

STANISŁAW MLEKO

WYZNACZANIE TEMPERATURY ŻELOWANIA BIAŁEK SERWATKOWYCH PRZY UŻYCIU REOMETRII ROTACYJNEJ I OSCYLACYJNEJ

Streszczenie

Określono temperatury żelowania roztworów koncentratu białek serwatkowych w różnych wartościach pH i stężenia białka. Stwierdzono, iż wartości temperatur punktu żelowania wyznaczone metodą reologii oscylacyjnej były mniejsze niż otrzymane metodą reologii rotacyjnej. Wynikało to z faktu, iż za początek żelowania uznawano w pierwszej metodzie moment, w którym wartości modułów były zbliżone, a w drugiej początek wzrostu lepkości roztworu białek. Temperatura punktu żelowania białek WPC zależała od stężenia białka w roztworze poddawanych żelowaniu, co prawdopodobnie wynika z zachodzących interakcji pomiędzy grupami dwusiarczkowymi α -laktoalbuminy i reaktywnymi grupami sulfhydrylowymi β -laktoglobuliny. Zaobserwowano zmiany punktu żelowania wraz ze zmianą pH, co wyjaśniono różnicami w ładunku oraz reaktywności grup tiolowych cząsteczek białek.

Wstęp

Koncentraty i izolaty białek serwatkowych, ze względu na swoje znakomite właściwości funkcjonalne są stosowane w coraz szerszej gamie produktów spożywczych. Podstawowe białka wchodzące w skład białek serwatkowych to β -laktoglobulina, α -laktoalbumina oraz albumina surowicy krwi bydłowej. W odpowiednich warunkach posiadają one zdolność do tworzenia trójwymiarowej matrycy żelowej [9]. Tworzenie żelu jest jedną z najważniejszych właściwości białek serwatkowych. Powstała struktura może wpływać na wygląd produktu, teksturę, wodochłonność oraz zdolność do uwalniania aromatów [2].

W punkcie żelowania następuje przejście z lepkoelastycznego płynu w sprężystolepki żel. Agregaty białkowe łączą się w pojedynczą, ciągłą strukturę, stabilizowaną przez wiązania dwusiarczkowe, oddziaływania hydrofobowe, wiązania jonowe oraz

wodorowe. Stan oddziaływań pomiędzy poszczególnymi łańcuchami białkowymi zależy między innymi od pH środowiska, a prawdopodobieństwo takich oddziaływań warunkuje stężenie białka [6, 10]. Uważa się, iż punkty żelowania dwóch podstawowych białek serwatkowych: β -laktoglobuliny oraz α -laktoalbuminy nie zależą od stężenia białka [12].

Wyznaczanie punktu żelowania białek jest często problematyczne i wymaga ekstrapolacji. Najprostsza metoda empiryczna polega na przetrzymywaniu próbek w odpowiednich warunkach i organoleptycznym sprawdzaniu płynności próbki [11]. Metoda ta jest oczywiście obciążona subiektywizmem i jako taka nie może być zaakceptowana.

Dużą dokładnością w wyznaczaniu punktu żelowania odznaczają się metody reologiczne. Generalnie zasada polega na zaobserwowaniu zmian pewnych wielkości reologicznych podczas powstawania żelowej matrycy. W przypadku reologii oscylacyjnej mamy do czynienia ze zmianami modułów: zachowawczego G' i stratności G'' . Tradycyjnie przyjmuje się, iż punkt żelowania odpowiada przecięciu się krzywych obrazujących zmiany powyższych modułów. Wówczas to straty energii na przepływ lepki są równe energii oddanej w wyniku sprężystego odkształcenia. Kąt fazowy w tak określonym punkcie żelowania wynosi 45° [13]. Substancje taką w jednakowym stopniu możemy określić jako lepką i sprężystą. Dalszy spadek wartości kąta fazowego obrazuje wzmacnianie się struktury i powstawanie sprężystego żelu [7, 8].

W literaturze brak jest danych na temat wartości temperatur żelowania białek serwatkowych w różnych warunkach pH oraz stężenia białka. Celem pracy było więc ich wyznaczenie. Porównano wyniki otrzymane za pomocą dwóch różnych metod: reometrii rotacyjnej oraz oscylacyjnej.

Materiał i metody

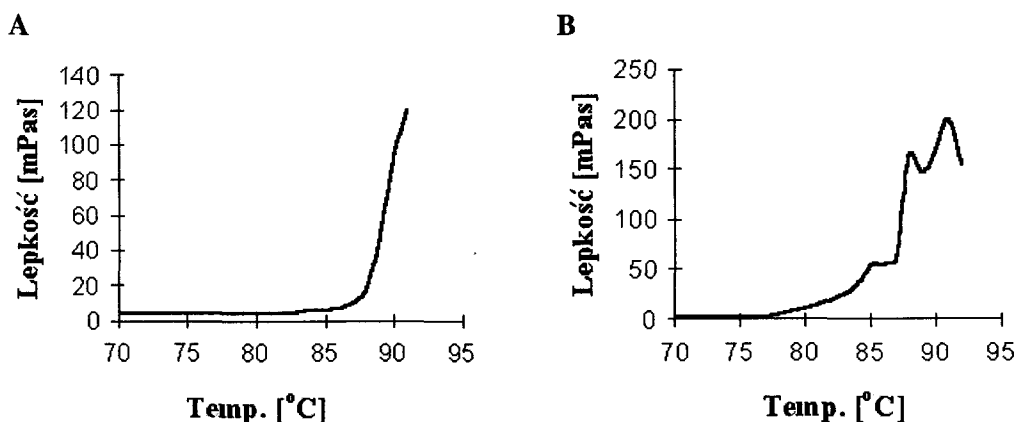
Do badań użyto koncentratu białek serwatkowych (whey protein concentrate-WPC) o zawartości białka 71,27% (N x 6,38) wyprodukowanego przez PPHW „Laktopol” sp. z o. o. Warszawa.

Sporządzano roztwory WPC o stężeniu 6, 8, 10 i 12 % (wag.) w 0,1 M NaCl. Ustalano pH na poziomie 3, 5, 7, 9 i 11 przy użyciu 1 M NaOH lub HCl. Roztwory podgrzewano do temp. 85°C , mierząc ich:

- lepkość za pomocą wiskozymetru Brookfield DV-II+ w układzie cylindrów współosiowych (Small Sample Adapter) przy prędkości 100 obr./min. (wyniki były rejestrowane przy użyciu programu komputerowego Win Gather VI),
- moduł zachowawczy G' oraz stratności G'' używając reometru oscylacyjnego Bohlin VOC w układzie cylindrów współosiowych C 25 przy częstotliwości drgań 5 Hz i maksymalnej wartości amplitudy drgań: 0,02.

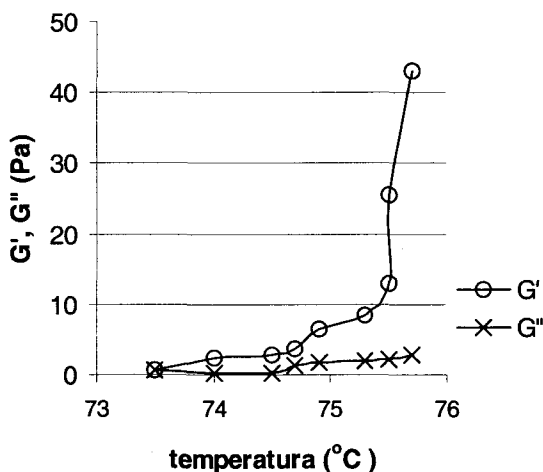
Wyniki i dyskusja

W momencie żelowania obserwowano wzrost lepkości roztworu WPC. W zależności od właściwości teksturalnych powstającego żelu obserwowano dalszy równomierny wzrost lepkości (Rys. 1A), bądź nie można było jej dokładnie zmierzyć z uwagi na to, że powstający żel był nie płynną, sprężystolepką substancją (Rys. 1B).



Rys. 1. Wpływ temperatury na lepkość (mPa s) roztworu WPC o stężeniu 8% w: A: pH = 3,0; B: pH = 7,0.

Fig. 1. Influence of temperature on the viscosity (mPa·s) of 8% WPC solution: A: at pH = 3.0; B: at pH = 7.0.



Rys. 2. Zmiany wartości modułu zachowawczego (G') i stratności (G'') podczas ogrzewania 8% roztworu WPC w pH 9,0.

Fig. 2. Changes of the values of conservative modulus (G') and lossiness (G'') during heating of 8% WPC solution at pH = 9.0.

Metoda reologii oscylacyjnej pozwoliła na bardziej dokładne określenie temperatury żelowania w stosunku do metody reometrii rotacyjnej. W pierwszym przypadku możliwe było określenie temperatury żelowania z dokładnością do $0,5^{\circ}\text{C}$. Otrzymane wartości w przypadku metody reologii oscylacyjnej były o $0,5\text{--}2,5^{\circ}\text{C}$ mniejsze. Wynika to z tego, iż w przypadku reologii rotacyjnej za początek żelowania uznano wzrost lepkości roztworu białek a w przypadku reologii oscylacyjnej moment w którym wartości modułów były zbliżone. Gwałtowny wzrost wartości modułu zachowawczego, który jest odpowiedzialny za wzrost lepkości, następował w temperaturze około $1,5\text{--}2^{\circ}\text{C}$ wyższej niż obserwowane zrównanie się wartości modułów (Rys. 2). Należy zwrócić uwagę na fakt, iż obserwowane zrównanie się modułów występuje na granicy czułości instrumentu. W celu dokładnego wyznaczenia tego punktu można stosować ekstrapolację wartości modułu zachowawczego do wartości 0 [3].

Główne białka serwatkowe: β -laktoglobulina i α -laktoalbumina należą do kategorii tzw. żelujących białek z powodu swojej niskiej masy cząsteczkowej, pomimo tego iż ich hydrofobowość jest większa niż 30% [12]. Punkt żelowania tych białek nie zależy od stężenia białka. W niniejszych badaniach zaobserwowano jednakże, że wraz ze wzrostem zawartości białka następuje spadek temperatury początku żelowania we wszystkich badanych wartościach pH (tab. 1 i 2). Podobne zjawisko zaobserwowali Shimada i Matsushita [12] w odniesieniu do albuminy jaja kurzego. Zasugerowali oni, że na skutek usieciowania tych białek za pomocą reaktywnych grup sulfhydrylowych owoalbuminy następuje przemiana owoalbuminy, białka którego punkt żelowania nie zależy od stężenia, w zależną od stężenia albuminę jaja kurzego. Podobnie obserwowaną zależność temperatury żelowania WPC od stężenia białka można wytłumaczyć zachodzącymi interakcjami pomiędzy grupami dwusiarczkowymi α -laktoalbuminy i reaktywnymi grupami sulfhydrylowymi β -laktoglobuliny. Wcześniej stwierdzono, iż ogrzewanie β -laktoglobuliny z α -laktoalbuminą lub albuminą surowicy krwi bydlęcej prowadzi do powstawania koagregatów [1]. Ogrzewanie zaś samej α -laktoalbuminy nie prowadzi do jej agregacji [5]. Tak więc uważa się, iż agregaty w zdenaturowanych roztworach białek serwatkowych są utworzone z koagregatów tych trzech podstawowych białek [4].

Zaobserwowano zmianę temperatury żelowania roztworu WPC wraz ze zmianą pH (tab. 1 i 2), a najniższą jej wartość stwierdzono dla pH 5 oraz 11. W pH 5,2 znajduje się punkt izoelektryczny białek serwatkowych i białka te koaguluja w rezultacie istniejących sił przyciągania. Na skutek tego zmianę lepkości występującą przy tworzeniu się żelu typu koagulum obserwuje się w stosunkowo niskiej temperaturze. W przeciwieństwie do pH 5,0, w pH 11 białka serwatkowe posiadają duży ładunek ujemny, który powoduje silne odpychanie się ich łańcuchów. Tym należy tłumaczyć fakt, że przy stężeniu białka 6 oraz 8% nie zaobserwowano tworzenia się żelu. W wysoce zasadowym pH występuje jednakże duże rozfałdowanie białek serwatkowych

oraz deprotonizacja grup tiolowych, co sprzyja tworzeniu się wiązań dwusiarczkowych. Jeżeli więc stężenie białka, a więc prawdopodobieństwo oddziaływań jest dostatecznie wysokie, to oddziaływania te będą zachodzić stosunkowo szybko. Wyraża się to niską temperaturą żelowania WPC przy stężeniu białka 10 oraz 12%. W niższych wartościach pH (9 i 7) deprotonizacja grup tiolowych jest mniejsza, a co za tym idzie temperatura żelowania jest wyższa. Wciąż występują bowiem warunki odpychania się jednoimiennie naładowanych łańcuchów białkowych. Stosunkowo wysoką temperaturę żelowania stwierdzono w pH 9 przy najniższym stężeniu białka (6%), a więc małym prawdopodobieństwem oddziaływań (tab. 1 i 2). Przy pH 3 oddziaływania elektrostatyczne powodujące odpychanie się łańcuchów białkowych są tak duże, że białka posiadają tendencję do pozostawania w roztworze. W warunkach niskiego pH następuje zahamowanie oddziaływań pomiędzy grupami dwusiarczkowymi i sulfhydrylowymi.

Tabela 1

Temperatury żelowania (°C) roztworów białek serwatkowych wyznaczone metodą reologii rotacyjnej.
The gel points of whey protein concentrate solutions determined by rotational rheometry.

pH	stężenie białka (% wag.) / protein concentration (wt. %)			
	6	8	10	12
3	87	85	82	80
5	70	68	67	65
7	77	77	77	76
9	81	75	73	73
11	nie żeluje	nie żeluje	65	64

Tabela 2

Temperatury żelowania (°C) roztworów białek serwatkowych wyznaczone metodą reologii oscylacyjnej.
The gel points of whey protein concentrate solutions determined by oscillatory rheometry.

pH	stężenie białka (% wag.) / protein concentration (wt. %)			
	6	8	10	12
3	86	84,5	81	78,5
5	68	66	64,5	63
7	75,5	75,5	75	74,5
9	79,5	73,5	71	71,5
11	nie żeluje	nie żeluje	63	62

W pH 3 zarówno strukturalna stabilność monomerycznej formy β -laktoglobuliny jak i niska reaktywność wolnych grup tiolowych zmniejsza prawdopodobieństwo polimeryzacji białek serwatkowych, która przebiega głównie za pomocą wiązań dwusiarczkowych. Wszystkie te czynniki powodują, że w pH 3 zaobserwowano najwyższe temperatury żelowania w całym badanym zakresie stężeń białka WPC (tab. 1 i 2).

Wnioski

Wartości temperatur punktu żelowania wyznaczone metodą reologii oscylacyjnej były mniejsze niż otrzymane metodą reologii rotacyjnej. Wynikało to z faktu, iż za początek żelowania uznawano w pierwszej metodzie moment, w którym wartości modułów były zbliżone, a w drugiej początek wzrostu lepkości roztworu białek który następuje podczas wzrostu modułu zachowawczego.

Temperatura punktu żelowania białek WPC zależy od stężenia białka w roztworze poddawanych żelowaniu. Wyznaczone temperatury żelowania można wykorzystać w procesach technologicznych.

Zaobserwowane zmiany punktu żelowania wraz ze zmianą pH można wyjaśnić zmianami w proporcji pomiędzy siłami przyciągania i odpychania pomiędzy łańcuchami białkowymi oraz zmianą reaktywności grup tiolowych. Pomimo iż krańcowe wartości pH użyte w powyższych badaniach odbiegają znacznie od pH żywności, zaobserwowane zjawiska można użyć w praktyce stosując wieloetapowe procesy.

LITERATURA

- [1] Dalgleish D.G., Senaratne V., Francois S.: Interactions between α -lactalbumin and β -lactoglobulin in the early stages of heat denaturation. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 3459.
- [2] Foegeding E.A., Gwartney E.A., Errington A.D.: Functional properties of whey proteins in forming networks. W: *Functional Properties of Proteins and Lipids*, (eds. J.R. Whitaker, F. Shahidi, A.L. Munguia, R.Y. Yada and G. Fuller). American Chemical Society, 1998, 145.
- [3] Hsieh Y.L., Regenstein J.M., Rao M.A.: Gel point of whey and egg proteins using dynamic rheological data. *J. Food Sci.*, **58**, 1993, 116.
- [4] Ju Z.Y., Otte J., Zakora M., Quist K.B.: Enzyme-induced gelation of whey proteins: effect of protein denaturation. *Int. Dairy J.*, **7**, 1997, 71.
- [5] Matsudomi N., Oshita T., Kobayashi K.: Enhanced heat-induced gelation of β -lactoglobulin by α -lactalbumin. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **56**, 1992, 1697.
- [6] Mleko S.: Effect of pH on the microstructure and texture of whey protein concentrates and isolate gels. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **1**, 1996, 63.
- [7] Mleko S.: Oscillatory shear studies of heat-induced whey protein isolate gels. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **3**, 1997, 89.
- [8] Mleko S.: Rheological properties of milk and whey protein desserts. *Milchwissenschaft*, **5**, 1997, 262-265.

- [9] Mleko S., Achremowicz B.: Żelowanie koncentratów białek serwatkowych. *Przemysł Spożywczy*, **10**, 1993, 272.
- [10] Mleko S., Achremowicz B., Foegeding A.: Effect of protein concentration on the rheological properties of whey protein concentrate gels. *Milchwissenschaft*, **5**, 1994, 266.
- [11] Ross-Murphy S.B. Rheological characterization of gels. *J. Texture Studies*, **26**, 1995, 391.
- [12] Shimada K., Matsushita S.: Relationship between thermocoagulation of proteins and amino acid compositions. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1980, 413.
- [13] Tung C.Y.M., Dynes P.J.: Relationship between viscoelastic properties and gelation in thermosetting systems. *J. Appl. Polym. Sci.*, **27**, 1982, 569.

DETERMINING THE GEL POINT OF WHEY PROTEINS BY ROTATIONAL AND OSCILLATORY RHEOMETRY

S u m m a r y

The gel points of whey protein concentrate solutions at different pH and protein concentration was determined. Values obtained by oscillatory rheometry were 0.5–2.5°C lower than corresponding values obtained by rotational rheometry. Moduli crossover point is at lower temperature than the point at which there is increase of viscosity. The gel point depended on protein concentration what probably was caused by interactions between whey proteins. Gelation temperature changed with pH. At different pH protein particles have different net charge and reactivity of thiol groups. ☒