

RKT Akademii Rolniczej w Lublinie

STANISŁAW MLEKO

*Wpływ pH i jonów sodowych na teksturę żeli otrzymywanych
z β -laktoglobuliny*

Effect of pH and Sodium Ions on the Texture of Gels Obtained from β -Lactoglobulin

Jedną z podstawowych właściwości funkcjonalnych białek jest ich zdolność do tworzenia stabilnych żeli. Struktura żelowa nadaje produktom żywnościowym kształt oraz odpowiednie właściwości teksturalne. Zapobiega syntezie, która poza pogarszaniem się wyglądu i właściwości sensorycznych produktu pozbawia go często wielu cennych składników odżywczych (4). Stosując jako środek żelujący białko o wysokiej wartości odżywczej, wzbogacamy produkt w cenne aminokwasy. Przykładem może być zastosowanie białek serwatkowych, które w wyniku ogrzewania w odpowiednich warunkach tworzą mocne i stabilne żele (6). Ich właściwości żelowania determinuje β -laktoglobulina, która stanowi około 56% wszystkich białek serwatki. Pozostałe to głównie α -laktoalbumina (19%) i albumina surowicy krwi bydlęcej (7%).

Konformacja termicznie zdenaturowanych białek globularnych nie różni się znacznie od konformacji natywnego białka, jednakże ogrzewanie powoduje ekspozycję na powierzchni pewnych hydrofobowych fragmentów, które w natywnym białku znajdowały się w głębi cząsteczki. Natura międzycząsteczkowych oddziaływań determinuje teksturalne właściwości powstających żeli. Na te oddziaływania wpływają takie czynniki jak: pH, rodzaj obecnych jonów, moc jonowa, zawartość innych substancji (tłuszcz, laktoza).

Strukturę żelu można określić przez zbadanie stopnia deformacji oraz siły potrzebnej do jej zniszczenia. Montejano i in. (7) stwierdzili, iż takie podstawowe wielkości reologiczne, jak względne odkształcenie przy zniszczeniu oraz naprężenie niszczące, korelują odpowiednio ze spójnością i twardością żeli.

Celem pracy było otrzymanie żeli z zawiesin β -laktoglobuliny w wodzie destylowanej i roztworze chlorku sodowego w różnych wartościach pH . Zbadano ich teksturę oraz mikrostrukturę.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano β -laktoglobulinę o zawartości białka 74,80% (Sigma Chemical Co.)

ŻELOWANIE I ANALIZA TEKSTURY

Sporządzano zawiesiny β -laktoglobuliny o stężeniu 120 g białka/kg zawiesiny w wodzie destylowanej oraz w 0,1 mol/L roztworze NaCl. Przy pomocy 1 mol/L HCl lub NaOH ustalano pH zawiesiny na poziomie 5, 6, 7 lub 8. Zawiesiny umieszczano w szklanych rurkach o średnicy wewnętrznej 7 mm i długości 80 mm, powleczonych cienką warstwą oleju roślinnego, zamkniętych z jednej strony gumowymi korkami. Wyloty rurek zakryto folią aluminiową. Zawiesiny ogrzewano w łaźni wodnej o temp. 80°C przez 30 min. Wszystkie próbki przetrzymywano następnie w rurkach w temperaturze pokojowej przez 10 min., a następnie przechowywano przez ok. 20 godz. w temp. 4°C. Żele wysuwano z rurek i cięto przy użyciu skalpela na 6 mm długości cylindry.

Próbki analizowano przy użyciu urządzenia Instron-Universal Testing Machine (Model 6022, Canton, MA) z głowicą o ciężarze 50 N przy prędkości przesuwu 50 mm/min.

Żele ściskano pomiędzy dwiema równoległymi płytkami powleczonymi tłuszczem roślinnym aż do otrzymania pierwszego piksu przy 5% spadku wartości siły. Próbki analizowano w trzech powtórzeniach po 6 walców w każdym powtórzeniu. Żele zostały potraktowane jako nieściśliwe materiały. Wartości naprężenia niszczącego przy ściskaniu i względnego odkształcenia przy zniszczeniu podczas ściskania zostały obliczone wg Hamanna (2). Względne odkształcenie przy zniszczeniu podczas ściskania obliczono ze wzoru: $\epsilon_{src} = \ln [1 - (\Delta h/h)]$, gdzie h - wysokość walca, Δh - wielkość przesunięcia głowicy do zniszczenia próbki. Naprężenie niszczące przy ściskaniu obliczono ze wzoru: $\delta_{src} = F [1 - (\Delta h/h)] / 2\pi r^2$, gdzie F - siła powodująca pęknięcie walca, r - początkowy promień walca.

OTRZYMYWANIE ZDJĘĆ MIKROSKOPOWYCH ŻELI

Żele pocięto na kawałki o objętości 1 mm³, a następnie utrwalano wstępnie w 4% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 mol/L buforze kakodylanowym o $pH = 7,4$ przez 4 godz. w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym przemyciu tym samym buforem preparaty dotrwalano w 1% czterotlenku osmu przez 2 godz. w takim samym 0,1 mol/L buforze kakodylanowym w temp. 4°C. Odwadniano w seriach przy użyciu roztworów alkoholu etylowego o stężeniach 30, 50, 70, 90 i 99,8%, a następnie w tlenku propylenu (8). Preparaty zatapiano w żywicy Spurr Low Viscosity (Polysciences). Następnie po polimeryzacji krojono je na skrawki tzw. ultracienkie o grubości 60 nm i po dobarwieniu 8% octanem uranylu, a następnie cytrynianem ołowiu wg Reynoldsa (8) oglądano i wykonywano elektronogramy przy użyciu mikroskopu elektronowego BS-500 Tesla przy 60 kV.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Istotność różnic między wynikami w teście Studenta w przedziale ufności 0,05 obliczono przy użyciu programu Stat 1 (ISK-Skierniewice).

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Tabele 1 i 2 przedstawiają wpływ pH na względne odkształcenie przy zniszczeniu podczas ściskania żeli otrzymywanych z zawiesin β -laktoglobuliny w odpowiednio: wodzie destylowanej oraz 0,1 mol/L NaCl. Stwierdzono, iż żele otrzymywane z dodatkiem 0,1 mol/L NaCl charakteryzowała większa spójność w porównaniu z żelami otrzymywanymi z zawiesin β -laktoglobuliny w wodzie destylowanej. Dodatek soli spowodował również większe ujednolicenie się wartości względnego odkształcenia. Wyniki te są zgodne z badaniami M l e k o i A c h r e m o w i c z a (5), którzy zauważyli, iż dodatek jonów sodowych do zawiesin koncentratów białek serwatkowych powodował wzrost wartości względnego odkształcenia otrzymywanych żeli. Wzrost wartości odkształcenia wraz z dodatkiem jonów sodowych można według B o w l a n d a i F o e g e d i n g a (1) wytłumaczyć zmianami struktury powstającej matrycy białkowej. Zaobserwowali oni, iż drobnousieciowane żele powstające przy niskich stężeniach jonów sodowych cechują się wysokimi wartościami odkształcenia. Wyższe stężenia Na^+ powodowały spadek tej wielkości do minimum. Takie żele posiadały mieszaną (mixed) mikrostrukturę. Wzrost stężenia jonów sodowych powodował powstawanie struktur ziarnistych (particulate). Następował równocześnie wzrost wartości odkształcenia. Obserwowany w niniejszej pracy wzrost spójności po dodaniu NaCl wynika z tego, iż struktura matrycy białkowej staje się bardziej ziarnista (particulate). Aby zaobserwować powstawanie struktury drobnousieciowej, badania żeli otrzymywanych z dodatkiem NaCl przeprowadzono w pH wyższym o jedną jednostkę w porównaniu z żelami bez dodatku soli. Wzrost pH zawiesiny β -laktoglobuliny w 0,1 mol/L NaCl powodował zmianę wartości odkształcenia, odzwierciedlającą zmianę mikrostruktury żelu. Najniższą wartość odkształcenia zaobserwowano przy $pH = 7$. Otrzymany żel posiadał wówczas strukturę mieszaną (mixed) - fot. 1B. Wzrost pH do 8 spowodował istotny wzrost spójności, gdyż powstający żel posiadał strukturę bardziej drobnousieciowaną (fot. 1C). Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku koncentratów białek serwatkowych (3).

Tabele 3 i 4 przedstawiają wpływ pH na naprężenie niszczące przy ściskaniu żeli otrzymywanych z zawiesin β -laktoglobuliny odpowiednio w wodzie destylowanej oraz 0,1 mol/L NaCl. Dodatek NaCl spowodował wzrost wartości naprężenia. Jest to zgodne z poprzednimi badaniami (5), w których stwierdzono, iż dodatek jonów sodowych do zawiesin izolatu białek serwatkowych powoduje wzrost twardości otrzymywanych żeli. Maksymalną wartość naprężenia niszczącego zaobserwowano przy dodatku jonów sodowych w ilości 100 mmol/L. Stwierdzono (6), iż pozytywne działanie dodatnich jonów na żelowanie wynika z faktu, że jony te wiążą i neutralizują ujemne grupy cząsteczek polipeptydów. Działanie takie jest bardziej

Tab. 1. Wpływ pH na względne odkształcenie przy zniszczeniu podczas ściskania żeli otrzymywanych z zawiesin β -laktoglobuliny w wodzie destylowanej*

Effect of pH on relative deformation with destruction while stressing the gels obtained from the suspensions of β -lactoglobulin in distilled water

pH	I	II	III	Średnia
5	0,06	0,70	0,61	0,66 ^c
6	0,21	0,19	0,19	0,20 ^a
7	0,55	0,52	0,52	0,53 ^b
* Każdy z trzech wyników jest średnią z sześciu powtórzeń				
a-c Różnice między średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne (<0,05)				

Tab. 2. Wpływ pH na względne odkształcenie przy zniszczeniu podczas ściskania żeli otrzymywanych z zawiesin β -laktoglobuliny w 0,1M NaCl*

Effect of pH on relative deformation with destruction while stressing the gels obtained from the suspensions of β -lactoglobulin on 0.1 M NaCl

pH	I	II	III	Średnia
6	0,82	0,83	0,81	0,82 ^{ab}
7	0,77	0,72	0,80	0,76 ^a
8	0,85	0,88	0,81	0,85 ^b
* Każdy z trzech wyników jest średnią z sześciu powtórzeń				
a-c Różnice między średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne (<0,05)				

Tab. 3. Wpływ pH na naprężenie niszczące przy ściskaniu żeli otrzymywanych z zawiesin β -laktoglobuliny w wodzie destylowanej*

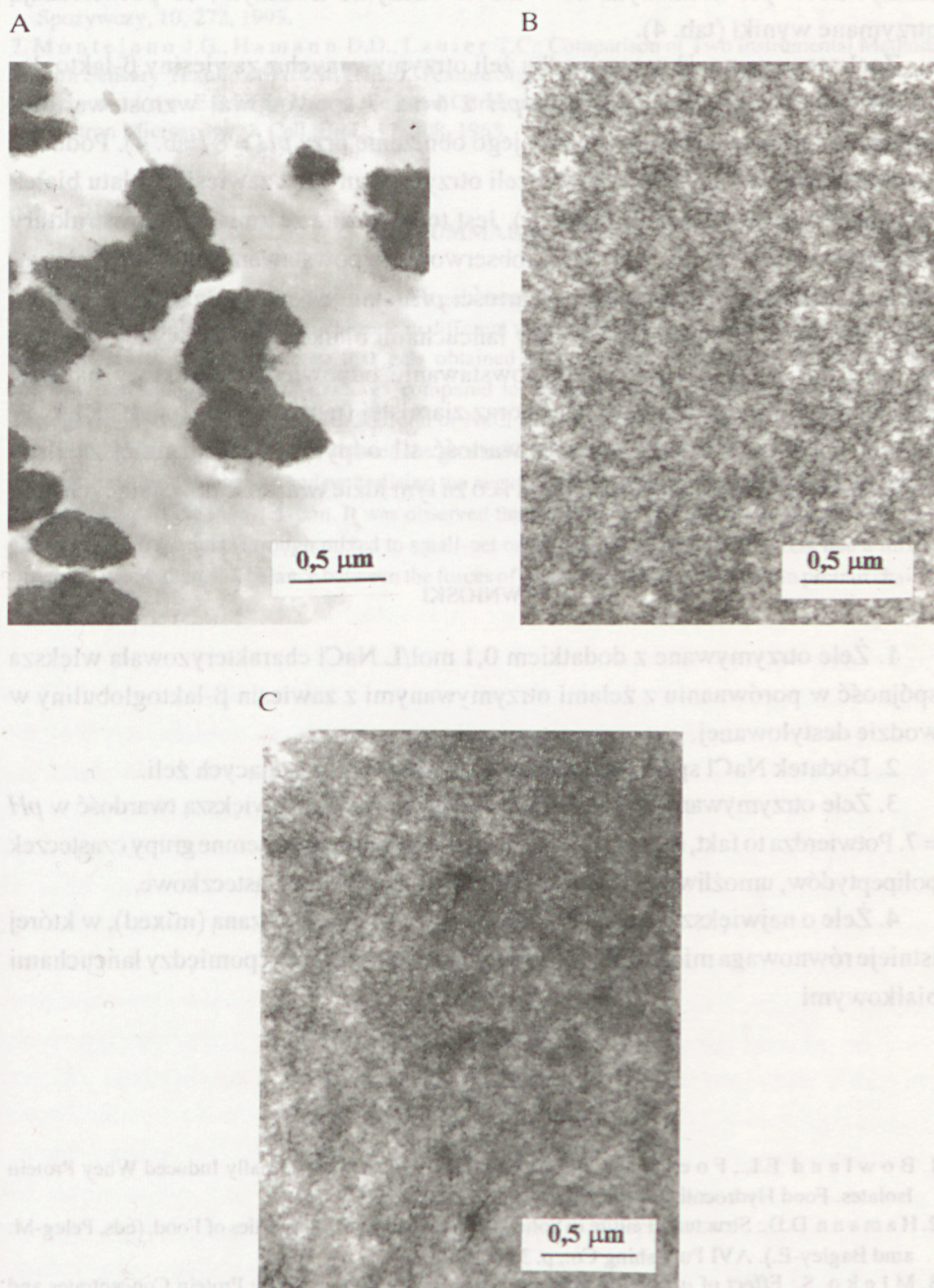
Effect of pH on destruction tension while stressing the gels obtained from the suspensions of β -lactoglobulin in distilled water

pH	I	II	III	Średnia
5	9,66	8,95	9,14	9,25 ^c
6	2,66	2,41	2,28	2,45 ^a
7	5,11	4,27	4,30	4,56 ^b
* Każdy z trzech wyników jest średnią z sześciu powtórzeń				
a-c Różnice między średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne (<0,05)				

Tab. 4. Wpływ pH na naprężenie niszczące przy ściskaniu żeli otrzymywanych z zawiesin β -laktoglobuliny w 0,1 mol/L NaCl*

Effect of pH on destruction tension while stressing the gels obtained from the suspension of β -lactoglobulin in 0.1 mol/L NaCl

pH	I	II	III	Średnia
6	22,5	24,5	19,3	22,1 ^a
7	38,8	40,8	39,3	39,6 ^c
8	33,1	31,4	32,4	32,3 ^b
* Każdy z trzech wyników jest średnią z sześciu powtórzeń				
a-c Różnice między średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne (<0,05)				



Fot. 1. Mikrostruktura (TEM) żelu β -laktoglobuliny otrzymanego przy (A) $pH = 6,0$; (B) $pH = 7,0$; (C) $pH = 8,0$
 Microstructure (TEM) of gel of β -lactoglobulin obtained with (A) $pH = 6,0$; (B) $pH = 7,0$; (C) $pH = 8,0$

efektywne w pH zbliżonym do 7 niż w odczynie kwaśnym, co potwierdzają otrzymane wyniki (tab. 4).

Zaobserwowano, iż w przypadku żeli otrzymywanych z zawiesiny β -laktoglobuliny w 0,1 mol/L NaCl wzrost pH z 6 na 7 spowodował wzrost wartości naprężenia niszczącego, a następnie jego obniżenie przy $pH = 8$ (tab. 4). Podobną tendencję zauważono w przypadku żeli otrzymywanych z zawiesin izolatu białek serwatkowych w 0,1 mol/L NaCl (3). Jest to związane ze zmianą mikrostruktury otrzymywanych żeli. Przy $pH = 7$ zaobserwowano powstawanie struktury mieszanej (mixed) - fot. 1B. Przy takiej wartości pH istnieje równowaga między siłami odpychania i przyciągania pomiędzy łańcuchami białkowymi. Powyżej i poniżej tej wartości pH zaobserwowano powstawanie odpowiednio struktury bardziej drobnousieciowanej (fine-stranded) oraz ziarnistej (particulate) - fot. 1C i 1A. W żelach o takiej strukturze wzrasta wartość sił odpychania, co zmniejsza ilość międzycząsteczkowych oddziaływań i co za tym idzie twardość powstających żeli.

WNIOSKI

1. Żele otrzymywane z dodatkiem 0,1 mol/L NaCl charakteryzowała większa spójność w porównaniu z żelami otrzymywanymi z zawiesin β -laktoglobuliny w wodzie destylowanej.

2. Dodatek NaCl spowodował wzrost twardości powstających żeli.

3. Żele otrzymywane z dodatkiem NaCl wykazywały największą twardość w $pH = 7$. Potwierdza to fakt, iż jony sodowe, wiążąc i neutralizując ujemne grupy cząsteczek polipeptydów, umożliwiają większe oddziaływania międzycząsteczkowe.

4. Żele o największej twardości posiadały strukturę mieszaną (mixed), w której istnieje równowaga między siłami odpychania i przyciągania pomiędzy łańcuchami białkowymi

PIŚMIENNICTWO

1. Bowland E.L., Foegeding E.A.: Effect of Anions on Thermally Induced Whey Protein Isolates. Food Hydrocoll., 143, 9, 1995.
2. Hamann D.D.: Structural Failure in Solid Foods [in:] Physical Properties of Food, (eds. Peleg-M. and Bagley-E.). AVI Publishing Co., p. 351, 1983.
3. Mleko S.: Effect of pH on the Microstructure and Texture of Whey Protein Concentrates and Isolate Gels. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1, 63-72, 1996.
4. Mleko S.: Żelowanie białek globularnych. Przemysł Spożywczy, 1996 (w druku).
5. Mleko S., Achremowicz B.: Effect of Sodium Chloride and Calcium Chloride on the Fracture Properties of Whey Protein Gels. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1996 (w druku).

6. Mleko S., Achremowicz B.: Żelowanie koncentratów białek serwatkowych. *Przemysł Spożywczy*, 10, 272, 1993.
7. Montejano J.G., Hamann D.D., Lanier T.C.: Comparison of Two Instrumental Methods with Sensory Texture of Protein Gels. *J. Texture Stud.*, 16, 403, 1985.
8. Reynolds E.S.: The Use of the Lead Citrate at High pH as and Electron Opaque Stain in Electron Microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208, 1963.

SUMMARY

The purpose of the studies was to obtain gels from the suspension of γ -lactoglobulin in distilled water and the solution of sodium chloride in different values of pH . Their texture and microstructure were examined. It was observed that gels obtained with an addition of 0.1 mol/L NaCl were characterised by greater compaction as compared to the gels obtained from the suspensions of γ -lactoglobulin in distilled water. An addition of NaCl caused greater hardness of the gels. The gels obtained with an addition of NaCl showed the greatest hardness in $pH = 7$. This confirms the fact that sodium ions through binding and neutralising the negative groups of particles of polypeptides enable greater intra-particle inter-relation. It was observed that an increase of pH caused changed structure of the gel from granular through mixed to small-net one. Gels of the greatest hardness had a mixed structure, where there is a balance between the forces of repulsion and attraction within protein chains.