonymi nośnikami w badaniach *ex vivo*. To zjawisko jest przypisywane niezależnej energetycznie penetracji błony plazmatycznej przez cząsteczki kazein [63, 132]. Dodatkowo zewnętrzna warstwa utworzona z kazeiny wykazywała odporność na trawienie pepsyną w niskim pH,

a ulegała trawieniu przez trypsynę w pH obojętnym [132]. Prawdopodobnie glutaraldehyd odpowiada za inhibicję trawienia żołądkowego zazwyczaj podatnej na ten proces kazeiny. Wiedza ta może zostać wykorzystana do opóźniania trawienia nanonośników, które nakierowane są na uwalnianie w jelitach.

Sieciowanie glutaraldehydem zastosowano również w badaniach nad kazeinowymi preparatami do fotochemioterapii glejaków wielopostaciowych. Autorzy wykorzystali kazeinę do stabilizacji genisteiny, która wykazuje działanie przeciwnowotworowe, lecz cierpi na ograniczenia wynikające z niskiej rozpuszczalności i biodostępności. Nanokapsułki stworzono metodą desolwacji przy użyciu acetonu, a następnie posieciowano glutaraldehydem i zliofilizowano. Następnie wyznakowano je zielenią indocyjaninową – barwnikiem fluorescencyjnym, który wyzwała reakcję wolnorodnikową pod wpływem promieniowania w zakresie bliskiej podczerwieni. Pod wpływem naświetlania preparat uwalniał genisteinę i generował reaktywne formy tlenu. Dodatkowo nanokapsułki zdolne były do przekraczania bariery krew-mózg i nie wykazywały niespecyficznej toksyczności w badaniach na szczurach. W badaniach na komórkach nowotworowych pod wpływem preparatu obserwowano uruchomienie cyklu apoptozy, zatrzymanie cyklu komórkowego i depolaryzację błony mitochondrialnej [133].

Mimo, że glutaraldehyd jest uważany za toksyczny [134] to istnieją dawno opracowane metody oznaczania nawet najmniejszych jego ilości [135, 136], a nawet monitorowania jego reakcji z białkami [136]. Glutaraldehyd można też zastąpić nietoksycznymi (lub mniej toksycznymi) czynnikami sieciującymi.

Czynnikiem takim jest enzym transglutaminaza. Jej użycie prowadzi do powstania kowalencyjnych wiązań w białku, które usztywniają jego strukturę. W kazeinie prowadzi to do obniżenia punktu izoelektrycznego, poszerzenia zakresu pH, w którym micelle pozostają stabilne oraz zapewnienia stabilności nawet w takich środowiskach jak 8M mocznik czy 99,5% alkohol etylowy [137].

Zhen i wsp. użyli transglutaminazy do posieciowania nanonośników kazeinowych zawierających cisplatynę. Nośniki umożliwiły głęboką penetrację tkanki guza i u myszy z nowotworem wątroby inhibicja wzrostu guza była lepsza niż w przypadku wolnej cisplatyny [138].

Dzięki wysokiej zawartości reaktywnych grup chemicznych kazeina może stanowić nośnik kompleksów enzymatycznych takich jak celulosomy. Geisa i wsp. użyli β -kazeiny i *N,N*-dimetylokazeiny (90% metylacji) jako rusztowań do których przytwierdzono endoglukanazy z reaktywną lizyną [139]. Ze względu na wysoką zawartość glutaminy w kazeinie do koniugacji wykorzystano transglutaminazę. Koniugaty *N,N*-dimetylokazeiny wykazywały dwukrotnie wyższą aktywność celulolityczną od koniugatów β -kazeiny ze względu na większą ilość związanych cząsteczek enzymu. Niedostępność lizyny spowodowana metylacją, sprawiła, że nie mogły powstawać wiązania poprzeczne w białku dzięki czemu większa ilość reszt bocznych glutaminy uczestniczyła w reakcji z endoglukanazami.

Z kolei genipina posłużyła do posieciowania nanonośników kazeinowych użytych do przygotowania pływających tabletek pęczniejących [140]. Chlorowodorek alfuzosyny rozpuszczono bezpośrednio w roztworze kazeiny po czym dodano etanolowy roztwór genipiny w celu posieciowania białka. Nanocząstki uformowano przez suszenie rozpyłowe [140, 141]. Sproszkowane nośniki zostały następnie zatabletkowane stosując tabletkarkę jednostemplową. Tabletki przygotowane tym sposobem porównano z komercyjnym preparatem alfuzosyny. Tabletki na bazie kazeiny zaczynały unosić się znacznie wcześniej od komercyjnych. Obie formułacje wydłużały uwalnianie alfuzosyny do 24 h [140], przy czym uwalnianie można modulować poprzez zmianę stopnia posieciowania [140, 141].

Ciekawych informacji dostarcza porównanie właściwości kazein modyfikowanych różnymi metodami. Hannß i wsp. porównali działanie glikacji laktozą, sieciowania metyloglioksem na drodze reakcji Maillarda oraz glutaraldehydem i transglutaminazą [142]. Kompleksy uzyskane w wyniku sieciowania glutaraldehydem zachowywały swoją pierwotną, nieco wydłużoną konformację. Pozostałe czynniki promowały powstawanie kompleksów o bardziej losowej, niezdefiniowanej strukturze, co może wynikać z reorganizacji zachodzących w trakcie reakcji. Glikacja prowadziła do niekowalencyjnej asocjacji cząsteczek kazein prawdopodobnie w wyniku tworzenia się wiązań wodorowych z udziałem wprowadzonych do struktury grup hydroksylowych.

Poza wymienionymi czynnikami do modyfikacji chemicznej kazeiny użyto również bezwodnika bursztynowego [94, 95]. Sukcynylicję prowadzono w pH 8 przez bezpośrednie dodanie bezwodnika do roztworu kazeinian sodu [95]. W zrekonstruowanych micelach stworzonych z tak modyfikowanego białka zamknięto witaminę A (palmitynian retinolu) oraz dokonano porównania z niemodyfikowanymi zrekonstruowanymi micelami, a także kompleksami witaminy A z kazeiną (sukcynylowaną i niemodyfikowaną). Preparaty poddawano trawieniu w symulowanych warunkach żołądka i testowano na linii komórkowej Caco-2. Zrekonstruowane micelle zapewniały wyższą biodostępność od prostych kompleksów. Dodatkowo w obydwu grupach lepsze wyniki uzyskano dla białka sukcynylowanego [94].

Aktywne biologicznie koniugaty kazeiny uzyskano także na drodze bezrozpuszczalnikowej kondensacji z metioniną i fenyloalaniną. Wykazywały one silniejsze działanie przeciwnowotworowe od analogicznych koniugatów karboksymetylocelulozy, a także flawonoidów takich jak tilirozyd, naringina i rutyna [143].

Pozostałe nanonośniki

Nanocząstki można przygotować wykorzystując interakcje kazeiny z innymi polimerami. Kompleksy kazeina/pektyna zostały przygotowane przez powolne zakwaszanie przy użyciu glukono- δ -laktonu i podgrzewanie. Jako substancji modelowej do kapsułkowania użyto rutyny. Otrzymane nanocząstki były w stanie opóźnić proteolizę w symulowanym środowisku żołądka i pozwalały na stopniowe uwalnianie w symulowanym środowisku jelita [144].

Kompleksy kazeina/zeina zostały wykorzystane do zakapsułkowania eugenolu wraz z tymolem poprzez homogenizację i suszenie rozpyłowe. Po rehydratacji kapsułki były stabilne i umożliwiały zawartym w nich substancjom działanie bakteriostatyczne wobec *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes* [145]. Podobnie kompleksy kazeiny z zeiną sporządzono na drodze precypitacji w nierozpuszczalniku [146]. Zeina rozpuszcza się w m.in. etanolu, więc po wymieszaniu roztworów kazeiny oraz zeiny, a następnie odparowaniu etanolu woda pełni rolę nierozpuszczalnika dla powstałych kompleksów. Uzyskane kompleksy posłużyły do kapsułkowania fukoksantyny i w badaniach *in vitro* wykazywały wyższą stabilność, biodostępność oraz aktywność antyoksydacyjną i antyproliferacyjną od wolnej fukoksantyny.

W kolejnych badaniach do nanokapsułkowania użyto wszystkich trzech wymienionych biopolimerów – kazeiny, zeiny oraz pektyny. Kapsułkowanym związkiem był eugenol. Kapsułkowanie prowadzono przez kompleksowanie w niskim pH wspomagane przez grzanie w temperaturze 80 °C przez 60 min. Uzyskane kapsułki były następnie suszone rozpyłowo [147].

Nagromadzenie ładunków ujemnych na powierzchni kazein sprawia, że są polianionami i mogą ulegać oddziaływaniom z przeciwnie naładowanymi polikationami takimi jak chitozan. Oddziaływania między tymi polimerami zależą ściśle od masy cząsteczkowej i stopnia acetylacji chitozanu. Nanokapsułki powstałe z tych polimerów wykorzystano jako nośnik dla insuliny.

Zastosowanie różnych kolejności dodawania reagentów pozwoliło na wyodrębnienie dwóch modeli interakcji z których wynika, że kazeina i insulina mogą rywalizować o wiązanie z chitozanem [148].

Kessler i wsp. wymieszali kazeinę bogatą we frakcje α_s z trójblokowym kopolimerem PEO₁₃-PPO₃₀-PEO₁₃ [18]. Utworzono w ten sposób micelle zawierające obydwa polimery, które wykazywały skuteczność w solubilizacji pirenu.

Jedną z najciekawszych metod nanokapsułkowania jest zastosowanie fazy kriocentrowanej [149]. Faza ta może być definiowana jako mikroprzestrzeń z dużą zawartością kryształów wody powstającą podczas mrożenia roztworu wodnego. Kazeina i β -karoten zostały wmieszane i były stopniowo zamrażane do osiągnięcia temp. -40 °C a następnie wysuszone ze stanu zamrożonego pod próżnią w temp. -20 °C. Cząsteczki β -karotenu zostały zamknięte pomiędzy powierzchnią, a centralną częścią nanocząstek. W trakcie przechowywania w stanie zamrożonym zawartość β -karotenu na powierzchni zaczęła wzrastać podobnie jak hydrofobowość powierzchni. Jednakże po rehydratacji, hydrofobowość powierzchniowa wróciła do stanu poprzedniego.

1.3.2.2. Mikronośniki

Pierwsze prace dotyczące użycia kazeiny do mikrokapsułkowania opublikowano pod koniec lat osiemdziesiątych [150, 151]. Od tamtej pory powstało wiele prac traktujących o tym zagadnieniu, lecz omówione zostaną tylko te niedawne.

Koacerwacja

Kazeina może wchodzić w interakcje z polisacharydami tworząc kompleksy typu koacerwat [152–155]. Koacerwację osiąga się w tym przypadku poprzez obniżenie pH poniżej punktu izoelektrycznego kazeiny (pH 4,6-4,8). Tak niskie pH jest konieczne ponieważ zarówno kazeina jak i polisacharydy wykazują ujemny ładunek powierzchniowy w obojętnym pH odpychając się nawzajem. Przesunięcie pH w stronę niskich wartości prowadzi do powstawania dodatniego ładunku na powierzchni białek, co pozwala im wchodzić w interakcję z wciąż ujemnie naładowanymi łańcuchami polisacharydów [154].

Koacerwacja jest skuteczna w kapsułkowaniu związków lotnych [154, 155]. Po wymieszaniu kazeinianu sodu lub izolatu białek serwatki z karboksymetylocelulozą, dodano β -pinen i przygotowano emulsje typu olej w wodzie. Koacerwację przeprowadzono przy pH 2,8. Wyższy stosunek białka do polisacharydów okazał się bardziej korzystny ze względu na tworzenie się sieci, w której uwięziony został β -pinen, co było bardziej widoczne w przypadku białek serwatki, prawdopodobnie z powodu ich zdolności do częściowego rozwinięcia się w niskim pH [154]. Dodatek czynników retikulujących⁷ podczas koacerwacji dał rozbieżne rezultaty – kwas taninowy nie wywołał znaczącej zmiany, podczas gdy glicerol dał 1,5 do 2-krotny wzrost w wydajności kapsułkowania w przypadku kazeinianu oraz ponad 2,2-krotny wzrost w przypadku izolatu białek serwatki. Różnice te zostały przypisane rozmiarom cząsteczek użytych związków – małe cząsteczki glicerolu były zdolne do wypełnienia porów w mikrokapsułkach i zamknięcia ich, podczas gdy kwas taninowy powodował zaburzenia podczas koacerwacji [155].

W innej pracy kazeinę koacerwowano z pektyną. Indometacynę zmieszano z roztworem zawierającym kazeinę i pektynę, a następnie wywołano koacerwację poprzez powolne

⁷ Sieciujących poprzez tworzenie wiązań wodorowych.

obniżanie pH do 3,5 [156]. Identycznie postąpiono z paracetamolem. Niektóre formułacje stworzone na potrzeby tych badań były dodatkowo sieciowane glutaraldehydem. Uzyskane mikronośniki były w stanie wydłużyć czas uwalniania indometacyny, a interakcja między kazeiną i pektyną nie zapobiegała trawieniu enzymatycznemu. Sieciowanie z kolei utrudniało trawienie, lecz nie wydłużało czasu uwalniania. Formułacja okazała się nieodpowiednia dla rozpuszczalnych w wodzie substancji, takich jak paracetamol, który wykazywał gwałtowne uwalnianie.

Opracowano procedurę przygotowywania hydrożeli poprzez kompleksowanie kazeiny z alginianem. Efekt uzyskano poprzez obniżanie pH do 4,5 [157, 158]. W utworzonych tym sposobem mikrokapsułkach zamknięto emulsję na bazie oleju kukurydzianego i kazeiny zawierającą β -karoten. Mikrokapsułki zapewniały stabilność β -karotenu w trakcie przechowywania i zwiększały biodostępność w symulowanych warunkach układu pokarmowego [157].

Emulsyfikacja

Amfifilowa natura kazeiny pozwala jej oddziaływać zarówno z substancjami hydrofobowymi jak i środowiskiem wodnym, co umożliwia wykorzystanie w roli emulgatora. Dodatkowo w emulsjach i mikrosferach kazeina działa jako antyoksydant [159].

Olej lniany został zakapsułkowany w preparatach na bazie kazeinianu i koncentratu białek serwatki przygotowanych poprzez emulsyfikację i suszenie rozpyłowe. Po sześciu miesiącach przechowywania w 35 °C mikrokapsułki wykazywały wysoką stabilność oksydacyjną. Podczas testów w symulowanych warunkach żołądka i symulowanych warunkach jelita mikrokapsułki kazeinianowe wykazywały prawie 2-krotnie lepsze uwalnianie niż kapsułki na bazie koncentratu białek serwatki [160].

Olej lniany i saponiny z kory mydłodziwnego zemulsyfikowano i wymieszano z alginianem sodu oraz kazeinianem sodu. Następnie przy użyciu enkapsulatora mieszaninę wkroplono do roztworu chlorku wapnia w celu wywołania żelowania. Kazeinian sodu skutecznie ograniczył inhibicję lipidów podczas 50 dni przechowywania w 55 °C [161].

Mikrosfery przygotowano także z kazeinianu sodu i pektyny emulsyfikowanych z olejem rybnym, a następnie posieciowanych transglutaminazą. Stabilność mikrokapsułkowanego oleju rybnego została porównana z emulsjami przygotowanymi z oleju i kazeiny lub polisorbatu 20. Warianty stabilizowane kazeinianem utleniały się wolniej od tych stabilizowanych polisorbatem 20 i co ciekawe, nie wykazano różnic pomiędzy emulsjami kazeinowymi i mikrosferami [159].

Podobny preparat został opracowany przez Salcedo-Sandoval i wsp. Olej rybi został zamknięty w otoczce składającej się z posieciowanego transglutaminazą kazeinianu sodu, która dodatkowo pokryta została pektyną. Preparat wykorzystano do wzbogacenia mięsa wieprzowego w olej rybi. W trakcie 19 dni przechowywania kapsułki kazeinowo-pektynowe, w porównaniu ze zwykłymi emulsjami na bazie oleju i kazeiny, skuteczniej obniżały stopień utleniania. Zawartość substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (produkty peroksydacji lipidów) w mięsie zawierającym kapsułki była niższa niż w mięsie wzbogaconym emulsją czy nieprzetworzonym olejem rybnym [162].

Olej rybi zamykano również w hydrożelach na bazie kazeinianu sodu i niskoestrowej pektyny amidowanej. Pęcherzyki oleju powleczono kazeinianem sodu, a następnie pokryto pektyną na drodze koacerwacji w pH 4.6. Dodatkowo preparaty posieciowano transglutaminazą. Formułacja skutecznie ograniczała degradację oleju w czasie przechowywania,

a w symulowanych warunkach jelita cienkiego uwalniała olej prawdopodobnie w wyniku osłabienia oddziaływań elektrostatycznych i trawienia enzymatycznego [163].

Jain i wsp. użyli gumy tragakantowej do koacerwacji z kazeiną w celu zakapsułkowania β -karotenu [152] i likopenu [153]. Wymienione, związki rozpuszczono w oleju z otrębów ryżowych i zemulsyfikowano z kazeiną oraz gumą tragakantową uzyskując emulsje typu olej w wodzie. Następnie obniżono pH z 10,5 do 2,0 wywołując koacerwację, a powstałe kompleksy traktowano genipiną by uzyskać posieciowanie powierzchni. Pomimo początkowego gwałtownego uwalniania, przypisanego zewnętrznemu β -karotenowi, mikrokapsułki generalnie przejawiały dobrą krzywą uwalniania w badaniach *in vitro*. Dodatkowo zachowywały one stabilność w szczególności podczas przechowywania przez 2 miesiące, w temp. 4 °C [152]. Stabilność kapsułek zawierających likopen była znacznie wyższa od stabilności likopenu w oleju. Zaobserwowano również 2 razy wyższą biodostępność kapsułkowanego likopenu w badaniach na szczurach [153].

Kolejne badania opisują kapsułkowanie oleju zawierającego β -karoten w koacerwatach kazeiny i gumy guar, które zostały dodatkowo posieciowane z wykorzystaniem genipiny. Koacerwaty uzyskano w wyniku obniżania pH do poziomu pH 5. Preparaty w warunkach *in vitro* charakteryzowały się wydłużonym uwalnianiem i poprawioną odpornością na degradację β -karotenu pod wpływem światła [164].

Koacerwaty utworzono także na bazie kazeiny i sacharydu SSPS⁸, a następnie emulsyfikowano z olejem, w którym uprzednio rozpuszczono kurkuminę. Emulsje uzyskane w pH 4 charakteryzowały się stabilnością i w badaniach na myszach wykazywały 11 krotnie wyższą biodostępność kurkuminy niż w przypadku emulsji stworzonych przy użyciu polisorbata 20 [165].

Mikrokapsułki kazeinowe zastosowano nawet jako dodatek do żelków wzbogaconych o witaminę C. Mikrokapsułki zawierające kwas askorbinowy powstały na drodze precypitacji podpuszczką, emulsyfikacji z olejem (nadmiar usunięto przez ultrawirowanie), a następnie suszenia rozpyłowego. Preparatem tym wzbogacono słodzone żelki na bazie innego białka – żelatyny. Problemem występującym w wielu produktach wzbogaconych o witaminę jest spadek ich aktywności w trakcie przechowywania produktu. Producenci takich wyrobów stosując więc zawyżone dawki witamin tak aby do końca okresu przydatności utrzymać zawartość na deklarowanym poziomie. Po zakończeniu przyspieszonych testów przechowywania żelki zawierające mikrokapsułki zachowywały większe ilości witaminy C od żelków w których nie była ona kapsułkowana. Wartością dodaną była poprawa parametrów uwalniania wynikająca z zastosowania mikrokapsułek [166].

Zgodnie z oczekiwaniami nie tylko kazeina bydlęca posiada zdolność do wiązania i stabilizowania substancji hydrofobowych. Kazeina otrzymana od dwóch ras kóz wykazywała powinowactwo do hydrofobowego resweratrolu podobnie jak kazeina bydlęca. Co ciekawe po 48h przechowywania emulsje przygotowane na bazie kazeiny koziej zawierały większe ilości resweratrolu od emulsji na bazie kazeiny bydlęcej. Na odzysk resweratrolu pozytywnie wpływał dodatek polisorbata 20 bez względu na pochodzenie biologiczne użytej kazeiny [167].

Kapsułkowanie probiotyków

Zdolność kazeiny do emulsyfikacji i tworzenia żeli, wykorzystano do kapsułkowania bakterii probiotycznych: *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* oraz *Lactobacillus rhamnosus* [168–173].

⁸ Rozpuszczalny w wodzie polisacharyd ekstrahowany z soi (ang. *Soluble Soybean PolySaccharide*)

Jedną z użytych metod było sieciowanie białka transglutaminazą. W wyniku sieciowania nastąpiło żelowanie kazeiny prowadzące do immobilizacji komórek bakterii [169, 170]. Niemniej jednak po liofilizacji i 3 miesiącach przechowywania w optymalnych warunkach (4 °C, 11% wilgotności względnej) zaobserwowano znaczny spadek liczebności żywych komórek. Uważa się, że to zjawisko jest nieuniknione, więc autorzy zaproponowali dodatek substancji ochronnych [170].

Pomimo odporności na niskie pH mikrocząstki kazeinowe są łatwo trawione przez proteazy w warunkach *in vitro* i nie zapewniają odpowiedniej ochrony bakteriom probiotycznym *in vivo*. Aby ograniczyć to zjawisko zastosowano powlekanie tłuszczem, które zapewniło odporność na trawienie pepsyną. Niemniej jednak w trakcie badań na myszach, cząstki nadal ulegały trawieniu przez proteazy prawdopodobnie przy udziale lipaz żołądkowych [171]. Nie można wykluczyć jednak, że inny rodzaj otoczki mógłby sprostać zadaniu.

Innym materiałem użytym do kapsułkowania bakterii probiotycznych była kazeina wraz z białkami serwatki [168]. Kazeinę micelną i/lub białka serwatki wymieszano z liofilizatem biomasy bakterii probiotycznych, po czym dodano podpuszczkę by wywołać koagulację. Następnie produkty poddano trawieniu w symulowanym soku żołądkowym i badano *in situ* przy użyciu analizatora cząstek sprzężonego z reaktorem trawiennym. Najlepsze wyniki pod względem rozkładu masy, modułu elastyczności, wydajności kapsułkowania, czasu połowicznego trawienia, rozmiaru cząstek i współczynnika przeżywalności uzyskano dla formułki zawierającej zdenaturowane białka serwatki i kazeinę micelną.

Oprócz emulsyfikacji do mikrokapsułkowania bakterii probiotycznych wykorzystano także suszenie rozpyłowe [173]. Kazeina micelarna została zmieszana ze zdenaturowanymi białkami serwatki i chymozyną. Po enzymatycznej hydrolizie kazeiny k dodano liofilizat bakterii *L. rhamnosus* i wysuszone rozpyłowo. Współczynnik przeżywalności komórek bakteryjnych po suszeniu był wystarczający, lecz preparat nie został przebadany w warunkach przewodu pokarmowego. Niemniej jednak uzyskane mikrocząstki wykazywały ciekawe zachowanie podczas odtwarzania w wodzie – przy 8 °C komórki ulegały uwolnieniu, podczas gdy przy 40 °C powstawał żel powodując pułapkowanie.

Podobna procedura została zastosowana do zakapsułkowania komórek *L. paracasei* [172]. W tym przypadku działaniu chymozyny i procedurze suszenia rozpyłowego poddano jednak odtłuszczone mleko w proszku, a nie tylko jego wyizolowane składniki [172, 174]. Uzyskane preparaty były stabilne, a komórki zostały całkowicie zamknięte w matrycy białkowej [172].

Omawiając kapsułkowanie bakterii probiotycznych warto poruszyć także kwestie stabilizowania substancji stymulujących rozwój mikroflory jelitowej. Wymieszanie prebiotyku z komórkami bakterii przed podaniem mogłoby spowodować przedwczesne strawienie takiej substancji i tym samym ograniczenie skuteczności działania. Dlatego też przeprowadzono badania nad preparatami chroniącymi substancje prebiotyczne. Saez-Orviz i wsp. przetestowali podejścia wykorzystujące m.in. kazeinian sodu do mikrokapsułkowania laktobionianu wapnia [175]. Mikrokapsułki uzyskane przez liofilizację pozwalały na uwalnianie substancji w symulowanych warunkach żołądka i jelit oraz chroniły przed trawieniem przez bakterie w środowisku serka wiejskiego użytego w roli modelowego środowiska.

2. WYNIKI I DYSKUSJA

2.1. IMMOBILIZACJA BAKTERIOFAGÓW

Bakteriofagi (fagi) to wirusy, które infekują bakterie [176]. Bakteriofagi są powszechne w słodkiej i słonej wodzie, glebie, odchodach oraz ściekach gospodarczych i przetwórczych, a także w produktach żywnościowych [177, 178]. Rozmiary fagów mieszczą się w zakresie 20-200 nm, co czyni je ok. stukrotnie mniejszymi niż przeciętna komórka bakteryjna [179]. Przy szacunkowej liczbie 10^{31} cząstek fagowych przewyższają one swą liczebnością światową populację bakterii w stosunku 10:1 i mogą być uważane za najbardziej powszechne nanocząstki biologiczne [180]. Utrzymywanie się ich liczebności na tak wysokim poziomie wynika z masowego infekowania bakterii. Bakteriofagi mogą przyczyniać się do śmierci od 20 do 50% wszystkich bakterii. Nie prowadzi to jednak do gwałtownego spadku liczebności bakterii [181], ponieważ w przyrodzie fagi występują z nimi w równowadze – pełnią rolę strażników hamujących niekontrolowany przyrost liczebności bakterii.

Bakteriofagi mogą infekować bakterie przynależące do wielu rodzajów systematycznych [176, 182], lecz są specyficzne – część z nich atakuje tylko jeden szczep bakterii danego gatunku podczas gdy inne potrafią infekować różne, ale za to ściśle określone gatunki [183]. Fagi posiadają zdolność do szybkiej replikacji oraz samoistnego zanikania – namnażają się tak długo jak w środowisku występują komórki bakteryjne, które mogą zainfekować, a w przypadku ich braku automatycznie zanikają [184]. Nie są znane przypadki fagów infekujących zamiennie bakterie Gram ujemnie jak i Gram dodatnie. Nie infekują też ludzi, ponieważ nie są zdolne do namnażania się w komórkach eukariotycznych [183].

W niniejszej pracy do badań z udziałem bakteriofagów zastosowano modelowego faga T4. Jest on jednym z siedmiu bakteriofagów (numerowanych od T1 do T7) infekujących bakterie z gatunku *Escherichia coli* [185]. Podobnie do *E. coli*, posiadającej status organizmu modelowego, w badaniach naukowych fag T4 był stosowany jako model we wczesnych badaniach z dziedziny genetyki molekularnej [185, 186]. Obecnie również posiada status modelowego.

Bakteriofagi są rozważane w kontekście zjawiska antybiotykooporności bakterii [187]. Zjawisko to jest powszechne wśród takich patogenów jak: *Acinetobacter*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae* [176]. Zjawisko antybiotykooporności jest jednak znacznie starsze niż mogłoby się wydawać – geny kodujące oporność na antybiotyki znaleziono w osadach wydobytych z wiecznej zmarzliny datowanej na 30 000 lat [188]. Tłumaczy to dlaczego w ciągu mniej niż 100 lat od odkrycia antybiotyków, oporność bakterii na te substancje gwałtownie wzrosła – nie była to nowa cecha, a masowe użycie antybiotyków doprowadziło tylko do wyselekcjonowania bakterii już nią obdarzonych.

Współczesna medycyna oczekuje, że fagi staną się alternatywą dla antybiotyków. Staje się to możliwe dzięki wprowadzeniu do terapii apirogennych preparatów bakteriofagowych [189–192]. Niemniej jednak do upowszechnienia terapii bakteriofagowej niezbędne jest opracowanie preparatów doustnych, co pociąga za sobą konieczność ochrony fagów przed warunkami panującymi w przewodzie pokarmowym. Najbardziej oczywiste wydaje się zastosowanie preparatów neutralizujących kwaśne środowisko żołądka [193]. Do innych metod zaliczyć można zamykanie bakteriofagów w kapsułkach, liposomach, hydrożelach i na powierzchni włókien [194–196].

Ze względu na szereg korzystnych właściwości kazeiny, podjęto próby zmierzające do opracowania metodyki zamykania bakteriofagów w nośnikach kazeinowych. Jedną z metod tworzenia takich nośników jest koprecypitacja zamykanego czynnika i materiału otoczki [64, 197]. W związku z tym pierwszym etapem było opracowanie metodyki kontrolowanej precypitacji kazeiny w warunkach nieinwazyjnych dla bakteriofagów.

2.1.1. Wyniki

2.1.1.1. Strącanie kazeinianu sodu

W badaniach korzystano z technicznego preparatu kazeiny kwasowej. Ze względu na właściwości i ograniczoną naturalną rozpuszczalność w wodzie wymagane było jej przygotowanie, które polegało na neutralizacji roztworem wodorotlenku sodu. Aby dobrać niezbędną ilość NaOH, metodą miareczkową wyznaczono proporcje pozwalające ustandaryzować skład przygotowywanych roztworów kazeiny (współczynnik zobojętniania). Stwierdzono, że 0,001 mola NaOH pozwala na zobojętnienie 1 g kazeiny kwasowej uzyskując pH ok. 8. W dalszych badaniach stosowano roztwory kazeiny sporządzane według powyższych proporcji.

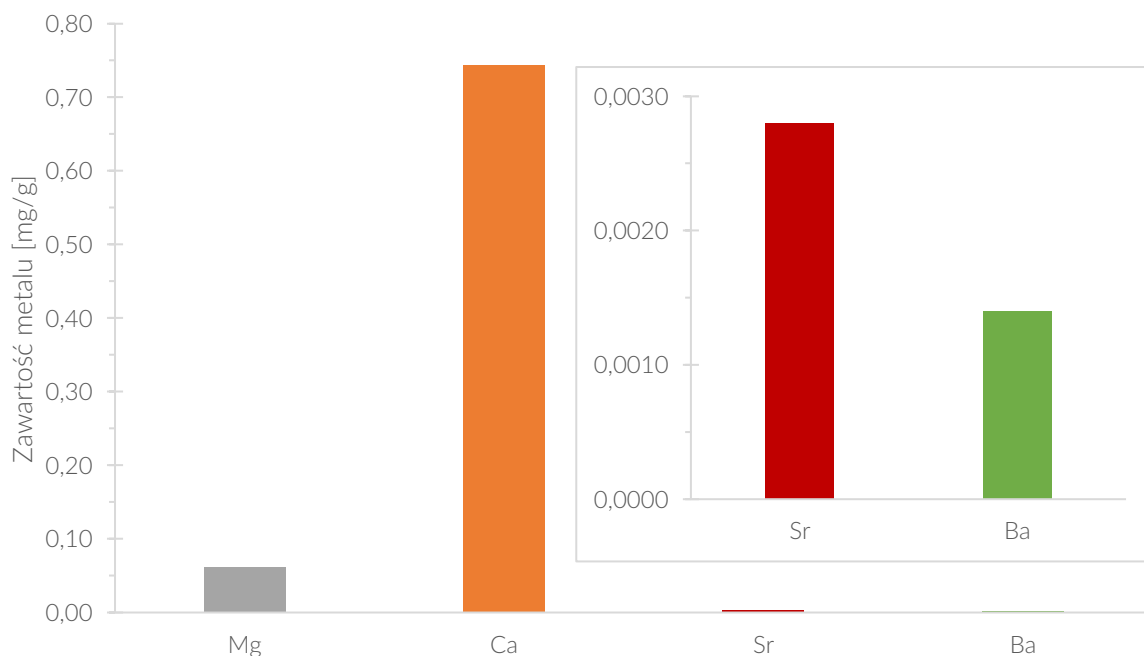
Z racji tego, że zneutralizowana wodorotlenkiem sodu kazeina kwasowa występuje w postaci soli – kazeinianu sodu, to jako metodę precypitacji zaproponowano strącanie poprzez ogólnie znaną reakcję tzw. podwójnej wymiany. Aby wykluczyć ewentualność strącania się kazeiny w wyniku spadku pH, do badań użyto chlorków metali II grupy układu okresowego. Jako układ kontrolny zastosowano precypitację kwasem solnym.

Chlorki wapnia, baru i strontu prowadziły do precypitacji białka, podobnie jak kwas solny. Roztwór chlorku magnezu nie wywoływał dostrzegalnych zmian. Na podstawie wizualnej obserwacji można stwierdzić, że reakcja przebiegała najgwałtowniej z udziałem baru, a w drugiej kolejności wapnia.

2.1.1.2. Interakcja z jonami metali ziem alkalicznych

Roztwór kazeinianu sodu dodawano kroplami do roztworów chlorków: magnezu, wapnia, strontu oraz baru. Uzyskane precypitaty kilkakrotnie wirowano i przepłukano wodą destylowaną. Tak uzyskane próbki oczyszczano z nadmiaru jonów poprzez dializę do wody destylowanej. Chlorek magnezu nie wywoływał zauważalnego strącenia, uzyskaną próbkę wirowano jednokrotnie i przeniesiono w formie ciekłej do wężyka dializacyjnego. Następnie próbki liofilizowano i poddano mineralizacji. W celu oznaczenia zawartości metali zastosowano technikę atomowej spektrometrii emisyjnej (ang. *Microwave Plasma-Atomic Emission Spectroscopy*, MP-AES). Próbę odniesienia stanowiła wyjściowa kazeina, która została poddana mineralizacji.

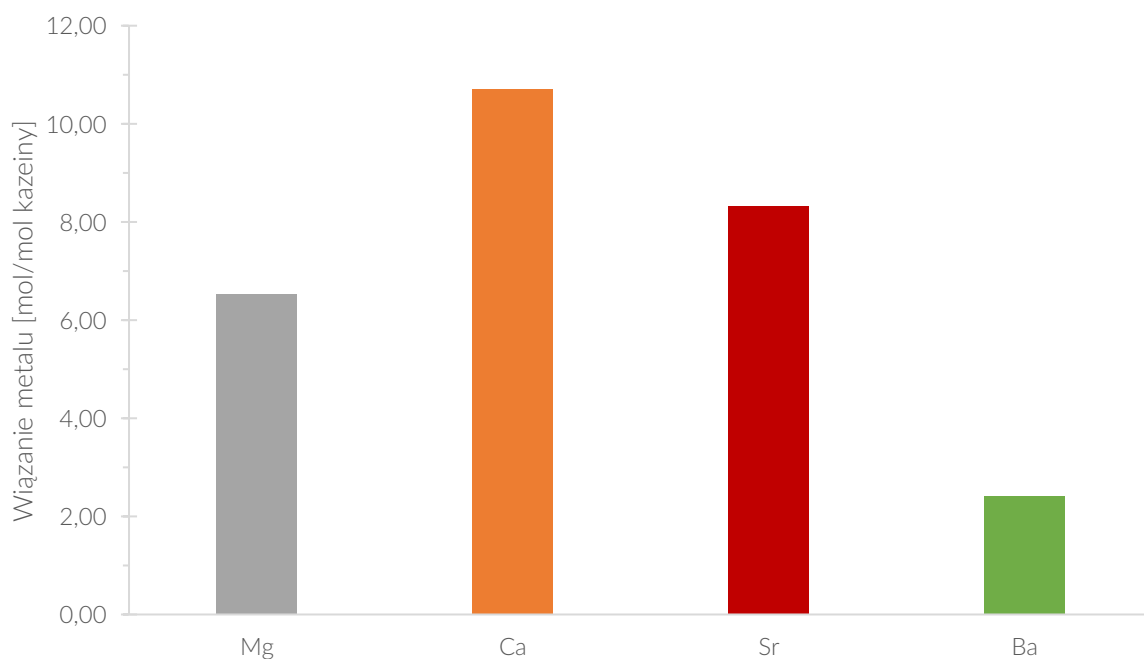
Wyjściowa kazeina zawierała natywnie zanieczyszczenia badanymi metalami (Ryc. 7). Nie jest zaskoczeniem, że w największej ilości był to wapń. Nieoczekiwaną obserwacją było stwierdzenie śladowych ilości baru i strontu w kazeinie.



Ryc. 7. Natywna zawartość metali II grupy układu okresowego w kazeinie wyjściowej.

Wyniki dla pozostałych próbek skorygowano o wartości uzyskane dla próby zerowej (kazeiny) i przeliczono na stosunek molowy danego metalu do kazeiny (ilość moli metalu, która wiązana jest przez jeden mol kazeiny). Wyniki prezentuje Ryc. 8.

Pomimo odplukiwania oraz dializy, nie udało się usunąć badanych metali z próbek. Tyczy się to nawet magnezu, który nie prowadził do strącenia się białka. Odwrotnie bar, który prowadził do precypitacji, został związany w najmniejszym stosunku molowym.



Ryc. 8. Wiązanie metali II grupy układu okresowego przez kazeinę.

Na podstawie uzyskanych wyników i wiedzy literaturowej zdecydowano o wykorzystaniu roztworów chlorku wapnia w dalszych doświadczeniach jako medium do kontrolowanej precypitacji kazeiny.

2.1.1.3. Przygotowanie niewypełnionych sfer

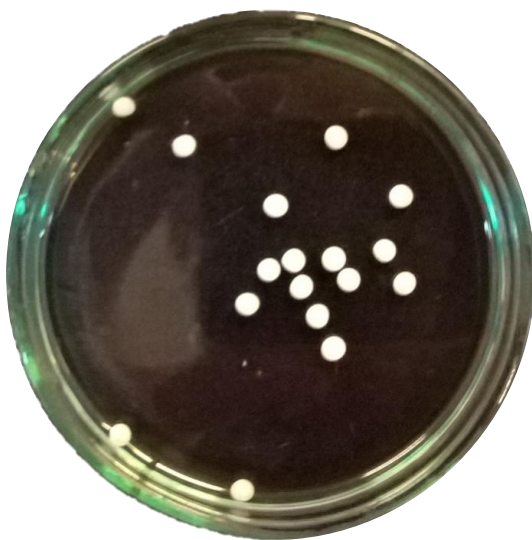
Kolejnym krokiem po określeniu warunków precypitacji było opracowanie metodyki tworzenia nośników kazeinowych. Do badań wykorzystano roztwór kazeinianu sodu o relatywnie wysokim stężeniu – 10% (w/v), który wkrapiano do 1M roztworu CaCl_2 .

Zaobserwowano strącanie się białka w postaci półsfer unoszących się na powierzchni roztworu. Oczekiwano, że dodatek substancji o dużej lepkości i ciężarze właściwym umożliwi strącanie w postaci pełnych sfer. Wstępne optymalizacje pokazały, że dodatek glicerolu pozwala osiągnąć te właściwości.

W procesie wytrącania optymalna okazała się zawartość glicerolu na poziomie 40% (w/v). Wkrapianie roztworu kazeiny z glicerolem do 1M CaCl_2 skutkowało strącaniem się kazeiny w postaci sferycznych precypitatów o średnicy 2-3 mm. Niemniej jednak przeważająca większość uzyskanych w ten sposób sfer wykazywała na swojej powierzchni defekt w postaci półkulistej wnęki lub pęcherzyka.

Badania Lee i wsp. przeprowadzone techniką ultraszybkiego obrazowania rentgenowskiego z kontrastem fazowym pokazały, że uderzenie kropli o twardą powierzchnię prowadzi do zatrzaśnięcia niewielkiej zawartości powietrza w postaci pęcherzyka [198].

Aby ocenić czy powyższe zjawisko odpowiada za powstawanie defektów, przetestowano dodatek substancji obniżających napięcie powierzchniowe roztworu chlorku wapnia. Przetestowano dodatek 1% (w/v) SDS (dodecylosiarczanu sodu) oraz 20% (v/v) etanolu. W obydwu przypadkach przy ocenie wizualnej stwierdzono, że powierzchnie uzyskanych sfer są gładkie, bez widocznych niedoskonałości.



Ryc. 9. Fotografia przedstawiająca uzyskane sfery w roztworze chlorku wapnia w szalce Petriego na czarnym tle.

Ze względu na łatwość usuwania etanolu z próbek, w kolejnych doświadczeniach do strącania kazeiny używano roztworu CaCl_2 zawierającego 20% etanolu.

2.1.1.4. Sterylizacja kazeiny

Badania z udziałem bakteriofagów wymagały stosowania sterylnej aparatury i materiałów, a w tym kazeiny. Jak dotąd problem sterylizacji kazeiny, a nawet produktów mlecznych w proszku, został niewystarczająco opisany w literaturze naukowej. Konieczne było

opracowanie skutecznych metod sterylizacji kazeiny, które spełniałyby wymogi preparatów używanych do kapsułkowania bakteriofagów.

W niniejszej pracy kazeinę poddano działaniu naświetlania promieniowaniem UV-C, ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego oraz łącznemu działaniu wymienionych metod, a także naświetlaniu wiązką przyspieszonych elektronów. Jako metodę referencyjną przyjęto sterylizację w autoklawie.

Skuteczność sterylizacji

Skuteczność sterylizacji badano przez posiew próbek na podłoża mikrobiologiczne i ocenę wzrostu kolonii bakteryjnych po 24 h. Jednak w przeciwieństwie do klasycznych metod, opierających się na ilościowym opisie spadku liczebności mikroorganizmów, w niniejszej pracy zastosowano bardziej rygorystyczne podejście jakościowe – pojawienie się co najmniej jednej kolonii bakteryjnej na pożywce świadczyło o nieskuteczności sterylizacji.

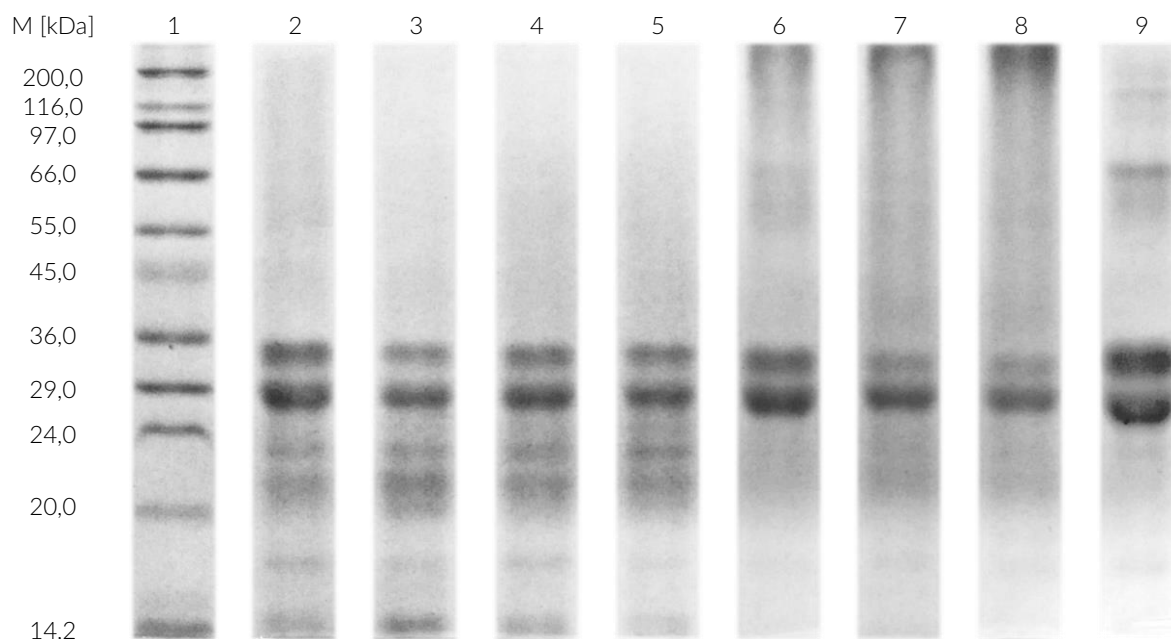
Tab. 4. Wpływ technik sterylizacji na obecność drobnoustrojów w próbkach kazeiny.

Metoda sterylizacji		Obecność żywych mikroorganizmów
Promieniowanie UV-C		+
Obróbka ultradźwiękowa		+
Promieniowanie mikrofalowe		+
Kombinacja metod		+
Ogrzewanie w autoklawie		-
Wiązka elektronowa	2 kGy	+
	5 kGy	+
	10 kGy	-
	25 kGy	-

Spośród przetestowanych podejść wyłącznie ogrzewanie w wilgotnej atmosferze (autoklaw) i naświetlanie wiązką elektronową przy dawce promieniowania ≥ 10 kGy okazały się skutecznie sterylizować kazeinę (Tab. 4). Działanie przegrzanej pary wodnej w autoklawie prowadziło do zauważalnego ciemnienia próbek. Wpływ bombardowania przyspieszonymi elektronami na kazeinę był niezauważalny wzrokowo.

Wpływ na strukturę białka

Aby ocenić wpływ metod sterylizacji, skutecznie hamujących wzrost drobnoustrojów, na parametry białka zastosowano elektroforezę żelową SDS-PAGE. Przebadano w ten sposób próbki naświetlane wiązką elektronową w różnych dawkach oraz próbki sterylizowane w autoklawie w trzech różnych wariantach. W pierwszym wariantcie naważkę kazeiny umieszczono w szklanym naczyniu i przeprowadzono sterylizację w autoklawie, a następnie zawieszono w sterylnym 40% roztworze glicerolu. W wariantcie drugim sterylizacji poddano kazeinę zawieszoną w roztworze glicerolu. Trzeci wariant polegał na sterylizacji kazeiny zawieszanej w wodzie destylowanej i dodaniu sterylnego glicerolu tak, by osiągnąć stężenie 40%.



Ryc. 10. Elektroforegram SDS-PAGE kazeiny poddanej sterylizacji radiacyjnej i przy użyciu autoklawu. **1)** Marker Mas; **2)** kazeina naświetlana dawką 2 kGy; **3)** kazeina naświetlana dawką 5 kGy; **4)** kazeina naświetlana dawką 10 kGy; **5)** kazeina naświetlana dawką 25 kGy; **6)** – kazeina autoklawowana bez cieczy; **7)** kazeina autoklawowana z 40% glicerolem; **8)** – kazeina autoklawowana z wodą destylowaną; **9)** – kazeina niesterylizowana.

Uzyskane wyniki sugerują, że w porównaniu z ogrzewaniem w autoklawie, sterylizacja radiacyjna nie wpływa w znaczący sposób na profil masy cząsteczkowej kazeiny. Co prawda obserwowany jest zanik prążka o masie ~66 kDa i pojawienie się dodatkowych prążków poniżej 24 kDa, lecz nie obserwuje się takich zmian jak na ścieżkach z kazeiną sterylizowaną w autoklawie – cząsteczki o dużej masie molekularnej na szczycie ścieżek oraz charakterystyczne smużenie (Ryc. 10). Peptyd o masie ~66 kDa najprawdopodobniej jest pozostałością jednego z białek serwatki.

Bazując na powyższych wynikach do dalszych badań stosowano próbki naświetlane wiązką elektronów o dawce 10 kGy.

2.1.1.5. Immobilizacja bakteriofaga T4

Opracowanie metod precypitacji, wytwarzania nośników i sterylizacji kazeiny pozwoliło na przeprowadzenie doświadczeń z udziałem bakteriofagów T4. Bakteriofagi namnożono w komórkach bakterii *E. coli* B oraz oczyszczono przez mikrofiltrację i ekstrakcję pozostałości martwych komórek. W tak uzyskanym lizacie oznaczono liczebność bakteriofagów (miano), która wynosiła $6,7 \cdot 10^5$ PFU/cm³.

Pełpawkowanie przeprowadzono stosując procedurę identyczną jak dla niewypełnionych sfer, lecz z wykorzystaniem kazeiny sterylizowanej radiacyjnie oraz z dodatkiem lizatu zawierającego bakteriofagi T4. Procedurę wykonano w dwóch wariantach. W pierwszym oznaczono liczebność bakteriofagów zamkniętych w utworzonych sferach. W wariacie drugim miano oznaczono dla całej zawartości próbki – kapsułek oraz otaczającego roztworu. Ze względu na to, że sfery nie rozpuszczały się w środowisku nieszkodliwym dla bakteriofagów (sól fizjologiczna, bufor SM, ostudzona płynna pożywka), ani bardziej agresywnym środowisku 1M NaOH konieczne było zastosowanie mechanicznej homogenizacji w moździerzu.

Na podstawie tych wyników obliczono wydajność immobilizacji, która wyniosła 82%.

2.1.2. Dyskusja

Zjawisko precypitacji jest często wykorzystywane do zamykania różnorodnych substancji. Korzystając z niego można wytwarzać kapsułki i sfery zawierające czynniki terapeutyczne.

Najdogodniejszą metodą strącania kazeiny jest wykorzystywana na skalę przemysłową precypitacja kwasowa, lecz zastosowanie niskiego pH może być niekorzystne w przypadku kapsułkowania substancji wrażliwych na zmiany pH. Dlatego też w niniejszej pracy zastosowano podejście z udziałem chlorków metali II grupy układu okresowego.

Jak przedstawiono w sekcji „Wyniki”, przy zastosowaniu wysokich stężeń kazeinian sodu ulega strąceniu pod wpływem roztworów chlorków wapnia, strontu i baru. Z kolei eksperymenty innych badaczy z udziałem niskich stężeń jonów wapnia ukazują tworzenie się regionów o większej gęstości w roztworach kazeinianu sodu [37]. Wiadomo, że sole nieorganiczne, w odpowiednich stężeniach, prowadzą do tzw. wysalania, czyli dehydratacji i precypitacji białek odzwierciedlających się w zmianach potencjału zeta [199]. Niemniej jednak przeanalizowany niedawno model teoretyczny sugeruje raczej bezpośrednie oddziaływanie kazeiny z solami niż efekt zaburzenia oddziaływań z wodą [40].

Kazeina w naturalnym stanie wiąże duże ilości wapnia [3], lecz nie musi być to koniecznie powtarzalne w warunkach *in vitro* i nie musi dotyczyć wszystkich metali II grupy układu okresowego. Aby ocenić charakter interakcji kazeinianu sodu z jonami metali II grupy układu okresowego produkty interakcji poddano oczyszczaniu przez dializę, a następnie określono zawartość każdego z metali w uzyskanych próbkach. Jak przedstawiono na Ryc. 8 w każdej z próbek stwierdzono zawartość dodanego metalu. O ile w przypadku Ca, Sr i Ba można by dopatrywać się ich obecności w wyniku fizycznego „zatrzaśnięcia” wewnątrz powstających osadów (i niemożliwości odpłukania), tak przypadek Mg, który nie wywoływał strącenia sugeruje, że należy kierować się w stronę mechanizmu opartego o wiązanie metali.

Przy tym założeniu kazeina najefektywniej wiąże jony wapnia, a najmniej efektywnie jony baru. Jest to o tyle intrygujące, że wizualnie właśnie bar wywoływał najbardziej gwałtowne strącanie się kazeiny. Nawet stront, który wywoływał strącanie mniej gwałtownie od wapnia i baru, a także magnez, który nie powodował nawet zmętnienia, zostały związane w większych ilościach.

Kazeina, w swojej natywnej micelarnej postaci, opisywana jest jako „nierozpuszczalna” część całej puli białek mleka [5]. W tej postaci wiąże duże ilości wapnia, jednakże nie obserwuje się spontanicznej precypitacji tego układu [22]. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że frakcja κ zapewnia stabilizację steryczną i utrzymuje micelle na granicy rozpuszczalności [6]. Potwierdzać to zdaje się obserwacja, że strawienie tej frakcji przy udziale podpuszczki prowadzi do precypitacji kazeiny [15]. Sugeruje to bardzo mocno, że związki poszczególnych frakcji kazeiny z wapniem są nierozpuszczalne w wodzie. Nie można wykluczyć, że inne sole kazeiny, takie jak kazeinian strontu i baru, również nie rozpuszczają się w wodzie. Nie dotyczy to raczej kazeinianu magnezu.

Starsze źródła sugerują, że wapń oraz bar i stront są w stanie sieciować cząsteczki kazein [200, 201]. Co prawda modele budowy miceli kazeinowej, opierające się o takie założenie, okazują się być mało realistyczne [20], ale nie można wykluczyć, że tego typu interakcje mają miejsce w przypadku kazeinianu sodu, który tworzy nieco inne struktury niż micela będąca wynikiem biosyntezy [36].

Kazeiniany nie zostały opisane w literaturze tak dokładnie jak kazeina w stanie micelarnym. Wiadomo, że kazeinian sodu występuje w postaci losowo utworzonych aglomeratów o zdecydowanie mniejszych rozmiarach niż typowa micela [36]. Wobec tego nie można

wykluczyć, że w roztworach kazeinianów frakcja κ jest zbyt rozdyspergowana by zapewniać stabilizację, bez której interakcja z wapniem lub innymi jonami tej grupy prowadzi do precipitacji. Zwłaszcza, że sama frakcja κ jest niewrażliwa na działanie jonów wapnia, podczas gdy pozostałe frakcje wydajnie te jony wiążą [36].

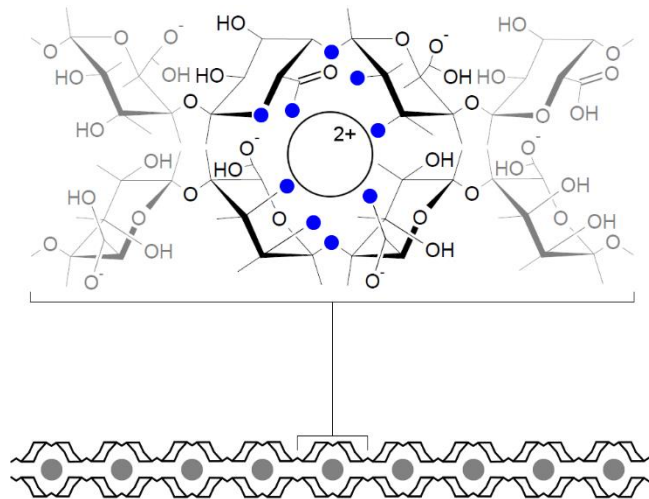
Lopez i wsp. badali precipitację kazeiny pod wpływem ogrzewania w obecności niewielkich stężeń wspomnianych metali w D_2O oraz H_2O . Strącanie zachodziło z różną intensywnością w obydwu środowiskach. [202]. Autorzy ci sugerują, że za strącanie kazeiny w tych badaniach odpowiadają właściwości chaotropowe metali II grupy, czyli ich zdolność do zaburzenia tzw. „struktury” wody (interakcji pomiędzy cząsteczkami wody oraz rozpuszczonych substancji z wodą) zgodnie z teorią, którą zaproponowali Greyson i Snell [203]. Spójnie z tym słabiej hydratowane jony mają silniejszą zdolność do wywoływania precipitacji.

Mogłoby to tłumaczyć również wyniki uzyskane z udziałem wysokich stężeń, które były stosowane w niniejszej pracy – w przypadku wkrapiania roztworu kazeiny do roztworu o dużej zawartości jonów tych metali mogłoby potencjalnie dochodzić do bardzo nagłego zniszczenia warstwy hydratacyjnej białka, co prowadzi do jego aglomeracji oraz precipitacji.

Jony Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , które są traktowane jako te zaburzające strukturę wody [202, 203], wydają się być wiązane przez kazeinę w tym większej ilości im mniejszy jest ich promień jonowy i masa. Magnez nie zaburza tej struktury, więc jego wiązanie może mieć inny charakter. Bardzo ciekawe w tym kontekście mogłyby się okazać badania z udziałem Berylu oraz Radu.

Zjawisko w pewnym stopniu podobne do opisanego powyżej ma miejsce w przypadku kwasu alginowego. Jest to polisacharyd, który ekstrahuje się z glonów należących do gromady Brunatnic. Zbudowany jest z bloków kwasu α -L-guluronowego (jednostka G) i D-mannuronowego (podjednostka M) połączonych wiązaniem β -1,4 glikozydowym. W budowie łańcucha alginianowego wyróżnia się sekwencje zbudowane z samych podjednostek G, samych jednostek M lub bloki MG, a ich rozłożenie zależy od gatunku glona [204–206]. Podobnie jak w przypadku kazeinianów, kwas alginowy jest najczęściej stosowany w formie soli (np. sodu). Interakcje alginianu z jonami metali II grupy układu okresowego opisuje model „wytłoczki na jajka” (ang. *egg-box*). Zgodnie z nim bloki G mogą, przy udziale grup $-COO$ i $C-OH$, chelatować jony wapnia oraz jak niedawno udowodniono – strontu, zamykając je w charakterystycznej strukturze (Ryc. 11) [206]. Strącony chlorkiem wapnia alginian wykorzystywany jest do pułapkowania komórek, enzymów oraz innych cząstek [205, 207, 208].

Pomiędzy opisanym strącaniem kazeiny kationami dwuwartościowymi, a zjawiskiem strącania alginianu można doszukać się niewyraźnej analogii. Co jednak istotne, możliwość strącania kazeinianu sodu chlorkami metali II grupy układu okresowego, w sposób podobny do strącania alginianu, otwiera nowe możliwości na polu kapsułkowania rozmaitych substancji.



Ryc. 11. Graficzna reprezentacja modelu „wytłoczki na jajka” opisującego żelowanie alginianu. Opracowano na podstawie [206]. Na niebiesko zaznaczono grupy zawierające tlen, które prawdopodobnie uczestniczą w chelatacji jonów metali II grupy układu okresowego.

Większość współczesnych prac z użyciem chlorku wapnia i kazeiny wykorzystywały bądź kazeinę w mieszance z alginianem [157, 161], bądź tylko domieszkę kationów dwuwartościowych przy precypitacji kwasowej [209]. Wyjątek mogą stanowić niektóre badania dotyczące nanokapsułkowania, lecz uzyskiwane w nich produkty miały postać dyspersyjnej zawiesiny powstałej przez dodawanie chlorku wapnia do roztworu kazeiny [74, 96, 101].

W niniejszej pracy po raz pierwszy zastosowano chlorek wapnia do przygotowania precypitatów kazeiny według metodyki podobnej do tej stosowanej w przypadku alginianu, lecz bez jego obecności. Zoptymalizowana metoda pozwoliła na uzyskanie gładkich kulistych sfer, które mają potencjał aby stać się nośnikami substancji terapeutycznych. Do demonstracji tego potencjału wybrano kapsułkowanie bakteriofagów.

Parametrem decydującym o przydatności kazeiny jako nośnika bakteriofagów jest jej czystość mikrobiologiczna. Kazeina, w zależności od warunków w jakich jest pozyskiwana, może być zanieczyszczona mikroorganizmami. Co prawda mleko powstające w komórkach wymion jest sterylne, ale może ulegać zanieczyszczeniu w wyniku styczności z powierzchnią ciała zwierząt oraz poprzez kontakt z czynnikami środowiskowymi podczas dojenia, transportu, przechowywania i przetwarzania [210]. Obecność mikroorganizmów w kazeinie może niekorzystnie wpływać na jakość preparatów uzyskiwanych przy jej wykorzystaniu. Tyczy się to zwłaszcza preparatów, które nie są poddawane procesom prowadzącym do usunięcia bądź obniżenia zawartości wody. Dodatkowo mikroorganizmy mogą dawać tło zaburzające wyniki badań aktywności bakteriofagowej.

Bakterie z rodzajów *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Paenisporosarcina* i *Sporosarcina* mogą nie tylko zanieczyszczać mleko, ale ich zdolność do tworzenia przetrwalników daje im ochronę przed pasteryzacją używaną jako główna metoda konserwowania mleka i produktów mlekopochodnych [210]. Przetrwalniki bakterii z rodzaju *Bacillus* izolowano m.in. z koncentratów kazeiny micelarnej i mleka w proszku [211]. Dlatego też ważnym zagadnieniem niniejszej pracy było opracowanie metod sterylizacji oraz ocena ich skuteczności i wpływu na kazeinę.

Podstawową metodą stosowaną w praktyce laboratoryjnej i medycznej jest sterylizacja w autoklawie. Metoda ta opiera się na ogrzewaniu parą wodną o temp. 121 °C pod zwiększonym ciśnieniem. Mimo, że metoda ta okazała się skuteczna do sterylizacji kazeiny, to działanie przegrzanej pary wodnej prowadziło do zauważalnego ciemnienia próbek. Na obrazie

elektroforetycznym próbek sterylizowanych tą metodą widoczne są zmiany uwzględniające cząsteczki o dużej masie molekularnej na szczycie ścieżek oraz charakterystyczne smużenie (Ryc. 10). Wynik taki jest najprawdopodobniej efektem powstawania agregatów białkowych o szerokim rozkładzie mas, które migrują w żelu z różną prędkością tworząc smugę lub mają na tyle dużą masę cząsteczkową, że pozostają na szczycie żelu. Nawet zastosowanie dodatku glicerolu podczas sterylizacji nie było w stanie ograniczyć negatywnych skutków ubocznych. Autoklawowanie może potencjalnie prowadzić do reakcji ubocznych białek [212], wśród których nie można wykluczyć agregacji spowodowanej szokiem cieplnym czy w wyniku przegrupowania Amadoriego reakcji Maillarda z udziałem laktozy (której pozostałości mogą znajdować się w kazeinie).

Spośród mniej inwazyjnych metod sterylizacji, które wykazują ograniczoną skuteczność wobec przetrwalników bakteryjnych, można wymienić naświetlanie promieniowaniem UV-C [213], działanie ultradźwięków [214], czy promieniowanie mikrofalowe [215]. W niniejszej pracy wymienione metody również zostały przetestowane lecz ich skuteczność okazała się niewystarczająca (Tab. 4). Jedną z przyczyn było zastosowanie bardziej rygorystycznego oznaczenia jakościowego w przeciwieństwie do ilościowego opisu stosowanego przez innych autorów opisujących wpływ wyżej wymienionych metod na mikroorganizmy. Warto zauważyć, że nieskuteczność sterylizacji światłem UV może wynikać z absorpcji przez niektóre aminokwasy obecne w białku [216].

Obiecujące wyniki uzyskano w przypadku naświetlania kazeiny wiązką elektronową, które pod względem eliminacji zanieczyszczenia mikrobiologicznego okazało się równie skutecznie co referencyjna metoda sterylizacji w autoklawie.

Wiadomo, że metody radiacyjne są stosowane do sieciowania polimerów syntetycznych, w tym poliamidów [217], więc istnieje ryzyko, że naświetlanie może prowadzić do sieciowania również naturalnego poliamidu jakim jest kazeina. Niemniej jednak wpływ przyspieszonych elektronów na kazeinę był niezauważalny niezbrojonym okiem. Dodatkowo analizując wyniki elektroforezy, można stwierdzić, że sterylizacja wiązką elektronów nie prowadzi do znacznych różnic w masie cząsteczkowej kazeiny bez względu na zastosowaną dawkę promieniowania. Pozwala to wnioskować, że nie wywołuje istotnych zmian budowy chemicznej tego białka.

Kazeina była wielokrotnie stosowana do kompleksowania i kapsułkowania szeregu substancji. Użyto jej nawet do pułapkowania i kapsułkowania komórek bateryjnych [168–173]. Autorzy tych prac nie informowali jednak o czystości mikrobiologicznej używanej kazeiny, ani o przeprowadzeniu sterylizacji. Można więc zakładać, że niniejsza praca jest jedyną uwzględniającą to ważne zagadnienie.

Do kolejnego etapu badań, czyli badań nad immobilizacją bakteriofagów w nośnikach kazeinowych, zastosowano kazeinę sterylizowaną radiacyjnie. Zoptymalizowana metodyka wytwarzania sfer pozwoliła na zamknięcie bakteriofagów z wydajnością na poziomie 81,93%. Badania dotyczące uwalniania czy skuteczności terapeutycznej takich preparatów nie były celem badań ponieważ wykraczają poza dziedzinę chemii. Jednakże nierozpuszczalność sfer w zastosowanych mediach (sól fizjologiczna, bufor SM, ostudzona płynna pożywka, 1M NaOH), może świadczyć o pewnej stabilności tych układów.

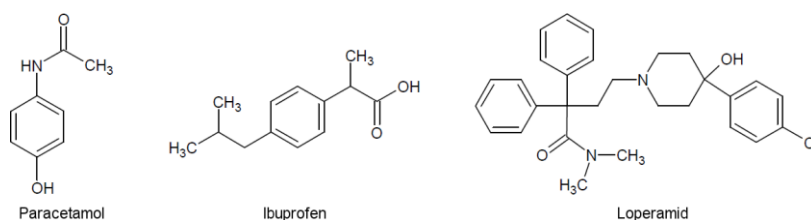
W badaniach dotyczących kapsułkowania bakteriofagów wielokrotnie stosowane były polimery pochodzenia naturalnego, w tym alginian i białka serwatki [194, 218–220]. Nie stosowano natomiast jak dotąd nośników na bazie kazeiny.

2.2. WIĄZANIE ZWIĄZKÓW NISKOCZĄSTECzkOWYCH Z KAZEINĄ

W wiązanie kazeiny ze związkami o małej masie cząsteczkowej zaangażowane mogą być różne mechanizmy molekularne. Wymienić należy wiązania wodorowe, jonowe, siły van der Waalsa i coraz lepiej poznawane oddziaływania π [221]. Kluczowymi parametrami są również kształt i wielkość krypt w porowatych micelach kazeinowych [21]. W przypadku białek funkcjonalnych (enzymy, przeciwciała itp.) miejsce wiązania jest precyzyjnie określone, podczas gdy w przypadku kazeiny nieposiadającej zdefiniowanych struktur wyższego rzędu [3] może istnieć duża dowolność. Dzięki ograniczonej wybiórczości wiązany może być szeroki panel związków nisko- i wysokocząsteczkowych, co z punktu widzenia niniejszej rozprawy doktorskiej, jest cechą korzystną.

Kompleksowanie leków z nośnikami jest istotnym zagadnieniem współczesnej chemii, farmacji i biotechnologii. Blisko połowa dopuszczonych do użytku leków i przeważająca większość nowo opracowanych wykazuje niską rozpuszczalność w środowisku wodnym. Aby rozwiązać ten problem technologiczny stosuje się różnorodne metody solubilizacji. Wyróżnić można te które wpływają bezpośrednio na substancję terapeutyczną takie jak m.in. zmiany pH, przekształcenie do postaci soli, amorfizację czy mikronizację oraz takie, które opierają się na zastosowaniu substancji pomocniczych stanowiących nośnik leku [222]. Wobec nośników takich stawiane są wielorakie oczekiwania: od zdolności do zabezpieczenia i stabilizowania leku, przez nietoksyczność i biokompatybilność, aż po uwalnianie substancji czynnej w określonym miejscu z zachowaniem odpowiedniej kinetyki [223, 224].

Kazeina wykazuje naturalne powinowactwo do substancji hydrofobowych. Stanowiło to inspirację do przetestowania zdolności kazeiny do interakcji z lekami. Do badań wykorzystano związki chemiczne jakimi są popularne leki: paracetamol, ibuprofen i loperamid (Ryc. 12). Wszystkie trzy substancje charakteryzują się niską rozpuszczalnością w wodzie.



Ryc. 12. Wzory chemiczne leków kompleksowanych z kazeiną.
Opracowano na podstawie [226, 229, 230].

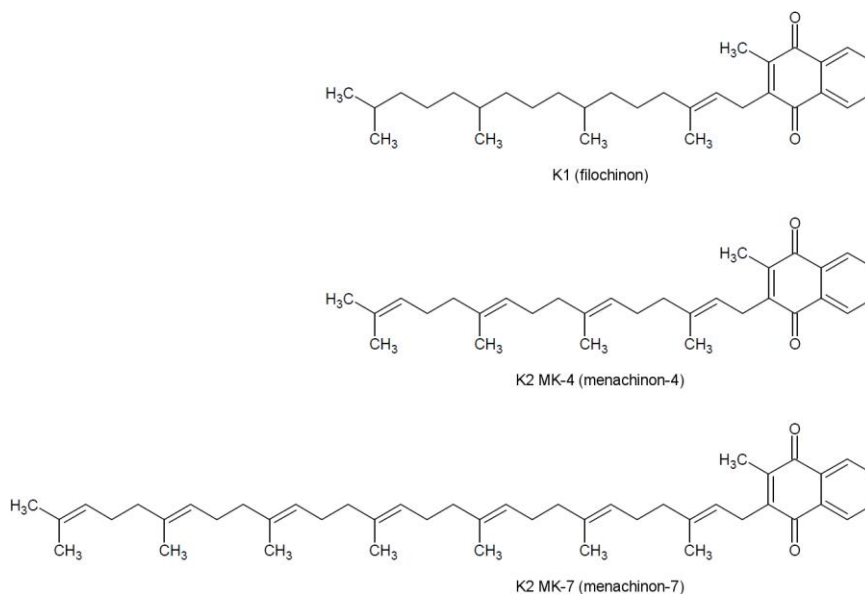
Paracetamol (acetaminofen) jest jedynym obecnie stosowanym anilinowym lekiem przeciwbólowym. Jest aktywnym metabolitem fenacetyny. Ta z kolei jest pochodną acetanilidu, od którego, przez zrządzenie losu, zaczęła się historia tej grupy leków przeciwbólowych. Co ciekawe dokładny mechanizm działania paracetamolu nie jest do końca poznany, a coraz więcej badań wskazuje na toksyczność tego leku [225–227]. Mimo to jest wciąż szeroko stosowany.

Ibuprofen jest pochodną kwasu propionowego o właściwościach przeciwzapalnych, przeciwbólowych i przeciwgorączkowych. Jest jednym z niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Po raz pierwszy zsyntezowany został jako alternatywa dla kwasu acetylosalicylowego (aspiryny) [228, 229]. Od kwasu propionowego odróżnia go grupa 4-(2-metylopropylo)fenylowa podstawiona w pozycji 2.

Loperamid jest syntetycznym opioidem o działaniu przeciwbiegunkowym (w małych dawkach; duże dawki mogą wywoływać efekty narkotyczne). Jest to pochodna piperydyny o budowie zbliżonej do petydyny oraz innych leków przeciwbiegunkowych, takich jak difenoksylat i difenoksyna [230].

Problem rozpuszczalności w wodzie, w równym stopniu co leków, dotyczy także grupy witamin „tłuszczowych” – A, D, E i K. W niniejszej pracy skupiono się na ostatniej z nich.

Witamina K to zbiorcza nazwa grupy aktywnych biologicznie lipofilowych związków chemicznych. Witamina ta występuje w zasadniczo dwóch izoformach – K1 i K2. Wszystkie witaminy K zwierają w swojej budowie 2-metylo-1,4-naftochinon (menadion), ale różnią się między sobą długością i stopniem nasycenia łańcucha poli(izoprenoidowego) przyłączonego w pozycji 3 (Ryc. 13) [231].



Ryc. 13. Wzory chemiczne najpopularniejszych związków z grupy witamin K. Opracowano na podstawie [231].

Witamina K1, czyli fillochinon (także fitomenadion, fitonadion), jest naturalnie produkowana w roślinach. Ze względu na swój udział w fotosyntezie w największych ilościach spotyka się ją w zielonych częściach warzyw [231, 232].

Witamina K2 ma wiele podtypów różniących się długością łańcucha izoprenowego. Takie homologi witaminy K2, zwane menachinonami, produkowane są przez mikroorganizmy. Menachinony nazywa się korzystając ze skrótu „MK-n”, gdzie „M” oznacza menachinon, „K” – witaminę, a „n” liczbę reszt bocznych w łańcuchu izoprenoidowym [231, 232]. Najczęstszymi podtypami są MK-4 i MK-7 (Ryc. 13). Witamina K2 MK-7 jest bardziej lipofilowa zarówno od K2 MK-4 jak i K1 [232].

Witamina K u ludzi i innych zwierząt bierze udział w m.in. budowaniu kości i zapobieganiu zwapnienia naczyń krwionośnych [231, 232]. W zredukowanej formie stanowi ważny kofaktor, biorący udział w aktywowaniu czynników krzepliwości II, VII, IX, X oraz białek antykoagulacyjnych C i S [233]. Ze względu na to, że organizm człowieka w pierwszej kolejności zużywa witaminę K w procesach związanych z krzepliwością, to jej częściowe niedobory zwiększają ryzyko wystąpienia innych chorób jak osteoporoza, miażdżyca i nowotwory. Początkowo uważano, że biologiczna funkcja witaminy K związana jest wyłącznie z krzepliwością. Obecnie wiadomo, że bierze ona także udział w biosyntezie innych istotnych białek. Dlatego też niektórzy postulują zwiększenie zalecanej dawki witaminy K w diecie [234].

Niedawne badania wskazują na problemy dotyczące jakości oraz zawartości witaminy K w dostępnych komercyjnie suplementach diety [235]. Ze względu na niestabilność witaminy K w czasie przechowywania oraz niską skuteczność stosowanych stabilizatorów podjęto się próby opracowania metody stabilizacji witaminy K z wykorzystaniem kazeiny.

2.2.1. Wyniki

2.2.1.1. Zastosowanie kazeiny w kompleksowaniu wybranych leków

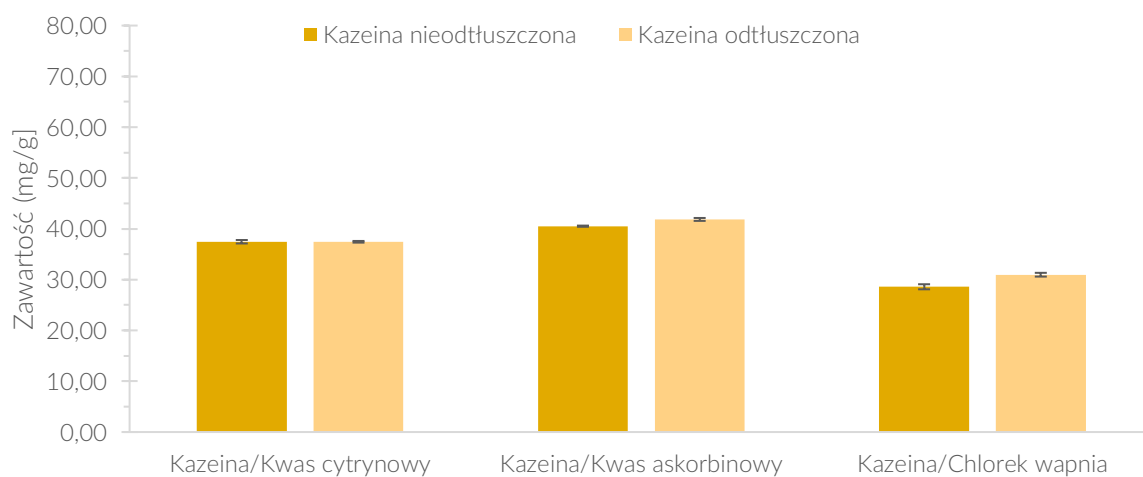
Ze względu na obecność tłuszczów w preparatach kazeiny, aby ocenić jakie będą różnice w oddziaływaniu z lekami, badania prowadzono z udziałem kazeiny nieodtłuszczonej i odtłuszczonej. Procedura przygotowania roztworów leków i kazeiny była identyczna dla wariantu odtłuszczonego i nieodtłuszczonego. Kompleksowanie kazeiny z modelowymi lekami prowadzono przez wkrapianie etanolowych roztworów leków do roztworów kazeiny. Proporcje dobierano tak, aby w mieszaninie z kazeiną uzyskać zawartości ibuprofenu i paracetamolu podobne do tych stosowanych terapeutycznie – 400 mg/g dla ibuprofenu i 500 mg/g dla paracetamolu. Z racji tego, że stosowane dawki loperamidu są niskie (rzędu 2 mg/tabletkę), celowo zastosowano proporcje znacznie wyższe niż te stosowane terapeutycznie (100 mg/g) aby móc lepiej określić skuteczność kompleksowania przez kazeinę. W dalszym etapie usunięcie etanolu pod próżnią wymuszało interakcje z hydrofobowymi regionami kazeiny. Ostatnim etapem procedury było wytrącenie preparatu z użyciem kwasu askorbinowego lub cytrynowego albo chlorku wapnia. Precypitaty wysuszono stosując liofilizację. Zawartość substancji badanych określono stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Podczas wkrapiania leków obserwowano niewielkie, lecz wyraźne zmętnienie próbek, co może być spowodowane częściową precypitacją modelowych leków w wodno-etanolowym środowisku, które nie stanowi dla nich tak dogodnego rozpuszczalnika jak nierozcieńczony etanol.

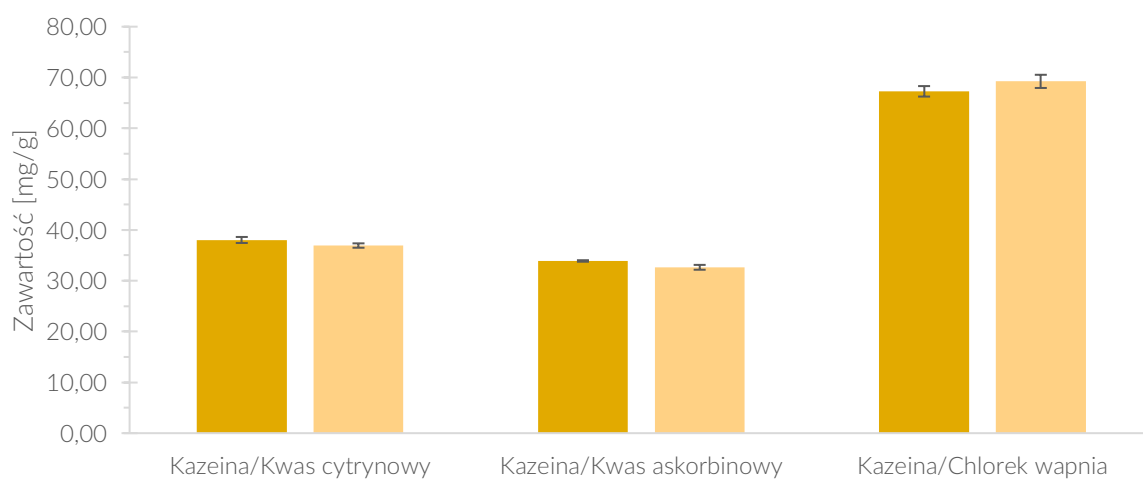
Wyniki dotyczące zawartości leków, ze względu na pracę z preparatem farmaceutycznym wyrażono w mg badanego leku na 1 g mieszaniny z kazeiną (Ryc. 14). Masowa zawartość substancji czynnej w preparacie nie zawsze jest wartością arbitralną, więc wyniki przeliczono także na stosunek molowy danego leku do kazeiny – ilość moli leku, która wiązana jest przez jeden mol kazeiny (Ryc. 15).

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że zastosowana metoda pozwala na skuteczne kompleksowanie kazeiny z paracetamolem, ibuprofenem i loperamidem jako że każdy z leków był obecny w preparatach. Oddziaływania mogły mieć charakter chemiczny, fizykochemiczny lub mechaniczny. Badane substancje zostały skompleksowane przez kazeinę w różnych ilościach. Zawartości leków w preparatach przygotowanych z użyciem kazeiny odtłuszczonej są na podobnym poziomie co w preparatach na bazie kazeiny nieodtłuszczonej. Preparaty strącane kwasem askorbinowym i kwasem cytrynowym wykazują zawartość leków na podobnym poziomie, lecz jest ona inna w preparatach strącanych CaCl_2 .

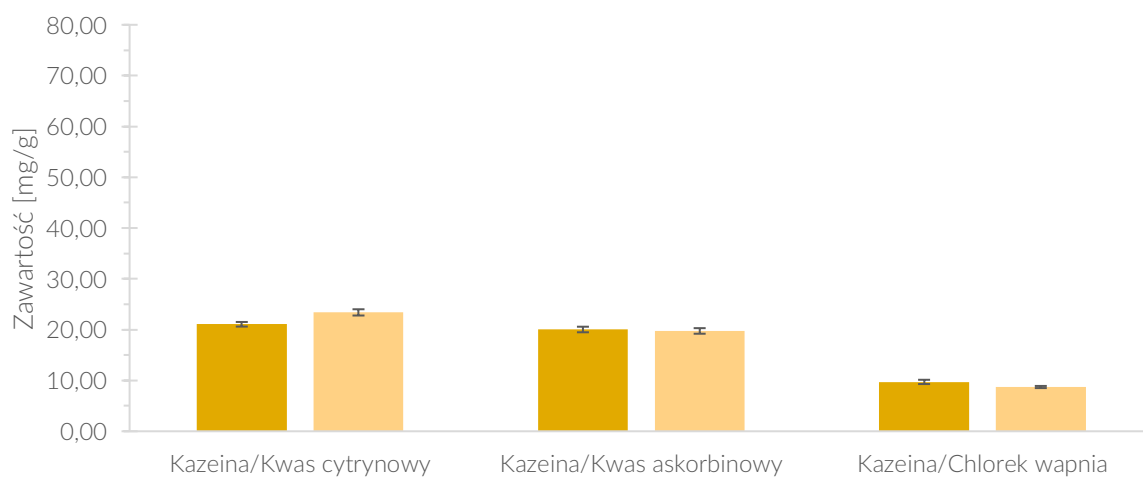
Ibuprofen



Loperamid

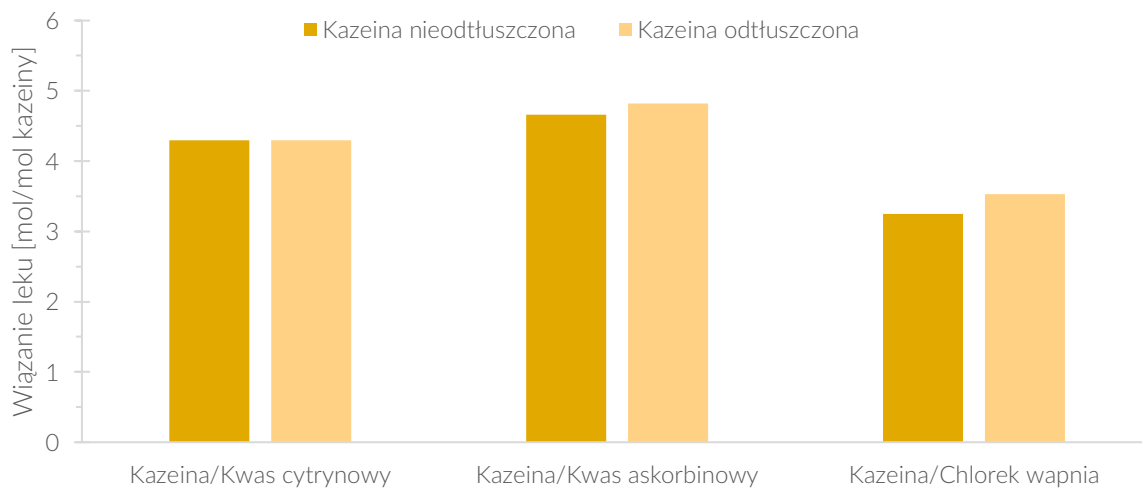


Paracetamol

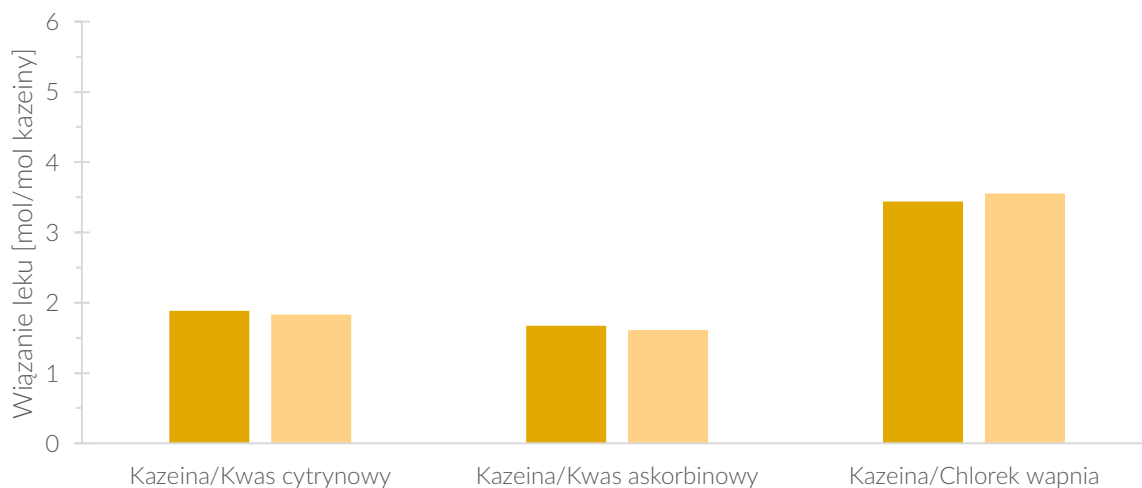


Ryc. 14. Ilość badanych leków skompleksowanych przez kazeinę. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe.

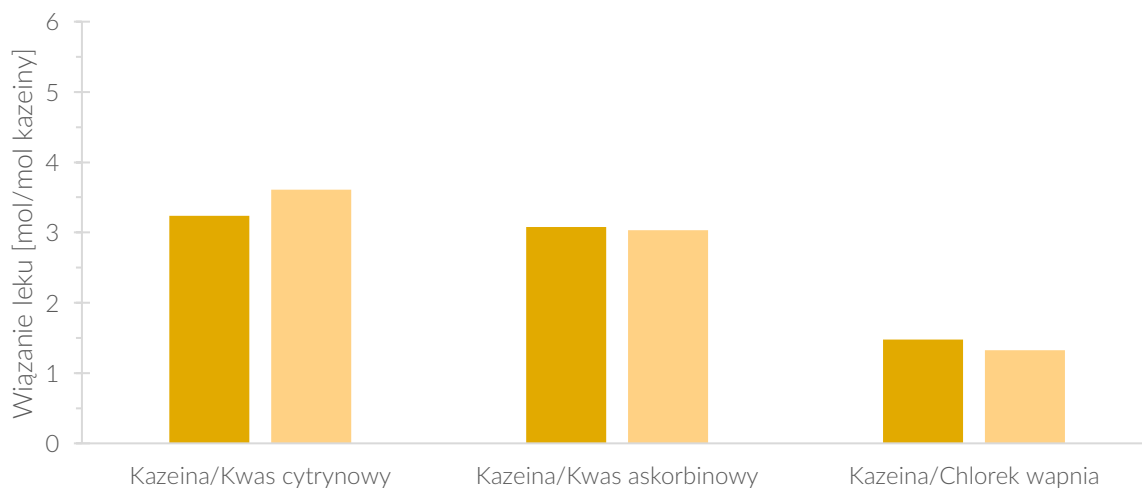
Ibuprofen



Loperamid



Paracetamol



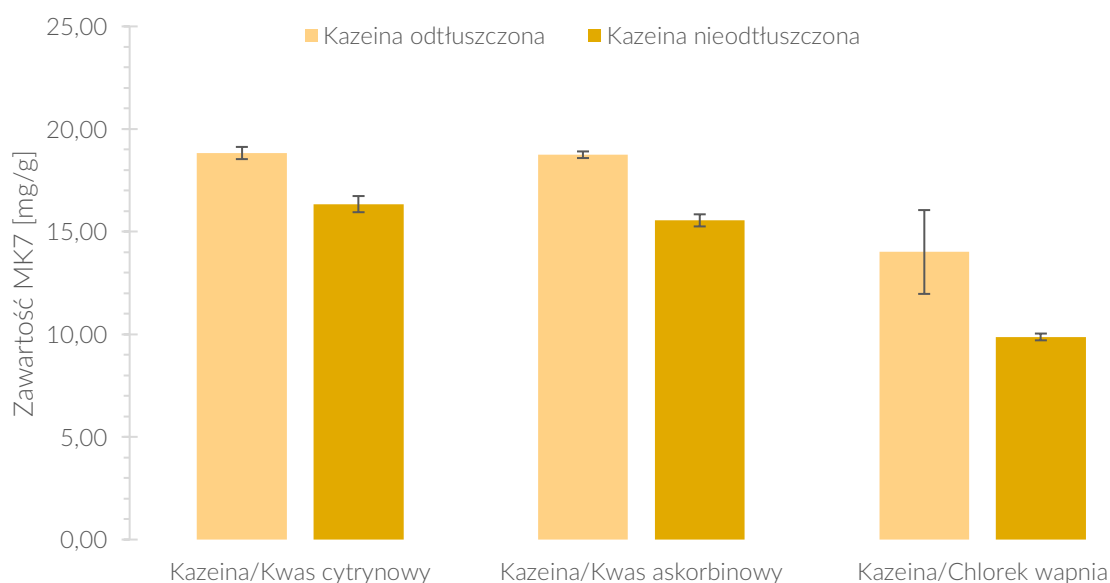
Ryc. 15. Wiązanie leków przez kazeinę.

2.2.1.2. Zastosowanie kazeiny w kompleksowaniu witaminy K

Do stabilizowania witaminy K zastosowano modyfikacje metody opracowanej przy udziale modelowych leków. Podobnie jak poprzednio badania nad kompleksowaniem witaminy K prowadzono stosując dwa warianty kazeiny – nieodtłuszczoną i odtłuszczoną. Kompleksowanie kazeiny z witaminą MK-7 prowadzono przez wkrapianie izopropanolowego roztworu MK-7 do wodnego roztworu kazeiny. W dalszym etapie odparowano alkohol pod próżnią w celu pozabawienia badanej substancji dogodnego rozpuszczalnika i ułatwienie w ten sposób interakcji z hydrofobowymi regionami kazeiny. Na koniec preparaty wytrącono przy użyciu kwasu askorbinowego, cytrynowego i chlorku wapnia oraz wysuszono poprzez liofilizację.

Wydajność kompleksowania

Zamysłem badania było wyznaczenie zawartości witaminy MK-7 w otrzymanych preparatach. W tym celu posłużono się chromatografią HPLC. Wyniki wyrażono w mg witaminy MK-7 w 1 g mieszaniny z kazeiną (Ryc. 16).



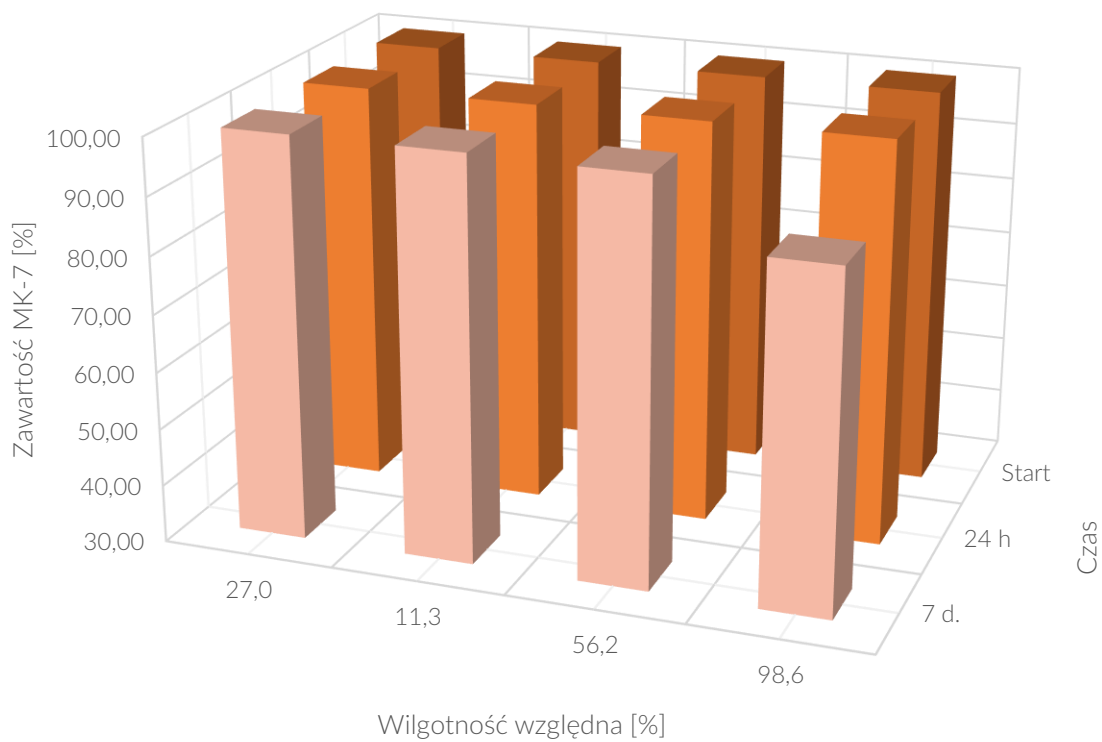
Ryc. 16. Zawartość witaminy K₂ MK-7 skompleksowanej w preparatach przygotowanych z udziałem różnych wariantów kazeiny oraz precipitantów. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe.

W przeciwieństwie do wyników dotyczących kompleksowania leków w przypadku kompleksów kazeiny z witaminą K₂ MK-7 wyraźnie widać większą zawartość substancji w preparatach na bazie odtłuszczonej kazeiny. Podobnie jak w przypadku leków zawartości witaminy K₂ MK-7 w preparatach strąconych kwasami są zbliżone do siebie i przewyższają te uzyskane dla chlorku wapnia.

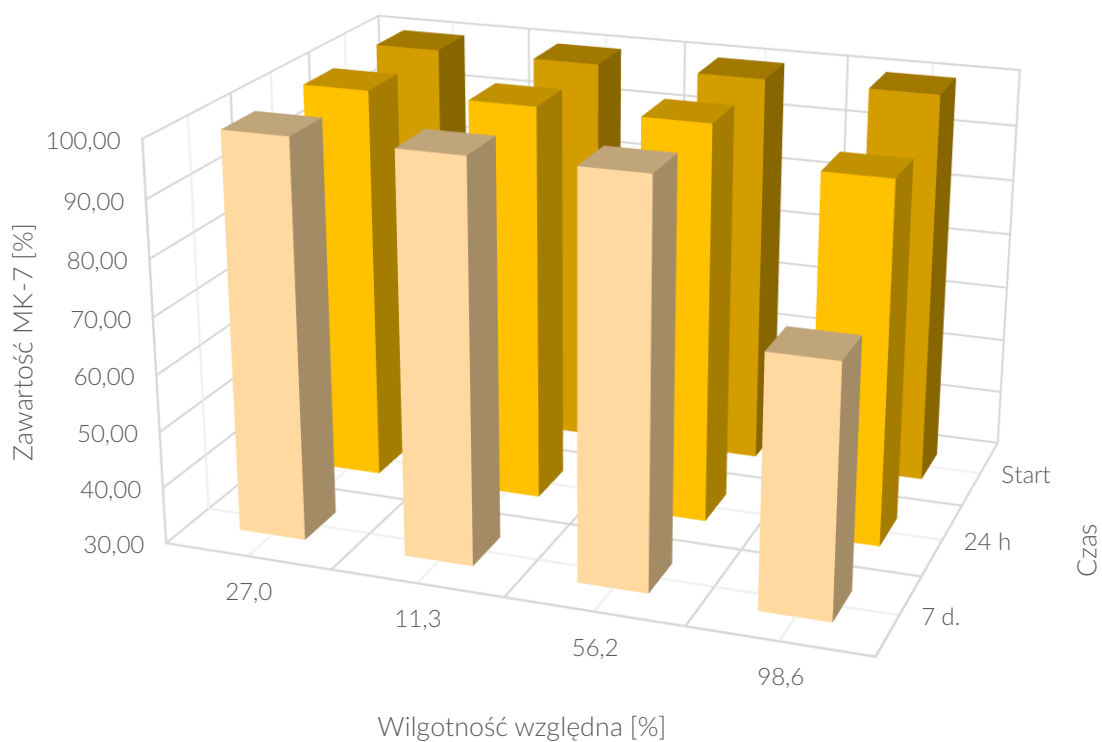
Wyznaczanie stabilności preparatów

Próbki preparatów kazeinowych przechowywano w temperaturze pokojowej i przy różnej wilgotności względnej powietrza (2%, 11%, 56% i 98%) przez 24 h i 7 dni. Po tym czasie zmierzono zawartość witaminy K w próbkach i wyrażono jako procent wartości zmierzonej na początku eksperymentu – odzysk. Wyniki przedstawiono na Ryc. 17-Ryc. 19.

Kazeina nieodtłuszczzona

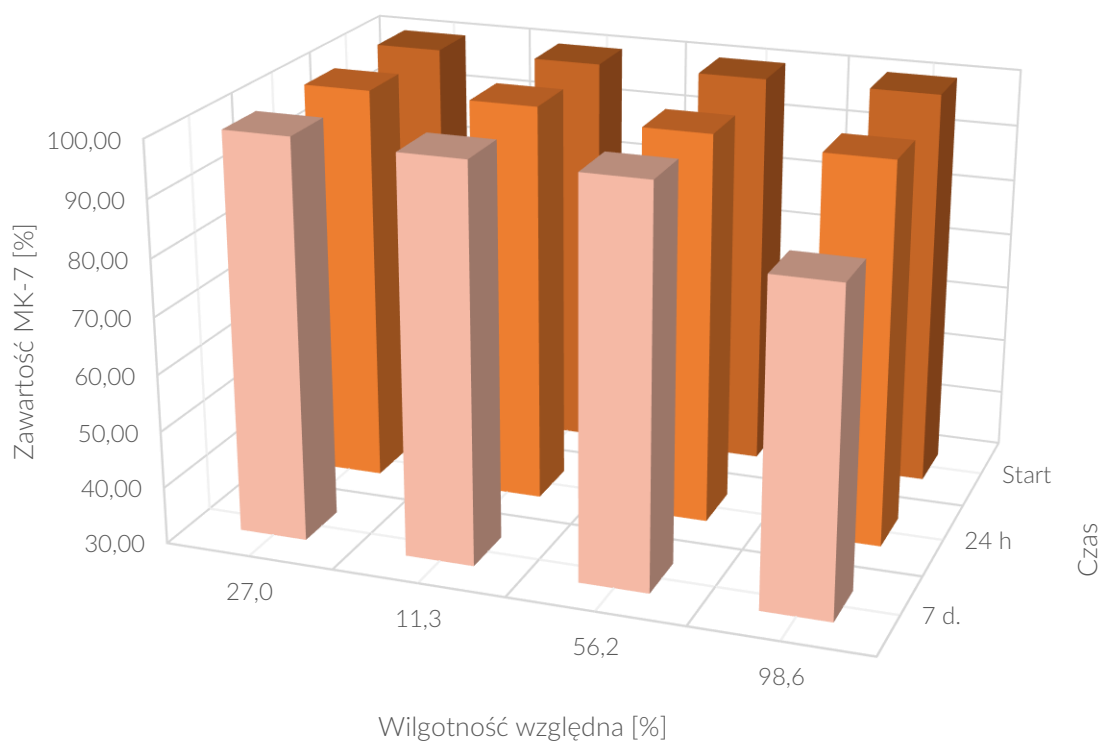


Kazeina odtłuszczzona

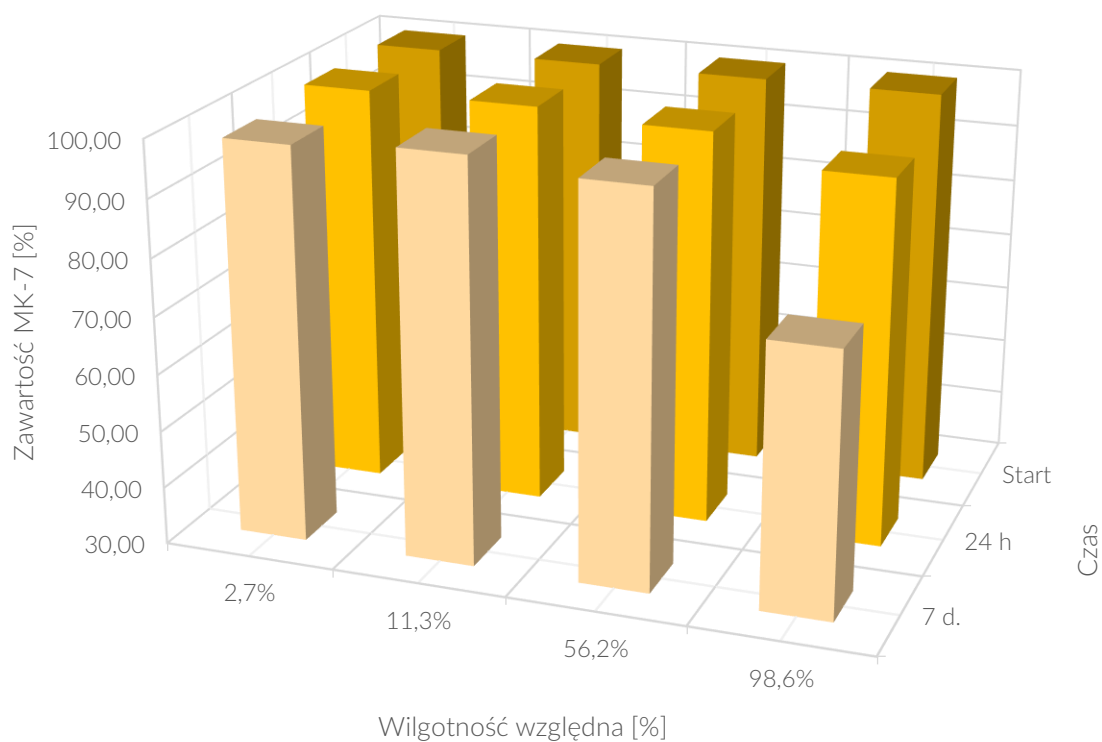


Ryc. 17. Odzysk witaminy MK-7 po 24 h i 7 dniach przy różnej wilgotności powietrza dla próbek strączanych kwasem cytrynowym.

Kazeina nieodtłuszczzona

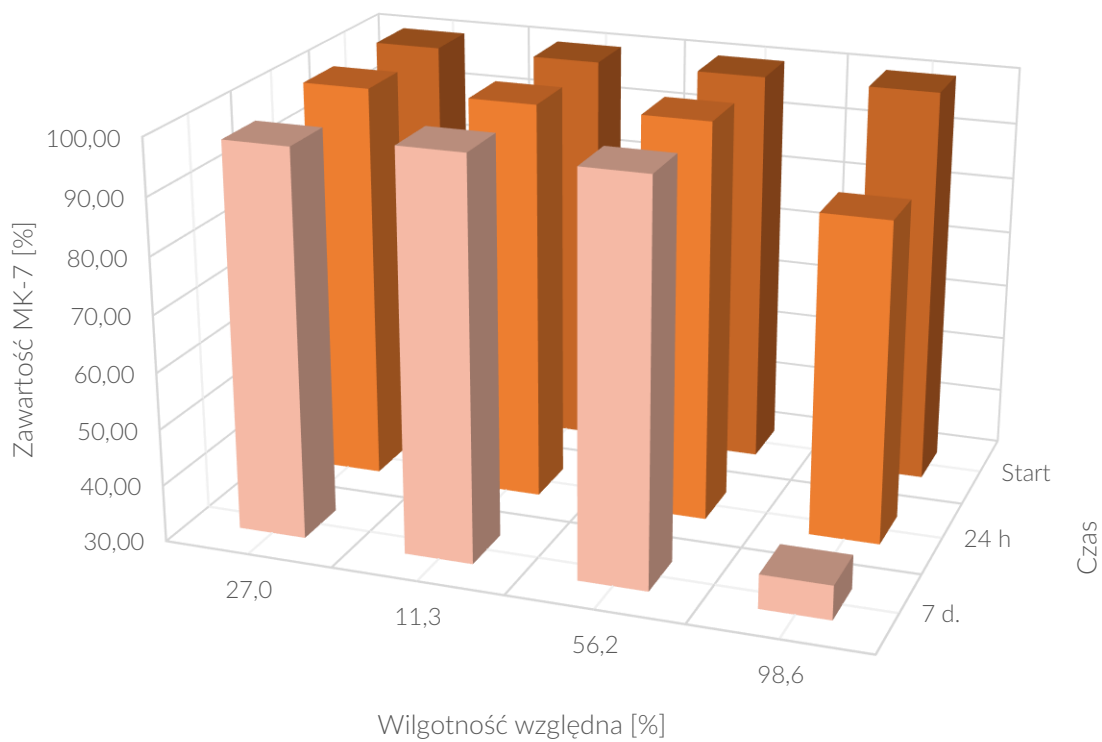


Kazeina odtłuszczzona

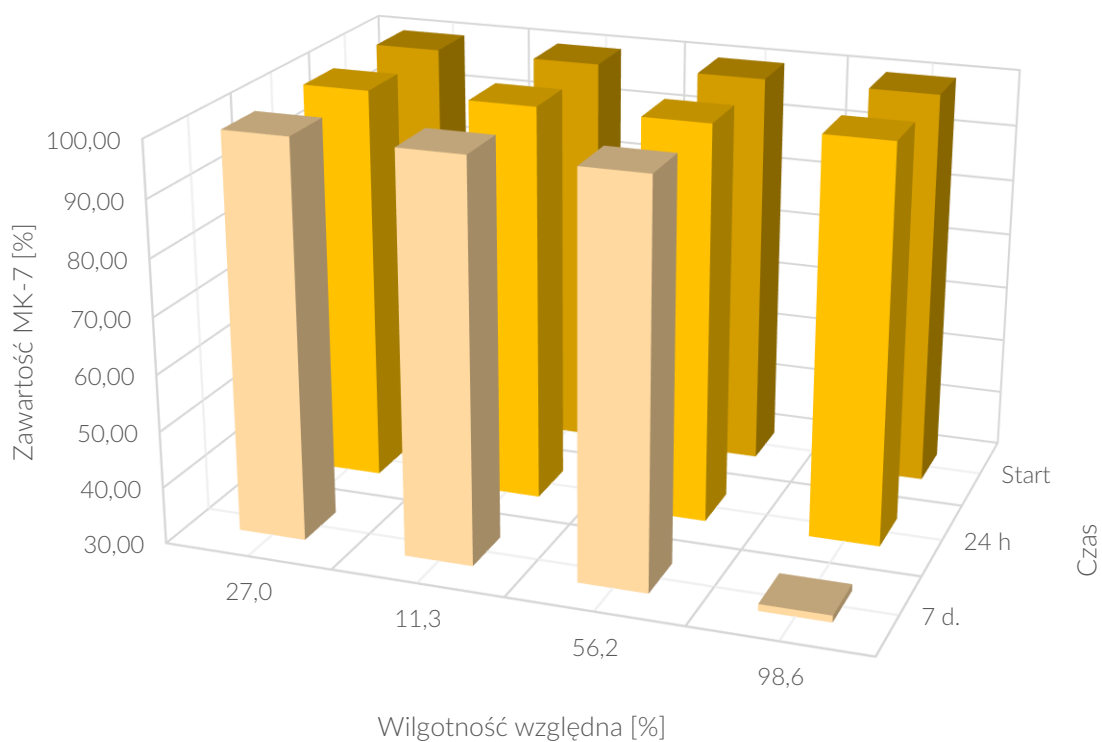


Ryc. 18. Odzysk witaminy MK-7 po 24 h i 7 dniach przy różnej wilgotności powietrza dla próbek strączanych kwasem askorbinowym.

Kazeina nieodtłuszczzona



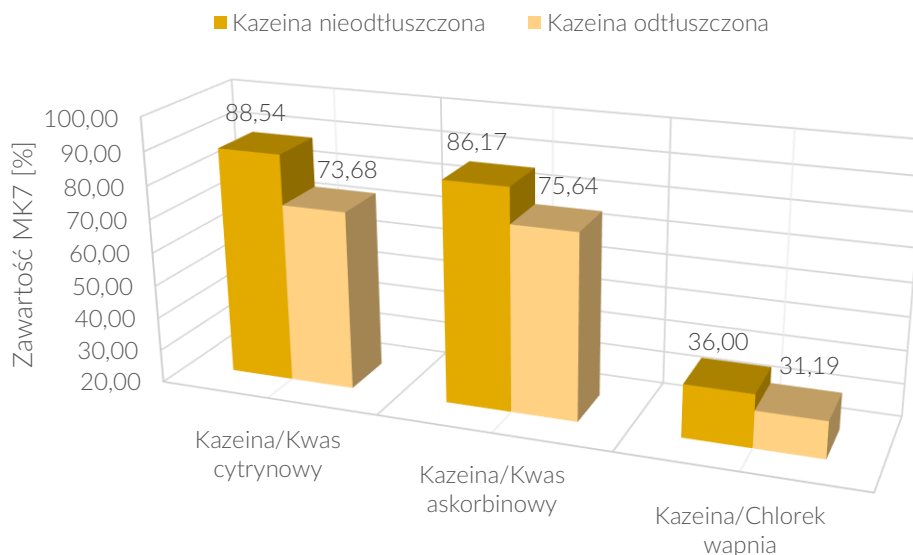
Kazeina odtłuszczzona



Ryc. 19. Odzysk witaminy MK-7 po 24 h i 7 dniach przy różnej wilgotności powietrza dla próbek strączanych chlorkiem wapnia.

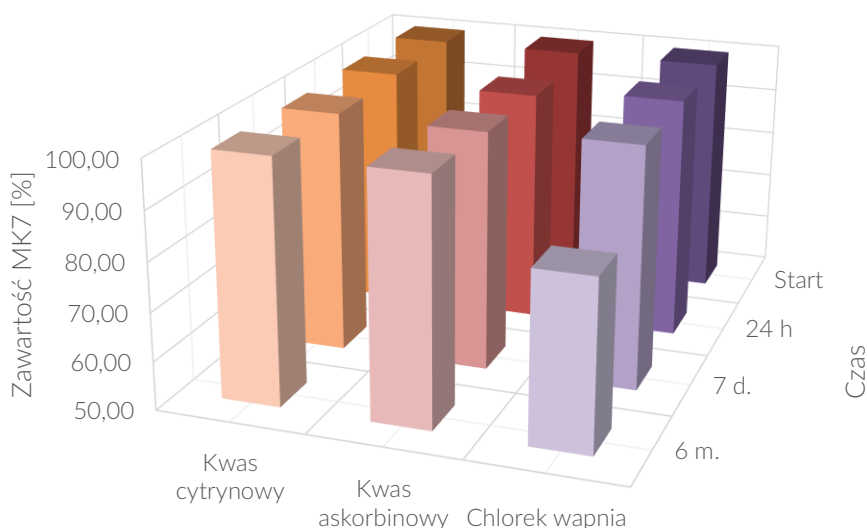
Przedstawione wyniki potwierdzają, że wszystkie uzyskane preparaty zachowują stabilność przez tydzień nawet przy 56,2% wilgotności powietrza bez wyraźnych różnic pomiędzy preparatami.

Dopiero w drastycznych warunkach przy 98,6% wilgotności powietrza ujawniają się różnice (wyniki wyodrębniono i zestawiono na Ryc. 20). Po 7 dniach w tych warunkach zauważalny jest wyraźny spadek zawartości witaminy K. Jest to widoczne zwłaszcza w preparatach wytrącanych chlorkiem wapnia. Co ciekawe preparaty przygotowane na bazie odtłuszczonego białka, pomimo większej zawartości witaminy K na początku eksperymentu, wykazują także największy spadek zawartości MK-7 w czasie.



Ryc. 20. Odzysk witaminy MK-7 po 7 dniach przechowywania w warunkach wysokiej wilgotności względnej powietrza 98,6%. Wyniki wyrażono jako procent zawartości witaminy K2 MK-7 w stosunku do początku eksperymentu.

Przeprowadzono także badania stabilności preparatów podczas przechowywania w warunkach względnej wilgotności 40-60% przez 6 miesięcy (Ryc. 21). Ze względu na wyraźnie negatywny wpływ odtłuszczenia zbadano wyłącznie próbki nieodtłuszczone.



Ryc. 21. Stabilność preparatów kazeinowych zawierających witaminę KM-7 po 6 miesiącach przechowywania w warunkach wilgotności powietrza na poziomie 40-60%.

Podobnie jak poprzednio wyłącznie próbka przygotowana z udziałem chlorku wapnia wykazywała spadek zawartości MK-7. Pozostałe próbki nie wykazywały zmian.

2.2.2. Dyskusja

W badaniach wykorzystano dostępne preparaty farmaceutyczne, które spełniały w założeniu charakter modelowych związków chemicznych. Różniły się od siebie budową chemiczną i działaniem, lecz miały wspólną cechę jaką jest niska rozpuszczalność w wodzie. Ibuprofen i paracetamol występowały w swojej postaci podstawowej, podczas gdy loperamid miał postać chlorowodoru loperamidu. Wszystkie substancje miały formę proszku.

Uzyskane w preparatach zawartości paracetamolu i ibuprofenu są ponad dziesięciokrotnie mniejsze niż dawki stosowane terapeutycznie (Ryc. 14). Z jednej strony może to budzić wątpliwości dotyczące skuteczności kompleksowania leków przez kazeinę, lecz z drugiej strony należy pamiętać, że dawki terapeutyczne paracetamolu czy ibuprofenu są wyjątkowo wysokie – wynoszą po ok 0,5 g/tabletkę.

Niska zawartość paracetamolu w precypitatach uzyskanych w niniejszej pracy może wynikać z rozpuszczalności paracetamolu w wodzie wynoszącej 14,90 g/kg [236]. Badania wykonywano w na tyle niskich stężeniach paracetamolu, że część tego leku mogła pozostać w wodnym środowisku na zewnątrz preparatów.

Marreto i wsp. także donoszą o niskiej efektywności kapsułkowania paracetamolu w preparatach na bazie kazeiny. Mimo, że przygotowane przez autorów koacerwaty kazeinowo-pektynowe pozwalały zamykać paracetamol, to jednak preparat ten charakteryzował się gwałtownym uwalnianiem. Zjawisko to również przypisano dosyć wysokiej rozpuszczalności paracetamolu w wodzie [156].

W innej publikacji kapsułkowano paracetamol w sferach kazeinowych uzyskanych przez strącanie 1 M HCl z 5% dodatkiem jonów wapnia, cynku lub żelaza III. Zdaniem autorów jony tych metali prowadziły do sieciowania kazeiny. Uzyskane preparaty charakteryzowały się skutecznością kapsułkowania na poziomie 55-76%. Biorąc pod uwagę nawet fakt, że zastosowano mniejsze proporcje leku do kazeiny (1:2) niż w niniejszej rozprawie doktorskiej (1:1), to efektywność kapsułkowania była ok. dziesięciokrotnie większa [209]. Często kluczowe okazują się techniczne parametry mieszania reagentów: sposób dozowania, warunki, temperatura itd. Nie można wykluczyć, że uzyskiwanie sfer przez wkrapianie do precypitantu (zamiast na odwrót) pozwala mechanicznie „zatrzasnąć” lek nawet jeśli nie jest on związany z kazeiną.

Podobnie do paracetamolu, w niniejszej pracy ibuprofen został związany w ilościach kilkukrotnie niższych niż stosowana dawka terapeutyczna (Ryc. 14). Rozpuszczalność ibuprofenu w wodzie jest znacznie niższa niż paracetamolu [228, 236], więc nie może to jednoznacznie tłumaczyć niskiej wydajności wiązania przez preparaty kazeinowe. Zwłaszcza, że biorąc pod uwagę stosunek molowy leku do kazeiny, został on związany w ilości największej (Ryc. 15).

Turovsky i wsp. również użyli ibuprofenu jako leku modelowego. Miał on zostać zamknięty wewnątrz miceli utworzonych z udziałem β frakcji kazeiny, lecz wyniki badań sugerują, że lokalizował się on raczej na granicy faz hydrofobowej i hydrofilowej [114]. Podobna procedura zastosowana przez tych autorów wobec celekokoxybu dała zupełnie inne wyniki – substancja została zamknięta w rdzeniu kapsułki [111, 113, 114]. Autorzy sugerują, że ibuprofen może

działać jak surfaktant w formulacjach z udziałem kazeiny, a nawet syntetycznych miceli opartych o Pluronic P104⁹ [114, 238].

Millar i Corrigan zbadali z kolei charakterystykę rozpuszczalności kompaktów kazeina-ibuprofen [239]. Fizyczne mieszanki ibuprofenu i kazeiny kwasowej, które zostały sprasowane pod dużym ciśnieniem, charakteryzowały się znacznym opóźnieniem rozpuszczania leku w porównaniu z analogicznymi mieszaninami z kazeinianem sodu. Autorzy wyjaśniają te różnice mikrośrodowiskowymi zmianami w pH na granicy lek-rozpuszczalnik. Wartości pH dla roztworów leku i kazeiny (5,54) były niższe niż dla kazeinianu (7,13). W niskim pH ibuprofen (pKa 4,59) będący w stanie niezjonizowanym wykazywał zmniejszoną rozpuszczalność niż w obojętnym środowisku kazeinianu. Dodatkowo pomiędzy odmianami kazeiny zaobserwowano różnice reologiczne (np. w lepkości kinematycznej). Kazeina kwasowa dawała bardziej lepkie roztwory i bardziej sztywne żele w danym stężeniu niż kazeinian sodu obniżając tym samym skuteczną rozpuszczalność i dyfundowalność leku [239, 240].

Kazeiny użyto również jako nośnika kwasu mefenamowego [241]. Sporządzono koprecypitaty oraz fizyczne mieszaniny poprzez ucieranie proszków w moździerzu i ugniatanie mieszaniny w obecności etanolu. Z racji tego, że zarówno kazeina jak i kwas mefenamowy dobrze rozpuszczają się wyłącznie w środowisku zasadowym, mieszanki rozpuszczono w podwyższonym pH, a następnie przeprowadzono precypitację kwasową. Wszystkie trzy preparaty wykazywały podobną zawartość leku, lecz jedynie koprecypitacja prowadziła do faktycznego wiązania leku i jego częściowej amorfizacji. Uzyskane preparaty porównywano z preparatem kwasu mefenamowego stabilizowanego w oparciu o poli(glikol etylenowy). Preparaty kazeinowe wykazywały większą biodostępność zarówno w badaniach *in vitro* jak i u szczurów.

Podobnie jak opisany powyżej kwas mefenamowy, ibuprofen i paracetamol wykazują poprawę rozpuszczalności w podwyższonym pH. Różnica jest jednak taka, że ibuprofen wykazuje lepszą rozpuszczalność w $\text{pH} \geq 5$, podczas gdy paracetamol dopiero przy $\text{pH} = 13$ [242]. Roztwory kazeiny stosowane w niniejszej pracy miały $\text{pH} \sim 8$. W warunkach tych ibuprofen mógł wykazywać znacznie wyższą rozpuszczalność niż paracetamol, co może tłumaczyć różnice w ilości leków związanych przez kazeinę.

Zdecydowanie inaczej, niż w przypadku paracetamolu i ibuprofenu, sytuacja wygląda w przypadku loperamidu – pomimo najmniejszej zawartości molowej ze wszystkich trzech kompleksowanych leków (Ryc. 15), stężenia tego leku w uzyskanych w niniejszej pracy preparatach znacznie przewyższają te stosowane w preparatach farmaceutycznych (Ryc. 14). Nie oznacza to oczywiście, że zasadnym jest używanie większych dawek loperamidu, lecz że kazeina może być dobrym kandydatem do stabilizowania hydrofobowych substancji, które stosowane są w niskich dawkach terapeutycznych.

Ciekawe w tym kontekście są różnice w wydajności kompleksowania pomiędzy preparatami uzyskanymi w wyniku obniżania pH oraz stosowania chlorku wapnia. Preparaty strącane chlorkiem wapnia wykazywały bowiem większą zawartość loperamidu. Loperamid jest praktycznie nierozpuszczalny w wodzie, lecz częściowo rozpuszcza się w kwasach [230]. Strącanie preparatów kwasami prowadziło do obniżenia pH roztworu otaczającego precypitaty, a pewne ilości loperamidu mogły ulec rozpuszczeniu w takim środowisku prowadząc tym samym do niższej efektywności kompleksowania.

Przykładem substancji hydrofobowych stosowanych w niskich dawkach są lipofilowe witaminy, takie jak witamina K. Do stabilizowania witamin A (w postaci β -karotenu) oraz D (ergokalcylferol

⁹ Kopolimer PEO-PPO-PEO [poli(tlenek etylenu)-*blok*-poli(tlenek propylenu)-*blok*-poli(tlenek etylenu)] zawierający 40% masowych PEO. Tego typu polimery znane są także pod nazwą „poloksamer” [237].

i cholekalcyferol) kazeinę wykorzystywano wielokrotnie [67–69, 84, 85, 87–93, 100, 157, 164], a badania *in silico* sugerują, że wiązanie witaminy E przez kazeinę także jest prawdopodobne [243]. Pozwala to sądzić, że materiał ten może skutecznie stabilizować również witaminę K2 MK-7.

Uzyskane wyniki udowadniają, że kazeina jest w stanie skutecznie wiązać witaminę K2 MK-7. Oceniając wydajność kompleksowania można stwierdzić, że jest zdecydowanie satysfakcjonująca. Dostępne komercyjnie preparaty zawierają 75-200 µg witaminy K w jednej tabletkie, co po przeliczeniu na masę tabletki daje ok. 0,15-0,30 mg/g [235]. Ilości związane przez kazeinę są niemalże stukrotnie większe. Daje to bardzo duży potencjał do użycia takiego preparatu w suplementach diety i żywności funkcjonalnej.

Niedawne badania ukazują problemy dotyczące jakości oraz zawartości witaminy K w dostępnych komercyjnie preparatach. Wiele suplementów diety zawiera ilości witaminy K poniżej deklarowanych przez producenta [235]. Pomijając argument o potencjalnej nieuczciwości producentów należy zwrócić uwagę na stabilność witaminy MK-7. Badania stabilności bowiem wskazują, że zawartość witaminy K w czasie przechowywania spada. Jest to zależne od jej pochodzenia (synteza lub fermentacja), czystości, warunków przechowywania oraz użytych stabilizatorów [244].

W kontekście przywołanych wcześniej doniesień o labilności witaminy MK-7, najważniejszym pytaniem jest czy kazeina może zwiększać jej stabilność. Uzyskane wyniki potwierdzają, że wszystkie zsyntezowane preparaty zachowują stabilność przez tydzień, nawet przy wysokiej wilgotności względnej powietrza (56,2%), bez wyraźnych różnic pomiędzy preparatami. Dopiero w ekstremalnych dla tego rodzaju substancji warunkach (98,6% wilgotności powietrza) ujawniają się różnice w stabilności (Ryc. 20). Po 7 dniach w tych warunkach wyraźnie widoczny jest spadek zawartości witaminy K.

Porównując te wyniki z danymi przedstawionymi przez Orlando i wsp. można zauważyć, że większość komercyjnie dostępnych preparatów po 6 miesiącach przechowywania w warunkach 60% wilgotności powietrza ma dużo niższy odzysk MK-7 od preparatów przygotowanych z udziałem kazeiny [244]. Podobnie „mleko” sojowe wzbogacone o witaminę MK-7 po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej wykazywało spadek zawartości witaminy K do poziomu ok. 75% zarówno dla wersji odtłuszczonej jak i zawierającej tłuszcz [245].

Efektywność działania kwasu cytrynowego i askorbinowego, jako mediów precypitacyjnych, jest porównywalna. Porównanie to ma znaczenie ponieważ kwas askorbinowy, wbrew nazwie, jest alkoholem polihydroksylowym. Na korzyść zastosowania kwasu askorbinowego działa jego ochronna właściwość wobec wrażliwych na utlenianie preparatów [246].

Niestety chlorek wapnia wykazuje negatywny wpływ na stabilność preparatów z witaminą K2 MK-7 o czym świadczy spadek zawartości witaminy K przy 98,6% wilgotności powietrza. Negatywny wpływ chlorku wapnia może wynikać z higroskopijności, która może przekładać się na sorpcję wody sprzyjającą hydrolizie. Wpływ chlorku wapnia na preparaty zawierające ibuprofen, loperamid i paracetamol jest niejednoznaczny, lecz może mieć związek z obojętnym odczynem tej soli, który nie prowadzi do spadku pH tak jak kwasy cytrynowy i askorbinowy.

Uzyskane wyniki pozwalają także stwierdzić, że zastosowanie procedury odtłuszczenia kazeiny nie wpływa znacząco na zawartość leków w przeciwieństwie do witaminy K2 MK-7, której zawartość była o 15-40% większa w preparatach przygotowanych na bazie kazeiny odtłuszczonej. Nie można wykluczyć, że usunięcie substancji tłuszczowych prowadzi do odblokowania dodatkowych miejsc wiązania witaminy K2 MK-7. Świadczy to również, że

w wiązanie witaminy K bezpośrednio oddziaływania zaangażowane są znacznie mocniej niż w przypadku wiązania paracetamolu czy ibuprofenu.

Co jednak ciekawe preparaty przygotowane na bazie odtłuszczonego białka, pomimo większej zawartości witaminy K na początku eksperymentu, wykazują także największy spadek zawartości MK-7 w czasie. Sugeruje to, że odtłuszczenie kazeiny negatywnie wpływa na trwałość preparatów powstających z jej udziałem. Niewielka ilość tłuszczu obecna w kazeinie może chronić preparaty poprzez utworzenie warstwy ochronnej na ich powierzchni. Powlekanie kapsułek substancjami o charakterze tłuszczowym jest bowiem często metodą ich zabezpieczania przed działaniem warunków otoczenia. W związku z tym można uznać, że odtłuszczenie kazeiny jest nie tylko etapem zbędnym, ale być może warto wzbogacać preparaty na bazie kazeiny o lipidy w celu poprawy stabilności. Ciekawe mogłoby okazać się zbadanie wpływu różnego rodzaju tłuszczów na takie preparaty.

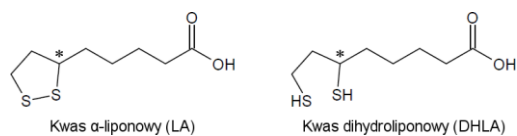
Zastosowana metoda stabilizacji witaminy K daje obiecujące wyniki. Pozwala ona na kompleksowanie relatywnie wysokich ilości witaminy K, a do tego próbki uzyskane z udziałem kwasu cytrynowego i askorbinowego są stabilne nawet przez pół roku przechowywania w warunkach zwiększonej wilgotności powietrza. Jest to o tyle istotne, że w trakcie produkcji suplementów diety często dodaje się nadmiar witamin tak, żeby w dniu końca przydatności do spożycia zawartość witaminy była zgodna z deklarowaną [235]. Preparaty kazeinowe wytrącane kwasami mogą pozwolić na stosowanie mniejszych dawek witaminy K obniżając koszty preparatu.

Proponowana procedura kompleksowania ma charakter uniwersalny i może być adaptowana do badania szerokiego panelu różnych substancji terapeutycznych. Zwłaszcza, że wykorzystane związki mają odmienny charakter chemiczny. Zaletą opracowanej w niniejszej pracy procedury kompleksowania jest zastosowanie do substancji, których stosunek dawki do aktywności biologicznej jest niski. Jeden z użytych leków – loperamid, wydaje się spełniać ten wymóg.

Ograniczeniem tej metody jest przydatność do wiązania związków stosowanych w dużych dawkach. Przyczyn można upatrywać w specyfice rozpuszczalności poszczególnych substancji oraz ich zachowania na granicy faz – zmiany pH wydają się mieć znacznie większy wpływ na kompleksowanie kazeiny z lekami niż w przypadku witaminy K, która wydaje się wiązać raczej pod wpływem podmiany rozpuszczalnika. Nie można wykluczyć również, że kazeina nie posiada odpowiedniej liczby miejsc wiązania substancji hydrofobowych tak, żeby pozwolić na wiązanie całości dodanego związku chemicznego. Należy zwrócić uwagę na to, że w pracach innych autorów, którym udało się zamknąć znaczące ilości paracetamolu czy ibuprofenu w preparatach kazeinowych, dochodziło raczej do fizyko-chemicznego lub fizycznego pułapkowania leku, aniżeli chemicznego wiązania [209, 239].

2.3. KONIUGACJA KAZEINY Z KWASEM ALFA-LIPONOWYM

Jedną z metod stabilizowania substancji terapeutycznych jest koniugacja. Polega ona na kowalencyjnym związaniu niskocząsteczkowej substancji z większą cząsteczką nośnikową. Najczęściej nośnikami są polimery [247], w tym również białka [248]. Koniugacja prowadzi do poprawy stabilności, rozpuszczalności i skuteczności działania substancji terapeutycznych. W niniejszej pracy techniką koniugacji posłużono się do wiązania kazeiny z kwasem α -liponowym. Jest to kwas karboksylowy obdarzony pierścieniem zawierającym dwa atomy siarki tworzące wewnętrzny mostek disiarczkowy (Ryc. 22). Związek ten posiada centrum chiralności, lecz co ważniejsze występuje w formie utlenionej lub zredukowanej [249].



Ryc. 22. Wzory chemiczne formy utlenionej i zredukowanej kwasu α-liponowego. Opracowano na podstawie [249].

Kwas α-liponowy stosowany jest jako suplement diety, a jego koniugaty jako substancje terapeutyczne [250, 251]. Aktywność biologiczna LA sprowadza się do udziału w regeneracji biologicznych systemów antyoksydacyjnych organizmu. Kwas α-liponowy występuje bowiem naturalnie w mitochondriach, gdzie związany kowalencyjnie z ε-aminą lizyny, pełni rolę kofaktora w reakcjach enzymatycznych. Jego aktywność wynika z reakcji redoks, w których uczestniczą atomy siarki w cząsteczce [249, 251]. Związek ten wykazuje także działanie terapeutyczne w przypadku leczenia cukrzycy, neuropatii czy nowotworów [249, 252]. Istnieją również przesłanki, że może być z powodzeniem stosowany w profilaktyce anemii [253, 254].

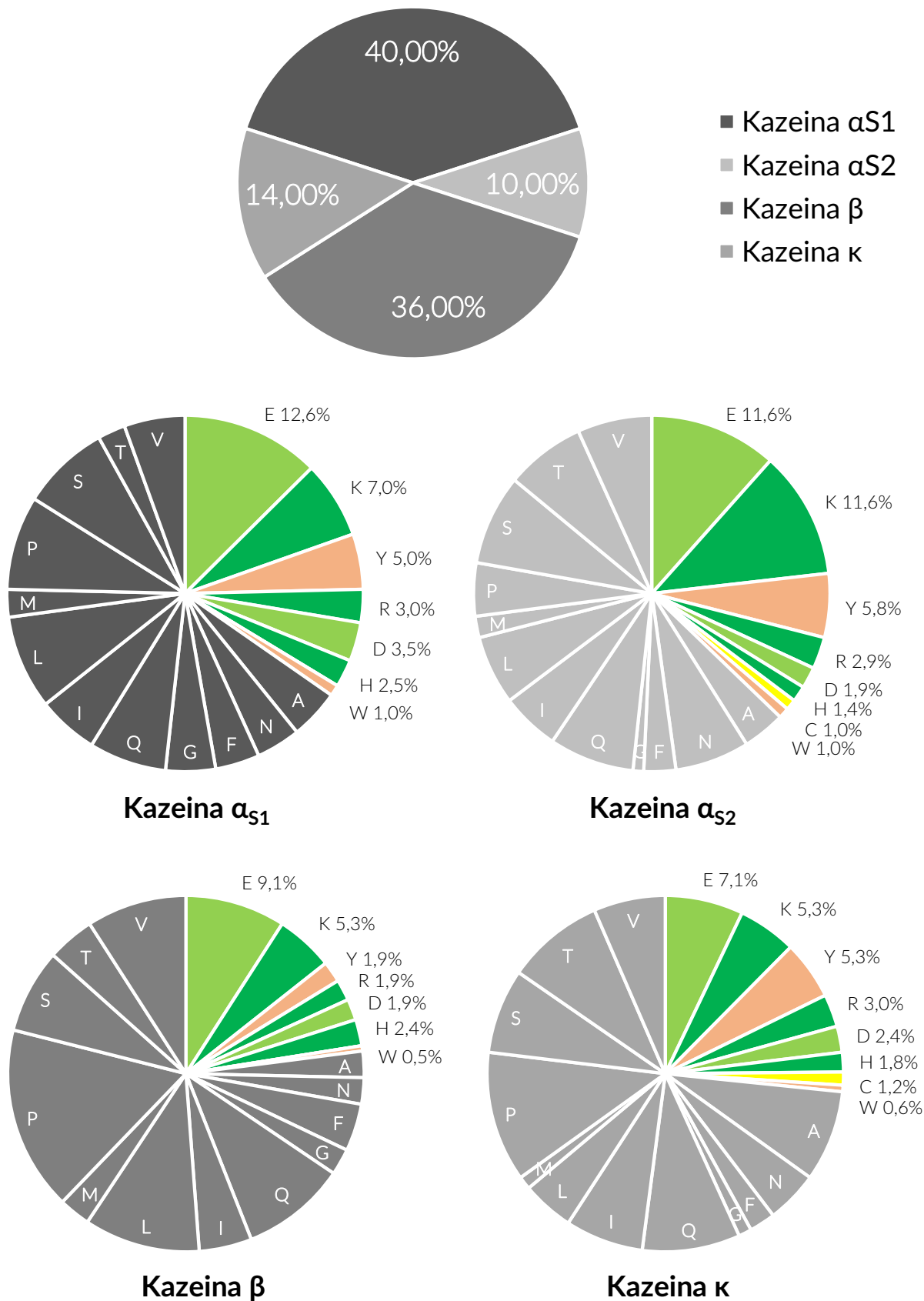
Kwas α-liponowy jest hydrofobowy i dobrze rozpuszcza się wyłącznie w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak acetonitryl, alkohole (metanol, etanol) czy chloroform [255]. Biologiczny czas półtrwania ($t_{1/2}$) tego związku wynosi zaledwie ok. 30 min [256], a biodostępność bezwzględna w roztworze wodnym to jedynie 38% dla izomeru R i 28% dla formy S [249]. Przewyciężenie tych ograniczeń wymaga zastosowania odpowiedniego systemu stabilizacji, takiego jak np. koniugacja z nośnikiem białkowym.

Białka są makrocząsteczkami zbudowanymi z aminokwasów. Łańcuchy boczne tych aminokwasów zawierają różnorodne grupy chemiczne z których tylko niektóre mogą stanowić cel modyfikacji chemicznych. Wyróżnić należy grupy karboksylowe na C końcu łańcucha peptydowego i w resztach bocznych kwasu asparaginowego i glutaminowego oraz grupy aminowe na N-końcu (α aminy), w reszcie bocznej lizyny (ε amina), histydyny i argininy. W wielu białkach występują dodatkowo grupy siarkowe, takie jak tioeterowe w metioninie i sulfhydrylowe w cysteinie. Grupy sulfhydrylowe często tworzą mostki disiarczkowe (S-S). Poza tym wymienić należy grupy aromatyczne – pierścień indolilowy tryptofanu i fenolowy tyrozyny. W glikoproteinach występują dodatkowo grupy hydroksylowe węglowodanów [257].

W celu określenia grup chemicznych, które staną się celem modyfikacji chemicznej w białku, przeanalizowano kazeinę pod kątem zawartości aminokwasów obdarzonych grupami chemicznymi reaktywnymi w stosunku do czynników sprzęgających (Ryc. 23).

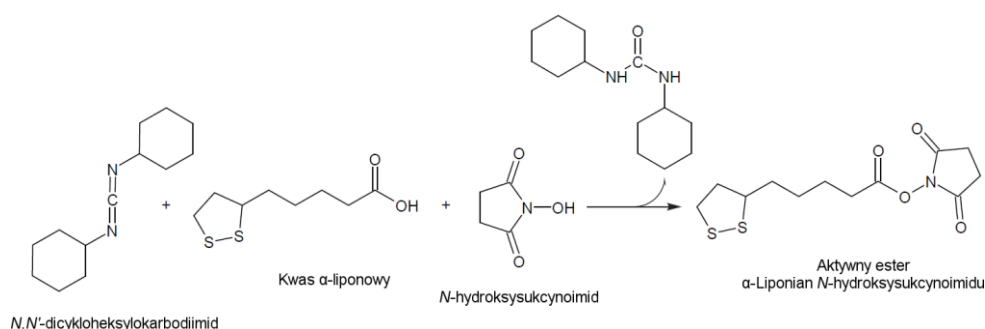
Kazeina jest białkiem bogatym w grupy karboksylowe (9,7% E i 2,4% D) oraz aminowe w reszcie bocznej lizyny (ε-amina), histydyny i argininy (6,6% K, 2,4% R, 2,1% H). Grupy -SH cystein, są niemalże nieobecne w kazeinach (0,6% Cys), dlatego też nie występują w nich mostki disiarczkowe (-S-S-).

W celu skoniugowania kwasu liponowego z kazeiną posłużono się reakcją acylacji opartą o użycie aktywnego estru N-hydroksysukcynoimidu (NHS). Aktywne estry NHS są elektrofilami, które mogą łatwo reagować z nukleofilowymi grupami aminowymi tworząc stabilne wiązania amidowe [258–261].



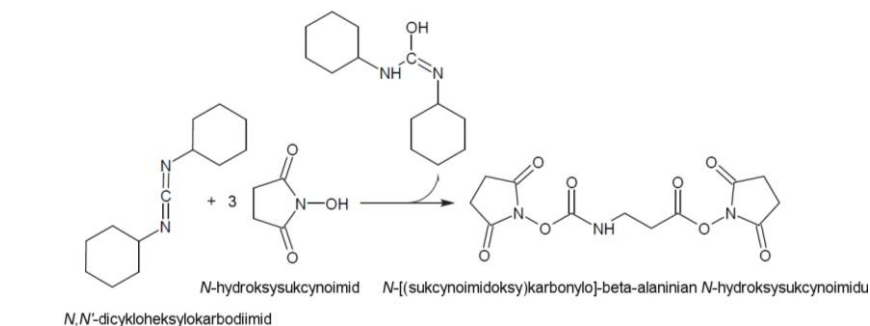
Ryc. 23. Skład aminokwasowy kazeiny bydlęcej. Poszczególne aminokwasy oznaczono skrótami jednoliterowymi. Kolorami wyszczególniono aminokwasy zawierające reszty boczne podatne na modyfikacje chemiczne.

Do syntezy aktywnego estru kwasu α -liponowego wykorzystano *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC). Metoda ta ma długą historię związaną z wykorzystaniem w biokoniugacji dzięki czemu dobrze znany jest przebieg reakcji głównych i ubocznych [260, 261]. Ze względu na nierozpuszczalność DCC w wodzie, syntezę estru NHS-LA prowadzono w dimetyloformamidzie (DMF). Reakcję przedstawia Ryc. 24. Produktem ubocznym jest dicykloheksyloizomocznik, który wytrąca się w postaci kryształów, co stanowi dobrą miarę przebiegu reakcji.



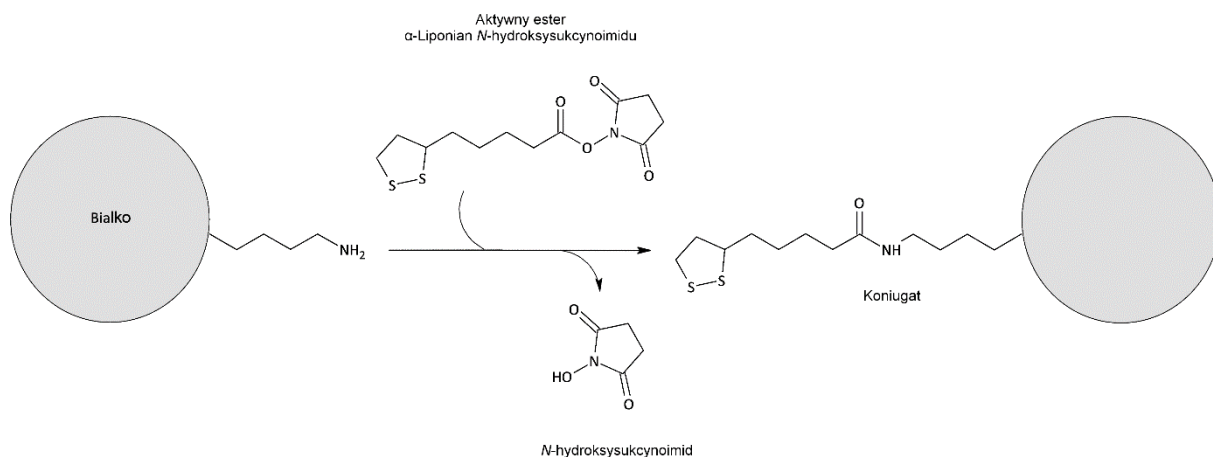
Ryc. 24. Reakcja syntezy aktywnego estru kwasu α -liponowego. Opracowano w oparciu o ogólną reakcję syntezy aktywnego estru NHS za pośrednictwem karbodiimidu [250, 261].

Z reakcją syntezy aktywnego estru NHS w aprotycznym środowisku bezwodnym, jakie stanowi DMF, konkurują dwie reakcje uboczne. Jedną z nich jest powstawanie nieaktywnego *N*-acylomocznika, a drugą powstawanie dwufunkcyjnego aktywnego estru z trzech cząsteczek NHS (Ryc. 25). za pośrednictwem DCC [260, 261]. Z tego względu istotna jest kolejność dodawania reagentów – do roztworu DCC dodany został nadmiar roztworu ALA, a dopiero później nadmiar roztworu NHS, tak aby ograniczyć powstawanie dwufunkcyjnego czynnika sieciującego.



Ryc. 25. Reakcja uboczna mogąca zachodzić podczas syntezy aktywnego estru – synteza dwufunkcyjnego aktywnego estru z trzech cząsteczek NHS przy udziale DCC. Opracowano na podstawie [260, 261].

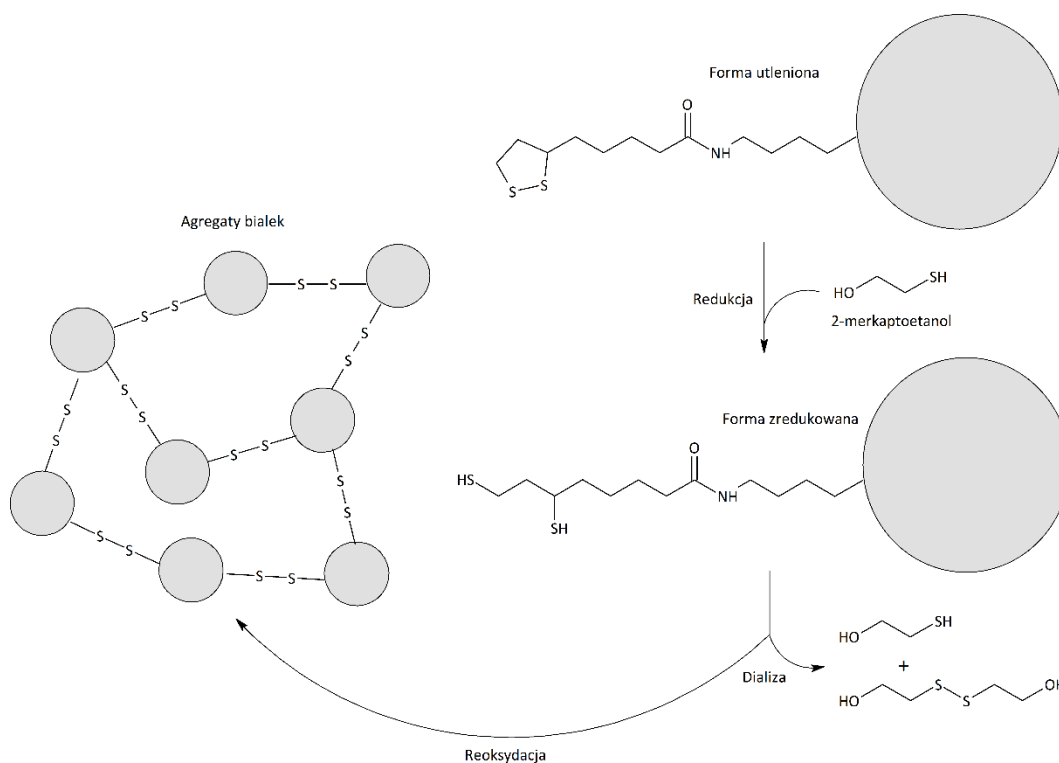
Koniugację kwasu liponowego z kazeiną prowadzono w środowisku wodnym przy pH 6; 7 oraz 8. Reakcję przedstawia Ryc. 26.



Ryc. 26. Koniugacja kwasu α-liponowego z białkiem za pośrednictwem aktywnego estru NHS. Opracowano w oparciu o ogólną reakcję aktywnego estru NHS z białkami [262].

Ze względu na występowanie w strukturze LA pięcioczłonowego pierścienia ditiolowego z wewnętrznym mostkiem disiarczkowym możliwe jest jego otwarcie przez zredukowanie disulfidu. Reoksydacja takiego układu prowadzi następnie do jego posieciowania – powstania krzyżowych wiązań pomiędzy cząsteczkami LA [263].

Reakcją tą posłużono się w niniejszej pracy do monitorowania skuteczności koniugacji. Kazeina nie zawiera naturalnie wystarczającej ilości grup siarkowych aby tworzyć wiązania krzyżowe, więc do posieciowania może dojść wyłącznie jeśli koniugacji uległ kwas liponowy. To z kolei pozwala monitorować przebieg reakcji poprzez pomiar masy molekularnej cząsteczek powstających w wyniku posieciowania łańcuchów peptydowych.



Ryc. 27. Schemat sieciowania białka poprzez redukcję i reoksydację mostków disiarczkowych kwasu α-liponowego skoniugowanego z kazeiną.

Do otwarcia pierścienia lipolilowego wykorzystano popularny czynnik redukujący jakim jest 2-merkaptoetanol (Ryc. 27). Następnie czynnik usunięto poprzez dializę pozwalając grupom sulfhydrylowym na reoksydację i sieciowania przy udziale poprzecznych mostków disiarczkowych. Dializę prowadzono w buforze fosforanowym w dwóch wariantach – tlenowym i beztlenowym.

Tlenowe warunki zapewniały otwarte naczynia z dostępem powietrza, natomiast warunki beztlenowe uzyskano prowadząc dializę w zakręconych butelkach wypełnionych do pełna odgazowanym buforem z dodatkiem przeciwutleniacza.

Postęp tej reakcji monitorowano za pomocą elektroforezy w żelu poli(akrylamidowym) w obecności dodecylosiarczanu sodu [ang. *Sodium Dodecyl Sulfate-Poly(Acrylamide) Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*] [264]. W celu oceny wpływu modyfikacji chemicznej na strukturę kazeiny przeprowadzono również badanie techniką spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR*).

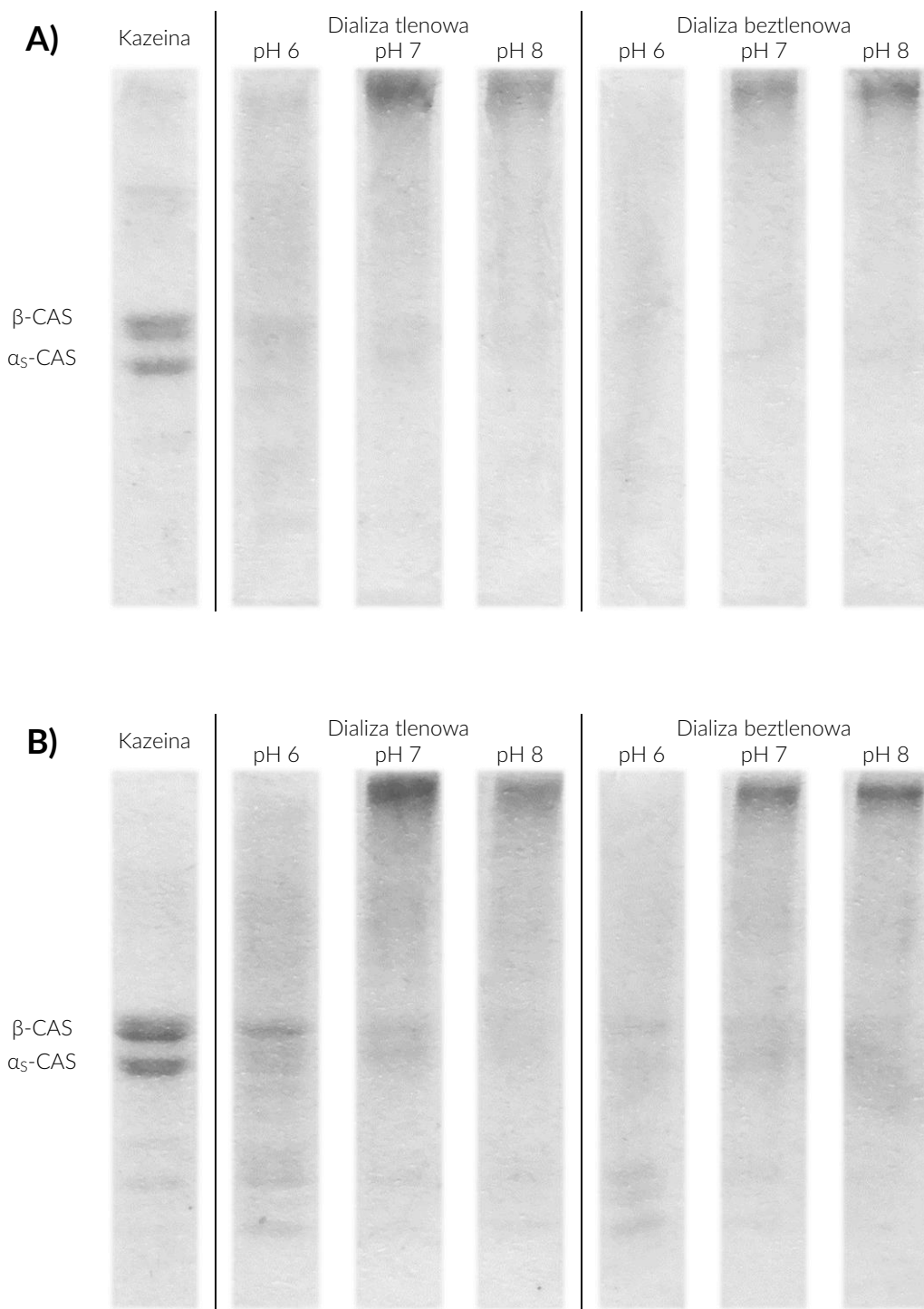
2.3.1. Wyniki

2.3.1.1. Elektroforeza koniugatów

Roztwory koniugatów po zakończeniu dializy wymieszano z buforem do nakładania próbek na żel. Procedurę powtórzono dwukrotnie stosując bufor redukujący (zawierający merkaptoetanol) i nieredukujący (bez merkaptoetanolu). Jako próbkę odniesienia zastosowano niezmodyfikowaną kazeinę. Separację przeprowadzono w 10% żelu poli(akrylamidowym) przykrytym 2,5% żelem zagęszczającym. Żele barwiono błękitem Coomassie. Uzyskane żele sfotografowano i poddano obróbce graficznej obejmującej przekształcenie do skali szarości i podział na ścieżki.

Analizując uzyskane obrazy elektroforetyczne (Ryc. 28) można stwierdzić brak wyraźnych różnic pomiędzy próbkami dializowanymi w warunkach tlenowych i beztlenowych. Kazeina rozdzielana metodą SDS-PAGE daje charakterystyczny profil elektroforetyczny [265]. Na ścieżkach koniugatów poddawanych elektroforezie w warunkach nieredukujących nie obserwuje się tego rodzaju prążków (Ryc. 28 żel A). Na ścieżkach koniugatów syntezowanych w pH 6 i rozdzielanych w warunkach nieredukujących nie obserwuje się wyraźnych prążków (Ryc. 28, żel A). Z kolei, w warunkach redukujących obserwuje się dwa prążki kazeiny na analogicznych ścieżkach (Ryc. 28, żel B).

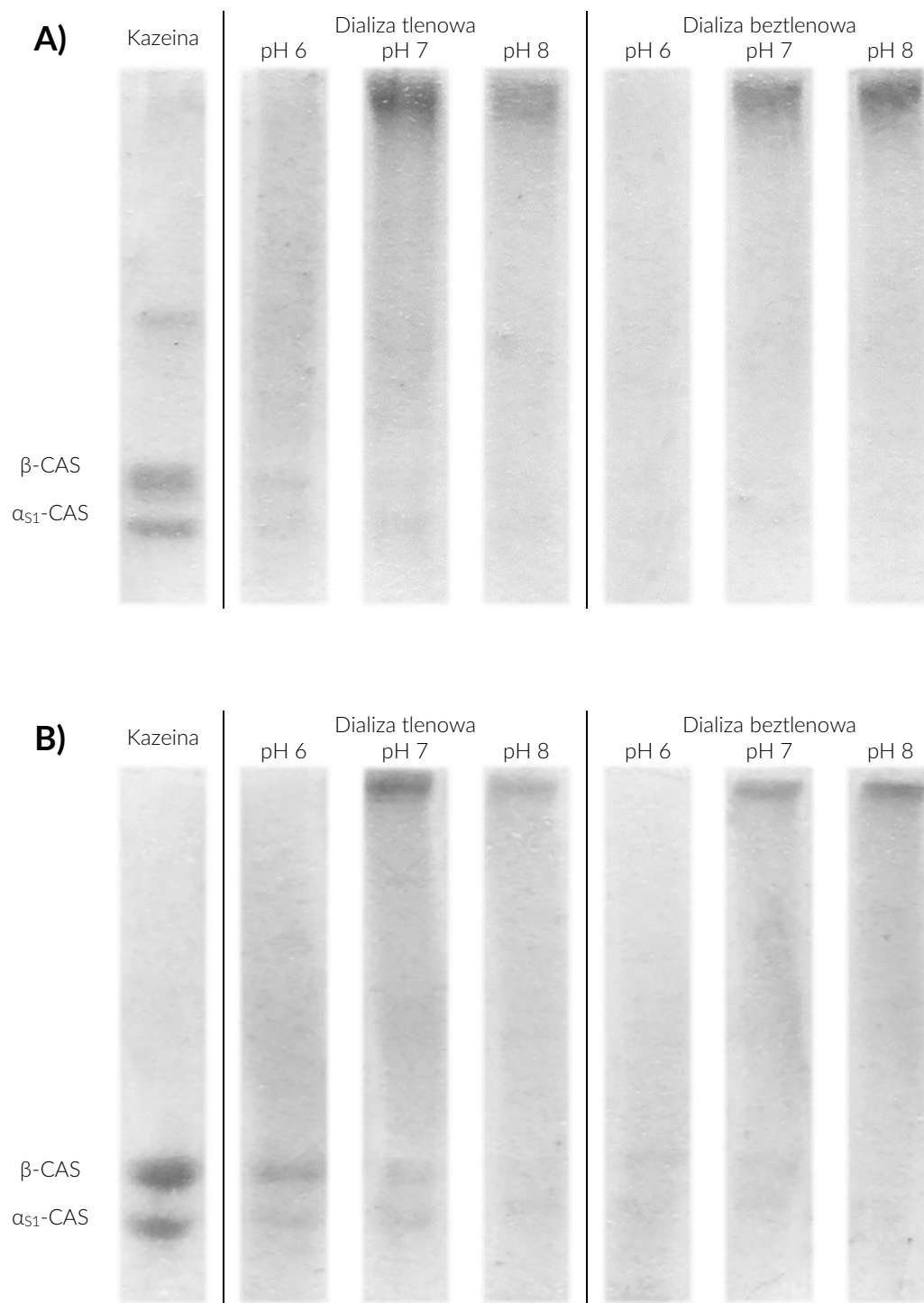
Elektroforezę przeprowadzono również w żelach o koncentracji 7,5% (Ryc. 29) i 5%, które nie zostały przedstawione ze względu na niskie parametry mechaniczne uniemożliwiające ich uwiecznienie. Wyniki uzyskane w tych żelach nie odbiegały znacząco od wyników widocznych na żelach 10%.



Ryc. 28. Obrazy elektroforetyczne kazeiny oraz cząsteczek złożonych z posieciowanych białek uzyskane w systemie nieciągłym w żelu 10%.

Żele zostały przedstawione w skali szarości, a pojedyncze ścieżki oddzielone w celu ułatwienia analizy wyników.

A) Bufor nieredukujący; **B)** Bufor redukujący.

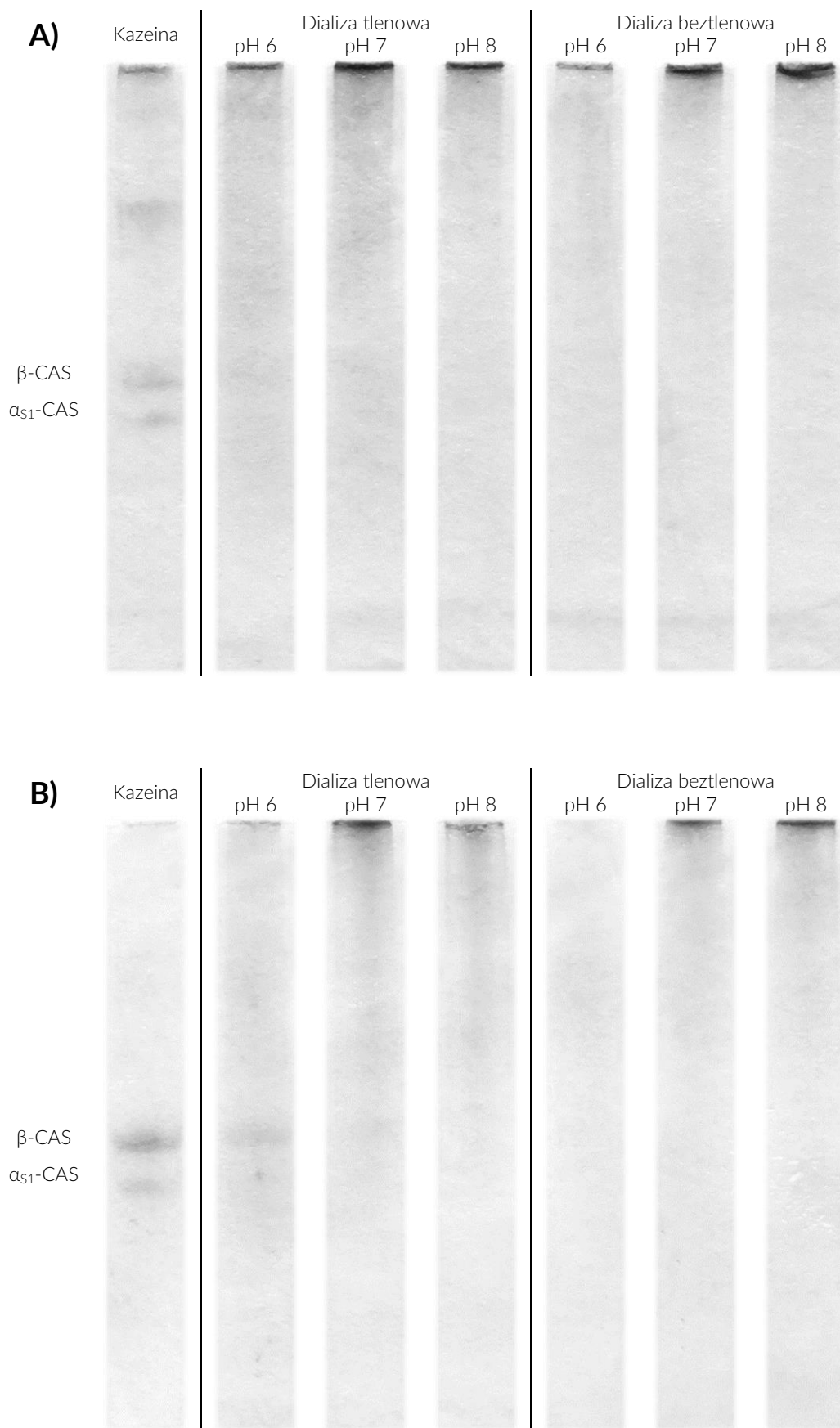


Ryc. 29. Obrazy elektroforetyczne kazeiny oraz cząsteczek złożonych z posieciowanych białek uzyskane w systemie nieciągłym w żelu 7,5%.

Żele zostały przedstawione w skali szarości, a pojedyncze ścieżki oddzielone w celu ułatwienia analizy wyników.

A) Bufor nieredukujący; **B)** Bufor redukujący.

Nie można wykluczyć, że wraz z usunięciem górnego żelu zagęszczającego może dojść do usunięcia białek, które są zbyt duże aby wejść w żel rozdzielający. W związku z tym powtórzono elektroforezę w żelach o stężeniu 10% w obecności SDS, lecz tym razem rozdział prowadzono w systemie ciągłym (pominięto górny 2,5% żel zagęszczający).



Ryc. 30. Obrazy elektroforetyczne kazeiny oraz cząsteczek złożonych z posieciowanych białek białkowych uzyskane w systemie ciągłym. Żele zostały przedstawione w skali szarości, a pojedyncze ścieżki oddzielone w celu ułatwienia analizy wyników. **A)** Bufor nieredukujący; **B)** Bufor redukujący.

Analiza profili elektroforetycznych w systemie ciągłym pozwala stwierdzić występowanie prążków na szczycie ścieżek koniugatów rozdzielanych w warunkach nieredukujących (Ryc. 30, żel A). Prążki zauważalne są również w przypadku próbek syntezowanych w pH 6. Natomiast w przypadku warunków redukujących (Ryc. 30, żel B) dla pH 6 nie obserwuje się prążków.

Interesująca jest obserwacja, że na przedstawionych żelach prążki charakterystyczne dla kazeiny pojawiają się również w warunkach redukujących na ścieżkach koniugatów uzyskanych w pH 7 i 8, lecz intensywność ich wybarwienia jest zdecydowanie niższa.

2.3.1.2. Elektroforeza koniugatów o zmiennym stopniu posieciowania

Ze względu na brak odpowiedniej rozdzielczości użytych dotychczas żeli, w kolejnym etapie badań zastosowano żele o większym formacie oraz metodę barwienia o większej czułości.

Próbki koniugatów zostały zsyntezowane na nowo stosując różne stężenia aktywnego estru – do roztworów kazeiny dodawano identyczne ilości roztworów zawierających aktywny ester o stężeniach 139; 69,5; 34,8; 13,9 mM. Podobnie jak poprzednio, reakcję prowadzono w pH 6, 7 i 8, a produkty oczyszczano przez dializę w warunkach tlenowych i beztlenowych.

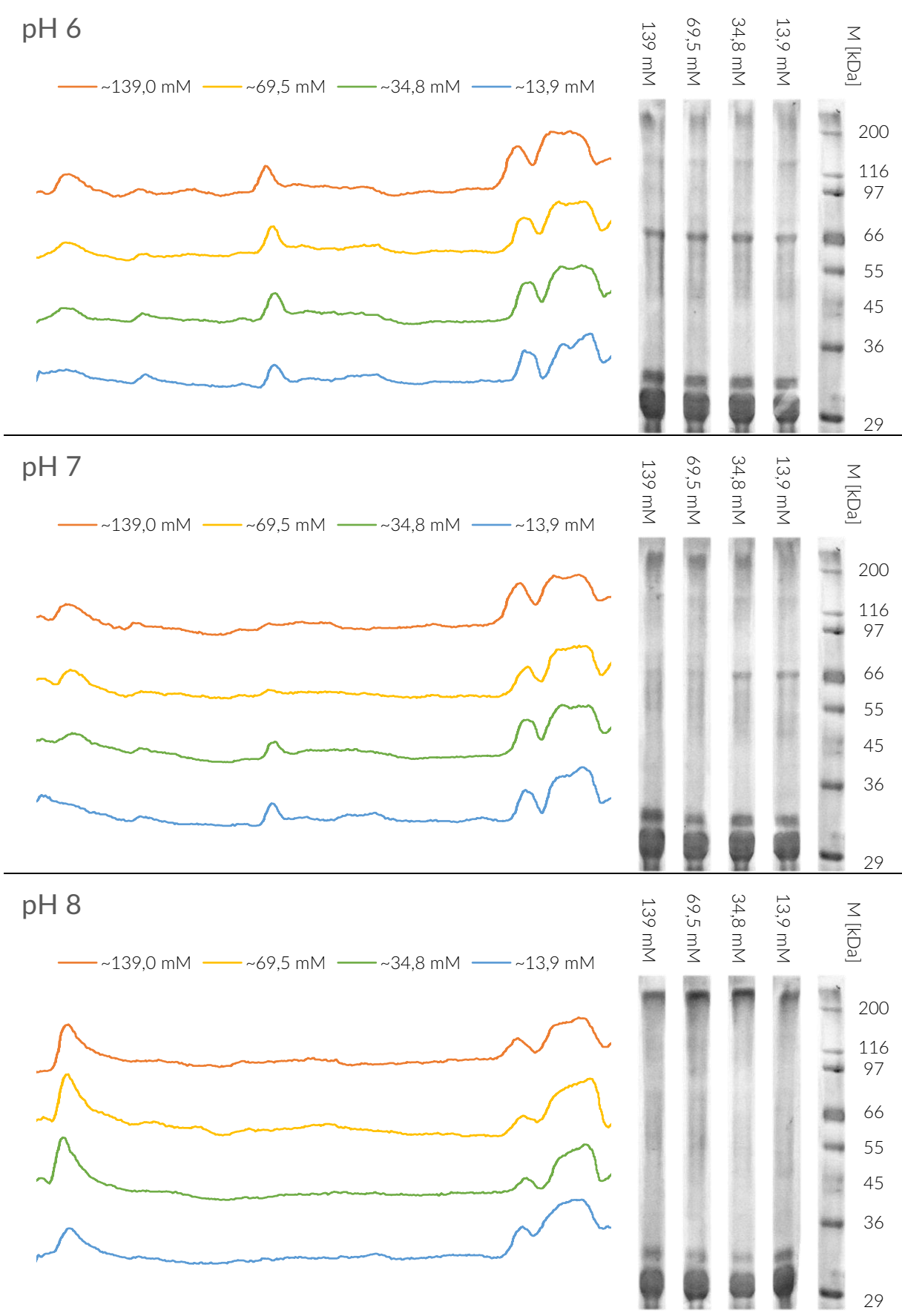
Do analizy próbek wykorzystano elektroforezę w systemie nieciągłym, stosując 2,5% żel zagęszczający i 10% żel rozdzielający. Do przygotowania próbek do nałożenia na żel użyto wyłącznie buforu nieredukującego. Uzyskane żele sfotografowano i poddano obróbce graficznej obejmującej przekształcenie do skali szarości i podział na ścieżki. Dla każdej ścieżki wykonano densytogram. Elektroforegramy i densytogramy przedstawiają Ryc. 31 i Ryc. 32.

Zastosowanie różnych stężeń aktywnego estru, ponad trzykrotnie niższych niż w poprzednich badaniach, pozwala na czytelną wizualizację intensywnych prążków charakterystycznych dla kazeiny. Dość charakterystycznym wynikiem jest również większa szerokość dolnego prążka kazeiny. Kolejną interesującą obserwacją jest występowanie na niektórych ścieżkach prążka o masie cząsteczkowej ~66 kDa.

Analiza wyników uzyskanych dla próbek dializowanych w warunkach tlenowych (Ryc. 31) dostarcza wielu cennych informacji. Przede wszystkim wyraźna jest różnica pomiędzy próbkami syntezowanymi w pH 6 i 8. Próbki syntezowane w pH 6 wykazują bowiem prążek przy ~66 kDa i nie obserwuje się intensywnych prążków na szczycie ścieżek. Z kolei w pH 8 cząstki o wysokiej masie są dobrze widoczne na szczycie żelu, a prążki ~66 kDa są nieobecne. W pH 7 prążek ~66 kDa jest widoczny tylko w przypadku próbek sieciowanych mniejszymi stężeniami aktywnego estru, a przy większych stężeniach obserwuje się jego zanik połączony ze wzrostem intensywności wybarwienia prążków na szczycie ścieżek.

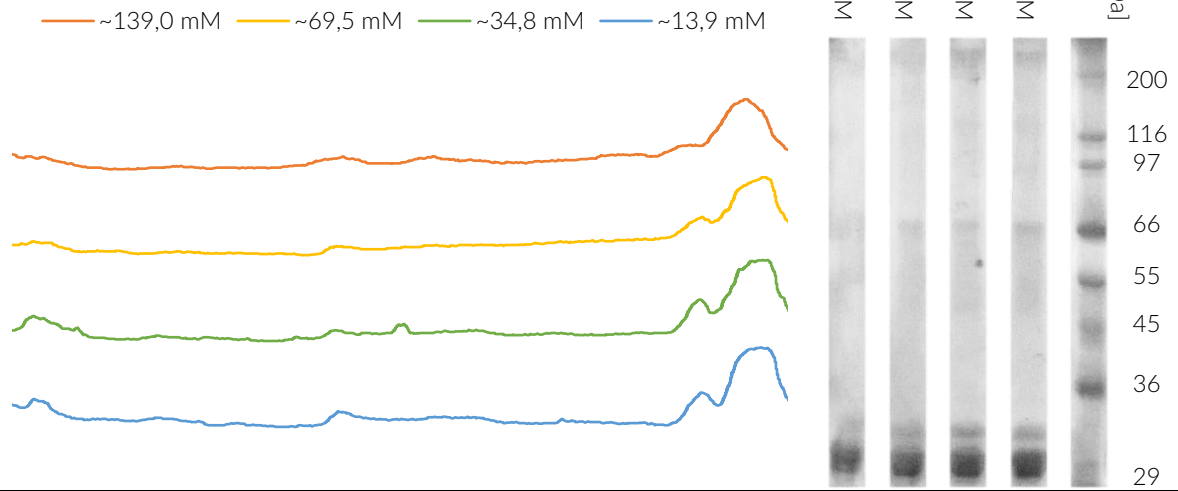
W przypadku obrazów uzyskanych dla próbek dializowanych beztlenowo (Ryc. 32) na ścieżkach nie obserwuje się prążka ~66 kDa. W związku z tym próbki poddano kolejnej analizie elektroforetycznej, lecz z zastosowaniem 10% stężenia poli(akrylamidu), zarówno w żelu zagęszczającym, jak i rozdzielającym. Żele o tej koncentracji mają dość wysoką wytrzymałość mechaniczną, więc możliwe jest ich barwienie i odbarwienie bez usuwania górnej części zagęszczającej. Pozwala to na zaobserwowanie także tych peptydów, które nie były w stanie migrować przez żel i umiejscowiły się na jego szczycie.

Analiza uzyskanych w ten sposób obrazów elektroforetycznych (Ryc. 33) pozwala stwierdzić występowanie prążków na szczycie wszystkich ścieżek koniugatów dializowanych zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych.

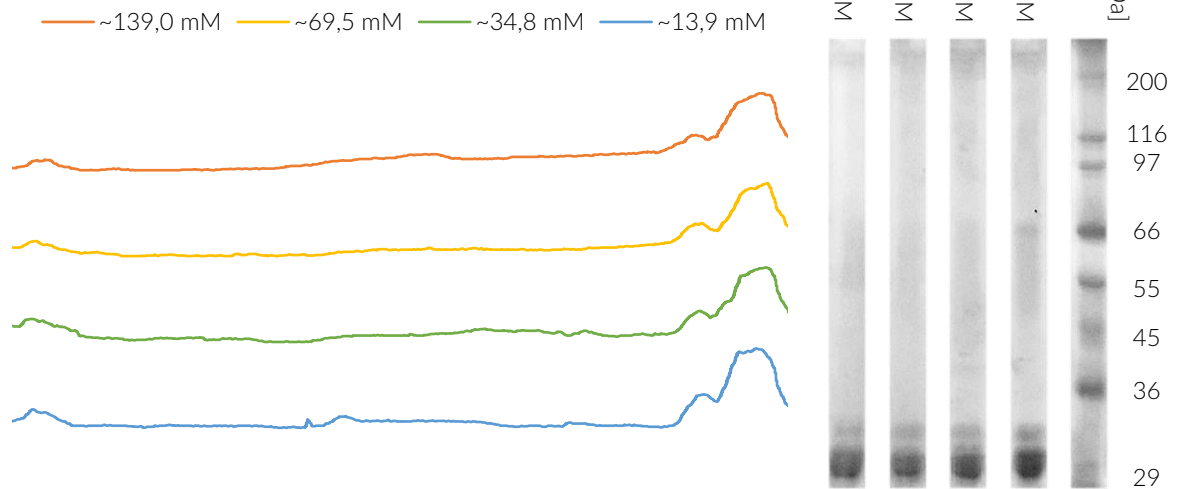


Ryc. 31. Elektroforegramy i densytogramy kazeiny oraz kompleksów białkowych dializowanych w warunkach tlenowych.

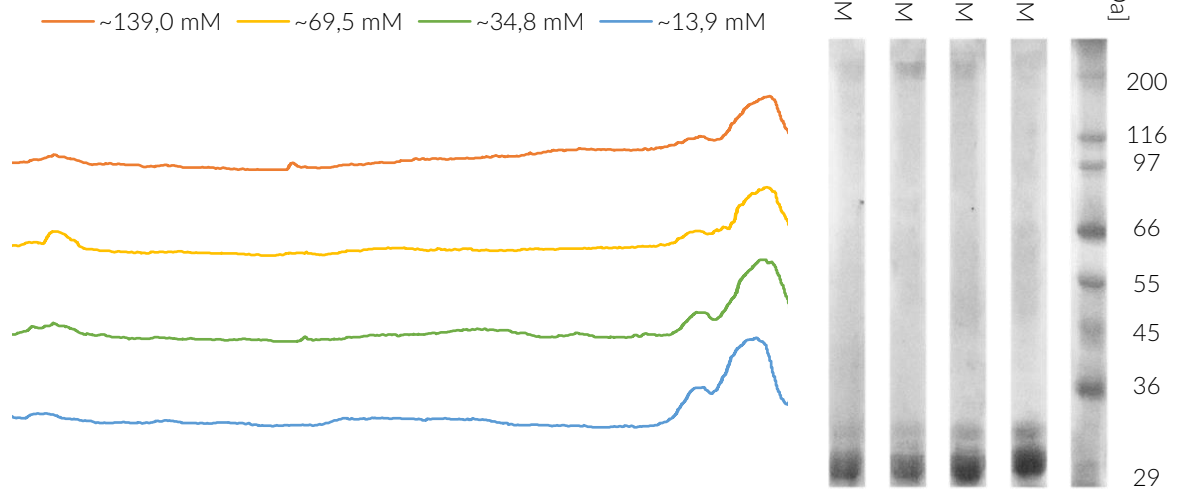
pH 6



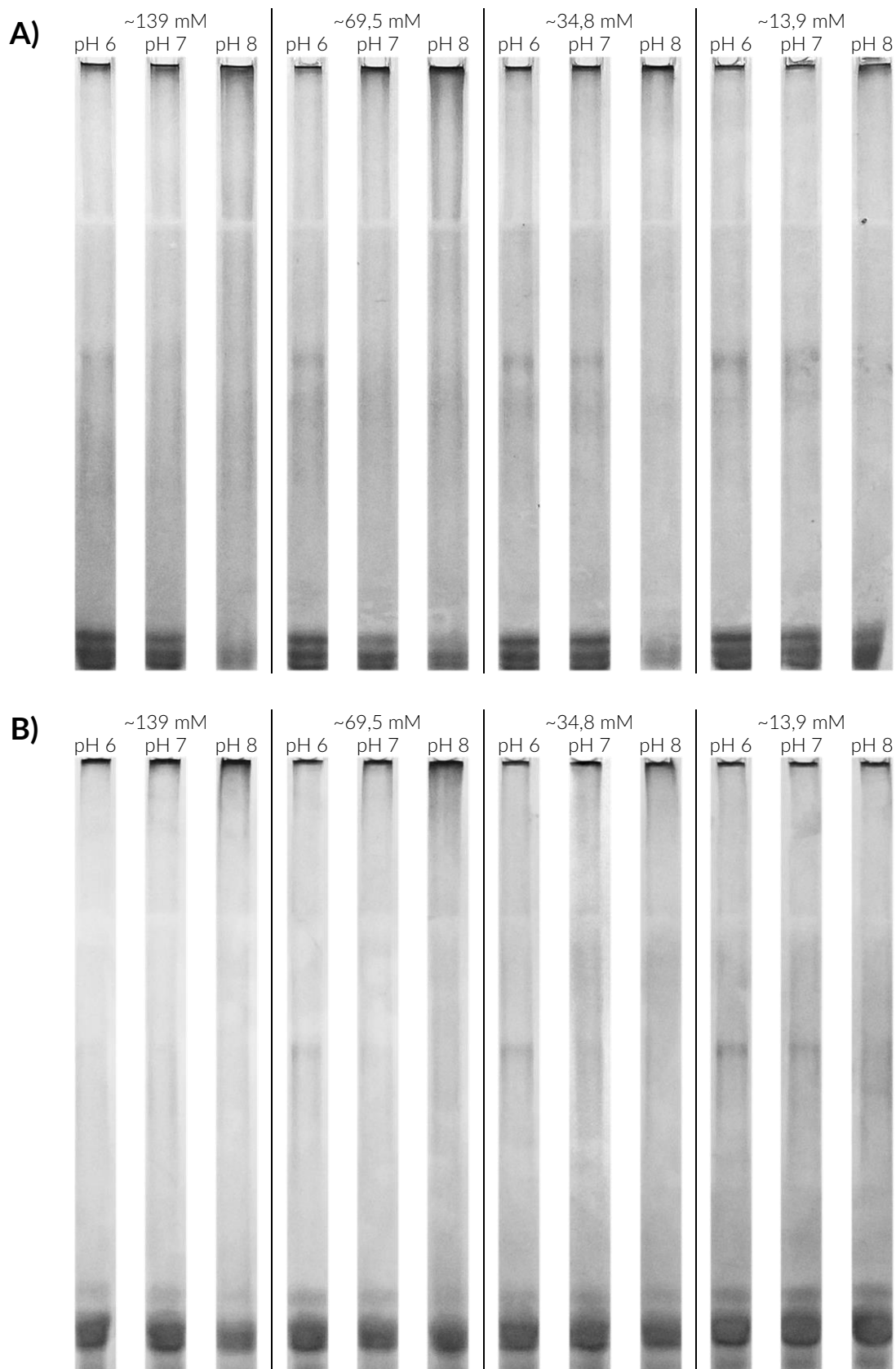
pH 7



pH 8



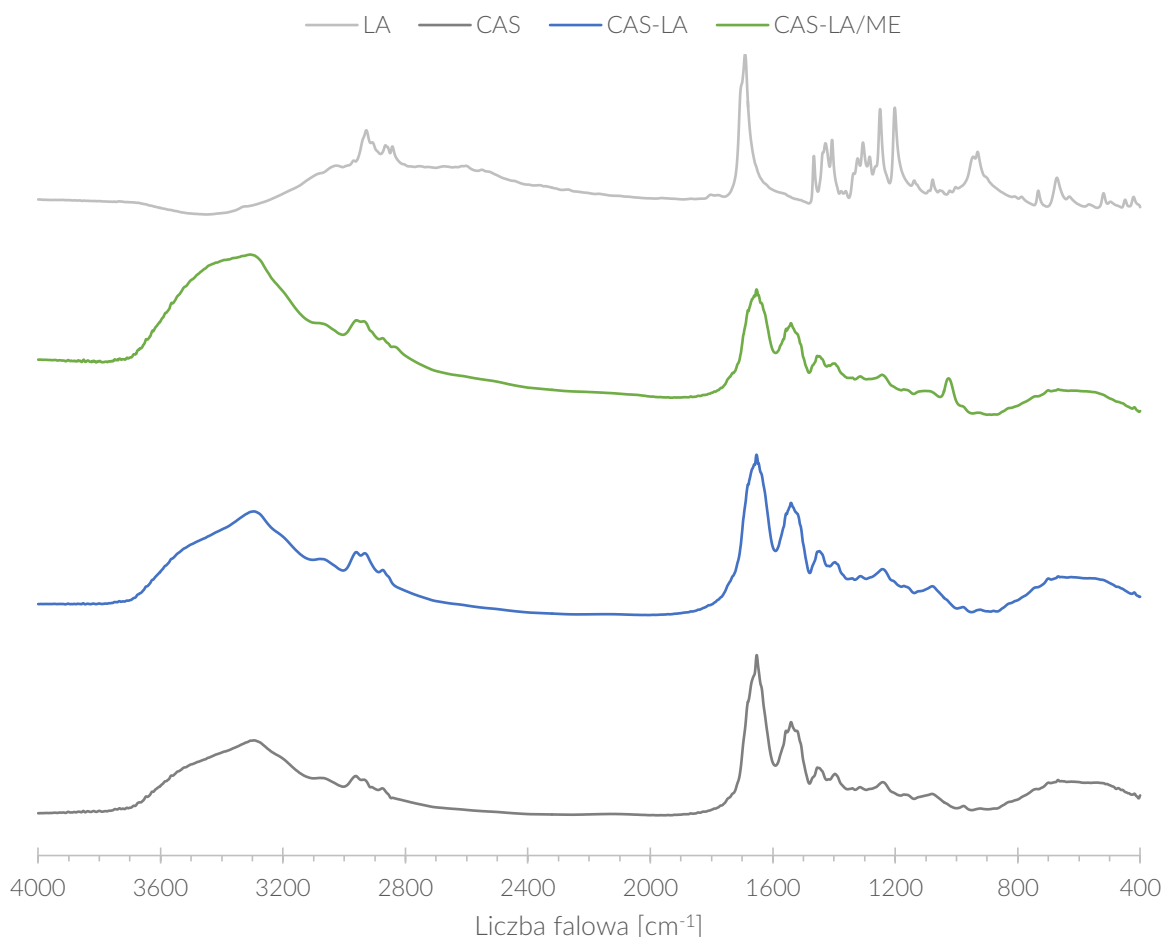
Ryc. 32. Elektroforegramy i densytogramy kazeiny oraz kompleksów białkowych dializowanych w warunkach beztlenowych.



Ryc. 33. Obrazy elektroforetyczne cząsteczek utworzonych z posieciowanych białek uzyskane w systemie nieciągłym – żel zagęszczający 10%, żel rozdzielający 10%. **A)** Dializa tlenowa; **B)** Dializa beztlenowa;

2.3.1.3. Badania spektroskopowe koniugatów w podczerwieni

Badaniu poddano próbki niemodyfikowanej kazeiny, koniugatu kazeiny z kwasem α -liponowym oraz koniugatu po redukcji i reoksydacji mostków disiarczkowych. Próbki po syntezie oczyszczono przez dializę oraz liofilizowano, a po wysuszeniu rozdrobiono do postaci proszku. Analizie poddano również czysty kwas α -liponowy. Widma zostały zmierzone w zakresie średniej podczerwieni techniką transmisyjną z użyciem pastylki KBr. Widma wyrażone jako procent transmitancji do liczby falowej przeliczono na absorbancję. Uzyskane widma nałożono na jedną rycinę w celu porównania (Ryc. 34). Uzyskane widma kazeiny niemodyfikowanej oraz kwasu α -liponowego są w zgodzie z widmami tych związków uzyskanymi przez innych autorów [209, 266, 267].

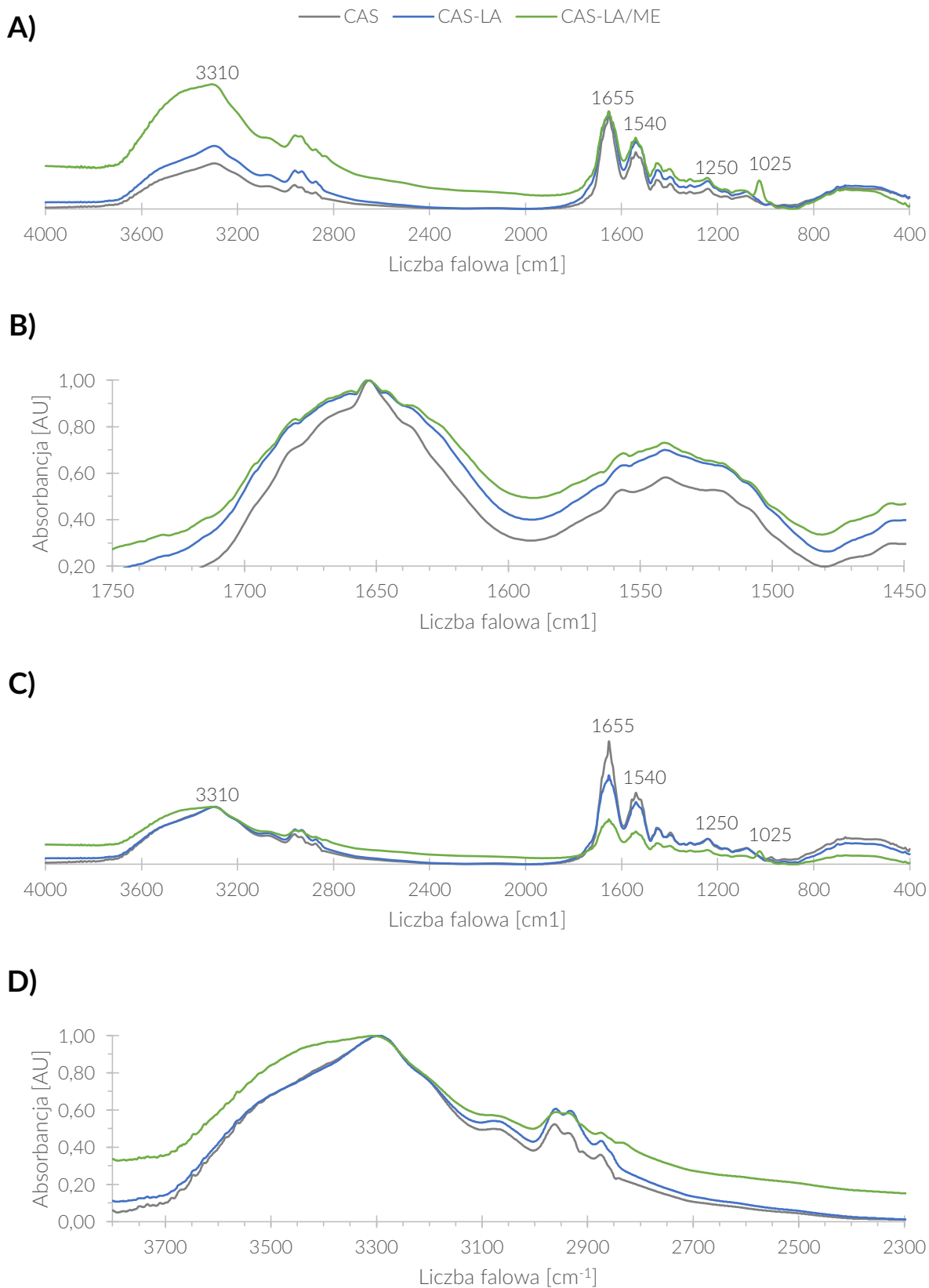


Ryc. 34. Widma FTIR uzyskane dla kwasu α -liponowego, kazeiny oraz koniugatu tych dwóch substancji. LA – kwas α -liponowy; CAS – kazeina; CAS-LA – koniugat kazeiny z kwasem α -liponowym; CAS-LA/ME – koniugat poddany redukcji i reoksydacji mostków disiarczkowych.

Kwas α -liponowy jest kwasem karboksylowym, więc wykazuje silny pik przy ~ 1690 cm^{-1} pochodzący od drgań rozciągających C=O i zdecydowanie mniejszy przy ~ 930 cm^{-1} od grupy O-H. Charakterystycznym elementem budowy cząsteczki kwasu α -liponowego jest występowanie mostka disiarczkowego, który może podlegać redukcji do grup sulfhydrylowych. Grupy te jednak wykazują piki prawie wyłącznie w zakresie 500-700 cm^{-1} charakteryzujące się bardzo niską intensywnością, więc nie mogą służyć do oceny skuteczności koniugacji.

Widma koniugatów kazeiny z kwasem α -liponowym nie wykazują przesunięć ani też pojawiania się czy zanikania pików charakterystycznych, więc podczas analizy widm FTIR uwzględniono tzw. pasma amidowe. Zmiany w tych regionach wynikają najczęściej ze zmian w głównym łańcuchu polipeptydowym [268]. Aby przeprowadzić analizę widm trzech wariantów kazeiny, znormalizowano je wobec pików zidentyfikowanych jako amid I (~ 1655 cm^{-1}) a także wobec

pasma amidu A (~3310 cm⁻¹). Tak przygotowane widma nałożono na siebie w celu porównania (Ryc. 35).



Ryc. 35. Znormalizowane widma FTIR trzech wariantów kazeiny.

A) Widma znormalizowane wobec amidu I (1655); **B)** Widma amidu I oraz amidu II; **C)** Widma znormalizowane wobec amidu A (3310); **D)** Widma amidu A oraz amidu B.

LA – kwas α-liponowy; CAS – kazeina; CAS-LA – koniugat kazeiny z kwasem α-liponowym; CAS-LA/ME – koniugat poddany redukcji i reoksydacji mostków disiarczkowych.

Do zarejestrowania piku przy $\sim 3310\text{ cm}^{-1}$ (amid A) prowadzą drgania rozciągające N-H. Jest to pasmo charakterystyczne dla białek niewrażliwych na konformację łańcucha polipeptydowego. Przy liczbach falowych ~ 1655 i $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ obserwowane są piki amidu I i II. Na amid I składają się głównie drgania rozciągające C=O, podczas gdy amid II to kombinacja drgań N-H zginających w płaszczyźnie i drgań rozciągających C-N z mniejszymi wpływami innych drgań. Pasma te są niewrażliwe na różnice budowy łańcuchów bocznych i przez to mogą służyć do oceny zmian w strukturze drugorzędowej białka.

Wyższa absorpcja koniugatów w regionie amidu A ($\sim 3310\text{ cm}^{-1}$) w stosunku do kazeiny może być skutkiem powstawania większej liczby ugrupowań amidowych. Należy jednocześnie odnieść się do wyraźnego poszerzenia tego piku oraz pojawienia się dodatkowego przy $\sim 1025\text{ cm}^{-1}$ w próbce poddanej redukcji mostków disiarczkowych. Zmiany te mogą pochodzić od drgań grupy O-H merkaptolanu, który sprawia duże trudności przy próbach całkowitego usunięcia z próbki.

Poza intensywnością oraz pozycją piku, źródło informacji może stanowić także jego szerokość i dlatego warto zwrócić uwagę na poszerzenie piku amidu I na widmach koniugatów (Ryc. 35 b). Pasma to wynika głównie z drgań wiązań peptydowych, więc poszerzenie piku może oznaczać zmianę w strukturze drugorzędowej białka.

2.3.2. Dyskusja

Grupy aromatyczne (aminokwasy Y i W) mają charakter niepolarny i hydrofobowy co czyni z nich trudny cel dla modyfikacji w środowisku wodnym. Z kolei część cukrowa w kazeinie występuje wyłącznie we frakcji κ [25, 26], więc nie jest dobrym celem dla modyfikacji. Pozostawia to do wyboru bądź grupy karboksylowe, obecne w kazeinie w dużej ilości, bądź grupy aminowe, których w kazeinie jest mniej, lecz charakteryzują się łatwą dostępnością w środowisku wodnym.

Kazeina jest białkiem, które najlepiej rozpuszcza się w środowisku zasadowym. W warunkach tych grupy aminowe są zdeprotonowane i mają charakter nukleofilowy. Wartość pKa dla α -amin wynosi 8,0 natomiast dla ϵ -amin lizyny to 10,8 [269]. Warto zaznaczyć, że wartości te dotyczą wolnych aminokwasów i są zależne od temperatury, siły jonowej oraz mikrośrodowiska, a w różnych białkach mogą przyjmować inne wartości. Wartości pKa różnych grup bocznych składają się na powierzchniowy ładunek cząsteczki białka. Jest on mierzalny w postaci potencjału zeta, który stanowi lepszą miarę niż suma ładunków poszczególnych grup bocznych, ponieważ uwzględnia także interakcje ze środowiskiem i przeciwnonami.

Wiele związków chemicznych, które wykorzystywane są do sieciowania i koniugowania białek wykazuje reaktywność wobec grup aminowych. Dla porównania niewiele substancji zdolnych jest reagować z grupami karboksylowymi w łagodnych warunkach niezbędnych do zachowania prawidłowej konformacji białek. W związku z tym jako cel modyfikacji chemicznej wybrano grupy aminowe.

Estry NHS są reaktywne wobec grup nukleofilowych. Mimo to nie reagują z grupą guanidylową argininy, której próg jonizacji jest tak wysoki (pKa 12,5), że niemalże zawsze występuje w postaci uprotonowanej. Reakcja tych estrów z grupami hydroksylowymi lub sulfhydrylowymi prowadzi do powstawania niestabilnych estrów i tioestrów, które w środowisku wodnym mogą ulegać hydrolizie albo wymianie z sąsiadującymi aminami, prowadząc do powstania wiązań amidowych. Pierścień imidazolowy histydyny również może ulegać acylacji, ale powstałe wiązania są nietrwałe. W związku z tym aktywne estry prowadzą do powstania stabilnych wiązań amidowych głównie z udziałem α -amin na N-końcu białka oraz ϵ -amin reszt bocznych

lizyny [257, 262, 269]. Można, więc założyć, że wiązanie pomiędzy kwasem α -liponowym, a kazeiną będzie mieć taki sam charakter jak w przypadku naturalnych koniugatów kwasu α -liponowego spotykanych w przyrodzie.

W badaniach spektroskopowych FTIR widma kazeiny niezmodyfikowanej i po modyfikacji chemicznej nie wykazują znaczących różnic ani przesunięć poza niewielkim poszerzeniem piku charakterystycznego dla amidu I oraz zwiększeniem intensywności piku amidu B. Kwas α -liponowy w wyniku koniugacji powinien tworzyć wiązania amidowe z aminami pierwszorzędowymi białka. Koniugaty mogą zawierać zwiększoną liczbę tych wiązań w porównaniu z niezmodyfikowanym białkiem, lecz jest to trudne do zaobserwowania ze względu na fakt, że wiązania typu C-N oraz N-H, są obecne w białku w postaci wiązań peptydowych. W związku z tym na podstawie uzyskanych widm FTIR nie można wysnuć jednoznacznych wniosków dotyczących skuteczności koniugacji.

Analizując uzyskane obrazy elektroforetyczne (Ryc. 28) nie można stwierdzić wyraźnych różnic pomiędzy próbkami dializowanymi w warunkach tlenowych i beztlenowych. Kazeina bydlęca składa się z czterech frakcji. Ich rozdział metodą SDS-PAGE daje charakterystyczny profil elektroforetyczny pochodzący od frakcji β oraz α_s [265]. Na ścieżkach koniugatów poddawanych elektroforezie w warunkach nieredukujących nie obserwuje się tego rodzaju prążków (Ryc. 28 żel A). Może to świadczyć, że przeważająca część koniugatów uległa posieciowaniu tworząc aglomeraty o masie cząsteczkowej znacznie większej od kazeiny. Dowodem na poparcie takiego twierdzenia zdaje się być występowanie prążków na szczycie ścieżek niektórych koniugatów.

Obok warunków dializy ważnym czynnikiem jest pH środowiska reakcji. Na ścieżkach koniugatów syntezowanych w pH 6 i rozdzielanych w warunkach nieredukujących nie obserwuje się wyraźnych prążków (Ryc. 28, żel A). Może to sugerować postawienie konglomeratów o tak wysokiej masie cząsteczkowej, że niemożliwe jest ich wejście w porowatą strukturę żelu poli(akrylamidowego). Z kolei, w warunkach redukujących obserwuje się dwa prążki kazeiny na analogicznych ścieżkach (Ryc. 28, żel B,) mogące świadczyć o „uwolnieniu” części cząsteczek z posieciowanego agregatu pod wpływem redukujących warunków buforu obciążającego zawierającego detergent SDS. Nie sposób jednak udzielić odpowiedzi na pytanie dlaczego koniugaty syntezowane w pH 6 tworzą podczas reoksydacji mostków disiarczkowych cząsteczki o wyjątkowo wysokiej masie molekularnej.

Analiza profili elektroforetycznych w systemie ciągłym pozwala stwierdzić występowanie prążków na szczycie ścieżek koniugatów rozdzielanych w warunkach nieredukujących (Ryc. 30, żel A). Prążki zauważalne są również w przypadku próbek syntezowanych w pH 6. Natomiast w przypadku warunków redukujących (Ryc. 30, żel B) dla pH 6 nie obserwuje się prążków. Pozwala to domniemywać, że w warunkach redukujących doszło do zmniejszenia masy cząsteczkowej kompleksów białkowych najpewniej w wyniku rozpadu mostków disiarczkowych, co objawia się w postaci braku prążka na żelu.

Interesująca jest obserwacja, że na przedstawionych żelach prążki charakterystyczne dla kazeiny pojawiają się również w warunkach redukujących na ścieżkach koniugatów uzyskanych w pH 7 i 8, lecz intensywność ich wybarwienia jest zdecydowanie niższa. Wskazywałoby to, że koniugaty syntezowane w środowisku obojętnym i podwyższonym pH dają w wyniku sieciowania koniugaty o masie cząsteczkowej niższej niż te uzyskane w wyniku reakcji w pH 6, ale jednocześnie mniej podatne na redukcję. Być może reakcja w wyższym pH prowadzi do wprowadzenia do struktury białka większej ilości grup sulfhydrylowych, które w wyniku redukcji i reoksydacji tworzą większą liczbę międzycząsteczkowych wiązań disiarczkowych niż w przypadku koniugatów syntezowanych w obniżonym pH. W konsekwencji cząsteczki takie, ze względu na większą liczbę wiązań, mogą być mniej wrażliwe na redukcję. Większa liczba tego typu wiązań może również utrudniać przyłączanie się kolejnych cząsteczek, poprzez zawadę

przestrzenną łańcuchów kwasu liponowego czy usztywnienie struktury białka w wyniku sieciowania, prowadząc w ten sposób do utworzenia cząsteczek o niższej masie niż te uzyskane w pH 6.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na powstawanie cząsteczek o bardzo wysokiej masie molekularnej, które są efektem sieciowania poprzedzonego koniugacją kazeiny z kwasem liponowym. Analiza żeli nie wskazuje na występowanie istotnych różnic w produktach uzyskanych przez sieciowanie w warunkach tlenowych i beztlenowych. Natomiast dobrze widoczne są różnice między próbkami w zależności od pH środowiska reakcji. Koniugaty syntezowane w obojętnym i podwyższonym pH charakteryzują się większą odpornością na redukcję wiązań disiarczkowych oraz mniejszą masą cząsteczkową od produktów reakcji w pH 6.

W kolejnych eksperymentach zastosowano ponad trzykrotnie niższe stężenia aktywnego estru niż w poprzednich badaniach. Pozwoliło to na wizualizację intensywnych prążków charakterystycznych dla kazeiny. Co ciekawe, pomimo mas cząsteczkowych frakcji kazeiny będących w zakresie ok. 21-26 kDa, na elektroforegramie widoczne są one powyżej markera o masie 29 kDa, co zostało zaobserwowane także przez innych autorów [265]. Dość charakterystycznym wynikiem jest również większa szerokość dolnego prążka kazeiny. Świadczy ona o częściowym oddzieleniu się frakcji κ od frakcji α s, co jest dowodem na większą rozdzielczość żeli stosowanych w tym etapie badań.

Kolejną interesującą obserwacją jest występowanie na niektórych ścieżkach prążka o masie cząsteczkowej ~66 kDa. Nie można wykluczyć, że pochodzi on od surowiczej albuminy wołowej (ang. *Bovine Serum Albumin*, BSA), która może przedostawać się z krwi do serwatki mleka [277], a stąd może być obecna w kazeinie. W niniejszej pracy stosowano techniczny preparat kazeiny kwasowej, który na etapie produkcji najprawdopodobniej nie był oczyszczany z białek serwatki. Obecność surowiczej albuminy bydlęcej w próbkach jest przypadkowa, lecz mimo to może stanowić dobry indyktor przebiegu reakcji.

Analiza wyników uzyskanych dla próbek dializowanych w warunkach tlenowych (Ryc. 31) dostarcza wielu cennych informacji. Przede wszystkim wyraźna jest różnica pomiędzy próbkami syntezowanymi w pH 6 i 8. Próbki syntezowane w środowisku kwaśnym zawierają bowiem wolne BSA i nie obserwuje się intensywnych prążków na szczycie ścieżek. Z kolei w środowisku zasadowym cząsteczki o wysokiej masie są dobrze widoczne na szczycie żelu, a prążki BSA są nieobecne. W pH 7 prążek BSA jest widoczny tylko w przypadku próbek sieciowanych mniejszymi stężeniami aktywnego estru, a przy większych stężeniach obserwuje się jego zanik połączony ze wzrostem intensywności wybarwienia prążków na szczycie ścieżek. BSA jest białkiem o dużej zawartości cysteiny, a więc zdolnym do tworzenia wielu mostków disiarczkowych. Dzięki temu wraz ze wzrostem ilości grup sulfhydrylowych w koniugatach kazeiny z kwasem liponowym rośnie intensywność powstawania międzypeptydowych mostków disiarczkowych między kazeiną, a BSA.

W przypadku obrazów uzyskanych dla próbek dializowanych beztlenowo (Ryc. 32) na ścieżkach nie obserwuje się prążka charakterystycznego dla BSA. Mogłoby to wskazywać na większy stopień posieciowania białek, lecz na szczycie żelu nie obserwuje się jednocześnie cząsteczek o wysokiej masie. Na podstawie tych wyników trudno ocenić, czy jest to wynikiem powstawania cząstek o wyjątkowo wysokiej masie molekularnej, które nie są w stanie wejść w strukturę żelu pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego, czy innego zjawiska.

Analiza uzyskanych w ten sposób obrazów elektroforetycznych (Ryc. 33) pozwala stwierdzić występowanie prążków na szczycie wszystkich ścieżek koniugatów dializowanych zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Pozwala to wnioskować, że obserwowany poprzednio brak prążków na szczycie żelu dla próbek dializowanych beztlenowo wynika z występowania wyjątkowo dużych cząsteczek, które pozostawały w 2,5% żelu zagęszczającym.

Opisane wyniki wskazują na to, że koniugacja najlepiej zachodzi w środowisku zasadowym, a jej skuteczność spada wraz z pH. W środowisku kwaśnym reakcja zachodzi tylko w przypadku stosowania wysokich stężeń aktywnego estru kwasu α -liponowego (por. Ryc. 28-Ryc. 30).

Jak opisano wcześniej, Haque i Kito wykorzystywali aktywny ester NHS do koniugacji frakcji α_{S1} z kwasem palmitynowym. Co jednak istotne, autorzy donoszą, że reakcja zachodziła w pH zasadowym, a obniżenie pH do 7 powodowało zatrzymanie reakcji [270]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy dowodzą natomiast, że kazeina nie tylko jest w stanie ulegać acylacji za pośrednictwem aktywnego estru w pH 7, ale prawdopodobnie również w pH 6. Biorąc pod uwagę zanik obydwu prążków kazeiny można przyjąć, że frakcja α_{S1} również bierze udział w reakcji.

Wyniki sugerują także, że dializa beztlenowa prowadzi do powstawania cząsteczek o masie molekularnej większej niż w przypadku dializy tlenowej. Być może warunki tlenowe promują nagłe utlenianie grup sulfhydrylowych, które prowadzi do powstawania mostków disiarczkowych między grupami zlokalizowanymi w niewielkiej odległości, czego efektem jest utworzenie się mostków wewnątrzpeptydowych. Takie mostki nie prowadzą do powstawania cząsteczek obdarzonych wysoką masą molekularną. Dializa beztlenowa z kolei mogłaby prowadzić do bardziej stabilnego utleniania grup sulfhydrylowych i rozciągnięcia tego procesu w czasie, co w konsekwencji prowadziło do utworzenia większej ilości mostków międzypeptydowych dając wielkocząsteczkowe produkty.

Podjęcie wykorzystujące aktywny ester NHS do syntezy koniugatów kazeiny z kwasami karboksylowymi badano wcześniej. W badaniach Zhang i wsp. do kazeiny przyłączano nasycone kwasy tłuszczowe – kaprylowy (C8), laurynowy (C12), mirystynowy (C14) i palmitynowy (C16). Efektywność reakcji zależała od długości łańcucha kwasu karboksylowego. Niemniej jednak najlepsze właściwości pod względem micelizacji wykazywały koniugaty kazeiny z kwasem palmitynowym. Ich użycie pozwoliło zakapsułkować kurkuminę w ilościach większych niż w kazeinie niemodyfikowanej [271].

Z kolei Bindhya i wsp. wykorzystali koniugację przebiegającą za pośrednictwem karbodiimidu i NHS do przyłączenia cząsteczek kwasu foliowego do powierzchni hybrydowych nanocząstek złożonych z kazeiny i żelazianu wapnia [272]. Nanocząstki zastosowano jako nośnik kurkuminy w celowanej terapii nowotworów wykorzystującej receptory folianowe. W badaniach *in vitro* cytotoksyczność koniugatów była wyższa niż preparatów niewyznaczonych kwasem foliowym, co pośrednio świadczy o skuteczności zastosowanej metody syntezy.

Podobnie sieciowanie z udziałem mostków disiarczkowych pochodzących od kwasu liponowego wykorzystywano również w innych pracach. Dotyczyły one opracowania systemów kontrolowanego uwalniania doksorubicyny na bazie m.in. dekstranu, PEG-ylowanej skrobi, glikolowanego chitozanu, kwasu hialuronowego oraz syntetycznych polipeptydów [263, 273–276].

Mohamed Saliq i wsp. stworzyli nanokapsułki zawierające kwas α -liponowy na bazie poloksameru 188, lecytyny jaja kurzego i oleju kokosowego [254]. Nanokapsułki posłużyły do wzbogacenia mleka krowiego o kwas liponowy. Autorzy zakładają, że taki funkcjonalny produkt żywnościowy ma szansę zapobiegać anemii poprzez modulowanie działania dehydrogenazy

glukozy-6-fosforanowej uczestniczącej w ochronie erytrocytów przed stresem oksydacyjnym. Co jednak istotne w badaniach na szczurach z indukowaną anemią zaobserwowano pozytywny wpływ mleka wzbogaconego o kwas liponowy na parametry hematologiczne.

Opisane powyżej badania mają duże znaczenie w kontekście niniejszej pracy. Koniugaty kazeiny z kwasem liponowym mają bowiem ogromny potencjał do wykorzystania jako dodatek funkcjonalny do produktów mlecznych bez istotnej ingerencji w ich skład chemiczny. Może mieć to znaczenie na drodze prawnej rejestracji tego typu produktów.

3. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Kazeina to zbiorcza nazwa białek z rodziny fosfoprotein wiążących wapń, które występują w mleku ssaków. Cechą wspólną wszystkich kazein jest amfifilowość, podczas gdy różnice przejawiają się w zawartości aminokwasów, grup fosforanowych i sacharydowych. Wiele płynów biologicznych, wliczając w to mleko, zawiera fosforany i wapń w stężeniach przekraczających ich granicę rozpuszczalności, które stabilizowane są przez białka. Kazeiny realizują tę rolę przez naturalną zdolność do samoczynnego konstruowania miceli w obecności fosforanu wapnia. W pewnym sensie zjawisko to może być postrzegane jako kapsułkowanie wymyślane przez samą przyrodę, a pierwsze prace dotyczące użycia kazeiny do syntetycznego kapsułkowania opublikowano już pod koniec lat osiemdziesiątych. Od tamtej pory nastąpił znaczny rozwój prac zmierzających do stabilizowania i kapsułkowania substancji terapeutycznych z udziałem kazeiny.

Niniejsza praca doktorska obejmowała opisanie właściwości kazeiny i wykorzystanie zgromadzonych informacji do zastosowania kazeiny w roli matrycy umożliwiającej wiązanie leków, stabilizowanie labilnej witaminy K oraz koniugację z kwasem liponowym, a także immobilizację bakteriofagów. Wykazano, że poznanie właściwości fizyko-chemicznych kazeiny otwiera wiele perspektyw badawczych i użytkarnych.

W badaniach dotyczących immobilizacji bakteriofagów podjęto próby zmierzające do opracowania metodyki zamykania bakteriofagów w nośnikach kazeinowych. Jedną z metod tworzenia takich nośników jest koprecypitacja zamykanego czynnika i materiału otoczki. W niniejszej pracy przetestowano podejście polegające na precypitacji kazeiny metalami ziem alkalicznych. Kazeinian sodu poddawano reakcji z chlorkami magnezu, wapnia, strontu oraz baru. Obecność badanych metali została stwierdzona we wszystkich próbkach, mimo, że precypitacja zachodziła tylko pod wpływem jonów wapnia, baru i strontu. Co ciekawe wyjściowa kazeina (próba kontrolna) zawierała natywnie zanieczyszczenia badanymi metalami. Obecność wapnia i magnezu nie była zaskoczeniem. Nieoczekiwaną obserwacją było stwierdzenie śladowych ilości baru i strontu.

Co jednak istotne możliwość strącania kazeinianu solami metali II grupy układu okresowego otwiera nowe możliwości na polu kapsułkowania rozmaitych substancji. Na tej podstawie opracowano procedurę strącania kazeiny przy udziale chlorku wapnia w warunkach pozwalających na uzyskanie sferycznych kapsułek. Optymalnym okazał się roztwór kazeinianu sodu o stężeniu 10% zawierający 40% glicerolu, strącany 1M chlorkiem wapnia z dodatkiem 20% etanolu.

Parametrem mogącym zadecydować o przydatności kazeiny jako nośnika w przemyśle farmaceutycznym jest jej czystość mikrobiologiczna. Kazeina jest produktem naturalnym izolowanym z mleka które może być obciążone obecnością mikroorganizmów. Jeśli realizowane badania miałyby mieć aspekt praktyczny, konieczne jest użycie kazeiny czystej mikrobiologicznie. W pracy kazeinę poddano sterylizacji polegającej na działaniu naświetlania UV-C, ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego. Dodatkowo przeprowadzono sterylizację radiacyjną przez naświetlanie wiązką przyspieszonych elektronów. Skuteczność zastosowanych metod porównano z referencyjną metodą sterylizacji w autoklawie.

Skuteczność sterylizacji badano przez posiew próbek na podłoża mikrobiologiczne i ocenę wzrostu kolonii bakteryjnych. W przeciwieństwie do metod opierających się na ilościowym opisie spadku liczebności mikroorganizmów, w niniejszej pracy zastosowano bardziej rygorystyczne podejście – pojawienie się co najmniej jednej kolonii bakteryjnej świadczyło o nieskuteczności sterylizacji. Spośród przetestowanych podejść wyłącznie autoklaw i naświetlanie wiązką elektronową okazały się skutecznie sterylizować kazeinę.

Niestety działanie przegrzanej pary wodnej w autoklawie prowadziło do zauważalnego ciemnienia próbek. Aby ocenić wpływ metod sterylizacji na strukturę białka zastosowano więc elektroforezę SDS-PAGE. Uzyskane wyniki sugerują, że w porównaniu z ogrzewaniem w autoklawie, sterylizacja radiacyjna nie wpływa w znaczący sposób na masę cząsteczkową kazeiny.

Makrosfery, uzyskane na drodze precypitacji sterylnej kazeiny, posłużyły do immobilizacji bakteriofagów (wirusów antybakteryjnych), a wydajność pułapkowania wynosiła 82%. Makrosfery wykazywały nierozpuszczalność w mediach takich jak sól fizjologiczna, bufor SM, ostudzona płynna pożywka, czy nawet 1M NaOH. Badania dotyczące uwalniania czy skuteczności terapeutycznej takich preparatów nie były celem badań ponieważ wykraczają poza dziedzinę chemii.

Kazeiny posiadają w swojej budowie hydrofobowe regiony zdolne do wiązania substancji lipofilowych. Wobec tego w rozprawie podjęto próby określenia czy fizykochemia kazeiny sprawia, że może być użyta jako nośnik hydrofobowych substancji terapeutycznych. Przeprowadzone badania miały na celu opracowanie prostej, szybkiej i nisko kosztowej metody kompleksowania substancji hydrofobowych przy użyciu kazeiny. Badania prowadzono stosując dwa warianty kazeiny – nieodtłuszczonej i odtłuszczonej. Do badań wykorzystano związki chemiczne jakimi są popularne leki: paracetamol, ibuprofen i loperamid. Kompleksowanie się leków z kazeiną wymuszano przez podmianę rozpuszczalnika, po czym preparaty wytrącano kwasem cytrynowym, askorbinowym lub chlorkiem wapnia. Zawartość leków badano metodą chromatografii HPLC.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że zastosowana metoda pozwala na skuteczne uzyskiwanie kompleksów kazeiny z wymienionymi lekami. Oddziaływania mogły mieć charakter chemiczny, fizykochemiczny lub mechaniczny. Użyte do badań substancje miały status modelowy, a uzyskanie wysokich dawek nie było celem badań. Proponowana procedura ma charakter uniwersalny i może być adaptowana do badania szerokiego panelu różnych substancji terapeutycznych, zwłaszcza, że wykorzystane związki mają odmienny charakter chemiczny. Ograniczeniem zastosowanej w niniejszej pracy procedury kompleksowania jest przydatność do wiązania substancji o wysokim stosunku dawki do aktywności.

Modyfikację metody opracowanej przy udziale modelowych leków zastosowano również do stabilizowania witaminy K. Uzyskane wyniki udowadniają, że kazeina jest w stanie skutecznie wiązać witaminę K₂ MK-7. Wszystkie uzyskane preparaty zachowują stabilność przez tydzień, nawet przy wilgotności powietrza 56,2%. Preparaty przygotowane na bazie odtłuszczonego białka, pomimo większej zawartości witaminy K na początku eksperymentu, wykazują także największy spadek zawartości MK-7 w czasie. Przeprowadzono również badania przechowywania próbek preparatów nieodtłuszczonych w warunkach względnej wilgotności 40-60% przez 6 miesięcy. Dwie spośród trzech partii zachowywały aktywność po zakończeniu testów starzeniowych. Wykazano także, że na odzysk witaminy K₂ MK-7 negatywnie wpływa obecność chlorku wapnia.

Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki pozwalają wyciągnąć wniosek, że kazeina jest w stanie wiązać substancje o charakterze hydrofobowym oraz, że strącanie kazeiny prowadzi do współstrącenia związanej substancji. Precypitacja preparatów kwasem askorbinowym daje rezultaty porównywalne z kwasem cytrynowym, lecz na korzyść askorbinianu przemawia działanie stabilizujące wobec preparatów wrażliwych na utlenianie.

Jedną z cech charakterystycznych dla białek jest łatwość, z jaką mogą ulegać zmianom pod wpływem różnych czynników chemicznych. Szczególną popularność zyskały tutaj reakcje koniugacji pozwalające na łączenie cząsteczek białka z innymi, niekoniecznie białkowymi cząsteczkami. W niniejszej pracy techniką koniugacji posłużono się do związania kazeiny z kwasem α -liponowym. Związek ten stosowany jest jako suplement diety, a jego koniugaty jako substancje terapeutyczne. Kwas α -liponowy jest hydrofobowy, a biodostępność bezwzględna w roztworze wodnym to jedynie 28-38%. Przewyciężenie tych ograniczeń wymaga zastosowania odpowiedniego systemu stabilizacji takiego jak np. koniugacja z nośnikiem białkowym.

Po przeanalizowaniu składu aminokwasowego kazeiny, spośród dostępnych grup chemicznych, jako cel modyfikacji obrano ϵ -aminy obecne w łańcuchach bocznych lizyny. W celu skoniugowania kwasu liponowego z kazeiną zastosowano reakcję acylacji opartą o użycie aktywnego estru *N*-hydroksysukcynoimidu (NHS). Koniugację prowadzono przy pH 6, 7 oraz 8. Charakterystyczna budowa cząsteczki kwasu α -liponowego posłużyła do dalszego sieciowania koniugatów. Koniugaty poddano redukcji i ponownej oksydacji. Wpływ warunków reakcji na właściwości kompleksów białkowych, powstających w wyniku sieciowania, badano przy użyciu spektroskopii FTIR i elektroforezy SDS-PAGE.

Widma FTIR kazeiny niezmodyfikowanej i po modyfikacji chemicznej wykazują wyłącznie niewielkie poszerzenie piku charakterystycznego dla amidu I oraz zwiększenie intensywności piku amidu B. Koniugaty mogą zawierać zwiększoną liczbę wiązań amidowych w porównaniu z niezmodyfikowanym białkiem, lecz jest to trudne do zaobserwowania ze względu na fakt, że wiązania typu C-N oraz N-H, są obecne w białku w postaci wiązań peptydowych. W związku z tym na podstawie uzyskanych widm FTIR nie można wysnuć jednoznacznych wniosków dotyczących skuteczności koniugacji.

Wyniki elektroforezy sugerują powstawanie cząsteczek o bardzo wysokiej masie molekularnej, będących efektem posieciowania koniugatów. Wyniki sugerują, że dializa beztlenowa prowadzi do powstawania cząsteczek o masie większej niż w przypadku dializy tlenowej. Dobrze widoczne są różnice między próbkami w zależności od pH środowiska reakcji. Koniugacja najlepiej zachodzi w środowisku zasadowym, a jej skuteczność spada wraz ze spadkiem pH. W środowisku kwaśnym reakcja zachodzi tylko w przypadku stosowania wysokich stężeń aktywnego estru kwasu α -liponowego. Koniugaty syntezowane w pH 7 i 8 charakteryzują się większą odpornością na redukcję wiązań disiarczkowych oraz mniejszą masą cząsteczkową od produktów reakcji prowadzonej w pH 6.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. MATERIAŁY

4.1.1. Odczynniki

Kazeina

Do badań zastosowano techniczny preparat kazeiny kwasowej (Kazeina Polska Sp. z o. o.).

Tab. 5. Właściwości fizykochemiczne kazeiny na podstawie karty technicznej dołączonej przez producenta.

Parametr	Jednostka	Wynik	Norma
Zawartość wilgoci	%	10,71	ISO ¹⁰ 5550: 2006 (IDF ¹¹ 78: 2006)
pH	-	4,11	ISO 5546: 1979
Wskaźnik nierozpuszczalności w 50°C	cm ³ /1g	0,04	ISO 8156: 2005 (IDF 129: 2005)
Kwasowość wolna w suchej masie	cm ³ _{0,1 N NaOH} /g	0,25	ISO 5547: 2008 (IDF 91:2008)
Zawartość tłuszczu w suchej masie	%	1,68	ISO 5543: 2004 (IDF 127: 2004)
Zawartość popiołu w suchej masie	%	1,96	ISO 5544: 1978
Zawartość białka w suchej masie	%	95,46	ISO 5549: 1978
Wielkość ziarna	Mesh	30	-
Właściwości sensoryczne	-	Proszek o barwie od białej do mlecznej bez obcych zapachów	-

Odczynniki do badań interakcji z metalami

Do badań interakcji kazeiny z metalami II grupy układu okresowego użyto uwodnionych chlorków metali (Chempur): magnezu chlorek 6 hydrat, cz.d.a.; baru chlorek 2 hydrat, cz.d.a.; strontu chlorek 6 hydrat, cz.d.a.; wapnia chlorek 6 hydrat, cz.d.a.

Odczynniki do atomowej spektrometrii emisyjnej MP-AES

W badaniach zastosowano standardy badanych metali ($c=1000\pm 5$ mg/cm³) –Mg, Ca, Sr, Ba (SPEX CertiPrep) oraz wodę dejonizowaną o przewodności elektrycznej $\leq 0,05$ μ S/cm.

Leki

Kazeinę kompleksowano z trzema lekami: paracetamolem {acetaminofen; nazwa IUPAC N-(4-hydroksyfenilo)acetamid; nr CAS 103-90-2}, ibuprofenem {nazwa IUPAC kwas 2-[4-(2-metylopropylo)fenilo]propanowy; nr CAS 15687-27-1} i loperamidem {chlorowoderek loperamidu; nazwa IUPAC 4-[4-(4-chlorofenylo)-4-hydroksypiperidyn-1-ylo]-N,N-dimetylo-

¹⁰ ISO – międzynarodowa organizacja normalizacyjna (ang. *International Organization for Standardization*).

¹¹ IDF – międzynarodowa federacja mleczarska (ang. *International Dairy Federation*).

2,2-difenylobutanamid; chlorowodorek; nr CAS 34552-83-5}. Leki otrzymano dzięki uprzejmości Przedsiębiorstwa Produkcji Farmaceutycznej Hasco Lek S.A.

Witamina K2 MK-7

Preparat witaminy K2 MK-7 (menachinon-7) (nr CAS 2124-57-4) (Vitasynth Sp. z o.o.) otrzymano dzięki współpracy z EuroPharma Alliance Sp. z o.o. Witamina K2 MK-7 była przechowywana w temperaturze 2-8°C bez dostępu światła.

Odczynniki do wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC

Wykorzystano następujące odczynniki do HPLC (Avantor Performance Materials Poland S.A.): n-Heksan 99% do HPLC; Tetrahydrofuran (THF) do HPLC; 2-propanol do HPLC; Metanol do HPLC – Super Gradient; Etanol 99,8% do HPLC

Odczynniki do koniugacji

Reakcję koniugacji prowadzono stosując następujące substancje: DCC (N,N'-Dicykloheksylokarbodiimid), puriss., ≥99% (Fluka Chemie GmbH); NHS (N-hydroksysukcynoimid), purum, ≥97% (Fluka Chemie GmbH); DMF (Dimetyloformamid), purum, ~99% (Fluka Chemie GmbH)

Odczynniki do elektroforezy w żelu poli(akrylamidowym) w obecności dodecylosiarczanu sodu SDS-PAGE

Zastosowano następujące odczynniki: akrylamid, purum, ≥98.0% (Sigma-Aldrich); N,N'-metylenobis(akrylamid), 99% (Sigma-Aldrich); Tris [Tris(hydroksymetylo)aminometan], Pufferan Buffer Grade, ≥99,3% (Carl Roth GmbH + Co. KG); SDS (dodecylosiarczan sodu), ≥98% (Fluka Chemie GmbH); APS (nadsiarczan amonu), cz.d.a. (Chempur); N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED), ~99% (Sigma-Aldrich); glicyna, cz.d.a. wsk. (Eurochem BGD Sp. z o.o.); glicerol bezwodny, cz. (Chempur); 2-merkptoetanol, min. 98% (Sigma-Aldrich); barwnik do białek Bluestain Sensitive Plus (EURx Sp. z o.o.)

Roztwory zastosowane do przeprowadzenia elektroforezy miały następujący skład:

- Bazowy roztwór akrylamidu 30% (Akrylamid:N,N'-Metylenobisakrylamid 29:1)
- Bufor do nakładania białek, redukujący (0,125 M Tris pH 6.8, 3% SDS, 20% sacharoza, 20% glicerol, 0,02% błękit bromofenolowy, 10% 2-merkptoetanol)
- Bufor do nakładania białek, nieredukujący (0,125 M Tris pH 6.8, 3% SDS, 20% sacharoza, 20% glicerol, 0,02% błękit bromofenolowy)
- Bufor do elektroforezy białek (0,3%Tris, 1,46% glicyna, 0,1% SDS)
- Barwnik do białek na bazie błękitu Coomassie (0,1% błękit Coomassie, 45% metanol, 10% kwas octowy)
- Odbarwiacz do białek (45% metanol, 10% kwas octowy)

Odczynniki do badań mikrobiologicznych

Bakteriofag T4 wywodzący się z kolekcji ATCC (ang. American Type Culture Collection) oraz wzorcowy szczep bakterii *Escherichia coli* B pochodzący z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów, a otrzymano je dzięki współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej im.

Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk. Wzorcowy szczep *E. coli* B na podłożu agar MacConkeya oraz lizat zawierający fagi T4 o mianie $1,85 \cdot 10^8$ PFU/cm³ przechowywano w temperaturze 4 °C.

Do badań wykorzystano standardowe pożywki i odczynniki mikrobiologiczne (BTL Polska sp. z o.o.; Biomaxima S.A.), a w tym: Agar MacConkeya, pepton K (trypton), ekstrakt wołowy, ekstrakt drożdżowy, aminobak, agar mikrobiologiczny, a także agarozę do biologii molekularnej (Bioline)

Pozostałe odczynniki

Oprócz substancji wymienionych powyżej stosowano standardowe odczynniki stanowiące wyposażenie laboratorium

4.1.2. Aparatura

W badaniach korzystano z następującej aparatury:

- Ciepłarka laboratoryjna POL-EKO CLW53STD
- Liofilizator Christ Typ 1102
- Łaźnia wodna z wytrząsaniem Elpan type 357
- Mineralizator mikrofalowy Berghoff speedwave MWS 2
- Spektrofotometr UV-VIS Jasco V-630
- Spektrometr emisyjny Agilent MP-AES 4200
- System do pionowej elektroforezy żelowej Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell wraz z jednostką zasilającą Bio-Rad PowerPac Basic
- System do pionowej elektroforezy żelowej C.B.S. Scientific DSG-170-02 wraz z jednostką zasilającą Uniequip Unipack 250
- System oczyszczania wody Merck Millipore Direct-Q 3 UV
- Termoblok Biosan Bio TDB-100
- Waga analityczna Mettler Toledo XS105DU/M
- Waga analityczna Radwag WPA 180/C/1
- Waga laboratoryjna Radwag PS 600/C/2
- Wąż dializacyjny Serva Visking 20/32 (MWCO 12 000-14 000, średnica porów ok. 25 Å)
- Wirówka Hettich Mikro 22R
- Wirówka MPW Med Instruments MPW-352R
- Wirówka Thermo Scientific Sorvall X1R
- Wirówko-worteks Biosan FVL-2400N Combi-Spin
- Worteks Biosan V-1 plus
- Wytrząsarka Heidolph REAX top
- Wysokosprawny chromatograf cieczerw Thermo Fisher Scientific UltiMate 3000 wyposażony w 4-składnikową pompę analityczną, termostatowany autosampler, piec kolumny oraz detektor UV-VIS
- Rotator Stuart SB3
- Kolumna chromatograficzna Waters Symmetry C18 4,6 × 75 mm 3,5µm
- Kolumna chromatograficzna Waters Symmetry C18 4,6 × 250 mm 5µm
- Standardowe szkło laboratoryjne
- Standardowe polimerowe naczynia i akcesoria laboratoryjne
- Pozostałe materiały stanowiące standardowe wyposażenie laboratorium

4.2. METODY

4.2.1. Wyznaczanie współczynnika zobojętniania kazeiny

Na wadze analitycznej odważono 1,0005 g kazeiny kwasowej. Do odważki dodano 20 cm³ 0,1 M NaOH i mieszano na łaźni wodnej o temperaturze 60 °C do całkowitego zawieszenia kazeiny. Zawiesinę wirowano przy przeciążeniu 36000×g przez 1h w temperaturze 25 °C. Supernatant przeniesiono do kolby, a następnie trzykrotnie pobrano po 3 cm³ i przeniesiono do osobnych kolb. Do każdej kolby dodano po 7 cm³ dH₂O i miareczkowano wobec fenoloftaleiny 0,1055 M HCl do zaniku malinowej barwy. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono zawartość NaOH w supernatantach. Na podstawie różnicy określono ilość NaOH zneutralizowaną przez kazeinę. Na tej bazie określono ilość moli NaOH niezbędną do zneutralizowania 1 g kazeiny kwasowej.

4.2.2. Średnia masa molowa kazeiny

Średnią masę molową kazeiny policzono posługując się średnią ważoną arytmetyczną według wzoru:

$$\overline{M}_{cas} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i M_i}{\sum_{i=1}^n w_i}, \text{ gdzie}$$

w_i – procentowy udział danej frakcji kazeiny

M_i – masa molowa danej frakcji kazeiny

Masy molowe poszczególnych frakcji zostały obliczone przy pomocy narzędzia ExPASy ProtParam [278, 279] korzystając z sekwencji aminokwasowych pochodzących z bazy danych UniProt [9–12]. Jako wagi przyjęto zawartość procentową frakcji kazein w mleku krowim [4] (Tab. 6).

Tab. 6. Masy molowe i zawartość procentowa poszczególnych frakcji kazeiny.

Frakcja	Numer dostępowy Swiss Prot/TrEMBL	Masa molowa (g/mol)	Udział frakcji (%)
α _{s1}	P02662	22,97487	40
α _{s2}	P02663	24,34855	10
β	P02666	23,58329	36
κ	P02668	18,97442	14

4.2.3. Immobilizacja bakteriofagów

4.2.3.1. Strącanie kazeiny solami metali

Sporządzono ~10% roztwór kazeiny: 1 g kazeiny zawieszono w 10 cm³ wody destylowanej i dodano 1 cm³ 1M NaOH, a następnie mieszano na łaźni wodnej o temperaturze 60 °C do całkowitego rozpuszczenia, po czym wystudzono.

Przy użyciu pipety Pasteura roztwór kazeiny wkrapiano do roztworów:

- 1 M kwasu solnego,
- 1 M chlorku wapnia,
- 1M chlorku baru
- 1M chlorku strontu
- 1M chlorku magnezu

4.2.3.2. Badanie interakcji kazeiny z jonami metali ziem alkalicznych

Wiązanie metali

Sporządzono 50 cm³ ~10% roztworu kazeiny. Roztwór dodawano po kropli do 1 M roztworu chlorków: magnezu, wapnia, strontu oraz baru.

Precypitaty uzyskane przy udziale chlorków wapnia, strontu i baru wirowano przy przeciążeniu 4227×g przez 1,5 min w temperaturze 25 °C po czym przepłukiwano wodą destylowaną. Czynność powtórzono pięciokrotnie. Uzyskane osady przeniesiono do wężyków dializacyjnych.

Próbkę uzyskaną przy udziale chlorku magnezu zwirowano jednokrotnie i przeniesiono w formie ciekłej do wężyka dializacyjnego.

Próbki dializowano czterokrotnie w temp. 4 °C po 24h do wody destylowanej z dodatkiem 0,05% NaN₃ i jednokrotnie 24h do wody destylowanej. Następnie próbki po dializie zamrożono w temp. -20 °C, a następnie wysuszono przez liofilizację. Próbki po liofilizacji oraz próbkę kazeiny kwasowej poddano mineralizacji.

Mineralizacja

Naważono po 200 mg materiału w naczyniach do mineralizacji wykonanych z PTFE¹² i dodano po 5 cm³ HNO₃, a następnie delikatnie wymieszano. Odczekano 20 min., po czym zamknięto. Naczynia ogrzewano w reaktorze mikrofalowym korzystając z programu dedykowanego do trawienia mleka w proszku (Tab. 7).

Po zakończeniu mineralizacji odczekano 20 min. pozwalając na ostygnięcie naczyń. Naczynia otwarto pod wyciągiem i przeniesiono ich zawartość do kolb miarowych o objętości 10 cm³ i dopełniono wodą destylowaną.

Tab. 7. Program użyty do mineralizacji kazeiny.

Etap	1	2	3
T [°C]	150	200	100
Moc [%]	80	90	40
Czas [min]	10	20	10

Zmineralizowane próbki zbadano pod kątem zawartości metali korzystając ze spektrometrii MP-AES.

¹² PTFE (ang. *PolyTetraFluoroEthylene*) – poli(tetrafluoroetylen).

Atomowa spektrometria emisyjna MP-AES

Badane próbki zostały przefiltrowane przez filtry nitrocelulozowe o średnicy porów 0,2 µm. Próbki zawierające zbyt duże stężenia analitów zostały stosownie rozcieńczone wodą dejonizowaną.

W celu oznaczenia stężenia metali zastosowano technikę atomowej spektrometrii emisyjnej. Roztwory kalibracyjne sporządzono rozcieńczając standardy tuż przed użyciem. Wszystkie roztwory przechowywano w temperaturze pokojowej.

Kalibrację przeprowadzono zgodnie z normą ISO 8466-1 *Jakość wody – Kalibracja i ocena metod analitycznych oraz szacowanie ich charakterystyk – Cz. 1: Statystyczna ocena liniowej funkcji kalibracji*. Sześć roztworów wzorcowych zawierających różne stężenia danego metalu zostało przygotowanych do celów walidacyjnych. Każdy roztwór badano trzykrotnie. Uzyskane dane posłużyły do obliczenia dolnej granicy oznaczalności i współczynnika korelacji. Wyniki walidacji przedstawia Tab. 8.

Tab. 8. Parametry analityczne i walidacyjne analizy MP AES.

Pierwiastek	Długość fali [nm]	Kalibracja	Zakres krzywej kalibracyjnej [mg/l]	Dolna granica oznaczalności [µg/l]	Współczynnik korelacji
Mg	403,076	Liniowa	1,0-20,0	5,8	0,99998
Ca	393,366	Liniowa	1,0-5,0	9,3	0,99952
Sr	407,771	Nieliniowa	2,0-10,0	3,9	0,99994
Ba	455,403	Liniowa	2,0-10,0	3,0	0,99980

Wyniki dla próbek przeliczono zgodnie ze stosowanymi rozcieńczeniami tak, by wyniki były wyrażone w mg/g próbki i skorygowano przez odjęcie wartości uzyskanych dla próby zerowej (kazeiny). Zdolność kazeiny do wiązania danego metalu wyrażono jako stosunek ilości moli danego metalu, który wiązany jest przez jeden mol kazeiny:

$$W = \frac{\frac{C_{\text{met}} \cdot 10^{-3}}{M_{\text{met}}}}{\frac{1 - C_{\text{met}} \cdot 10^{-3}}{M_{\text{cas}}}}, \text{ gdzie}$$

C_{met} – stężenie danego metalu wyrażone w mg/g próbki,

M_{met} – masa molowa danego metalu [g/mol],

M_{cas} – średnia masa molowa kazeiny – 22,77121 g/mol

4.2.3.3. Sterylizacja kazeiny

Steryлизację kazeiny kwasowej prowadzono przy użyciu kilku metod.

Naświetlanie promieniowaniem UV

Naważkę kazeiny rozprowadzono na powierzchni sterylnej szalki Petriego i naświetlano promieniowaniem UV-C przez okres 1 h. Następnie proszek przeniesiono do sterylnej naczynia i zawieszono w sterylnej wodzie destylowanej.

Obróbka ultradźwiękowa

Naważkę kazeiny zawieszono w sterylnej wodzie destylowanej, a następnie poddano działaniu ultradźwięków na łaźni ultradźwiękowej przez 1 h przy częstotliwości 35 kHz.

Promieniowanie mikrofalowe

Naważkę kazeiny zawieszono w sterylnej wodzie destylowanej, a następnie trzykrotnie podgrzewano przy użyciu promieniowania mikrofalowego do momentu zagotowania. Promieniowanie mikrofalowe było generowane w kuchence mikrofalowej o mocy 800 W.

Metoda łączona

Naważkę proszku kazeiny naświetlano promieniowaniem UV-C przez 1 h, po czym przeniesiono do sterylnego naczynia i zawieszono w sterylnej wodzie destylowanej. Następnie próbki inkubowano w łaźni ultradźwiękowej przez 1 h przy częstotliwości 35 kHz, po czym trzykrotnie podgrzewano przy użyciu promieniowania mikrofalowego do momentu zagotowania.

Sterylizacja w autoklawie

Naważkę kazeiny umieszczono w szklanym naczyniu i wysterylizowano pod zwiększonym ciśnieniem, przy temp. 121°C, a następnie zawieszono w sterylnej wodzie destylowanej.

Sterylizacja radiacyjna

Steryлизację radiacyjną przeprowadzono we współpracy z Międzyresortowym Instytutem Techniki Radiacyjnej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej.

Naważki kazeiny umieszczono w szklanych ampułkach, a następnie zamknięto je poprzez zatapianie wylotów w płomieniu palnika i zaciśnięciu uplastycznionego wylotu.

Tak przygotowane ampułki sterylizowano poprzez naświetlanie wiązką przyspieszonych elektronów o sumarycznej dawce promieniowania 2, 5, 10 lub 25 kGy. Próbki napromieniano z szybkością 6,5 kGy/min. Czas trwania pojedynczego pulsu wynosił 9 μ s, a częstotliwość pulsacji 20 Hz.

Ocena skuteczności sterylizacji przez posiew powierzchniowy

Po zakończeniu sterylizacji próbki kazeiny rozpuszczano przez dodanie 1M NaOH zgodnie z wyznaczonym współczynnikiem zobojętniania. Tak uzyskane roztwory posiewano powierzchniowo na podłoże ½ agar. Próbkę ślepią stanowił roztwór kazeiny niepoddawany sterylizacji. Po 24h inkubacji w temp. 37 °C oceniano wzrost mikroorganizmów. Badanie prowadzono jakościowo, więc pojawienie się co najmniej jednej kolonii bakteryjnej uznawano za oznakę niesterylności próbki.

Przygotowanie próbek do analizy elektroforetycznej w żelu poli(akrylamidowym) w obecności dodecylosiarczanu sodu SDS-PAGE

Do analizy elektroforetycznej wybrano próbki sterylizowane radiacyjnie dawką 2, 5, 10 i 25 kGy oraz próbki sterylizowane w autoklawie w trzech wariantach. Jako próbę odniesienia zastosowano próbkę kazeiny niesterylizowanej.

W wariacie pierwszym naważkę kazeiny umieszczono w szklanym naczyniu i wysterylizowano w autoklawie, a następnie zawieszono w sterylnym 40% (w/v) roztworze glicerolu. W wariacie drugim sterylizacji poddano kazeinę zawieszoną w 40% (w/v) roztworze glicerolu. Trzeci wariant polegał na sterylizacji kazeiny zawieszonej w wodzie destylowanej i dodaniu sterylnego glicerolu po sterylizacji w ilości pozwalającej uzyskać końcowe stężenie w próbce wynoszące 40% (w/v).

Do każdej z próbek dodano roztwór NaOH zgodnie ze współczynnikiem zobojętniania kazeiny. Roztwory następnie poddano analizie metodą elektroforezy SDS-PAGE.

4.2.3.4. Przygotowanie niewypełnionych sfer

Sporządzono 10% roztwór kazeiny zgodnie z opracowanym wcześniej współczynnikiem zobojętniania oraz 10% roztwór kazeiny zawierający 40% (w/v) glicerolu. Roztwory wytrącano przez wkrapianie objętości 20 mm³ do 1M roztworu CaCl₂.

Dodatkowo 10% roztwór kazeiny zawierający 40% (w/v) glicerolu wkrapiano do 1M roztworu CaCl₂ zawierającego 20% (v/v) etanolu oraz do 1M roztworu CaCl₂ zawierającego 1% (w/v) dodecylosiarczanu sodu.

4.2.3.5. Namnażanie bakteriofagów

Namnażanie bakteriofagów T4 przeprowadzono zgodnie z metodyką opracowaną przez Szermer-Olearnik i Boratyńskiego [280, 281] z pewnymi modyfikacjami.

Sporządzono bulion odżywczy o składzie procentowym (w/v): 0,04% ekstrakt wołowy; 0,54% pepton K; 0,17% ekstrakt drożdżowy; 0,4% aminobak. Składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej i wysterylizowano w autoklawie po czym dodano sterylną glukozę osiągając stężenie 1%. Pożywkę zaszczerpiono inokulum bakterii *E. coli* B i inkubowano przez 24 h w temperaturze 37 °C.

Po czasie inkubacji dokonano pomiaru OD₆₀₀¹³ w celu określenia ilości bakterii w hodowli. Następnie hodowlę zaszczerpiono fagiem w proporcji 0,02 PFU/komórkę bakteryjną. Namnażanie bakteriofagów w komórkach bakteryjnych prowadzono w temperaturze 37 °C przez 24 h.

Powstały w ten sposób lizat przefiltrowano przez filtr membranowy o średnicy porów 0,45 µm i dodano MgCl₂ do końcowego stężenia 0,02 M. Filtrat przechowywano w temp. 4 °C do czasu oczyszczenia chloroformem.

Oczyszczanie chloroformem przeprowadzono zgodnie z metodyką Bonilli i wsp. [282]: do lizatu dodano 0,1 objętości chloroformu, zamieszano i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę wirowano przy przeciążeniu 4000×g przez 5 min, a powstały

¹³ OD₆₀₀ o wartości 1,0 równe jest 8·10⁸ komórek/ml.

supernatant przeniesiono do sterylnego naczynia. Oczyszczony lizat przechowywano w temp. 4 °C. Użycie chloroformu było wymuszone przez zastosowaną metodykę, a procedurę zrealizowano zgodnie z przepisem.

Miano lizatu przed i po oczyszczeniu określono stosując metodę płytek dwuwarstwowych.

4.2.3.6. Oznaczanie liczebności bakteriofagów

Liczebność bakteriofagów określano technikami mikrobiologicznymi stosując metodę płytek dwuwarstwowych. Do tego celu wykorzystano zmodyfikowaną metodykę autorstwa Santosa i wsp. [283] opartą na klasycznej metodzie Adamsa [284].

Dzień przed badaniem zaszczerpiono bulion LB (1% pepton K; 0,5% ekstrakt drożdżowy; 1% NaCl) inokulum *E. coli* B i inkubowano w temperaturze 37 °C przez noc.

Roztwór, w którym oznaczano liczebność fagów, rozcieńczano seryjnie w buforze SM (zawierającym w 100 cm³ 0,58 g NaCl; 0,2 g MgSO₄·7H₂O oraz 5 cm³ 1M Tris-HCl o pH 7,4). Zastosowano rozcieńczenia dziesiętne.

Następnie po 100 mm³ z każdego rozcieńczenia dodawano do probówek zawierających 4 cm³ górnego agaru (bulion LB żelowany 0,4% agarozą) o temperaturze 42 °C, po czym po 100 mm³ nocnej hodowli bakteryjnej.

Każdą z probówek worteksowano, a następnie jej zawartość wylewano na szalki Petriego zawierające warstwę agaru dolnego (bulion LB zestalony 1,2% agaru i wzbogacony o 5% glicerolu). Po wystygnięciu płytki obrócono wierzchem do dołu i inkubowano w 37 °C przez noc. Następnego dnia policzono łysinki widoczne na murawie bakteryjnej.

Liczebność bakteriofagów wyznaczono przez obliczenie miana wyrażonego w jednostce PFU/cm³ (ang. *Plaque Forming Unit* – jednostka tworząca łysinkę) według wzoru:

$$M = n \cdot \frac{1}{V_p} \cdot R, \text{ gdzie}$$

M – miano bakteriofaga [PFU/cm³]

n – liczba łysinek na płytce

V_p – objętość roztworu zawierającego faga użyta do posiewu [cm³]

R – krotność rozcieńczenia

4.2.3.7. Immobilizacja bakteriofaga T4

Procedura pułapkowania

W sterylnej butelce sporządzono 10 cm³ roztworu składającego się z 1 g kazeiny sterylizowanej radiacyjnie (próbka nr 5); 1 cm³ NaOH i 8 cm³ sterylnego 50% roztworu glicerolu.

Do roztworu kazeiny dodano 1 cm³ lizatu zawierającego faga. Roztwór kazeiny wkrapiano do jałowego 1M roztworu chlorku wapnia zawierającego 20% etanolu.

Wydajność pułapkowania

Sfery sporządzono poprzez wkropienie 200 mm³ roztworu kazeiny z bakteriofagami do 2 cm³ 1M roztworu chlorku wapnia zawierającego 20% etanolu. W tej procedurze uzyskiwano ok. 10 sfer. Procedurę powtórzono dwukrotnie.

W pierwszym powtórzeniu po 5 min sfery wydobyto z roztworu sterylną eżą i przeniesiono do sterylnego moździerza. Sfery zhomogenizowano dodając porcjami 10 cm³ buforu SM. W drugim powtórzeniu po 5 min sfery wraz z roztworem chlorku wapnia zhomogenizowano w moździerzu dodając porcjami 8 cm³ buforu SM. Dla obydwu powtórzeń wykonano szereg rozcieńczeń seryjnych i oznaczono liczebność bakteriofagów.

Wydajność pułapkowania obliczono stosując wzór:

$$W = \frac{M_k}{M_c} \cdot 100\%, \text{ gdzie}$$

W – wydajność pułapkowania

M_k – miano immobilizowanych fagów

M_c – miano fagów całego roztworu (sfery wraz z otaczającym roztworem)

4.2.4. Wiązanie związków niskocząsteczkowych z kazeiną

4.2.4.1. Odtłuszczenie kazeiny

Odtłuszczenie kazeiny prowadzono przez ekstrakcję tłuszczów do n-heksanu. Naważki sproszkowanej kazeiny zalano n-heksanem i inkubowano przez noc. Po ekstrakcji naważki kilkakrotnie przepłukano n-heksanem i odsączono, a następnie pozostawiono do wysuszenia.

4.2.4.2. Kompleksowanie leków

Użyte do badań substancje będące lekami miały charakter modelowy.

Przygotowano etanolowe roztwory loperamidu, ibuprofenu i paracetamolu o stężeniach wynoszących 1, 4 i 5% (w/v) poprzez odważenie odpowiedniej ilości leku i rozpuszczenie w 96% etanolu.

Roztwory kazeiny sporządzono zgodnie z wyznaczonym współczynnikiem zobojętniania i w stężeniach zależnych od tego, który lek był poddawany kompleksowaniu. Stężenia roztworów kazeiny do badań z udziałem loperamidu, ibuprofenu i paracetamolu wynosiły odpowiednio 4,5; 3 oraz 2,5% (w/v).

Badania nad wiązaniem leków prowadzono stosując dwa warianty kazeiny – odtłuszczonej i nieodtłuszczonej. Procedura przygotowania roztworów leków i kazeiny była identyczna dla wariantu odtłuszczonego i nieodtłuszczonego.

Do 20 cm³ roztworu kazeiny dodawano kroplami po 10 cm³ 96% etanolu, a następnie po 10 cm³ etanolowego roztworu danego leku na mieszaniu z użyciem mieszadła magnetycznego. Nadmiar etanolu usuwano przy użyciu pompy próżniowej.

Następnie przeprowadzono koprecypitację kazeiny z lekami. Proces ten prowadzono przy mieszaniu poprzez wkrapianie 1M roztworu CaCl₂ do momentu w którym dodatkowe ilości soli nie powodowały zwiększenia ilości powstającego osadu przy ocenie wizualnej albo 1 M

roztworów kwasu cytrynowego i askorbinowego i pomiarze pH-metrem do osiągnięcia pH~4 – w tym pH nie obserwuje się występowania miceli, co pozwala zakładać że kazeina jest w formie całkowicie nierozpuszczalnej [31].

Liofilizowane próbki poddano analizie chromatograficznej HPLC. Warunki analizy podano w sekcji 4.2.4.4

Zawartość leków w badanych preparatach obliczono korzystając ze wzoru:

$$C_{\text{mg/g}} = \frac{A_{\text{sm}} \times d_{\text{sm}} \times m_{\text{wz}}}{A_{\text{wz}} \times d_{\text{wz}} \times m_{\text{sm}}} \times 1000, \text{ gdzie}$$

$C_{\text{mg/g}}$ – zawartość związku badanego wyrażona w mg/g,
 A_{sm} – pole powierzchni pod pikiem dla analizy próbki badanej,
 d_{sm} – współczynnik rozcieńczenia próbki badanej,
 m_{sm} – masa naważki próbki badanej,
 A_{wz} – pole powierzchni pod pikiem dla analizy wzorca,
 d_{wz} – współczynnik rozcieńczenia wzorca,
 m_{wz} – masa naważki wzorca

Wyniki dodatkowo przeliczono na stosunek ilości moli wiązanego leku, do jednego mola kazeiny zgodnie ze wzorem:

$$W = \frac{\frac{C_{\text{mg/g}} \cdot 10^{-3}}{M_{\text{lek}}}}{\frac{1 - C_{\text{lek}} \cdot 10^{-3}}{M_{\text{cas}}}}, \text{ gdzie}$$

$C_{\text{mg/g}}$ – zawartość związku badanego wyrażona w mg/g,
 M_{lek} – masa molowa danego leku [g/mol],
 M_{cas} – średnia masa molowa kazeiny – 22,77121 g/mol

4.2.4.3. Kompleksowanie witaminy K2 MK-7

Wiązanie witaminy K2 MK-7

Roztwór witaminy K2 MK-7 sporządzono poprzez odważenie 0,406 g wit. K2 MK-7 i dodanie 10 cm³ n-heksanu. Rozpuszczanie witaminy K2 MK-7 przyspieszono poprzez umieszczenie mieszaniny na kilka sekund w łaźni ultradźwiękowej. Roztwór przechowywano w warunkach zapewniających brak dostępu światła.

Badania nad wiązaniem witaminy K2 MK-7 prowadzono stosując dwa warianty kazeiny – odtłuszczonej i nieodtłuszczonej. Procedura przygotowania roztworów leków i kazeiny była identyczna dla wariantu odtłuszczonego i nieodtłuszczonego.

Roztwory kazeiny sporządzono poprzez odważenie po 2 g kazeiny i dodanie po 40 cm³ wody destylowanej i 2 cm³ 1M NaOH. Mieszaniny wytrząsano na łaźni wodnej w temp. 60 °C do czasu zawieszenia się białka, a następnie pozostawiono do schłodzenia.

Sporządzono 1 M roztwory kwasu askorbinowego, kwasu cytrynowego i chlorku wapnia.

Bezpośrednio przed przeprowadzeniem kompleksowania roztwór wit. K2 MK-7 w heksanie rozcieńczano 10 krotnie izopropanolem. Do odpowiedniego roztworu kazeiny dodawano kroplami 10 cm³ izopropanolowego roztworu wit. K2 MK-7 na mieszanii z użyciem mieszadła magnetycznego. Nadmiar rozpuszczalników organicznych (izopropanol, heksan) usuwano przy użyciu pompy próżniowej.

Następnie przeprowadzono koprecypitację kazeiny z witaminą K2 MK-7 przy mieszanu miesadłem magnetycznym poprzez wkrapianie 1 M roztworów kwasu cytrynowego i askorbinowego i pomiarze pH-metrem do osiągnięcia pH~4 albo 1M roztworu CaCl₂ do momentu, w którym dodatkowe ilości soli nie powodowały zwiększenia ilości powstającego osadu przy ocenie wizualnej.

Uzyskane próbki liofilizowano po czym metodą chromatografii HPLC określono zawartość witaminy K2 MK-7 w uzyskanych preparatach.

Wyznaczanie stabilności preparatów

Do fiolek chromatograficznych (szkło brązowe) naważono około 200 mg odpowiedniego preparatu. Naważki energicznie mieszano przez 15 minut. Następnie fiołki wstawiono do eksykatora o odpowiedniej wilgotności (2%, 11%, 56%, 98%). Po upływie około 24 h i 7 dni pobrano porcję każdej z próbek do analizy zawartości witaminy K2 MK-7 metodą chromatografii HPLC.

Dodatkowo próbki przygotowane na nieodtłuszczonej kazeinie pozostawiono w eksykatorze o wilgotności powietrza 40-60% na 6 miesięcy. Po tym czasie próbki przebadano pod kątem zawartości witaminy K2 MK-7 przy użyciu chromatografii HPLC. Warunki analizy podano w sekcji 4.2.4.4.

Obliczenia zawartości witaminy K2 MK-7 w badanej próbce dokonano korzystając z krzywej kalibracyjnej o wzorze: $y=351,052x-0,0412$.

Przeliczenia uzyskanych wyników na mg/g dokonano przy użyciu wzoru:

$$C_{\text{mg/g}} = \frac{C_{\text{ap}} \cdot V}{m_p} \cdot 1000, \text{ gdzie}$$

$C_{\text{mg/g}}$ – zawartość witaminy MK-7 w badanej populacji wyrażona w mg/g,
 C_{ap} – zawartość witaminy MK-7 wyznaczona metodą chromatograficzną [mg/cm³],
 V – iloczyn objętości poszczególnych etapów przygotowania próbki [cm³],
 m_p – masa naważki badanego preparatu [mg].

Obliczenie odzysku witaminy MK-7 dla wzorca wykonano przy użyciu wzoru:

$$C_{\%} = \frac{C_{\text{ap}} \cdot V}{m_n \cdot P_w} \cdot 100\%, \text{ gdzie}$$

$C_{\%}$ – odzysk dla witaminy MK-7 wyrażony w procentach,
 C_{ap} – zawartość witaminy MK-7 wyznaczona metodą chromatograficzną [mg/cm³],
 V – iloczyn rozcieńczeń na poszczególnych etapach przygotowania próbki [cm³],
 m_n – masa naważki standardu [mg],
 P_w – czystość standardu [%].

4.2.4.4. Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC

Zawartość ibuprofenu, paracetamolu, loperamidu i witaminy K2 M-7 zbadano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Badania prowadzono we współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

w laboratorium posiadającym certyfikat GLP¹⁴. Zbieranie danych, analizę oraz raportowanie wykonano za pomocą oprogramowania Chromeleon.

Standardy nważono w odpowiedniej ilości (po 11 mg dla leków i 5,68 mg dla K2 MK-7) do kolby miarowej o pojemności 10 cm³ i rozpuszczono w około 5-7 cm³ heksanu, a następnie uzupełniono do 10 cm³ heksanem. Przeniesiono 1 cm³ do kolby miarowej i rozcieńczono 2-propanolem. Lek i rozcieńczono dziesięciokrotnie, podczas gdy witaminę K2 MK-7 pięćdziesięciokrotnie. Następnie po 0,2 cm³ każdego z roztworów przeniesiono do fiolek chromatograficznych i wykonano analizę chromatograficzną.

Preparaty kazeinowe rozdrobniono w moździerzu bezpośrednio przed analizą. Następnie odważono odpowiednie ilości materiału badanego (po 50 mg dla preparatów leków i 20-40 mg dla preparatów zawierających K2 MK-7) do 15 cm³ próbówki wirówkowej, po czym dodano 1 cm³ wody dejonizowanej. Próbkę inkubowano przez 90 minut w temperaturze 37°C, przy czym co 15 minut mieszając na wortexie. Następnie dodano 9 cm³ tetrahydrofuranu do HPLC i inkubowano kolejne 90 minut w temperaturze pokojowej, co 15 minut mieszano na wortexie. Następnie pobrano po 1,5 cm³ do próbek Eppendorfa i wirowano przez 5 minut przy przeciążeniu 15000×g w temperaturze 4°C. Objętości po 0,2 cm³ supernatantu przeniesiono do fiolek chromatograficznych i wykonano analizę chromatograficzną w warunkach przedstawionych w Tab. 9.

Tab. 9. Warunki chromatograficzne.

Badana substancja	Paracetamol	Ibuprofen	Loperamid	Witamina K2 MK-7
	A. H ₂ O 0,1% FA (kwas mrówkowy) B. Acetonitryl 0,1% FA			C. Metanol D. Etanol
Faza ruchoma	90%A:10%B (v/v)	Elucja gradientowa: 0 min – 5%B 1 min – 5%B 10 min – 95%B 11 min – 95%B 12 min – 5%B 16 min – 5%B		70%C:30%D (v/v)
Długość fali użyta do detekcji [nm]	244	220		248
Czas analizy [min]	6	16		20
Kolumna	Waters Symmetry C18 4,6 × 75 mm 3,5µm			Waters Symmetry C18 4,6 × 250 mm 5µm
Objętość nasyty [mm ³]	5			20
Przepływ [cm ³ /min]	0,9			1,6
Temperatura termostatowania kolumny [°C]	25			
Temperatura termostatowania próbek [°C]	5			

4.2.5. Koniugacja kazeiny z kwasem alfa-liponowym

4.2.5.1. Analiza składu aminokwasowego kazeiny bydlęcej

Analizę składu aminokwasowego przeprowadzono metodami teoretycznymi przy użyciu sekwencji aminokwasowych frakcji kazeiny pochodzących z bazy danych UniProt [9–12] (Tab.

¹⁴Dobra Praktyka Laboratoryjna (ang. *Good Laboratory Practice*).

10). Zawartość aminokwasowa została obliczona przy pomocy narzędzia ExPASy ProtParam [278, 279]. Następnie uśredniono uzyskane wyniki stosując średnią ważoną arytmetyczną według wzoru:

$$\bar{x}_{aa} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i a_i}{\sum_{i=1}^n w_i}, \text{ gdzie}$$

w_i – procentowy udział danej frakcji kazeiny

a_i – zawartość danego aminokwasu

Jako wagi przyjęto zawartość procentową frakcji kazein w mleku krowim [4].

Tab. 10. Sekwencje aminokwasowe frakcji kazeinowych wraz z ich procentowym udziałem w kazeinie.

Frakcja	Udział frakcji (%)	Sekwencja aminokwasowa
α_{s1}	40	MKLLILTCLVAVALARPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDI GSESTEDQAMEDIKQMEAESISSSEIEVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRK KYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAY PSGAWYVYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
α_{s2}	10	MKFFIFTCLLAVALAKNTMEHVSSSEESIISQETYKQEKNNMAINPSKENLCSTFCKEVV RNANEEEEYSIGSSSEESAEEVATEEVKITVDDKHQKALNEINQFYQKFPQYLQYLYQ GPIVLNPWDQVKRNAVPITPLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVEFTKKTLEEEK NRLNFKKISQRYQKQFALPQYLKTVYQHQAAMKPKWIPKTKVIPYVRYL
β	36	MKVLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQSEEQQTDEL QDKIHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLSLPQNIPLTQTTPVVPFLQPEVMGVSKVKEAM APKHKEMPFKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFP PQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVGRPFPIIV
κ	14	MMKSFFLVVITILALTLPLGAQEQNQEQPIRCEKDERFFSDKIAYIPIQYVLSRPSY GLNYYQKQPVALINNQFLPYYPYAKPAAVRSPAQILQWQVLSNTVPAKSCQAQPTT MARHHPHLSFMAIPPKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVI ESPPEINTVQVTSTAV

4.2.5.2. Synteza aktywnego estru kwasu α -liponowego

Reakcję syntezy estru NHS kwasu α -liponowego prowadzono w dimetyloformamidzie (DMF). Sporządzono roztwory karbodiimidu DCC, N-hydroksysukcynoimidu oraz kwasu α -liponowego o stężeniach ~515 mM poprzez rozpuszczenie odpowiednich naważek w DMF. Następnie do roztworu DCC dodany został 20% nadmiar roztworu kwasu α -liponowego oraz 50% nadmiar roztworu N-hydroksysukcynoimidu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 72 h w temperaturze 4°C. Zaktywowana forma kwasu α -liponowego była wstępnie oczyszczana z wytrącających się kryształów dicykloheksyloizomocznika przez ultrawierowanie przy RCF=11000×g przez 5 min w temperaturze 4°C. Supernatant zawierający aktywny ester przeniesiono do nowej probówki.

4.2.5.3. Synteza koniugatów

Odpowiednie naważki kazeiny rozpuszczono w wodzie destylowanej zneutralizowanej NaOH zgodnie z wyznaczonym współczynnikiem zobojętniania, a następnie rozcieńczono 0,1 M buforem fosforanowym NaOH/NaH₂PO₄ o pH 6, 7 lub 8 osiągając roztwory o stężeniu białka równym 2%. Do każdej próbki dodano roztwór aktywnego estru w stosunku objętościowym 1:5. Reakcję pozostawiono na 30 min.

4.2.5.4. Sieciowanie koniugatów

Do każdej z próbek koniugatów kazeiny i kwasu α -liponowego dodano 2-merkaptoetanol w stosunku objętościowym 1:6. Roztwory pozostawiono na 30 min w celu redukcji mostków disiarczkowych wprowadzonych wraz z kwasem α -liponowym. Następnie roztwory zostały umieszczone w wężykach dializacyjnych w dwóch powtórzeniach.

Dializa, mająca na celu usunięcie 2-merkaptoetanolu oraz pozostałości po syntezie aktywnego estru, prowadzona była do 0,01 M buforu $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ o pH 6,8. Dializa prowadzona była w warunkach tlenowych i beztlenowych. Tlenowe warunki uzyskane zostały przez prowadzenie dializy w otwartych naczyniach z dostępem powietrza, natomiast beztlenowe w naczyniach zamkniętych, w buforze przygotowanym na świeżo destylowanej wodzie, z dodatkiem 0,3% askorbinianu sodu w roli przeciwutleniacza. Dializy prowadzono przez 2 h, po czym dwukrotnie zmieniono bufor na świeży i ponownie dializowano przez 2 h. Trzecia dializa prowadzona była przez 24 h. Po zakończeniu dializy próbki przeniesiono do probówek.

4.2.5.5. Koniugacja i sieciowanie przy różnych stężeniach czynnika sieciującego

Sporządzono roztwory aktywnego estru w DMF o stężeniach 139; 69,5; 34,8 oraz 13,9 mM oraz roztwory kazeiny o stężeniu ~1% i pH 6, 7 lub 8. Do roztworów białka dodawano roztwory aktywnego estru w stosunku objętościowym 1:17, a po 30 min 2-merkaptoetanol w stosunku 1:8. Uzyskane koniugaty dializowano do 0,01M buforu fosforanowego o pH 7,2 zawierającego 0,05% NaN_3 przez 2h, kolejne 2h i 24h a następnie przez 24 h do wody destylowanej z dodatkiem NaN_3 . Dializa prowadzona była zarówno w warunkach dostępności tlenu oraz przy zmniejszonej dostępności tlenu uzyskanej przez zamknięte naczynia i 0,02% dodatek askorbinianu sodu. Po zakończeniu dializy próbki przeniesiono do probówek.

4.2.5.6. Badania spektroskopowe koniugatów w podczerwieni FTIR

Odpowiednie naważki kazeiny rozpuszczono w wodzie destylowanej zneutralizowanej NaOH, a następnie rozcieńczono 0,1 M buforem fosforanowym o pH 8.

Do dwóch próbek dodano aktywny ester kwasu α -liponowego. Reakcję pozostawiono na 30 min. Następnie do jednej z dwóch próbek koniugatów dodano 2-merkaptoetanol w celu redukcji mostków disiarczkowych i pozostawiono na 30 min. Trzecia próbka pozostała bez zmian.

Wszystkie próbki dializowano do 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7 przez 24h, po czym przez 24 h do 0,01 M buforu fosforanowego o pH 7. Następnie przez kolejne 24h przeprowadzono dializę do wody destylowanej w celu usunięcia wolnych jonów nieorganicznych. Próbki liofilizowano, a po wysuszeniu rozdrobiono do postaci proszku.

Próbki poddano analizie metodą spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera FTIR. Widma zostały zmierzone w zakresie średniej podczerwieni (MIR) $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ z rozdzielczością 2cm^{-1} przy użyciu fourierowskiego spektrometru Nicolet-Nexus techniką pastylki KBr.

Widma wyrażone jako procent transmitancji do liczby falowej przeliczono na absorbcję korzystając ze wzoru:

$$A = 2 - \log_{10}(T_{\%}), \text{ gdzie:}$$

A – absorbcja wyrażona w jednostkach absorbcji AU

T% – zmierzona transmitancja wyrażona w procentach

Uzyskane widma nałożono na jeden wykres w celu porównania

Dodatkowo widma trzech wariantów kazeiny znormalizowano wobec pikę zidentyfikowanego jako amid I. Normalizację przeprowadzono przez podzielenie wartości absorbcji w każdym punkcie krzywej przez różnicę pomiędzy najwyższą wartością w pikę amidu I oraz najniższą zmierzoną absorbcją w danym widmie. Widma nałożono na siebie w celu porównania.

4.2.6. Elektroforeza w żelu poli(akrylamidowym) w obecności dodecylosiarczanu sodu SDS-PAGE

Elektroforezę w żelu poli(akrylamidowym) w obecności dodecylosiarczanu sodu [ang. *Sodium Dodecyl Sulfate-Poly(Acrylamide) Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*] [264] prowadzono według zmodyfikowanej metodyki opracowanej przez Wu i Koiwa [285], która pozwala na jednoczesne wylewanie żelu rozdzielającego i zagęszczającego oraz wykazuje poprawioną rozdzielczość.

Elektroforeza kazeiny sterylizowanej

Próbki rozcieńczono do stężenia ok 1mg/cm³. Z każdej próbki pobrano po 20 mm³ i zmieszano z 20 mm³ redukującego buforu do nakładania białek i gotowano przez 5 min. Po schłodzeniu do temperatury otoczenia naniesiono po 10 mm³ każdej próbki do dołków i przeprowadzono elektroforezę.

Próbki rozdzielano w systemie nieciągłym składającym się z górnego żelu zagęszczającego o stężeniu 2,5% i dolnego żelu rozdzielającego o koncentracji 10%. Wymiary żelu wynosiły 100 × 75 cm. Proces prowadzono przy stałym napięciu 50 V przez 10 min, następnie 100 V przez 10 min oraz 150 V do czasu gdy czoło barwnika dotarło do końca żelu.

Po zakończeniu elektroforezy żele umieszczono w pojemnikach z tworzywa polimerowego i dodano wody destylowanej w ilości pozwalającej na całkowite przykrycie żelu, a następnie ogrzewano w kuchence mikrofalowej do momentu zagotowania, po czym pozostawiono pod przykryciem na 5 min. Zdekantowano wodę i dodano barwnik Bluestain Sensitive Plus w ilości pozwalającej na całkowite przykrycie żelu, po czym podgrzano do momentu zagotowania w kuchence mikrofalowej. Żele pozostawiono w środowisku barwnika na 5 min. Zdekantowano barwnik i usunięto jego nadmiar poprzez kilkukrotne płukanie wodą destylowaną.

Żele po wybarwieniu sfotografowano i poddano obróbce graficznej obejmującej normalizację jasności i kontrastu oraz zmianę palety barw na skalę szarości.

Elektroforeza agregatów

Próbki po dializie przeniesiono do nowych próbek. Próbę odniesienia przygotowano poprzez zawieszenie ok. 0,01 g kazeiny w 1 cm³ 0,1 M buforu NaH₂PO₄/NaOH o pH 7 i pięciokrotne rozcieńczenie tym samym buforem. Z każdej próbki pobrano po 20 mm³ i zmieszano z 20

mm³ odpowiedniego buforu do nakładania białek – redukującym lub nieredukującym. Próbki gotowano przez 5 min. Po schłodzeniu do temperatury otoczenia naniesiono po 10 mm³ każdej próbki do dołków i przeprowadzono elektroforezę.

Próbki rozdzielano zarówno w systemie nieciągłym, składającym się z górnego żelu zagęszczającego o stężeniu 2,5% i dolnego 10% żelu rozdzielającego, jak i systemie ciągłym w żelu o koncentracji 10%. Wymiary żelu wynosiły 100 × 75 cm. Skład żelu w systemie ciągłym i dolnego żelu w systemie nieciągłym był identyczny. Każdą elektroforezę wykonano w dwóch powtórzeniach – po jednej dla próbek w warunkach redukujących i nieredukujących.

Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 50 V przez 10 min, następnie 100 V przez 10 min oraz 150 V do czasu gdy czoło barwnika dotarło do końca żelu.

Żele barwiono błękitem Coomassie przez noc. Po tym czasie odbarwiano przez 30 min skoncentrowanym odbarwiaczem, a następnie sześciokrotnie rozcieńczonym odbarwiaczem do czasu całkowitego odbarwienia.

Żele po wybarwieniu sfotografowano i poddano obróbce graficznej obejmującej normalizację jasności i kontrastu oraz zmianę palety barw na skalę szarości.

Elektroforeza agregatów o zmiennym stopniu posieciowania

Próbki przeniesiono po dializie do nowych probówek. Z każdej próbki pobrano po 20 mm³ i zmieszano z 20 mm³ nieredukującego buforu do nakładania białek i gotowano przez 5 min. Po schłodzeniu do temperatury otoczenia naniesiono po 10 mm³ każdej próbki do dołków i przeprowadzono elektroforezę.

Próbki rozdzielano w systemie nieciągłym składającym się z górnego żelu zagęszczającego o stężeniu 2,5% i dolnego 10% żelu rozdzielającego oraz w systemie, w którym stężenie obydwu żeli wynosiło 10%. Wymiary żelu wynosiły 165 × 155 mm. Proces prowadzono przy napięciu 50 V i natężeniu 15mA przez 30 min, następnie 100V i 20mA przez 30 min oraz 250 V i 30 mA do czasu gdy czoło barwnika dotarło do końca żelu. Aparat do elektroforezy wyposażony był w system przepływowego chłodzenia wodą, który zastosowano w celu odprowadzenia ciepła powstającego w wyniku szybkiej migracji białek pod wpływem wysokiego napięcia i natężenia prądu.

Po zakończeniu elektroforezy żele umieszczono w pojemnikach z tworzywa polimerowego i dodano wody destylowanej w ilości pozwalającej na całkowite przykrycie żelu, a następnie ogrzewano w kuchence mikrofalowej do momentu zagotowania, po czym pozostawiono pod przykryciem na 5 min. Zdekantowano wodę i dodano barwnik Bluestain Sensitive Plus w ilości pozwalającej na całkowite przykrycie żelu, po czym podgrzano do momentu zagotowania w kuchence mikrofalowej. Żele pozostawiono w środowisku barwnika na 5 min. Zdekantowano barwnik i usunięto jego nadmiar poprzez kilkukrotne płukanie wodą destylowaną.

Żele po wybarwieniu sfotografowano i poddano obróbce graficznej obejmującej normalizację jasności i kontrastu oraz zmianę palety barw na skalę szarości. Dla każdej ze ścieżek na elektroforegramach sporządzono densytogram przy użyciu oprogramowania ImageJ [286, 287]. Podział na ścieżki przeprowadzono ręcznie. Obrazy densytogramów przekształcono do tabeli danych w układzie współrzędnych XY, po czym zaimportowano do programu Microsoft Excel, przy użyciu którego dokonano dalszej obróbki densytogramów.

LITERATURA

1. Głąb TK, Boratyński J (2017) Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents. *Top Curr Chem (Z)* 375:71. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0158-z>
2. Beezer GR (1940) Latin and Greek roots in chemical terminology. *J Chem Educ* 17:63–66. <https://doi.org/10.1021/ed017p63>
3. Holt C, Carver JA, Ecroyd H, Thorn DC (2013) Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods¹. *Journal of Dairy Science* 96:6127–6146. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6831>
4. Artym J, Zimecki M (2013) Milk-derived proteins and peptides in clinical trials. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 67:800–816. <https://doi.org/10.5604/17322693.1061635>
5. Pereira PC (2014) Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* 30:619–627. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
6. Elzoghby AO, Abo El-Fotoh WS, Elgindy NA (2011) Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 153:206–216. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.010>
7. Caroli AM, Chessa S, Erhardt GJ (2009) Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science* 92:5335–5352. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>
8. Abd El-Salam MH, El-Shibiny S (2012) Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. *International Journal of Dairy Technology* 65:13–21. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00737.x>
9. UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47:D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
10. UniProt Consortium T (2018) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 46:2699–2699. <https://doi.org/10.1093/nar/gky092>
11. Bateman A, Martin MJ, O'Donovan C, et al (2017) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 45:D158–D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
12. UniProt. <https://www.uniprot.org/>. Dostęp 25 Sier 2020
13. Farrell Jr. HM, Malin EL, Brown EM, Qi PX (2006) Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11:135–147. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.005>
14. Livney YD (2010) Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15:73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>
15. Audic J-L, Chaufer B, Daufin G (2003) Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Lait* 83:417–438. <https://doi.org/10.1051/lait:2003027>
16. Fox PF, Brodtkorb A (2008) The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal* 18:677–684. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.002>
17. Swaisgood HE (2003) Chemistry of the Caseins. W: Fox PF, McSweeney PLH (redakcja) *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. Springer US, pp 139–201
18. Kessler A, Menéndez-Aguirre O, Hinrichs J, et al (2014) α s-Casein–PE6400 mixtures: Surface properties, miscibility and self-assembly. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 118:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.030>
19. Anema SG (2018) Spontaneous interaction of lactoferrin with casein micelles or individual caseins. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 48:89–110. <https://doi.org/10.1080/03036758.2018.1439846>
20. de Kruif CG, Huppertz T, Urban VS, Petukhov AV (2012) Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science* 171–172:36–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>
21. Trejo R, Dokland T, Jurat-Fuentes J, Harte F (2011) Cryo-transmission electron tomography of native casein micelles from bovine milk. *Journal of Dairy Science* 94:5770–5775. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4368>

22. De Sa Peixoto P, Silva JVC, Laurent G, et al (2017) How High Concentrations of Proteins Stabilize the Amorphous State of Calcium Orthophosphate: A Solid-State Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Study of the Casein Case. *Langmuir* 33:1256–1264. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04235>
23. Gonzalez-Jordan A, Thomar P, Nicolai T, Dittmer J (2015) The effect of pH on the structure and phosphate mobility of casein micelles in aqueous solution. *Food Hydrocolloids* 51:88–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.024>
24. Tagliabracci VS, Engel JL, Wen J, et al (2012) Secreted Kinase Phosphorylates Extracellular Proteins That Regulate Biomineralization. *Science* 336:1150–1153. <https://doi.org/10.1126/science.1217817>
25. Gebhardt R, Vendrely C, Kulozik U (2011) Structural characterization of casein micelles: shape changes during film formation. *J Phys Condens Matter* 23:444201. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/23/44/444201>
26. Jollès P (1979) The carbohydrate portions of milk glycoproteins. *Journal of Dairy Research* 46:187–191. <https://doi.org/10.1017/S0022029900017027>
27. Dalgleish DG (1998) Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities. *Journal of Dairy Science* 81:3013–3018. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75865-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75865-5)
28. Kruif CGD, Holt C (2003) Casein Micelle Structure, Functions and Interactions. W: Fox PF, McSweeney PLH (redakcja) *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. Springer US, pp 233–276
29. Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL (2006) Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *Journal of Dairy Science* 89:1235–1243. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72192-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72192-0)
30. Fox PF (2009) Lactose: Chemistry and Properties. W: McSweeney P, Fox PF (redakcja) *Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. Springer, New York, NY, pp 1–15
31. Liu Y, Guo R (2008) pH-dependent structures and properties of casein micelles. *Biophysical Chemistry* 136:67–73. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2008.03.012>
32. Liu Z, Juliano P, Williams RP, et al (2014) Ultrasound effects on the assembly of casein micelles in reconstituted skim milk. *Journal of Dairy Research* 81:146–155. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000721>
33. Tuinier R, de Kruif CG (2002) Stability of casein micelles in milk. *J Chem Phys* 117:1290–1295. <https://doi.org/10.1063/1.1484379>
34. Suárez-Luque S, Mato I, Huidobro JF, Simal-Lozano J (2007) Determination of major metal cations in milk by capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal* 17:896–901. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.12.004>
35. Ye R, Harte F (2013) Casein maps: Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of Dairy Science* 96:799–805. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5838>
36. Thomar P, Nicolai T, Benyahia L, Durand D (2013) Comparative study of the rheology and the structure of sodium and calcium caseinate solutions. *International Dairy Journal* 31:100–106. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.02.005>
37. Thomar P, Benyahia L, Durand D, Nicolai T (2014) The influence of adding monovalent salt on the rheology of concentrated sodium caseinate suspensions and the solubility of calcium caseinate. *International Dairy Journal* 37:48–54. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.02.007>
38. Philippe M, Le Graët Y, Gaucheron F (2005) The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. *Food Chemistry* 90:673–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.001>
39. Rodzik A, Pomastowski P, Railean-Plugaru V, et al (2020) The Study of Zinc Ions Binding to α S1-, β - and κ -Casein. *International Journal of Molecular Sciences* 21:8096. <https://doi.org/10.3390/ijms21218096>

40. Harton K, Shimizu S (2019) Statistical thermodynamics of casein aggregation: Effects of salts and water. *Biophysical Chemistry* 247:34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.02.004>
41. Salque M, Bogucki PI, Pyzel J, et al (2013) Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. *Nature* 493:522–525.
<https://doi.org/10.1038/nature11698>
42. Szpendowski J, Siemianowski K (2013) Właściwości odżywcze i funkcjonalne oraz zastosowanie kazeinianów w przetwórstwie spożywczym. *Nauki Inżynierskie i Technologie*
43. St-Gelais D, Haché S (2005) Effect of β -casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening. *Food Research International* 38:523–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.11.006>
44. Szpendowski J, Szymanski E, Staniewski B, Bohdziewicz K (2010) Właściwości fizykochemiczne i funkcjonalne kazeinianów otrzymywanych metodą zbiornikową oraz ekstruzji. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 17:62–75
45. IDF (2013) Bulletin of the International Dairy Federation 470/2013: The World Dairy Situation 2013. Fédération Internationale du Lait/International Dairy Federation, Brussels
46. Kosmowski M (2019) Atlas serów polskich: Producenci i nazewnictwo serów w latach 1948–2019. Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej
47. ser - Encyklopedia PWN - źródło wiarygodnej i rzetelnej wiedzy.
<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/ser:3974047.html>. Dostęp 1 Mar 2021
48. ANTONIO J, ELLERBROEK A, PEACOCK C, SILVER T (2017) Casein Protein Supplementation in Trained Men and Women: Morning versus Evening. *Int J Exerc Sci* 10:479–486
49. Sarode AR, Sawale PD, Khedkar CD, et al (2016) Casein and Caseinate: Methods of Manufacture. W: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F (redakcja) *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford, pp 676–682
50. Paris C, Lecomte S, Coupry C (2005) ATR-FTIR spectroscopy as a way to identify natural protein-based materials, tortoiseshell and horn, from their protein-based imitation, galalith. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 62:532–538.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.01.023>
51. Schwarzenbrunner R, Barbu MC, Petutschnigg A, Tudor EM (2020) Water-Resistant Casein-Based Adhesives for Veneer Bonding in Biodegradable Ski Cores. *Polymers* 12:1745. <https://doi.org/10.3390/polym12081745>
52. Guo M, Wang G (2016) Milk Protein Polymer and Its Application in Environmentally Safe Adhesives. *Polymers* 8:324. <https://doi.org/10.3390/polym8090324>
53. Biranje S, Madiwale P, Adivarekar RV (2019) Porous electrospun Casein/PVA nanofibrous mat for its potential application as wound dressing material. *J Porous Mater* 26:29–40.
<https://doi.org/10.1007/s10934-018-0602-7>
54. Minaei F, Ravandi SAH, Hejazi SM, Alihosseini F (2019) The fabrication and characterization of casein/PEO nanofibrous yarn via electrospinning. *e-Polymers* 19:154–167.
<https://doi.org/10.1515/epoly-2019-0017>
55. Nechyporchuk O, Köhnke T (2019) Regenerated Casein–Nanocellulose Composite Fibers via Wet Spinning. *ACS Sustainable Chem Eng* 7:1419–1426.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05136>
56. Plank J, Bian H (2010) Method to assess the quality of casein used as superplasticizer in self-levelling compounds. *Cement and Concrete Research* 40:710–715.
<https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2010.01.005>
57. Lindgren T (2010) A case of indoor air pollution of ammonia emitted from concrete in a newly built office in Beijing. *Building and Environment* 45:596–600.
<https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2009.07.014>
58. Cross KJ, Huq NL, Reynolds EC (2016) Casein Phosphopeptide–Amorphous Calcium Phosphate Nanocomplexes: A Structural Model. *Biochemistry* 55:4316–4325.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00522>

59. Kumar VLN, Itthagarun A, King NM (2008) The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. *Australian Dental Journal* 53:34–40. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.00006.x>
60. Kensche A, Dürasch A, König B, et al (2019) Characterization of the in situ pellicle ultrastructure formed under the influence of bovine milk and milk protein isolates. *Archives of Oral Biology* 104:133–140. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.05.021>
61. Péterfi Z, Kocsis B (2000) Comparison of Blocking Agents for an Elisa for Lps. *Journal of Immunoassay* 21:341–354. <https://doi.org/10.1080/01971520009349541>
62. Quigley EMM, Turnberg LA (1987) pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo. *Gastroenterology* 92:1876–1884. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0016508587906196>
63. Liu C, Yao W, Zhang L, et al (2010) Cell -penetrating hollow spheres based on milk protein. *Chemical Communications* 46:7566–7568. <https://doi.org/10.1039/C0CC02370A>
64. Vert M, Doi Y, Hellwich K-H, et al (2012) Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* 84:377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>
65. Mounsey JS, O'Kennedy BT, Kelly PM (2005) Comparison of re-micellised casein prepared from acid casein with micellar casein prepared by membrane filtration. *Le Lait* 85:419–430. <https://doi.org/10.1051/lait:2005022>
66. Deryusheva E, Nemashkalova E, Galloux M, et al (2019) Does Intrinsic Disorder in Proteins Favor Their Interaction with Lipids? *PROTEOMICS* 19:1800098. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800098>
67. Semo E, Kesselman E, Danino D, Livney YD (2007) Casein micelle as a natural nanocapsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids* 21:936–942. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.006>
68. Chu B-S, Ichikawa S, Kanafusa S, Nakajima M (2007) Preparation and Characterization of β -Carotene Nanodispersions Prepared by Solvent Displacement Technique. *J Agric Food Chem* 55:6754–6760. <https://doi.org/10.1021/jf063609d>
69. Chu B-S, Ichikawa S, Kanafusa S, Nakajima M (2007) Preparation of Protein-Stabilized β -Carotene Nanodispersions by Emulsification–Evaporation Method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84:1053–1062. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1132-7>
70. Ghasemi S, Abbasi S (2014) Formation of natural casein micelle nanocapsule by means of pH changes and ultrasound. *Food Hydrocolloids* 42, Part 1:42–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.028>
71. Roach A, Dunlap J, Harte F (2009) Association of Triclosan to Casein Proteins Through Solvent-Mediated High-Pressure Homogenization. *Journal of Food Science* 74:N23–N29. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01048.x>
72. Huppertz T, Grosman S, Fox PF, Kelly AL (2004) Heat and ethanol stabilities of high-pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal* 14:125–133. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00170-5)
73. Guan Y, Zhong Q (2017) Encapsulation of ferulic acid ethyl ester in caseinate to suppress off-flavor formation in UHT milk. *Food Chemistry* 237:532–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.140>
74. Madan JR, Ansari IN, Dua K, Awasthi R (2020) Formulation and In Vitro Evaluation of Casein Nanoparticles as Carrier for Celecoxib. *Adv Pharm Bull* 10:408–417. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.049>
75. Elzoghby AO, Helmy MW, Samy WM, Elgindy NA (2013) Spray-dried casein-based micelles as a vehicle for solubilization and controlled delivery of flutamide: Formulation, characterization, and in vivo pharmacokinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84:487–496. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.01.005>
76. Elzoghby AO, Helmy MW, Samy WM, Elgindy NA (2013) Micellar Delivery of Flutamide Via Milk Protein Nanovehicles Enhances its Anti-Tumor Efficacy in Androgen-Dependent

- Prostate Cancer Rat Model. *Pharm Res* 30:2654–2663. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1091-7>
77. Bar-Zeev M, Nativ L, Assaraf YG, Livney YD (2018) Re-assembled Casein Micelles for Oral Delivery of Chemotherapeutic Combinations to Overcome Multidrug Resistance in Gastric Cancer. *Journal of Molecular and Clinical Medicine* 1:52–61
 78. Pan K, Zhong Q, Baek SJ (2013) Enhanced Dispersibility and Bioactivity of Curcumin by Encapsulation in Casein Nanocapsules. *J Agric Food Chem* 61:6036–6043. <https://doi.org/10.1021/jf400752a>
 79. Pan K, Luo Y, Gan Y, et al (2014) pH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity. *Soft Matter* 10:6820–6830. <https://doi.org/10.1039/C4SM00239C>
 80. Yazdi SR, Bonomi F, Iametti S, et al (2013) Binding of curcumin to milk proteins increases after static high pressure treatment of skim milk. *Journal of Dairy Research* 80:152–158. <https://doi.org/c>
 81. Wijiani N, Isadiartuti D, Rijal MAS, Yusuf H (2020) Characterization and Dissolution Study of Micellar Curcumin-Spray Dried Powder for Oral Delivery. *Int J Nanomedicine* 15:1787–1796. <https://doi.org/10.2147/IJN.S245050>
 82. Ghayour N, Hosseini SMH, Eskandari MH, et al (2019) Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. *Food Hydrocolloids* 87:394–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.031>
 83. Ghatak D, Iyyaswami R (2019) Selective encapsulation of quercetin from dry onion peel crude extract in reassembled casein particles. *Food and Bioproducts Processing* 115:100–109. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.03.003>
 84. Menéndez-Aguirre O, Stuetz W, Grune T, et al (2011) High pressure-assisted encapsulation of vitamin D2 in reassembled casein micelles. *High Pressure Research* 31:265–274. <https://doi.org/10.1080/08957959.2011.565057>
 85. Menéndez-Aguirre O, Kessler A, Stuetz W, et al (2014) Increased loading of vitamin D2 in reassembled casein micelles with temperature-modulated high pressure treatment. *Food Research International* 64:74–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.010>
 86. Moeller H, Martin D, Schrader K, et al (2018) Spray- or freeze-drying of casein micelles loaded with Vitamin D2: Studies on storage stability and in vitro digestibility. *LWT* 97:87–93. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.003>
 87. Haham M, Ish-Shalom S, Nodelman M, et al (2012) Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. *Food Funct* 3:737–744. <https://doi.org/10.1039/C2FO10249H>
 88. Levinson Y, Ish-Shalom S, Segal E, Livney YD (2016) Bioavailability, rheology and sensory evaluation of fat-free yogurt enriched with VD3 encapsulated in re-assembled casein micelles. *Food Funct* 7:1477–1482. <https://doi.org/10.1039/C5FO01111F>
 89. Cohen Y, Ish-Shalom S, Segal E, et al (2017) The bioavailability of vitamin D3, a model hydrophobic nutraceutical, in casein micelles, as model protein nanoparticles: Human clinical trial results. *Journal of Functional Foods* 30:321–325. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.019>
 90. Sáiz-Abajo M-J, González-Ferrero C, Moreno-Ruiz A, et al (2013) Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. *Food Chemistry* 138:1581–1587. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.016>
 91. Jarunglumlert T, Nakagawa K, Adachi S (2015) Influence of aggregate structure of casein on the encapsulation efficiency of β -carotene entrapped via hydrophobic interaction. *Food Structure* 5:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2015.05.001>
 92. Yi J, Lam TI, Yokoyama W, et al (2015) Beta-carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxy radical oxidation in Caco-2 cells. *Food Hydrocolloids* 43:31–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.028>
 93. Zhang Y, He S, Ma Y, et al (2015) Characterization and bioaccessibility of β -carotene in re-assembled casein. *RSC Adv* 5:77595–77600. <https://doi.org/10.1039/C5RA07736B>

94. Rana S, Arora S, Gupta C, Kapila S (2019) Effect of sodium caseinate and vitamin A complexation on bioaccessibility and bioavailability of vitamin A in Caco-2 cells. *Food Research International* 121:910–918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.019>
95. Gupta C, Arora S, Syama MA, Sharma A (2017) Preparation of milk protein-vitamin A complexes and their evaluation for vitamin A binding ability. *Food Chemistry* 237:141–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.106>
96. Penalva R, Esparza I, Agüeros M, et al (2015) Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids* 44:399–406. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.004>
97. Zimet P, Rosenberg D, Livney YD (2011) Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids* 25:1270–1276. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.025>
98. Koo SY, Mok I-K, Pan C-H, Kim SM (2016) Preparation of Fucoxanthin-Loaded Nanoparticles Composed of Casein and Chitosan with Improved Fucoxanthin Bioavailability. *J Agric Food Chem* 64:9428–9435. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04376>
99. Guo H, Chen YF, Tang Y, Qian JQ (2020) Method for enhancing bioavailability of myricetin based on self-assembly of casein–myricetin nanomicelles. *IET Nanobiotechnology* 14:239–244. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5431>
100. Cohen Y, Levi M, Lesmes U, et al (2017) Re-assembled casein micelles improve in vitro bioavailability of vitamin D in a Caco-2 cell model. *Food Funct* 8:2133–2141. <https://doi.org/10.1039/C7FO00323D>
101. Gil AG, Irache JM, Peñuelas I, et al (2017) Toxicity and biodistribution of orally administered casein nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology* 106:477–486. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.020>
102. Portnaya I, Cogan U, Livney YD, et al (2006) Micellization of Bovine β -Casein Studied by Isothermal Titration Microcalorimetry and Cryogenic Transmission Electron Microscopy. *J Agric Food Chem* 54:5555–5561. <https://doi.org/10.1021/jf060119c>
103. Faizullin DA, Konnova TA, Haertlé T, Zuev YF (2017) Secondary structure and colloidal stability of beta-casein in microheterogeneous water-ethanol solutions. *Food Hydrocolloids* 63:349–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.011>
104. Atamer Z, Post AE, Schubert T, et al (2017) Bovine β -casein: Isolation, properties and functionality. A review. *International Dairy Journal* 66:115–125. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.010>
105. Thekkilaveedu S, Krishnaswami V, Mohanan DP, et al (2020) Lactic acid-mediated isolation of alpha-, beta- and kappa-casein fractions by isoelectric precipitation coupled with cold extraction from defatted cow milk. *International Journal of Dairy Technology* 73:31–39. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12646>
106. Duerasch A, Herrmann P, Hogh K, Henle T (2020) Study on β -Casein Depleted Casein Micelles: Micellar Stability, Enzymatic Cross-Linking, and Suitability as Nanocarriers. *J Agric Food Chem* 68:13940–13949. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00904>
107. Shapira A, Assaraf YG, Epstein D, Livney YD (2010) Beta-casein Nanoparticles as an Oral Delivery System for Chemotherapeutic Drugs: Impact of Drug Structure and Properties on Co-assembly. *Pharm Res* 27:2175–2186. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0222-7>
108. Portnaya I, Ben-Shoshan E, Cogan U, et al (2008) Self-Assembly of Bovine β -Casein below the Isoelectric pH. *J Agric Food Chem* 56:2192–2198. <https://doi.org/10.1021/jf072630r>
109. de Kruif CG, Grinberg VY (2002) Micellisation of β -casein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 210:183–190. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00371-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00371-0)
110. Horne DS (2002) Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7:456–461. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00082-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00082-1)

111. Bachar M, Mandelbaum A, Portnaya I, et al (2012) Development and characterization of a novel drug nanocarrier for oral delivery, based on self-assembled β -casein micelles. *Journal of Controlled Release* 160:164–171. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.004>
112. Perlstein H, Turovsky T, Gimeson P, et al (2015) Thermotropic behavior of celecoxib-loaded beta-casein micelles: relevance to the improved bioavailability. *European Journal of Nanomedicine* 7:303–312. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2015-0023>
113. Turovsky T, Khalfin R, Kababya S, et al (2015) Celecoxib Encapsulation in β -Casein Micelles: Structure, Interactions, and Conformation. *Langmuir* 31:7183–7192. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01397>
114. Turovsky T, Portnaya I, Kesselman E, et al (2015) Effect of temperature and loading on the structure of β -casein/ibuprofen assemblies. *Journal of Colloid and Interface Science* 449:514–521. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.02.030>
115. Shapira A, Assaraf YG, Livney YD (2010) Beta-casein nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6:119–126. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.06.006>
116. Shapira A, Markman G, Assaraf YG, Livney YD (2010) β -casein-based nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs: drug-protein interactions and mitoxantrone loading capacity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6:547–555. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.01.003>
117. Moeniafshari A-A, Zarrabi A, Bordbar A-K (2015) Exploring the interaction of naringenin with bovine beta-casein nanoparticles using spectroscopy. *Food Hydrocolloids* 51:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.036>
118. Li M, Fokkink R, Ni Y, Kleijn JM (2019) Bovine beta-casein micelles as delivery systems for hydrophobic flavonoids. *Food Hydrocolloids* 96:653–662. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.005>
119. Cheng H, Dong H, Wusigale, Liang L (2020) A comparison of β -casein complexes and micelles as vehicles for trans-/cis-resveratrol. *Food Chemistry* 330:127209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127209>
120. Bar-Zeev M, Assaraf Y (2016) β -casein nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic Drug combinations overcoming P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric cancer cells. *Oncotarget* 7:23322–23334. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8019>
121. Shapira A, Davidson I, Avni N, et al (2012) β -Casein nanoparticle-based oral drug delivery system for potential treatment of gastric carcinoma: Stability, target-activated release and cytotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80:298–305. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.10.022>
122. Esmaili M, Ghaffari SM, Moosavi-Movahedi Z, et al (2011) Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. *LWT - Food Science and Technology* 44:2166–2172. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.023>
123. Griffin M, Casadio R, Bergamini CM (2002) Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochemical Journal* 368:377–396. <https://doi.org/10.1042/bj20021234>
124. Butler MF, Ng Y-F, Pudney PDA (2003) Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *J Polym Sci A Polym Chem* 41:3941–3953. <https://doi.org/10.1002/pola.10960>
125. Wine Y, Cohen-Hadar N, Freeman A, Frolow F (2007) Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnol Bioeng* 98:711–718. <https://doi.org/10.1002/bit.21459>
126. Pan X, Mu M, Hu B, et al (2006) Micellization of casein-graft-dextran copolymer prepared through Maillard reaction. *Biopolymers* 81:29–38. <https://doi.org/10.1002/bip.20372>
127. Pan X, Yao P, Jiang M (2007) Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-graft-dextran and β -carotene. *Journal of Colloid and Interface Science* 315:456–463. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.015>

128. Wu Y, Wang X (2017) Binding, stability, and antioxidant activity of curcumin with self-assembled casein-dextran conjugate micelles. *International Journal of Food Properties* 20:3295–3307. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1286505>
129. Muhoza B, Xia S, Cai J, et al (2017) Time effect on coenzyme Q10 loading and stability of micelles based on glycosylated casein via Maillard reaction. *Food Hydrocolloids* 72:271–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.046>
130. Markman G, Livney YD (2012) Maillard-conjugate based core-shell co-assemblies for nanoencapsulation of hydrophobic nutraceuticals in clear beverages. *Food Funct* 3:262–270. <https://doi.org/10.1039/C1FO10220F>
131. Kumar S, Singh SK (2017) In silico-in vitro-in vivo studies of experimentally designed carvedilol loaded silk fibroin-casein nanoparticles using physiological based pharmacokinetic model. *International Journal of Biological Macromolecules* 96:403–420. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.052>
132. Huang J, Shu Q, Wang L, et al (2015) Layer-by-layer assembled milk protein coated magnetic nanoparticle enabled oral drug delivery with high stability in stomach and enzyme-responsive release in small intestine. *Biomaterials* 39:105–113. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.059>
133. Kaundal B, K. Srivastava A, Nadim Sardoiwala M, et al (2019) A NIR-responsive indocyanine green-genistein nanoformulation to control the polycomb epigenetic machinery for the efficient combinatorial photo/chemotherapy of glioblastoma. *Nanoscale Advances* 1:2188–2207. <https://doi.org/10.1039/C9NA00212J>
134. Zeiger E, Gollapudi B, Spencer P (2005) Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde—a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 589:136–151. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.01.001>
135. Sawicki Eugene, Hauser TR, Stanley TW, Elbert Walter (1961) The 3-Methyl-2-benzothiazolone Hydrazone Test. Sensitive New Methods for the Detection, Rapid Estimation, and Determination of Aliphatic Aldehydes. *Anal Chem* 33:93–96. <https://doi.org/10.1021/ac60169a028>
136. Boratyński J, Žal T (1990) Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means of phenol and sulfuric acid or phenol and perchloric acid. *Analytical Biochemistry* 184:259–262. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90677-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90677-2)
137. Nogueira MH, Tavares GM, Nogueira Silva NF, et al (2019) Physico-chemical stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase as a function of acidic pH. *Food Structure* 19:100103. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2018.100103>
138. Zhen X, Wang X, Xie C, et al (2013) Cellular uptake, antitumor response and tumor penetration of cisplatin-loaded milk protein nanoparticles. *Biomaterials* 34:1372–1382. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.061>
139. Budinova GALG, Mori Y, Tanaka T, Kamiya N (2018) Casein-based scaffold for artificial cellulosome design. *Process Biochemistry* 66:140–145. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.12.013>
140. Elzoghby AO, Vranic BZ, Samy WM, Elgindy NA (2015) Swellable floating tablet based on spray-dried casein nanoparticles: Near-infrared spectral characterization and floating matrix evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 491:113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.015>
141. Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA (2013) Novel Spray-Dried Genipin-Crosslinked Casein Nanoparticles for Prolonged Release of Alfuzosin Hydrochloride. *Pharm Res* 30:512–522. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0897-z>
142. Hannß M, Abbate RA, Mitzenheim E, et al (2020) Association of Enzymatically and Nonenzymatically Functionalized Caseins Analyzed by Size-Exclusion Chromatography and Light-Scattering Techniques. *J Agric Food Chem* 68:2773–2782. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06592>
143. Basta AH, Lotfy VF, Ghaly NS, et al (2020) Bioactivity evaluation of amino acid-conjugates with protein versus cellulose based conjugates and extracted flavonoids. *Journal*

- of Drug Delivery Science and Technology 60:101924.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101924>
144. Luo Y, Pan K, Zhong Q (2015) Casein/pectin nanocomplexes as potential oral delivery vehicles. *International Journal of Pharmaceutics* 486:59–68.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.043>
 145. Chen H, Zhang Y, Zhong Q (2015) Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering* 144:93–102. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.021>
 146. Li H, Xu Y, Sun X, et al (2018) Stability, bioactivity, and bioaccessibility of fucoxanthin in zein-caseinate composite nanoparticles fabricated at neutral pH by antisolvent precipitation. *Food Hydrocolloids* 84:379–388.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.032>
 147. Veneranda M, Hu Q, Wang T, et al (2018) Formation and characterization of zein-caseinate-pectin complex nanoparticles for encapsulation of eugenol. *LWT* 89:596–603.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.040>
 148. Lall A, Kamdem Tamo A, Doench I, et al (2020) Nanoparticles and Colloidal Hydrogels of Chitosan–Caseinate Polyelectrolyte Complexes for Drug-Controlled Release Applications. *International Journal of Molecular Sciences* 21:5602.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165602>
 149. Nakagawa K, Jarunglumert T, Adachi S (2016) Structural changes in casein aggregates under frozen conditions affect the entrapment of hydrophobic materials and the digestibility of aggregates. *Chemical Engineering Science* 143:287–296.
<https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.01.001>
 150. Chen Y, Willmott N, Anderson J, Florence AT (1987) Comparison of albumin and casein microspheres as a carrier for doxorubicin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39:978–985. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1987.tb03144.x>
 151. Desoize B, Jardillier JC, Kanoun K, et al (1986) In-vitro cytotoxic activity of cross-linked protein microcapsules. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 38:8–13.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1986.tb04458.x>
 152. Jain A, Thakur D, Ghoshal G, et al (2016) Characterization of microcapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. *International Journal of Biological Macromolecules* 87:101–113.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.117>
 153. Jain A, Thakur D, Ghoshal G, et al (2016) Formation and functional attributes of electrostatic complexes involving casein and anionic polysaccharides: An approach to enhance oral absorption of lycopene in rats in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules* 93, Part A:746–756. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.071>
 154. Koupantsis T, Pavlidou E, Paraskevopoulou A (2014) Flavour encapsulation in milk proteins – CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocolloids* 37:134–142.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.031>
 155. Koupantsis T, Pavlidou E, Paraskevopoulou A (2016) Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins – CMC complex coacervates for flavour encapsulation. *Food Hydrocolloids* 57:62–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.007>
 156. Marreto RN, Ramos MFS, Silva EJ, et al (2013) Impact of Cross-linking and Drying Method on Drug Delivery Performance of Casein–Pectin Microparticles. *AAPS PharmSciTech* 14:1227–1235. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0012-8>
 157. Liu W, Wang J, McClements DJ, Zou L (2018) Encapsulation of β -carotene-loaded oil droplets in caseinate/alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *Journal of Functional Foods* 40:527–535. <https://doi.org/d>
 158. Zhang Z, Zhang R, Decker EA, McClements DJ (2015) Development of food-grade filled hydrogels for oral delivery of lipophilic active ingredients: pH-triggered release. *Food Hydrocolloids* 44:345–352. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.002>

159. Matalanis A, Decker EA, McClements DJ (2012) Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. *Food Chemistry* 132:766–772. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.034>
160. Goyal A, Sharma V, Sihag MK, et al (2015) Development and physico-chemical characterization of microencapsulated flaxseed oil powder: A functional ingredient for omega-3 fortification. *Powder Technology* 286:527–537. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.050>
161. Chen F, Liang L, Zhang Z, et al (2017) Inhibition of lipid oxidation in nanoemulsions and filled microgels fortified with omega-3 fatty acids using casein as a natural antioxidant. *Food Hydrocolloids* 63:240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.001>
162. Salcedo-Sandoval L, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, et al (2015) Oxidative stability of n-3 fatty acids encapsulated in filled hydrogel particles and of pork meat systems containing them. *Food Chemistry* 184:207–213. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.093>
163. Zhang Z, Decker EA, McClements DJ (2014) Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. *Food Research International* 64:520–526. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.020>
164. Thakur D, Jain A, Ghoshal G, et al (2017) Microencapsulation of β -Carotene Based on Casein/Guar Gum Blend Using Zeta Potential-Yield Stress Phenomenon: an Approach to Enhance Photo-stability and Retention of Functionality. *AAPS PharmSciTech* 18:1447–1459. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0806-1>
165. Xu G, Wang C, Yao P (2017) Stable emulsion produced from casein and soy polysaccharide compacted complex for protection and oral delivery of curcumin. *Food Hydrocolloids* 71:108–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.010>
166. Yan B, Davachi SM, Ravanfar R, et al (2021) Improvement of vitamin C stability in vitamin gummies by encapsulation in casein gel. *Food Hydrocolloids* 113:106414. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106414>
167. Mora-Gutierrez A, Attaie R, Núñez de González MT, et al (2020) Interface Compositions as Determinants of Resveratrol Stability in Nanoemulsion Delivery Systems. *Foods* 9:1394. <https://doi.org/10.3390/foods9101394>
168. Burgain J, Gaiani C, Cailliez-Grimal C, et al (2013) Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 19:233–242. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.012>
169. Heidebach T, Först P, Kulozik U (2009) Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal* 19:77–84. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.08.003>
170. Heidebach T, Först P, Kulozik U (2010) Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering* 98:309–316. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.003>
171. Würth R, Hörmannspurger G, Wilke J, et al (2015) Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. *Journal of Functional Foods* 15:116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.046>
172. Würth R, Wiesner S, Foerst P, Kulozik U (2017) Impact of the CaCl₂ content in the rehydration media on the microcapsule formation out of spray dried capsule precursors for the immobilization of probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 68:75–79. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.01.008>
173. Guerin J, Petit J, Burgain J, et al (2017) *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *Journal of Food Engineering* 193:10–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.08.008>
174. Würth R, Foerst P, Kulozik U (2016) Development and evaluation of a spray drying microencapsulation process for water-insoluble milk protein capsules. *International Dairy Journal* 61:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.05.001>

175. Sáez-Orviz S, Camilleri P, Marcet I, et al (2019) MICROENCAPSULATION OF CALCIUM LACTOBIONATE FOR PROTECTION FROM MICROORGANISMS IN A SOLID PHASE FOOD. *Biochemical Engineering Journal* 150:107281. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107281>
176. O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A (2009) Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 33:801–819. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00176.x>
177. Jordan K, Dalmasso M, Zentek J, et al (2014) Microbes versus microbes: control of pathogens in the food chain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94:3079–3089. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6735>
178. Ashelford KE, Day MJ, Fry JC (2003) Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil. *Appl Environ Microbiol* 69:285–289. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.285-289.2003>
179. Singh A, Glass N, Tolba M, et al (2009) Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* 24:3645–3651. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.05.028>
180. Hagens S, Loessner MJ (2014) Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front Microbiol* 5:159. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00159>
181. Maura D, Debarbieux L (2011) Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:851–859. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3227-1>
182. Fortier L-C, Sekulovic O (2013) Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4:354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>
183. Kutter EM, Gvasalia G, Alavidze Z, Brewster E (2013) Phage Therapy. W: Grassberger M, Sherman RA, Gileva OS, et al (redakcja) *Biotherapy - History, Principles and Practice: A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease using Living Organisms*. Springer Netherlands
184. Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J (2012) Bacteriophages and their role in food safety. *Int J Microbiol* 2012:863945. <https://doi.org/10.1155/2012/863945>
185. Yap ML, Rossmann MG (2014) Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiol* 9:1319–1327. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.91>
186. Hobman JL, Penn CW, Pallen MJ (2007) Laboratory strains of *Escherichia coli*: model citizens or deceitful delinquents growing old disgracefully? *Molecular Microbiology* 64:881–885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05710.x>
187. Kakasis A, Panitsa G (2019) Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int J Antimicrob Agents* 53:16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>
188. D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
189. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, et al (2017) Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61:. <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>
190. Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, et al (2017) Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Crit Care* 21:. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1709-y>
191. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, et al (2009) Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLOS ONE* 4:e4944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004944>
192. LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, et al (2018) Phage Therapy for a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Craniectomy Site Infection. *Open Forum Infect Dis* 5:. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy064>

193. Międzybrodzki R, Kłak M, Jończyk-Matysiak E, et al (2017) Means to Facilitate the Overcoming of Gastric Juice Barrier by a Therapeutic Staphylococcal Bacteriophage A5/80. *Front Microbiol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00467>
194. Choińska-Pulit A, Mituła P, Śliwka P, et al (2015) Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology* 45:212–221. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.001>
195. Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, et al (2017) Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science* 249:100–133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
196. Loh B, Gondil VS, Manohar P, et al (2021) Encapsulation and Delivery of Therapeutic Phages. *Appl Environ Microbiol* 87:. <https://doi.org/10.1128/AEM.01979-20>
197. Cocero MJ, Martín Á, Mattea F, Varona S (2009) Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *The Journal of Supercritical Fluids* 47:546–555. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.08.015>
198. Lee JS, Weon BM, Je JH, Fezzaa K (2012) How Does an Air Film Evolve into a Bubble During Drop Impact? *Phys Rev Lett* 109:204501. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.204501>
199. Xu H-N, Liu Y, Zhang L (2015) Salting-out and salting-in: competitive effects of salt on the aggregation behavior of soy protein particles and their emulsifying properties. *Soft Matter* 11:5926–5932. <https://doi.org/10.1039/C5SM00954E>
200. Dickson IR, Perkins DJ (1971) Studies on the interactions between purified bovine caseins and alkaline-earth-metal ions. *Biochem J* 124:235–240. <https://doi.org/10.1042/bj1240235>
201. Zhang ZP, Aoki T (1995) Effect of Alkaline Earth Metals on the Crosslinking of Casein by Micellar Calcium Phosphate. *Journal of Dairy Science* 78:1665–1672. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76791-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76791-1)
202. Lopez F, Cuomo F, Nostro PL, Ceglie A (2013) Effects of solvent and alkaline earth metals on the heat-induced precipitation process of sodium caseinate. *Food Chemistry* 136:266–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.117>
203. Greyson J, Snell H (1969) Influence of the alkaline earth chlorides on the structure of water. *J Phys Chem* 73:3208–3214. <https://doi.org/10.1021/j100844a007>
204. Inoue A (2018) Chapter Sixteen - Characterization of PL-7 Family Alginate Lyases From Marine Organisms and Their Applications. W: Moore BS (redakcja) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 499–524
205. Zhang Z, Ortiz O, Goyal R, Kohn J (2014) Chapter 23 - Biodegradable Polymers. W: Lanza R, Langer R, Vacanti J (redakcja) *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. Academic Press, Boston, pp 441–473
206. Zhang X, Wang L, Weng L, Deng B (2020) Strontium ion substituted alginate-based hydrogel fibers and its coordination binding model. *Journal of Applied Polymer Science* 137:48571. <https://doi.org/10.1002/app.48571>
207. Bezbaruah AN, Krajangpan S, Chisholm BJ, et al (2009) Entrapment of iron nanoparticles in calcium alginate beads for groundwater remediation applications. *Journal of Hazardous Materials* 166:1339–1343. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.054>
208. Won K, Kim S, Kim K-J, et al (2005) Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry* 40:2149–2154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.014>
209. Bani-Jaber A, Aideh K, Hamdan I, Maraqa R (2009) Drug-loaded casein beads: influence of different metal-types as cross-linkers and oleic acid as a plasticizer on some properties of the beads. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 19:125–131. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(09\)50020-2](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(09)50020-2)
210. Gopal N, Hill C, Ross PR, et al (2015) The Prevalence and Control of Bacillus and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Front Microbiol* 6:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>

211. Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J (2014) Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in micellar casein concentrates—effect of protein content and pH development. *Dairy Sci & Technol* 94:539–548. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0178-1>
212. Ford DJ (1976) The effect of methods of sterilization on the nutritive value of protein in a commercial rat diet. *British Journal of Nutrition* 35:267–276. <https://doi.org/10.1079/BJN19760031>
213. Gayán E, Álvarez I, Condón S (2013) Inactivation of bacterial spores by UV-C light. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 19:140–145. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.007>
214. Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC (2003) Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology* 87:207–216. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00075-8)
215. Celandroni F, Longo I, Tosoratti N, et al (2004) Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Applied Microbiology* 97:1220–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02406.x>
216. Aitken A, Learmonth MP (2009) Protein Determination by UV Absorption. W: Walker JM (redakcja) *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 3–6
217. Burillo G, Adem E, Muñoz E, Vásquez M (2013) Electron beam irradiated polyamide-6 at different temperatures. *Radiation Physics and Chemistry* 84:140–144. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.06.029>
218. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, et al (2017) Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Scientific Reports* 7:41441. <https://doi.org/10.1038/srep41441>
219. Śliwka P, Mituła P, Mituła A, et al (2019) Encapsulation of bacteriophage T4 in mannitol-alginate dry microspheres and survival in simulated gastrointestinal conditions. *LWT* 99:238–243. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.043>
220. Ma Y-H, Islam GS, Wu Y, et al (2016) Temporal distribution of encapsulated bacteriophages during passage through the chick gastrointestinal tract. *Poultry Science* 95:2911–2920. <https://doi.org/10.3382/ps/pew260>
221. Fink K, Boratyński J (2014) Oddziaływania niekwalencyjne kation- π -ich rola w przyrodzie. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 68:1276–1286. <https://doi.org/10.5604/17322693.1127950>
222. Kalepu S, Nekkanti V (2015) Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5:442–453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>
223. Jacob J, Haponiuk JT, Thomas S, Gopi S (2018) Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Materials Today Chemistry* 9:43–55. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.002>
224. Fu Y, Kao WJ (2010) Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* 7:429–444. <https://doi.org/10.1517/17425241003602259>
225. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, et al (2006) Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. *CNS Drug Reviews* 12:250–275. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00250.x>
226. Toussaint K, Yang XC, Zielinski MA, et al (2010) What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 35:617–638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2009.01143.x>
227. McCrae JC, Morrison EE, MacIntyre IM, et al (2018) Long-term adverse effects of paracetamol – a review. *British Journal of Clinical Pharmacology* 84:2218–2230. <https://doi.org/10.1111/bcp.13656>
228. Garzón LC, Martínez F (2004) Temperature Dependence of Solubility for Ibuprofen in Some Organic and Aqueous Solvents. *J Solution Chem* 33:1379–1395. <https://doi.org/10.1007/s10953-004-1051-2>
229. Rainsford KD (2009) Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacol* 17:275–342. <https://doi.org/10.1007/s10787-009-0016-x>

230. Katselou M, Papoutsis I, Nikolaou P, et al (2017) "Poor man's methadone" can kill the poor man. Extra-medical uses of loperamide: a review. *Forensic Toxicol* 35:217–231. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0365-x>
231. Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A (2016) Production and application of menaquinone-7 (vitamin K2): a new perspective. *World J Microbiol Biotechnol* 33:2. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2169-2>
232. Pucaj K, Rasmussen H, Møller M, Preston T (2011) Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K2, menaquinone-7. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21:520–532. <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.568983>
233. Lurie Y, Loebstein R, Kurnik D, et al (2010) Warfarin and vitamin K intake in the era of pharmacogenetics. *British Journal of Clinical Pharmacology* 70:164–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03672.x>
234. Vermeer CV (2012) Vitamin K: the effect on health beyond coagulation – an overview. *Food & Nutrition Research* 56:5329. <https://doi.org/10.3402/fnr.v56i0.5329>
235. Szterk A, Zmysłowski A, Bus K (2018) Identification of cis/trans isomers of menaquinone-7 in food as exemplified by dietary supplements. *Food Chemistry* 243:403–409. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.001>
236. Granberg RA, Rasmuson ÅC (1999) Solubility of Paracetamol in Pure Solvents. *J Chem Eng Data* 44:1391–1395. <https://doi.org/10.1021/je990124v>
237. Alexandridis P, Alan Hatton T (1995) Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 96:1–46. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)03028-X](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)03028-X)
238. Foster B, Cosgrove T, Espidel Y (2009) PFGSE-NMR Study of pH-Triggered Behavior in Pluronic–Ibuprofen Solutions. *Langmuir* 25:6767–6771. <https://doi.org/10.1021/la900299v>
239. Millar FC, Corrigan OI (1993) Dissolution mechanism of ibuprofen-casein compacts. *International Journal of Pharmaceutics* 92:97–104. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90268-K](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90268-K)
240. Gubbins RH, O'Driscoll CM, Corrigan OI (2003) The effects of casein on diclofenac release from hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) compacts. *International Journal of Pharmaceutics* 260:69–76. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00235-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00235-7)
241. Bani-Jaber A, Alshawabkeh I, Abdullah S, et al (2017) In Vitro and In Vivo Evaluation of Casein as a Drug Carrier for Enzymatically Triggered Dissolution Enhancement from Solid Dispersions. *AAPS PharmSciTech* 18:1750–1759. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0650-8>
242. Shaw LR, Irwin WJ, Grattan TJ, Conway BR (2005) The Effect of Selected Water-Soluble Excipients on the Dissolution of Paracetamol and Ibuprofen. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 31:515–525. <https://doi.org/10.1080/03639040500215784>
243. Guntero VA, Gutierrez L, Kneeteman MN, Ferretti CA (2020) In Silico Study of the Interaction between Casein with Tocopherols: Preliminary Evaluation of Lipophilic Substrate Inclusion on Proteic Matrix. *Chemistry Proceedings* 3:49. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-24-08345>
244. Orlando P, Silvestri S, Marcheggiani F, et al (2019) Menaquinone 7 Stability of Formulations and Its Relationship with Purity Profile. *Molecules* 24:829. <https://doi.org/10.3390/molecules24050829>
245. Ma Y, Tang PTP, McClure DD, et al (2019) Development of a menaquinone-7 enriched functional food. *Food and Bioprocess Processing* 117:258–265. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.06.017>
246. De'Nobili MD, Soria M, Martinefski MR, et al (2016) Stability of L-(+)-ascorbic acid in alginate edible films loaded with citric acid for antioxidant food preservation. *Journal of Food Engineering* 175:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.11.015>

247. Ekladios I, Colson YL, Grinstaff MW (2019) Polymer–drug conjugate therapeutics: advances, insights and prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* 18:273–294. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0005-0>
248. Vhora I, Patil S, Bhatt P, Misra A (2015) Chapter One - Protein- and Peptide-Drug Conjugates: An Emerging Drug Delivery Technology. W: Donev R (redakcja) *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Academic Press, pp 1–55
249. Gorąca A, Huk-Kolega H, Piechota A, et al (2011) Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep* 63:849–858. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70600-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70600-4)
250. Gruzman A, Hidmi A, Katzhendler J, et al (2004) Synthesis and characterization of new and potent alpha-lipoic acid derivatives. *Bioorg Med Chem* 12:1183–1190. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.11.025>
251. Koufaki M (2014) Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 24:993–1005. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.937425>
252. Li BJ, Hao XY, Ren GH, Gong Y (2015) Effect of lipoic acid combined with paclitaxel on breast cancer cells. *Genet Mol Res* 14:17934–17940. <https://doi.org/10.4238/2015.December.22.18>
253. El-Nakib GA, Mostafa TM, Abbas TM, et al (2013) Role of alpha-lipoic acid in the management of anemia in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *IJNRD* 6:161–168. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S49066>
254. Mohamed Saliq A, Krishnaswami V, Janakiraman K, Kandasamy R (2020) α -Lipoic acid nanocapsules fortified cow milk application as a dietary supplement product for anemia. *Appl Nanosci* 10:2007–2023. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01304-2>
255. Packer L (1994) Antioxidant Properties of Lipoic Acid and Its Therapeutic Effects in Prevention of Diabetes Complications and Cataracts. *Annals of the New York Academy of Sciences* 738:257–264. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21811.x>
256. Kofuji K, Isobe T, Murata Y (2009) Controlled release of alpha-lipoic acid through incorporation into natural polysaccharide-based gel beads. *Food Chemistry* 115:483–487. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.044>
257. Hermanson GT (2013) Chapter 2 - Functional Targets for Bioconjugation. W: Hermanson GT (redakcja) *Bioconjugate Techniques* (Third Edition). Academic Press, Boston, pp 127–228
258. Sheehan JC, Hess GP (1955) A New Method of Forming Peptide Bonds. *J Am Chem Soc* 77:1067–1068. <https://doi.org/10.1021/ja01609a099>
259. Staros JV (1982) N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers. *Biochemistry* 21:3950–3955. <https://doi.org/10.1021/bi00260a008>
260. Hermanson GT (2013) Chapter 4 - Zero-Length Crosslinkers. W: Hermanson GT (redakcja) *Bioconjugate Techniques* (Third Edition). Academic Press, Boston, pp 259–273
261. Hermanson GT (2013) Chapter 15 - Immobilization of Ligands on Chromatography Supports. W: Hermanson GT (redakcja) *Bioconjugate Techniques* (Third Edition). Academic Press, Boston, pp 589–740
262. Hermanson GT (2013) Chapter 3 - The Reactions of Bioconjugation. W: Hermanson GT (redakcja) *Bioconjugate Techniques* (Third Edition). Academic Press, Boston, pp 229–258
263. Li Y-L, Zhu L, Liu Z, et al (2009) Reversibly Stabilized Multifunctional Dextran Nanoparticles Efficiently Deliver Doxorubicin into the Nuclei of Cancer Cells. *Angewandte Chemie International Edition* 48:9914–9918. <https://doi.org/10.1002/anie.200904260>
264. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
265. Jovanovic S, Barac M, Macej O, et al (2007) SDS-PAGE Analysis of Soluble Proteins in Reconstituted Milk Exposed to Different Heat Treatments. *Sensors (Basel)* 7:371–383

266. Ikuta N, Tanaka A, Otsubo A, et al (2014) Spectroscopic Studies of R(+)- α -Lipoic Acid–Cyclodextrin Complexes. *Int J Mol Sci* 15:20469–20485. <https://doi.org/10.3390/ijms151120469>
267. Chakrapani V, Ahmed KBA, Kumar VV, et al (2014) A facile route to synthesize casein capped copper nanoparticles: an effective antibacterial agent and selective colorimetric sensor for mercury and tryptophan. *RSC Adv* 4:33215–33221. <https://doi.org/10.1039/C4RA03086A>
268. Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767:1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
269. Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJJr (2015) 2.1 Proteins Are Built from a Repertoire of 20 Amino Acids. W: *Biochemistry*, 8th ed. W H Freeman, New York, pp 29–35
270. Haque Z, Kito M (1983) Lipophilization of α -s1-casein. 1. Covalent attachment of palmitoyl residue. *J Agric Food Chem* 31:1225–1230. <https://doi.org/10.1021/jf00120a021>
271. Zhang Y, Yao F, Liu J, et al (2018) Synthesis and characterization of alkylated caseinate, and its structure-curcumin loading property relationship in water. *Food Chemistry* 244:246–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.047>
272. K. Purushothaman B, Harsha S M, Maheswari PU, Sheriffa Begum KMM (2019) Magnetic assisted curcumin drug delivery using folate receptor targeted hybrid casein-calcium ferrite nanocarrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 52:509–520. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.010>
273. Zhang A, Zhang Z, Shi F, et al (2013) Disulfide crosslinked PEGylated starch micelles as efficient intracellular drug delivery platforms. *Soft Matter* 9:2224–2233. <https://doi.org/10.1039/C2SM27189C>
274. Zhou Y, Yu J, Feng X, et al (2016) Reduction-responsive core-crosslinked micelles based on a glycol chitosan–lipoic acid conjugate for triggered release of doxorubicin. *RSC Adv* 6:31391–31400. <https://doi.org/10.1039/C6RA05501J>
275. Zhong Y, Meng F, Deng C, et al (2017) Targeted inhibition of human hematological cancers in vivo by doxorubicin encapsulated in smart lipoic acid-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles. *Drug Delivery* 24:1482–1490. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1384864>
276. Wu L, Zou Y, Deng C, et al (2013) Intracellular release of doxorubicin from core-crosslinked polypeptide micelles triggered by both pH and reduction conditions. *Biomaterials* 34:5262–5272. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.035>
277. Vincent D, Elkins A, Condina MR, et al (2016) Quantitation and Identification of Intact Major Milk Proteins for High-Throughput LC-ESI-Q-TOF MS Analyses. *PLoS One* 11:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163471>
278. ExPASy - ProtParam tool. <https://web.expasy.org/protparam/>. Dostęp 29 Sty 2020
279. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. W: Walker JM (redakcja) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 571–607
280. Boratyński J, Szermer-Olearnik B (2017) Endotoxin Removal from Escherichia coli Bacterial Lysate Using a Biphasic Liquid System. W: Holst O (redakcja) *Microbial Toxins: Methods and Protocols*. Springer, New York, NY, pp 107–112
281. Szermer-Olearnik B, Boratyński J (2015) Removal of Endotoxins from Bacteriophage Preparations by Extraction with Organic Solvents. *PLoS One* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122672>
282. Bonilla N, Rojas MI, Cruz GNF, et al (2016) Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *PeerJ* 4:e2261. <https://doi.org/10.7717/peerj.2261>
283. Santos SB, Carvalho CM, Sillankorva S, et al (2009) The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiol* 9:148. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-148>

284. Adams MH (1959) Bacteriophages. Bacteriophages
285. Wu X, Koiwa H (2012) One-step casting of Laemmli discontinued sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis gel. *Analytical Biochemistry* 421:347–349. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.004>
286. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods* 9:671–675
287. ImageJ. <https://imagej.nih.gov/>. Dostęp 15 Cze 2020

SPIS RYSUNKÓW I TABEL

Ryc. 1. Standardowa zawartość białek w mleku krowim.	8
Ryc. 2. Schematyczny diagram liniowego rozłożenia ładunków oraz regionów hydrofobowych i hydrofilowych najbardziej powszechnych wariantów genetycznych kazein w fizjologicznym pH mleka – 6,6.	9
Ryc. 3. Poglądowa graficzna reprezentacja przekroju miceli kazeinowej.	10
Ryc. 4. Mechanizmy metod używanych do strącania kazeiny.	12
Ryc. 5. Graficzne przedstawienie ogólnej zasady tworzenia zrekonstruowanych miceli kazeinowych.	15
Ryc. 6. Reakcje z wykorzystaniem różnych reagentów sieciujących kazeinę.	19
Ryc. 7. Natywna zawartość metali II grupy układu okresowego w kazeinie wyjściowej.	28
Ryc. 8. Wiązanie metali II grupy układu okresowego przez kazeinę.	28
Ryc. 9. Fotografia przedstawiająca uzyskane sfery w roztworze chlorku wapnia w szalce Petriego na czarnym tle.	29
Ryc. 10. Elektroforegram SDS-PAGE kazeiny poddanej sterylizacji radiacyjnej i przy użyciu autoklawu.	31
Ryc. 11. Graficzna reprezentacja modelu „wytłoczki na jajka” opisującego żelowanie alginianu.	34
Ryc. 12. Wzory chemiczne leków kompleksowanych z kazeiną.	36
Ryc. 13. Wzory chemiczne najpopularniejszych związków z grupy witamin K.	37
Ryc. 14. Ilość badanych leków skompleksowanych przez kazeinę.	39
Ryc. 15. Wiązanie leków przez kazeinę.	40
Ryc. 16. Zawartość witaminy K ₂ MK-7 skompleksowanej w preparatach przygotowanych z udziałem różnych wariantów kazeiny oraz precypitantów.	41
Ryc. 17. Odzysk witaminy MK-7 po 24 h i 7 dniach przy różnej wilgotności powietrza dla próbek strącanych kwasem cytrynowym.	42
Ryc. 18. Odzysk witaminy MK-7 po 24 h i 7 dniach przy różnej wilgotności powietrza dla próbek strącanych kwasem askorbinowym.	43
Ryc. 19. Odzysk witaminy MK-7 po 24 h i 7 dniach przy różnej wilgotności powietrza dla próbek strącanych chlorkiem wapnia.	44
Ryc. 20. Odzysk witaminy MK-7 po 7 dniach przechowywania w warunkach wysokiej wilgotności względnej powietrza 98,6%.	45
Ryc. 21. Stabilność preparatów kazeinowych zawierających witaminę KM-7 po 6 miesiącach przechowywania w warunkach wilgotności powietrza na poziomie 40-60%.	45
Ryc. 22. Wzory chemiczne formy utlenionej i zredukowanej kwasu α -liponowego.	50
Ryc. 23. Skład aminokwasowy kazeiny bydlęcej.	51
Ryc. 24. Reakcja syntezy aktywnego estru kwasu α -liponowego.	52

Ryc. 25. Reakcja uboczna mogąca zachodzić podczas syntezy aktywnego estru – synteza dwufunkcyjnego aktywnego estru z trzech cząsteczek NHS przy udziale DCC.	52
Ryc. 26. Koniugacja kwasu α -liponowego z białkiem za pośrednictwem aktywnego estru NHS.	53
Ryc. 27. Schemat sieciowania białka poprzez redukcję i reoksydację mostków disiarczkowych kwasu α -liponowego skoniugowanego z kazeiną.	53
Ryc. 28. Obrazy elektroforetyczne kazeiny oraz cząsteczek złożonych z posieciowanych białek uzyskane w systemie nieciągotym w żelu 10%.	55
Ryc. 29. Obrazy elektroforetyczne kazeiny oraz cząsteczek złożonych z posieciowanych białek uzyskane w systemie nieciągotym w żelu 7,5%.	56
Ryc. 30. Obrazy elektroforetyczne kazeiny oraz cząsteczek złożonych z posieciowanych białek białkowych uzyskane w systemie ciągłym.	57
Ryc. 31. Elektroforegramy i densytogramy kazeiny oraz kompleksów białkowych dializowanych w warunkach tlenowych.	59
Ryc. 32. Elektroforegramy i densytogramy kazeiny oraz kompleksów białkowych dializowanych w warunkach beztlenowych.	60
Ryc. 33. Obrazy elektroforetyczne cząsteczek utworzonych z posieciowanych białek uzyskane w systemie nieciągotym	61
Ryc. 34. Widma FTIR uzyskane dla kwasu α -liponowego, kazeiny oraz koniugatu tych dwóch substancji.	62
Ryc. 35. Znormalizowane widma FTIR trzech wariantów kazeiny.	63
Tab. 1. Różnice w wybranych właściwościach molekularnych peptydów kazeinowych.	8
Tab. 2. Metody rekonstruowania miceli kazeinowych.	16
Tab. 3. Substancje terapeutyczne kapsułkowane w rekonstruowanych micelach β -kazeinowych.	18
Tab. 4. Wpływ technik sterylizacji na obecność drobnoustrojów w próbkach kazeiny.	30
Tab. 5. Właściwości fizykochemiczne kazeiny na podstawie karty technicznej dołączonej przez producenta.	72
Tab. 6. Masy molowe i zawartość procentowa poszczególnych frakcji kazeiny.	75
Tab. 7. Program użyty do mineralizacji kazeiny.	76
Tab. 8. Parametry analityczne i walidacyjne analizy MP AES.	77
Tab. 9. Warunki chromatograficzne.	84
Tab. 10. Sekwencje aminokwasowe frakcji kazeinowych wraz z ich procentowym udziałem w kazeinie.	85

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje związane z tematyką doktoratu:

1. Głab T, Boratyński J (2017) *Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents*. Top Curr Chem (Z) 375 (4): 71. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0158-z>
2. Myga-Nowak M, Godela A, Głab T, Lewańska M, Boratyński J (2016) *Bakteriofagi w walce z infekcjami pokarmowymi wywołanymi zanieczyszczeniem żywności bakteriami z rodzaju Campylobacter*. Postepy Hig Med Dosw (Online) 70: 989–1000. <https://doi.org/10.5604/17322693.1220084>

Pozostałe publikacje:

3. Głab T, Jurasz J, Boratyński J (2016) *The perspective of solar and wind energy utilisation in the copper electrorefinement*. Ekonomia i Środowisko 59 (4): 179–193
4. Głab T, Jurasz J, Godela A, Myga-Nowak M, Boratyński J (2016) *Perspektywa zastosowania energii słońca i wiatru w przemyśle chloro-alkalicznym*. Przegląd Naukowo-Metodyczny Edukacja dla Bezpieczeństwa 9 (1): 1180–1198
5. Myga-Nowak M, Godela A, Lewańska M, Głab T, Boratyński J (2016) *Akademia Młodych Wynalazców – inicjatywa poszerzająca horyzonty postrzegania świata*. Edukacja Biologiczna i Środowiskowa 60 (3): 130–133
6. Rogacz D, Lewicka K, Głab T, i in. (2015) *Występowanie bakterii metaloopornych w glebie terenu Huty Częstochowa*. W: *Inżynieria Środowiska – Młodym Okiem*. Oficyna wydawnicza Politechniki Białostockiej, Białystok: 138-148

Udział w konferencjach naukowych i seminariach:

1. Głab T *Kazeina znana i nieznaną*. Seminarium Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, 8.06.2017
2. Głab T „*Pierwsza kapsułka*”. *Możliwości wykorzystania kazeiny jako nośnika leków*. Spotkanie dotyczące współpracy naukowej z Centrum Badawczo-Rozwojowym Novasome firmy Hasco-Lek., Wrocław 15.02.2017
3. Głab T, Godela A, Myga-Nowak M, Boratyński J *The New Wind of Renewable Energy*. Międzynarodowa Konferencja Odnawialne Źródła Energii – Technika, Technologie, Innowacje, Krynica Zdrój, 26-29.05.2015
4. Lewicka K, Głab T, Rogacz D, Olszewska D, Marczak M *Woda z wybranych źródeł z obszaru Parku Krajobrazowego Orlich Gniazd, jako potencjalny wektor bakterii grupy coli*. III Ogólnopolska Konferencja pt. Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości, Wrocław, 20-21.11.2014

OŚWIADCZENIE AUTORSKIE

Ja, niżej podpisany **Tomasz Konrad Głąb** oświadczam, że przedkładaną rozprawę doktorską pt.:

Chemiczne modyfikacje kazeiny w kapsułkowaniu czynników aktywnych biologicznie

- a) napisałem samodzielnie uwzględniając jedynie merytoryczną pomoc promotora,
- b) rozprawa nie stanowi istotnego fragmentu cudzego utworu zastosowanego bez podania źródła w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 roku o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. Nr 24, poz. 83 z późn. zm.) oraz dóbr osobistych chronionych prawem,
- c) rozprawa nie zawiera danych i informacji, które uzyskałem w sposób niedozwolony,
- d) rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w Uczelni,
- e) drukowana wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Jednocześnie przyjmuję do wiadomości, że gdyby powyższe oświadczenie okazało się nieprawdziwe, decyzja o wydaniu mi dyplomu zostanie cofnięta.

miejsowość i data

podpis autora