

STANISŁAW MLEKO, PIOTR JANAS, STANISŁAW PIKUS

## TEKSTURA A STRUKTURA ŻELI WYBRANYCH BIAŁEK GLOBULARNYCH

### Streszenie

Jedną z najważniejszych właściwości funkcjonalnych białek jest żelowanie. Tekstura żeli może być określana za pomocą pomiaru siły powodującej załamanie się ich struktury oraz wielkości występującego przy tym odkształcenia. Celem badań było określenie zależności pomiędzy teksturą żeli a ich budową. Użyto izolatu białek serwatkowych, albuminy surowicy krwi bydlęcej oraz świni i  $\beta$ -laktoglobuliny. Żele badanych białek miały największą wartość naprężenia przy takich wartościach pH, przy których prawdopodobnie istnieje równowaga między siłami odpychania i przyciągania pomiędzy łańcuchami białkowymi. Żele otrzymane z różnych białek i charakteryzujące się podobną twardością miały różną strukturę. Maksymalną twardość otrzymanych żeli determinowało stężenie białka w dyspersji poddawanej żelowaniu.

### Wstęp

Białka charakteryzują się właściwościami funkcjonalnymi, które umożliwiają wykorzystanie ich w wielu produktach spożywczych. Jedną z najważniejszych cech jest zdolność tworzenia stabilnych żeli. Tekstura takich żeli może być określana za pomocą pomiaru siły powodującej załamanie się ich struktury oraz wielkości występującego przy tym odkształcenia. Stwierdzono, iż wartości naprężenia niszczącego przy ściskaniu oraz względnego odkształcenia przy zniszczeniu podczas ściskania korelują odpowiednio z twardością i spójnością żeli [6].

Białka globularne mogą tworzyć dwójakiego rodzaju strukturę w zależności od pH oraz stężenia soli [1]. Przezroczyste żele są tworzone ze struktur o wielkości odpowiadającej od jednej do kilku średnic cząsteczki białka. Takie struktury nazywa się drobnousieciowanymi (fine-stranded). Nieprzezroczyste żele tworzone są z cząstek o

średnicy 100–1000 razy większej od średnicy cząsteczki białka. Są to tak zwane struktury ziarniste (particulate). Niekiedy obserwuje się powstawanie struktur mieszanych (mixed), będących czymś pośrednim pomiędzy drobnousieciowanymi a ziarnistymi.

Właściwości teksturalne żeli może determinować struktura matrycy białkowej oraz natura międzycząsteczkowych oddziaływań. Interesująca wydaje się odpowiedź na pytanie, czy matryca białkowa, utworzona z agregatów oraz pustych przestrzeni o jednakowych wymiarach, będzie się charakteryzowała podobnymi właściwościami teksturalnymi, niezależnie od składu białkowego lub inaczej mówiąc, czy żele otrzymane z różnych białek i posiadające podobne właściwości teksturalne charakteryzują się podobną strukturą białkowej matrycy.

### **Materiał i metody badań**

Do badań użyto izolatu białek serwatkowych (whey protein isolate-WPI) (Le Sueur Isolates, Le Sueur, MN, USA), albuminy surowicy krwi bydłowej (bovine serum albumin-BSA), albuminy surowicy krwi świni (pig serum albumin-PSA) oraz  $\beta$ -laktoglobuliny (Sigma Chemical Co.). W próbkach oznaczano zawartość białka ogólnego metodą Kjeldahla ( $N \times 6,38$ ).

Sporządzano dyspersje białek o stężeniu 15% (m/m) w  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  roztworze NaCl. Za pomocą  $1 \text{ mol/dm}^3$  NaOH lub  $1 \text{ mol/dm}^3$  HCl ustalano pH zawiesiny w przedziale 3,0–11,0, a w przypadku  $\beta$ -laktoglobuliny na poziomie 6,0; 7,0 i 8,0. Zawiesiny ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze  $80^\circ\text{C}$ , przez 30 minut. Otrzymane żele analizowano przy użyciu urządzenia Instron-Universal Testing Machine (Model 6022, Canton, MA, USA). Obliczano wartości naprężenia niszczącego przy ściskaniu i względnego odkształcenia przy zniszczeniu podczas ściskania [3].

Żele cięto na kawałki o przybliżonej objętości  $1 \text{ mm}^3$  i utrwalano przez 4 godz. w 4% roztworze aldehydu glutarowego w  $0,1 \text{ M}$  buforze kokadylanowym (pH 7,4). Po trzykrotnym przemyciu w tym buforze, próbki utrwalano przez 2 godz. w 1% roztworze czterotlenku osmu w  $0,1 \text{ M}$  buforze kokadylanowym (pH 7,4), odwadniano w seriach przy użyciu etanolu i zatapiano w żywicy Sourr, którą polimeryzowano w piecu próżniowym, w temp.  $70^\circ\text{C}$  [7]. Preparaty cięto przy użyciu ultramikrotomu Om-U3 Reichert na próbki o grubości 60 nm, następnie barwiono przy użyciu octanu uranylu i cytrynianu ołowiawego. Tak przygotowane preparaty oglądano i fotografowano przy użyciu elektronowego mikroskopu transmisyjnego BS-500 Tesla (Czechy).

Wykonano pomiary krzywych małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego. Pomiary przeprowadzano przy użyciu kamery Kratky'ego (Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa). Próbkę żelu przygotowywano w specjalnie wykonanej celce o grubości 1,5 mm. Krzywe rozpraszania przedstawiono jako funkcje intensywności od wektora rozpraszania.

Stosując statystyczny program Stat1 (ISK-Skierniewice), obliczono wartości odchyłeń standardowych oraz zbadano istotność różnic między wynikami, testem t-Studenta, na poziomie istotności  $P = 0,05$ .

## Wyniki badań i dyskusja

Wyniki badań tekstury żeli zebrano w tab. 1 i 2. W przypadku żeli BSA i PSA, wraz ze wzrostem pH do 8,0 stwierdzono wzrost względnego odkształcenia próby przy zniszczeniu podczas ściskania, a następnie jego zmniejszenie. Nie zaobserwowano istnienia związku pomiędzy wartością pH, a odkształceniem żeli WPI (tab. 2). Największe wartości naprężenia niszczącego przy ściskaniu zaobserwowano w zakresie pH 7–10 (tab. 1). Można założyć, że oznaczone żele są najbardziej twarde w tym zakresie pH, gdyż istnieje równowaga między siłami odpychania i przyciągania pomiędzy łańcuchami białkowymi [5]. Żele charakteryzujące się podobną twardością miały różną strukturę. Żel WPI powstały przy pH 8,0 wykazywał mieszaną mikrostrukturę (fot. 1), a żel BSA przy pH 8,0 i 9,0 składał się z bardziej drobnych struktur (wielkości kilkudziesięciu nm) (fot. 2). Podobną strukturę miał żel  $\beta$ -laktoglobuliny przy pH 7,0 (fot. 3). Całkowicie inną strukturę zaobserwowano w przypadku żelu PSA otrzymanego przy pH 9,0 i 10,0. Żel ten jest drobnousieciowym tworem złożonym z bardzo blisko ułożonych obok siebie agregatów (fot. 4).

Tabela 1

Wpływ wartości pH na naprężenie niszczące przy ściskaniu żeli, otrzymanych z zawiesin  $\beta$ -laktoglobuliny ( $\beta$ -LG), izolatu białek serwatkowych (WPI), albuminy surowicy krwi bydłowej (BSA) oraz albuminy surowicy krwi świni (PSA).\*

Influence of pH on shear stress at fracture of gels obtained from  $\beta$ -lactoglobulin, whey protein isolate, bovine serum albumin and pig serum albumin.\*

Naprężenie niszczące przy ściskaniu [kPa]									
Shear stress at fracture [kPa]									
pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0
$\beta$ -LG	nie badano	nie badano	nie badano	32.9 <sup>fg</sup> (2.11)	63.8 <sup>p</sup> (4.03)	40.8 <sup>ij</sup> (3.82)	nie badano	nie badano	nie badano
WPI	14.4 <sup>cde</sup> (2.21)	-----	-----	41.2 <sup>ij</sup> (3.92)	48.2 <sup>klm</sup> (0.54)	60.5 <sup>op</sup> (6.60)	51.6 <sup>mn</sup> (2.09)	43.2 <sup>ijk</sup> (3.38)	45.0 <sup>kl</sup> (1.39)
BSA	6.44 <sup>ab</sup> (0.60)	15.0 <sup>de</sup> (0.90)	10.3 <sup>bcd</sup> (0.97)	48.7 <sup>lm</sup> (2.69)	56.2 <sup>no</sup> (4.18)	64.4 <sup>p</sup> (4.67)	61.2 <sup>p</sup> (2.09)	48.1 <sup>klm</sup> (2.29)	30.1 <sup>f</sup> (1.38)
PSA	4.35 <sup>a</sup> (0.39)	16.3 <sup>e</sup> (0.20)	8.38 <sup>ab</sup> (0.49)	8.97 <sup>ab</sup> (0.17)	9.81 <sup>bc</sup> (0.36)	35.5 <sup>gh</sup> (2.90)	65.0 <sup>p</sup> (6.49)	63.6 <sup>p</sup> (5.71)	39.0 <sup>hi</sup> (1.97)

\*Wartości średnie (odchylenie standardowe dla trzech powtórzeń po sześć próbek)

\*Mean values (standard deviation for three replications; six samples in one replication)

----- Tekstura nieodpowiednia do pomiaru

----- Texture inappropriate for measurements

a-p Różnice między średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ( $P \leq 0,05$ )

a-p Differences between means with different letters are statistically significant ( $P \leq 0.05$ )

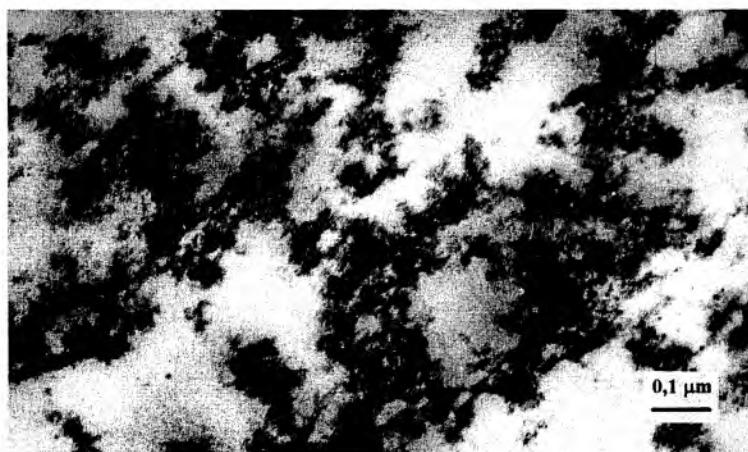
Tabela 2

Wpływ wartości pH na względne odkształcenie przy zniszczeniu podczas ściskania żeli, otrzymanych z zawiesin  $\beta$ -laktoglobuliny ( $\beta$ -LG), izolatu białek serwatkowych (WPI), albuminy surowicy krwi bydlęcej (BSA) oraz albuminy surowicy krwi świni (PSA).\*

Influence of pH on shear stress at fracture of gels obtained from  $\beta$ -lactoglobulin, whey protein isolate, bovine serum albumin and pig serum albumin.\*

Względne odkształcenie przy zniszczeniu podczas ściskania Shear strain at fracture									
pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0
$\beta$ -LG	nie badano	nie badano	nie badano	0.82 <sup>mno</sup> (0.02)	0.77 <sup>klm</sup> (0.01)	0.89 <sup>pqr</sup> (0.01)	nie badano	nie badano	nie badano
WPI	0.27 <sup>b</sup> (0.01)	-----	-----	1.35 <sup>i</sup> (0.01)	0.90 <sup>pqr</sup> (0.01)	0.93 <sup>qr</sup> (0.01)	0.90 <sup>pqr</sup> (0.01)	0.94 <sup>r</sup> (0.01)	1.12 <sup>s</sup> (0.08)
BSA	0.29 <sup>b</sup> (0.01)	0.39 <sup>c</sup> (0.00)	0.50 <sup>d</sup> (0.02)	0.73 <sup>ijk</sup> (0.05)	0.86 <sup>nop</sup> (0.04)	0.87 <sup>opq</sup> (0.02)	0.74 <sup>kl</sup> (0.05)	0.72 <sup>hijk</sup> (0.03)	0.70 <sup>hij</sup> (0.01)
PSA	0.18 <sup>a</sup> (0.03)	0.37 <sup>c</sup> (0.11)	0.62 <sup>efg</sup> (0.03)	0.60 <sup>ef</sup> (0.01)	0.80 <sup>lmn</sup> (0.08)	0.89 <sup>pqr</sup> (0.08)	0.66 <sup>gh</sup> (0.04)	0.59 <sup>e</sup> (0.07)	0.67 <sup>ghi</sup> (0.02)

\*Wartości średnie (odchylenie standardowe dla trzech powtórzeń po sześć próbek)  
\*Mean values (standard deviation for three replications; six samples in one replication)  
----- Tekstura nieodpowiednia do pomiaru  
----- Texture inappropriate for measurements  
a-t Różnice między średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ( $P \leq 0,05$ )  
a-t Differences between means with different letters are statistically significant ( $P \leq 0,05$ )

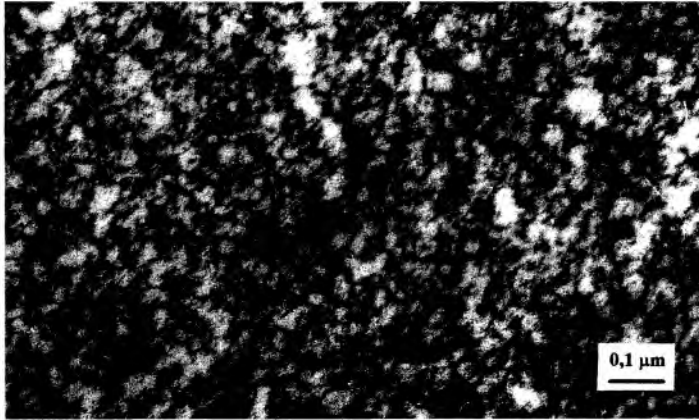


Fot. 1. Mikrostruktura (TEM) żelu WPI, pH 8,0.

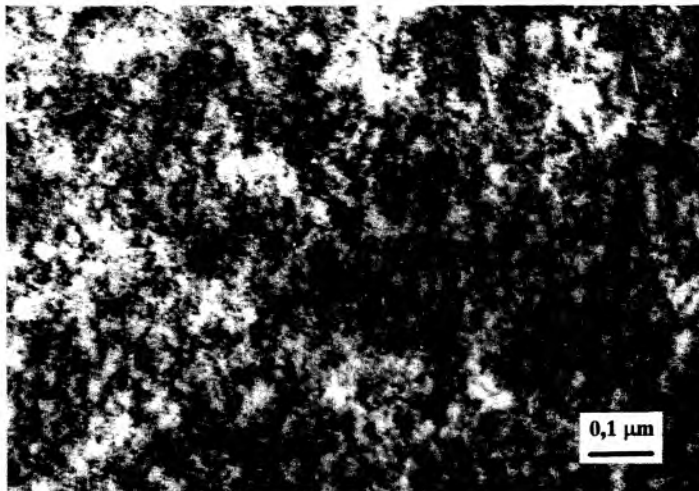
Phot. 1. Microstructure (TEM) of gel WPI, pH 8.0.

Badania rentgenograficzne żeli metodą SAXS również wykazały istnienie podobnych różnic w budowie żeli. Kształty krzywych rozpraszania SAXS potwierdzają, że wszystkie żele, z wyjątkiem PSA, złożone są z cząstek o różnej wielkości, połączo-

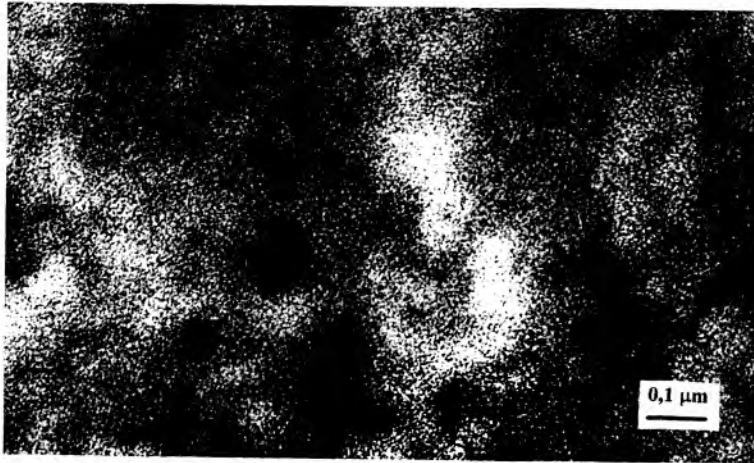
nych w agregaty (rys. 1, 2 i 4). Żel PSA, otrzymany przy pH 9,0 składa się natomiast z pojedynczych struktur o jednakowych, w przybliżeniu, wymiarach (rys. 3). Dla wartości pH 10,0 w której zaobserwowano powstawanie drobniejszych struktur (fotografii nie zamieszczono) w porównaniu z pH 9,0, krzywe rozpraszania SAXS potwierdzają istnienie struktur o mniejszej wielkości (rys. 1 i 2). Mimo tych różnic, w przypadku obu żeli zanotowano nie różniące się statystycznie wartości naprężenia niszczącego przy pęknięciu (tab. 1). Przebieg krzywej SAXS żelu BSA przy pH 10,0 może świadczyć o pewnym uporządkowaniu agregatów białkowych w żelach. Prawdopodobnie z



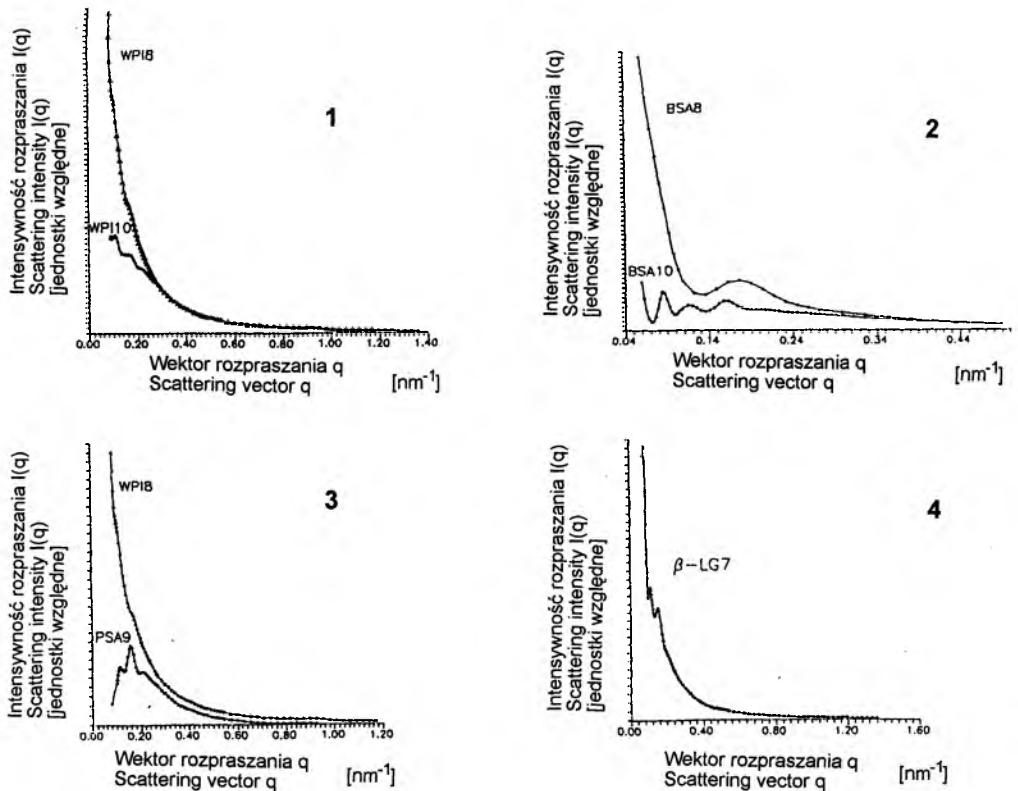
Fot. 2. Mikrostruktura (TEM) żelu BSA, pH 8,0.  
Phot. 2. Microstructure (TEM) of gel BSA, pH 8.0.



Fot. 3. Mikrostruktura (TEM) żelu  $\beta$ -LG, pH 7,0.  
Phot. 3. Microstructure (TEM) of gel  $\beta$ -LG, pH 7.0.



Fot. 4. Mikrostruktura (TEM) żelu PSA, pH 9,0  
 Phot. 4. Microstructure (TEM) of gel PSA, pH 9.0.



Rys. 1-4. Krzywe małąkątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego.  
 Fig. 1-4. Small angle X-ray scattering curves.

uwagi na fakt, iż w tych warunkach pH cząsteczki białek naładowane są ujemnie, występuje ich elektrostatyczne odpychanie. Maksymalizacja wartości naprężenia niszczącego przy pęknięciu, może więc być spowodowana istnieniem uporządkowanych struktur, za pomocą wiązań podnoszących oporność próbki na pęknięcie przy ścisaniu.

Stwierdzono, że nie istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy maksymalnymi wartościami naprężenia stycznego przy ścisaniu żeli wszystkich czterech badanych preparatów białkowych (tab. 1). Wartość ta wynosiła średnio około 63 kPa. Świadczy to o tym, że stężenie białka w zawiesinie poddawanej żelowaniu determinuje twardość żelu. Zgodne jest to z wcześniejszymi badaniami Foegedinga [2] oraz Mleko i wsp. [5], w których stwierdzono, że istnieją wykładnicze zależności pomiędzy stężeniem białka w żelach białek serwatkowych, a ich twardością. Naprężenie styczne przy pęknięciu, określone jako funkcja stężenia białka, może być wyrażone w postaci wzoru:

$$\sigma \text{ (kPa)} = A (\% \text{ białka})^n \quad (1)$$

Wartości stałej „n” wahają się w przedziale 2,19–2,79, w odniesieniu do żeli izolatu białek serwatkowych, a w przypadku żeli koncentratów białek serwatkowych 3,3–4,1. Stała „A” żeli izolatu białek serwatkowych wynosiła 0,047 [2]. Podstawiając tę wartość, naprężenie 63 kPa oraz stężenie 15% do wzoru (1) otrzymuje się wartość współczynnika „n” równą 2,66 a więc zawierającą się w zakresie określonym dla żeli WPI przez Foegedinga [2].

## Wnioski

1. Żele białek globularnych posiadają największą wartość naprężenia przy pęknięciu w takich wartościach pH, przy których prawdopodobnie istnieje równowaga między siłami odpychania i przyciągania pomiędzy łańcuchami białkowymi.
2. Żele otrzymane z różnych białek i charakteryzujące się podobną wartością naprężenia, przy pęknięciu posiadają różną strukturę. Świadczy to o tym, iż nie tylko wielkość i stopień upakowania agregatów determinuje ich twardość. Również budowa cząsteczek białek, determinując naturę międzycząsteczkowych oddziaływań, wpływa na teksturę powstającego żelu.
3. Maksymalną wartość naprężenia przy pęknięciu żeli determinuje stężenie białka w zawiesinie poddawanej żelowaniu.

## LITERATURA

- [1] Clark A.H., Judge F.J., Stubbs J.M., Suggett A.: Electron microscopy of network structures in thermally induced globular protein gels. *Inter. J. Peptide Prot. Res.*, 17, 1981, 380.

- [2] Foegeding E.A.: Rheological properties of whey protein isolate gels determined by torsional fracture and stress relaxation. *J. Texture Studies*, **23**, 1992, 337.
- [3] Hamann D.D.: Structural failure in solid foods, *in: Physical Properties of Food*, (eds. Peleg, M. and Bagley, E.). AVI Publishing Co. 1983, 351.
- [4] Mleko S., Achremowicz B., Foegeding E.A.: Effect of protein concentration on the rheological properties of whey protein concentrate gels. *Milchwissenschaft*, **49**, 1994, 266.
- [5] 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.
- [6] Montejano J.G., Hamann D.D., Lanier T.C.: Comparison of two instrumental methods with sensory texture of protein gels. *J. Texture Stud.*, **16**, 1985, 403.
- [7] Reynolds E.S.: The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron. *J. Cell Micr. Biol.*, **17**, 1963, 208.

## TEXTURE AND STRUCTURE OF SOME GLOBULAR PROTEIN GELS

### S u m m a r y

Gelation is one of the most important functional properties of proteins. Gel texture can be evaluated by measurements of the force necessary to break the structure and the value of strain. The aim of this research was to find relationships between texture and structure of the gels. Whey protein isolate, bovine serum albumin, pig serum albumin and  $\beta$ -lactoglobulin were used. The greatest value of shear stress at fracture was noted at pH, at which there is probably a balance between repulsive and attractive forces in the proteins molecules. For the gels obtained from different proteins and characterized by similar shear stress value, different structures were observed. Maximum value of shear stress was determined by the protein concentration. ✕