

STANISŁAW MLEKO

WŁAŚCIWOŚCI TEKSTURALNE I MIKROSTRUKTURA ŻELI ALBUMINY SUROWICY KRWI BYDŁĘCEJ Z DODATKIEM SKROBI

Streszczenie

Przebadano wpływ dodatku skrobi ziemniaczanej na teksturę i mikrostrukturę żeli albuminy surowicy krwi bydłowej. Przy wyższych stężeniach skrobi (300 g/kg BSA) zaobserwowano spadek spójności powstających żeli. Skrobia tworzyła wówczas osobną sieć żelową wewnątrz matrycy białkowej. Dodatek skrobi powodował wzrost twardości powstających żeli BSA. Tworzące nieciągłą fazę spęczniałe ziarna skrobiowe pełniły rolę wypełniaczy wzmacniających strukturę matrycy BSA. Wraz z dodatkiem skrobi, struktura matrycy białkowej stawała się coraz bardziej upakowana i drobnousieciowana, co mogło również być powodem wzrostu twardości powstających żeli.

Wstęp

Białka globularne posiadają zdolność żelowania pod wpływem ogrzewania. Właściwość ta zależy od wielu czynników, wśród których najważniejsze to: siła jonowa roztworu, pH, masa cząsteczkowa białka i jego skład aminokwasowy, stężenie białka, temperatura, czas i szybkość ogrzewania [4, 5, 6]. Duże znaczenie pod względem żywieniowym, funkcjonalnym oraz ekologicznym posiada wykorzystanie białek serwatkowych. Wśród nich najważniejsze to: β -laktoglobulina, α -laktoalbumina oraz albumina surowicy krwi bydłowej (bovine serum albumin – BSA). Ta ostatnia albumina posiada masę cząsteczkową równą 66267 Da i elipsoidalny kształt cząsteczek. Jej punkt izoelektryczny znajduje się w okolicy $\text{pH} = 5$. Trzyczłonowa struktura tego białka zależy od pH i może występować w postaci kilku konfiguracji przestrzennych. Termiczne żelowanie białek globularnych przebiega w dwóch fazach: rozfałdowanie białka oraz agregacja. Stosunek prędkości przebiegu tych dwóch faz żelowania jest istotnym czynnikiem, który wpływa na właściwości reologiczne powstających żeli. W inny sposób przebiega żelowanie skrobi. Zachodzi ono na skutek zniszczenia uporządkowania wewnątrz ziarn skrobiowych. Uwadnianie ziarn skrobiowych uplastycznia

amorficzne regiony ich wnętrza. Zwiększa się ruchliwość łańcuchów amylopektyny. W podwyższonej temperaturze zachodzi ich rozpuszczanie się. Struktura ziarn skrobiowych staje się coraz bardziej amorficzna, postępuje pęcznienie ziarn i wypływ amylozy. Następuje kleikowanie skrobi i charakterystyczny wzrost lepkości. Interesującym z punktu widzenia zastosowania w technologii żywności jest zagadnienie powstawania mieszanych żeli białkowo-węglowodanowych. Zagadnienie to jest jak dotąd mało poznane, a właściwości powstających mieszanych żeli są trudne do określenia a priori.

Material i metody

Do badań użyto albuminy surowicy krwi bydlęcej o zawartości białka 96,20% (Sigma Chemical Co.) oraz skrobi ziemniaczanej wyprodukowanej przez Zakład Przemysłu Ziemniaczanego w Trzemesznie. Temperatura kleikowania skrobi wynosiła 61°C i została wyznaczona za pomocą pomiaru lepkości przy użyciu wiskozymetru Brookfield DV-II+ w układzie cylindrów współosiowych (Small Sample Adapter) przy prędkości 100 obr./min.

Żelowanie i analiza tekstury

Sporządzano roztwór BSA o stężeniu 150 g białka/kg roztworu w 0,1 M roztworze NaCl. Dodawano skrobi ziemniaczanej w ilości 30, 50, 100, 150, 200, 300, 400 lub 500 g/kg białka BSA. Przy pomocy 1 M NaOH ustalano pH roztworu na poziomie 7,0. Roztwory umieszczano w szklanych rurkach o średnicy wewnętrznej 7 mm i długości 80 mm powleczonych wewnątrz olejem roślinnym, zamkniętych z jednej strony gumowymi korkami. Wyloty rurek zakryto folią aluminiową. Roztwory ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 80°C przez 30 min., pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 10 min. i przechowywano przez ok. 20 godz. w temperaturze 4°C po czym, po wysunięciu z rurek, cięto przy pomocy skalpela na walce o dł. 6 mm.

Właściwości reologiczne utworzonych żeli analizowano przy użyciu urządzenia Instron-Universal Testing Machine (Model 6022, Canton, MA) z głowicą o masie 50 N przy prędkości przesuwu 50 mm/min., ściskając je pomiędzy dwiema równoległymi płytkami powleczonymi tłuszczem roślinnym, aż do otrzymania pierwszego piksu przy 5% spadku wartości siły. Próbkę analizowano w trzech powtórzeniach po 6 walców w każdym powtórzeniu. Żele zostały potraktowane jako nieściśliwe materiały. Wartości naprężenia niszczonego przy ściskaniu i względnego odkształcenia przy zniszczeniu podczas ściskania zostały obliczone wg Hamann'a [2]. Względne odkształcenie przy zniszczeniu podczas ściskania obliczono ze wzoru:

$$\epsilon_{src} = -\ln [1-(\Delta h/h)],$$

gdzie:

h – wysokość walca, a Δh – wielkość przesunięcia głowicy do zniszczenia próbki.

Napężenie niszczące przy ściskaniu obliczono ze wzoru:

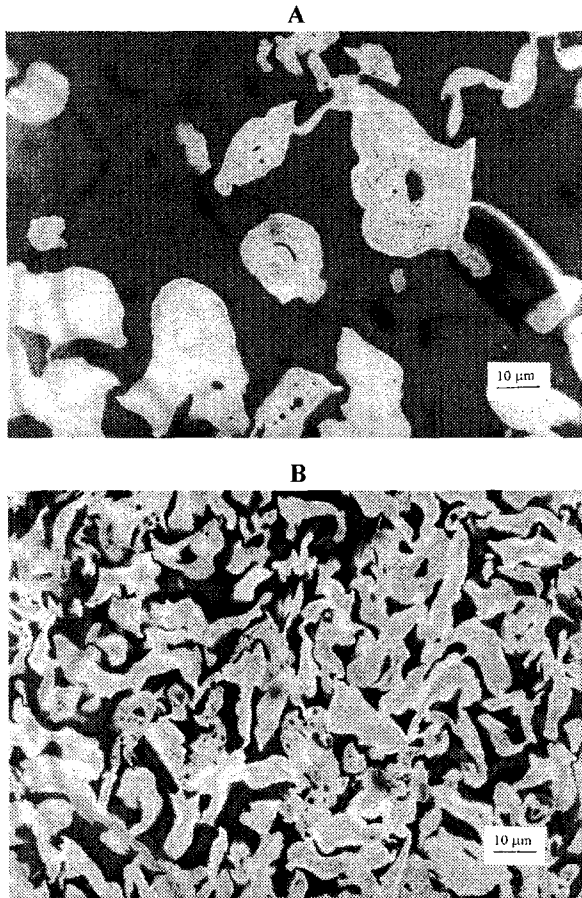
$$\sigma_{\text{src}} = F [1 - (\Delta h/h)] / 2\pi r^2,$$

gdzie:

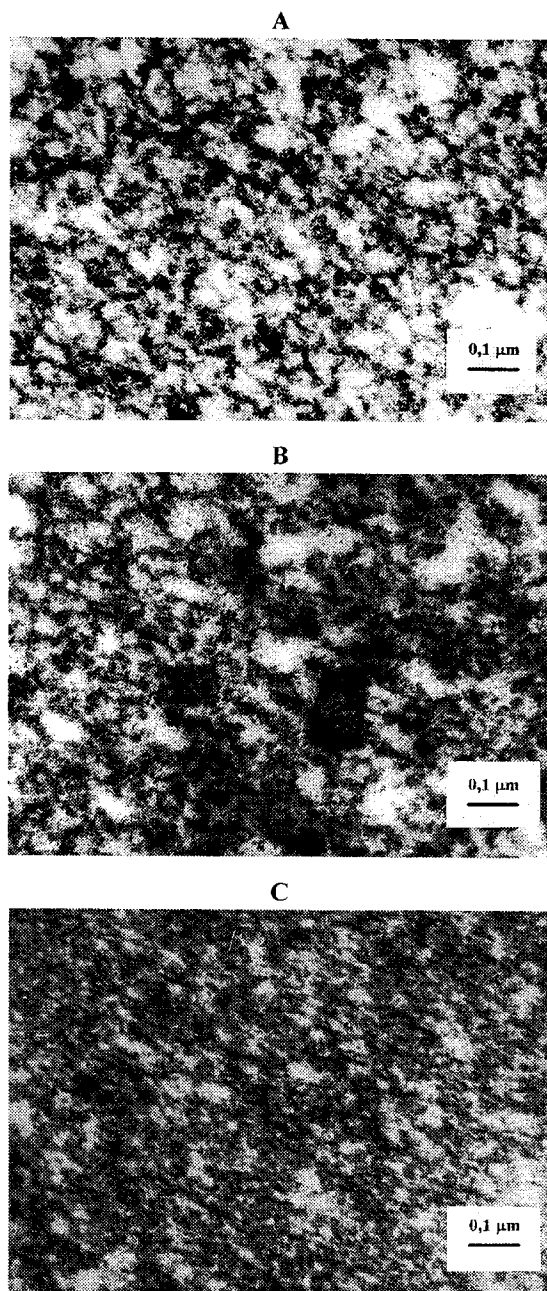
F – siła powodująca pęknięcie walca, r – początkowy promień walca.

Otrzymywanie zdjęć mikroskopowych żeli

Żele pocięto na kawałki o objętości około 1 mm^3 , a następnie utrwalano wstępnie w 4% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylanowym o $\text{pH} = 7,4$



Fot. 1. Struktura żeli albuminy surowicy krwi bydlęcej (mikroskopia świetlna): A – z dodatkiem skrobi w ilości 200 g/kg białka BSA, B – z dodatkiem skrobi w ilości 500 g/kg białka BSA.



Fot. 2. Mikrostruktura (TEM) matrycy białkowej żeli albuminy surowicy krwi bydlęcej: A – bez dodatku skrobi, B – z dodatkiem skrobi w ilości 100g/kg białka BSA, C – z dodatkiem skrobi w ilości 300 g/kg białka BSA.

przez 4 godz. w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym przemyciu buforem preparaty dotrwalano w 1% czterotlenku osmu przez 2 godz. w takim samym 0,1 M buforze kakodylanowym w temp. 4°C. Odwadniano przy użyciu roztworów alkoholu etylowego o stężeniach kolejno: 30, 50, 70, 90 i 99,8%, a następnie w tlenku propylenu [7]. Preparaty zatapiano w żywicy Spurr Low Viscosity firmy Polysciences. Następnie po polimeryzacji krojono je na skrawki, tzw. półcienkie przy pomocy ultramikrotomu Om-U3 firmy Reichert. Skrawki te miały grubość 0,75 mm. Po dobarwieniu 1% błękitem metylenowym z 1% Azurem II w 1% boraksie wykonano mikrofotografie przy użyciu mikroskopu optycznego Jenaval Contrast Zeiss-Jena. Natomiast preparaty ultracienkie, o grubości ok. 60 nm po dobarwieniu 8% octanem uranylu, a następnie cytrynianem ołowiu wg Reynoldsa [7] oglądano i wykonywano elektronogramy przy użyciu mikroskopu elektronowego BS-500 Tesla przy 60 kV.

Analiza statystyczna

Wartości odchyłeń standardowych oraz istotność różnic między wynikami w teście Studenta w przedziale ufności 0,05 obliczono przy użyciu programu Stat1 (ISK-Skierniewice).

Wyniki i dyskusja

Tabela 1 przedstawia wpływ dodatku skrobi ziemniaczanej na wartości względnego odkształcenia przy zniszczeniu podczas ściskania żeli. Dodatek skrobi w ilości od 30–200 g/kg białka BSA nie spowodował istotnej zmiany odkształcenia. Przy większym stężeniu skrobi zaobserwowano spadek wartości względnego odkształcenia. Oznacza to, że mieszane żele były mniej spójne, czego prawdopodobną przyczyną są właściwości matrycy białkowej. Niewielki dodatek skrobi nie zmienił w zasadniczym stopniu struktury żelu BSA: spęczniałe ziarna skrobiowe zawieszono w ciągłej strukturze żelu białkowego (Fot. 1A). Dopiero wówczas, gdy stężenie skrobi było tak duże, że zaczęła ona tworzyć osobną sieć wewnątrz matrycy białkowej (Fot. 1B) zaobserwowano spadek spójności żeli (Tab. 1). Również Hamann i inni [3] zauważyli, że dodatek 5% skrobi ziemniaczanej do surimi o zawartości białka 9% nie spowodował istotnej zmiany wartości odkształcenia.

Rysunek 1 przedstawia wpływ dodatku skrobi ziemniaczanej na naprężenie niszczące przy ściskaniu żeli BSA. Wraz z dodatkiem skrobi zaobserwowano statystycznie istotny wzrost wartości naprężenia. Potwierdza to wyniki otrzymane przez Hamman'a i wsp. [3], którzy stwierdzili, iż dodatek skrobi w ilości 5% do surimi o zawartości białka 9% powoduje wzrost naprężenia niszczącego. Podobny wzrost twardości po dodaniu skrobi zaobserwowano w przypadku badań nad żelami białka jaja kurzego [1]. Wu i wsp. [8, 9] zasugerowali, że zmienność właściwości reologicznych żeli białko-

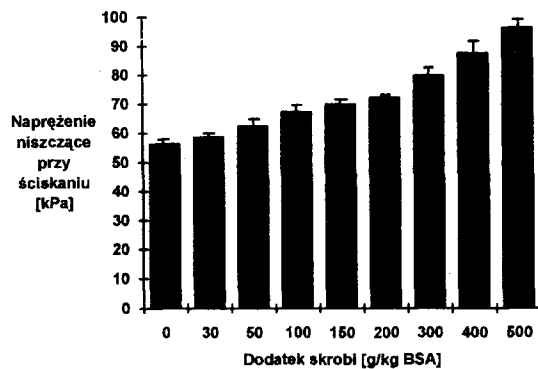
wych zawierających dodatki skrobi różnego pochodzenia mogą być wyjaśnione różnicami w ich temperaturach żelowania. Jeden ze składników mieszanych żeli będzie tworzył fazę ciągłą. Będzie to ten składnik, który posiada niższą temperaturę żelowania. Żelowanie drugiego składnika będzie utrudnione, wobec tego będzie on tworzył fazę nieciągłą, pełniąc rolę wypełniacza. Tak więc otrzymane przez Wu i wsp. [8, 9] żele surimi z dodatkiem skrobi różnego pochodzenia charakteryzowały się różnymi właściwościami reologicznymi, gdyż w niektórych przypadkach skrobia ryżowa o wysokiej temperaturze żelowania była wypełniaczem białkowej matrycy, a w innych, skrobia ziemniaczana o niskiej temperaturze żelowania tworzyła fazę ciągłą, którą wzmacniały białka miofibrylarne ryb.

Tabela 1

Wpływ dodatku skrobi ziemniaczanej na względne odkształcenie przy zniszczeniu żeli albuminy surowicy krwi bydlęcej podczas ściskania*

Dodatek skrobi [g/kg BSA]	I	II	III	Średnia
0	0,88	0,84	0,86	0,86 ^{cd}
30	0,89	0,97	0,84	0,90 ^d
50	0,86	0,89	0,80	0,85 ^{cd}
100	0,88	0,83	0,96	0,89 ^d
150	0,88	0,86	0,84	0,86 ^{cd}
200	0,83	0,82	0,87	0,84 ^{bcd}
300	0,79	0,79	0,81	0,80 ^{abc}
400	0,76	0,78	0,79	0,78 ^{ab}
500	0,74	0,77	0,76	0,76 ^a

* każdy z trzech wyników jest średnią z sześciu powtórzeń
a-d Różnice między średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne (P<0,05)



Rys. 1. Wpływ dodatku skrobi ziemniaczanej na napężenie niszczące przy ściskaniu żeli albuminy surowicy krwi bydlęcej.

Temperatura kleikowania badanej skrobi wynosiła 61°C. Prawdopodobnie już w niższej temperaturze zachodziła agregacja rozfałdowanych cząsteczek BSA, co spowodowało zahamowanie wypływu amylozy z wnętrza ziarn skrobiowych i co za tym idzie ograniczenie możliwości ich pęcznienia. Nie następowała więc penetracja matrycy białkowej przez cząsteczki amylozy. Zamiast tego spęczniałe ziarna skrobiowe tworzyły swoiste „mikrozele” pełniące rolę wypełniaczy wzmacniających strukturę matrycy BSA. Tym należy tłumaczyć fakt obserwowanego wzrostu naprężenia stycznego przy pękaniu mieszanych żeli zawierających coraz większy dodatek skrobi. Również struktura samej matrycy białkowej ulegała zmianie. Stawała się coraz bardziej upakowana i drobnousieciowana (fot. 2A–2C). Być może również ta zmiana mikrostruktury matrycy białkowej przyczyniła się do wzrostu twardości powstających żeli z dodatkiem skrobi.

WNIOSKI

1. Spadek spójności powstających żeli zaobserwowano dopiero przy dużym dodatku skrobi, co świadczy o tym, że tę właściwość reologiczną determinuje struktura matrycy białkowej.
2. Albumina surowicy krwi bydlęcej żelowała w pierwszej kolejności, tworząc fazę ciągłą.
3. Dodatek skrobi powodował wzrost twardości powstających żeli BSA. Tworząc nieciągłą fazę spęczniałe ziarna skrobiowe pełniły rolę wypełniaczy wzmacniających strukturę matrycy BSA.
4. Wraz z dodatkiem skrobi, struktura matrycy białkowej stawała się coraz bardziej upakowana i drobnousieciowana, co mogło również być powodem wzrostu twardości powstających żeli.

LITERATURA

- [1] Friedman R.B.: Interactions of starches in foods. W: *Ingredient Interactions*. Marcel Dekker, New York, 1995, 187.
- [2] Hamann D.D.: Structural failure in solid foods. W: *Physical Properties of Food*, (eds. M. Peleg-M. and E.B. Bagley). AVI Publishing Co., 1983, 351.
- [3] Hamann D.D., Amato P.M., Wu M.C., Foegeding E.A.: Inhibition of modori (gel weakening) in surimi by plasma hydrolysate and egg white. *J. Food Sci.*, **55**, 1990, 665.
- [4] Mleko S.: Żelowanie białek globularnych. *Przemysł Spożywczy*, **12**, 1996, 11.
- [5] Mleko S., Achremowicz B.: Żelowanie koncentratów białek serwatkowych. *Przemysł Spożywczy*, **10**, 1993, 272.
- [6] Mleko S., Achremowicz B., Foegeding A.: Effect of protein concentration on the rheological properties of whey protein concentrate gels. *Milchwissenschaft*, **5**, 1994, 266.

- [7] Reynolds E.S.: The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 1963, 208.
- [8] Wu M.C.: Rheological and calorimetric investigations on the thermal transitions of fish protein and protein-starch systems. Relationship to structural failure of fish gels and gels containing starches. *Dissertation Abstracts International*, **7**, 1985, 513B.
- [9] Wu M.C., Lanier T.C., Hamann D.D.: Thermal transitions of admixed starch/fish protein systems during heating. *J. Food Sc.*, **50**, 1985, 20.

TEXTURAL PROPERTIES AND MICROSTRUCTURE OF BOVINE SERUM ALBUMIN GELS WITH ADDED STARCH

S u m m a r y

The influence of potato starch on texture and microstructure of bovine serum albumin gels was investigated. At high starch concentrations (300 g/kg BSA) a decrease of gels cohesiveness was observed. Within the protein matrix, starch formed its own separate network. With added starch, increase of gels hardness was noted. Swollen starch granules created a non-continuous phase and acted as fillers reinforcing the protein matrix. With added starch, protein matrix was more packed and fine-stranded, what could cause an increase in gels hardness. ☒