

Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowywania
Akademia Rolnicza, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

Waldemar Gustaw, Stanisław Mleko, Paweł Glibowski, Piotr Janas

**Wpływ ogrzewania i typu dodanego karagenu
na właściwości fizykochemiczne roztworów WPI**

Effect of heating and carrageenan type on physico-chemical properties of WPI solutions

ABSTRACT. Kappa and iota carrageenans were used to obtain whey protein isolate (WPI) – carrageenan mixed gels and their texture, microstructure and surface hydrophobicity was studied. The texture properties of WPI (3%) and WPI-carrageenan in the pH range 3–8 and κ -, ι -carrageenan concentration of 0.1–0.5% were studied. WPI at a concentration of 3% did not form gel however, after addition of carrageenan, gels were obtained in pH range of 5–8. Synergistic interactions between unheated WPI and kappa carrageenan (0.5%) were also observed.

KEY WORDS: texture, hydrophobicity, SAXS, whey proteins

Białka i polisacharydy często występują razem w produktach spożywczych, a oddziaływanie pomiędzy tymi składnikami decyduje o strukturze, właściwościach reologicznych i stabilności tych produktów.

Jednymi z częściej wykorzystywanych w przemyśle spożywczym polisacharydów są karageny. Zbudowane są one naprzemiennie ze związków (1,3) α -D-galaktopiranozy i (1,4) β -D-galaktopiranozy [Gustaw, Mleko 1998]. Wśród tych hydrokoloidów wyróżnia się wiele frakcji, z których kappa (κ), jota (ι) i lambda (λ) są najczęściej spotykane. Karageny κ i ι rozpuszczają się w wodzie po podgrzaniu do 60–75°C i żelują po ochłodzeniu, natomiast frakcja λ rozpuszcza się w zimnej wodzie, ale nie żeluje.

Zastosowanie ultrafiltracji i wymiany jonowej do separacji białek serwatkowych spowodowało wyraźny wzrost zainteresowania tymi białkami w przemyśle spożywczym. Białka serwatkowe mają znakomite właściwości funkcjonalne i odżywcze. Jedną z głównych właściwości funkcjonalnych białek serwatkowych jest zdolność żelowania.

Niektóre mieszaniny polisacharydów i polisacharydów z białkami wykazują synergistyczne oddziaływania, które pozwalają uzyskać produkty o nowych właściwościach funkcjonalnych i zmniejszyć koszty produkcji [Gustaw i in. 2001]. Przykładem są żele κ -karagenu z galaktomannanami, które mają całkowicie odmienną teksturę w porównaniu z żelami karagenu i mniejszą skłonność do synerezy [Gustaw i in. 2003]. Dodatek karagenu do roztworów białek serwatkowych wpływał również na zmianę ich właściwości reologicznych [Gustaw, Mleko 2003; Pikus i in. 2001; Mleko i in. 1997]. Jednak oddziaływania pomiędzy polisacharydami a białkami nie są w pełni wyjaśnione i wymagają dalszych badań. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu ogrzewania na interakcje pomiędzy różnymi typami karagenu i białkami serwatkowymi.

METODY

Do badań użyto izolatu białek serwatkowych (WPI) o zawartości białka 91,87% wyprodukowanego przez DAVISCO Foods International (Le Seur, USA), κ -karagenu (kk) i ι -karagenu (jk) produkcji Sigma Chemical Co. (USA).

Białka serwatkowe i polisacharydy rozpuszczano oddzielnie w 0,1 mol NaCl. Roztwory białek serwatkowych przygotowano w stężeniach 6 i 20%, przez mieszanie przy pomocy mieszadła magnetycznego przez 2 h. Roztwory kk i jk podgrzewano do 70°C w celu rozpuszczenia. Roztwory następnie mieszano w proporcji 1:1 i ustalano pH w zakresie od 3,0 do 8,0 za pomocą 1 mol HCl lub 1 mol NaOH.

Układy ogrzewane poddawano obróbce cieplnej w 85°C przez 30 min w łaźni wodnej.

Właściwości teksturalne badano przy użyciu analizatora tekstury TA-XT2i (Stable Micro Systems, Wielka Brytania). Żele ściskano przy prędkości 1 mm/s w temperaturze pokojowej. Próby przeprowadzano w trzech powtórzeniach po 6 walców. Żele traktowano jako materiały nieściśliwe i obliczano naprężenie ścinające przy pęknięciu [Gustaw, Mleko 2003].

Pomiary metodą małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS) wykonano kamerą typu Kratky ego (Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa), stosując lampę Cu o liniowym ognisku. Próbkę żelu przygotowywano w specjalnie wykonanej celce o grubości 1,5 mm. Promieniowanie

monochromatyczne osiągnięto poprzez zastosowanie filtru Ni, wzmacniacza liniowego i analizatora wysokości impulsów. Mierzono krzywe rozpraszania żeli oraz pustej celki, wynik uzyskany dla pustej celki odejmowano od krzywych rozpraszania próbek. Krzywe rozpraszania przedstawiono jako funkcje intensywności od wektora rozpraszania.

Hydrofobowość powierzchniową białek mierzono przy użyciu kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego (ANS) (Sigma Chemical Co., USA). 20 μ l 8 mmol ANS dodawano do 4 ml rozcieńczonych próbek, zawierających od 0,001 do 0,01% białka (w/w). Następnie próbki mieszano, okręcano folią aluminiową i wstawiano na 15 min do łaźni wodnej o temperaturze pokojowej. Intensywność fluorescencji mierzono rozpoczynając od najniższego do najwyższego stężenia białka za pomocą spektrofлуorymetru Shimadzu F-5000, przy fali wzbudzenia na poziomie, 390 nm a emisji 470 nm. Hydrofobowość powierzchniową wyrażono jako nachylenie początkowe (S_0) prostej wyrażającej zależność intensywności fluorescencji od stężenia białka.

WYNIKI

Wartości naprężenia ścinającego przy pęknięciu mieszanin 3% WPI-kk w zależności od pH i stężenia dodanego polisacharydu przedstawiono w tabeli 1. Białka serwatkowe nie tworzyły żeli przy 3% stężeniu. W przypadku ogrzewanych mieszanin trwał, dające się zbadać żele otrzymano tylko w pH 6 przy

Tabela 1. Zmiany naprężenia ścinającego przy pęknięciu (kPa) żeli 3% WPI i WPI - κ - karagen (kk) w różnym pH
Table. 1. Changes in shear stress at fracture (kPa) of 3% WPI and WPI - κ - carrageenan (kk) at different pH

kk (%)	pH			
	5,0	6,0	7,0	8,0
	Ogrzewane Heated			
0,1	-	5,0 \pm 0,7	1,64 \pm 0,17	-
0,2	1,83 \pm 0,2	6,7 \pm 0,32	5,56 \pm 0,57	4,48 \pm 0,23
0,3	2,9 \pm 0,18	8,3 \pm 0,22	6,51 \pm 0,29	4,02 \pm 0,19
0,5	2,2 \pm 0,7	7,17 \pm 0,29	7,2 \pm 0,45	4,14 \pm 0,87
	Nieogrzewane Unheated			
0,1	-	-	-	-
0,2	-	-	-	-
0,3	-	-	-	-
0,5	-	7,14 \pm 0,5	-	-

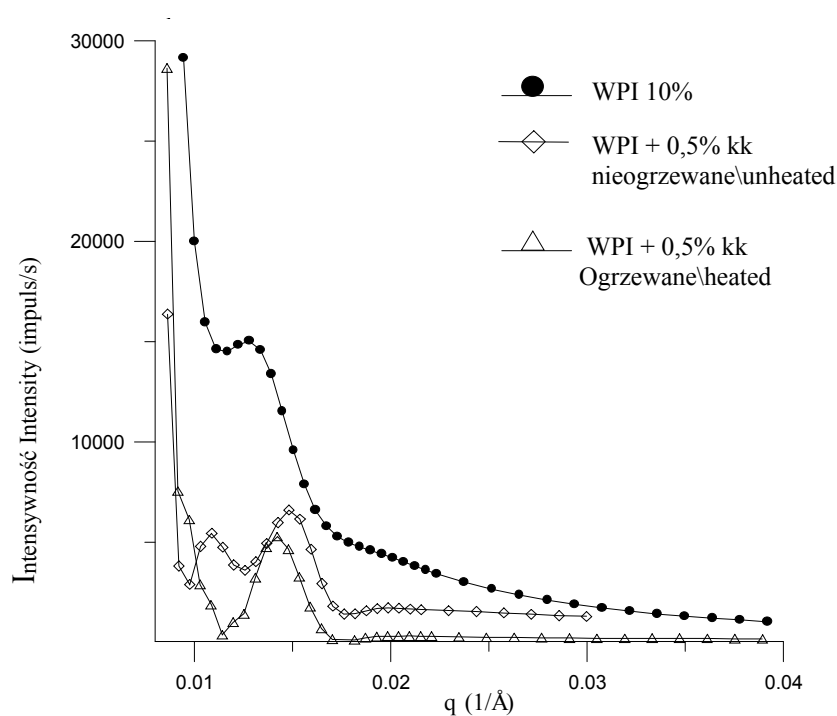
najniższym 0,1% dodatku kk. Wzrost stężenia kk wpływał na lepsze żelowanie mieszanin w zakresie pH od 5 do 8. W pH 4 żele były gąbczaste i podczas ściskania wydzielaly dużo wody, ale nie pękały nawet przy 80% odkształceniu, natomiast w pH 3 otrzymane żele były zbyt słabe. Najtwardsze żele otrzymano w pH 6 i z 0,3% dodatkiem kk, wyższe stężenie kk i pH wpływały na osłabienie żeli WPI-kk. W przypadku nieogrzewanych mieszanin 3% WPI z kk otrzymano żel tylko w przypadku najwyższego stężenia polisacharydu i pH 6. Żel ten był jednak słabszy od żelu otrzymanego na skutek ogrzewania mieszaniny hydrokolidów, jednak był twardszy od żelu samego kk (5,34 kPa). Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że nawet w nieogrzewanych mieszaninach polisacharydowo-białkowych występują interakcje pomiędzy składnikami, które wpływają na wzrost twardości żelu kk. W pobliżu pI głównego białka serwatkowego (β -laktoglobuliny) pomiędzy polisacharydem a białkami serwatkowymi mogły powstawać kompleksy elektrostatyczne. Występowanie takich połączeń pomiędzy białkami serwatkowymi a karagenem opisano już wcześniej w przypadku ogrzewanych układów [Galazka i in. 1999; Gustaw, Mleko 2003]. Oddziaływania pomiędzy tymi hydrokolidami tłumaczono również występowaniem fazy separacji [Pikus i in. 2001]. Ogrzewanie może wzmacniać interakcje pomiędzy kk a białkami serwatkowymi, co sugerowali już wcześniej Mleko i in. [1997].

Tabela 2. Zmiany naprężenia ścinającego przy pęknięciu żeli (kPa) 3% WPI i WPI - τ - karagen (jk) w różnym pH

Table. 2. Changes in shear stress at fracture (kPa) of 3% WPI and WPI - τ - carrageenan (jk) at different pH

τ -k (%)	pH		
	6,0	7,0	8,0
	Ogrzewane Heated		
0,1	-	-	-
0,2	-	1,66 \pm 0,28	-
0,3	3,0 \pm 0,34	2,84 \pm 0,18	4,22 \pm 0,84
0,5	-	2,2 \pm 0,05	3,64 \pm 0,73

Mieszaniny jk z 3% roztworami WPI żelowały dużo słabiej w porównaniu z układami z kk (tab. 2). Roztwory WPI z dodatkiem jk utworzyły dające się oznaczyć żele tylko w zakresie pH od 6 do 8 i w przypadku wysokich stężeń jk. Układy jk z białkami serwatkowymi niepoddawane procesowi ogrzewania nie tworzą stałych żeli. Jota karagen nie wykazuje synergistycznych oddziaływań z galaktomannanami w przeciwieństwie do frakcji kappa, co tłumaczone jest dużo wyższą gęstością ładunków elektrycznych w cząsteczce tej frakcji karagenu i w rezultacie odpychaniem się cząsteczek polisacharydów [Gustaw i in. 2003].

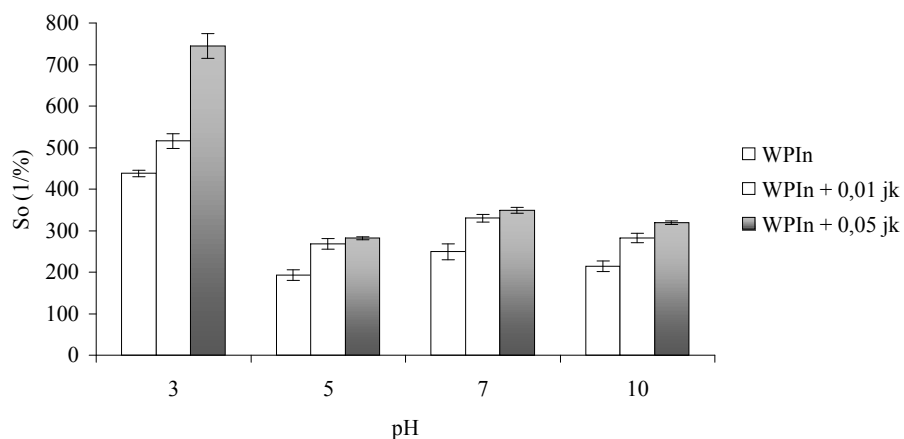


Rycina 1. Krzywe rozpraszania SAXS 10% żeli WPI i WPI - κ - karagen (0,5%) otrzymanych w pH 7

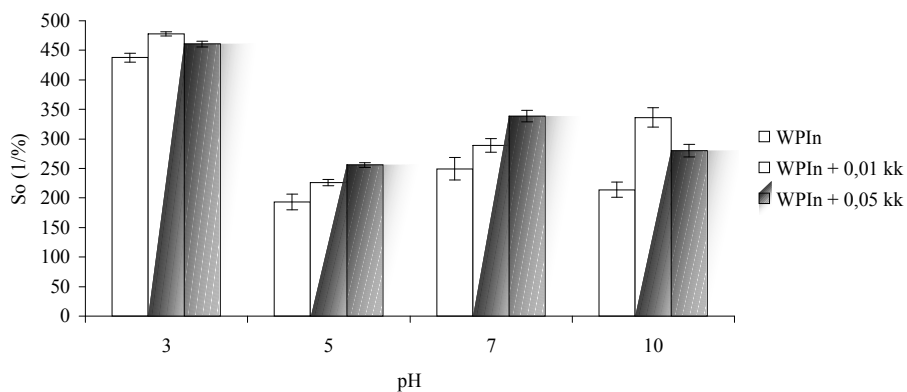
Figure 1. The SAXS curve for WPI (10%) and WPI- κ - carrageenan (0,5%) mixed gels obtained at pH 7

Na rycinie 1 porównano krzywe rozpraszania SAXS żeli 10% WPI i mieszanych żeli z 0,5% dodatkiem κ , ogrzewanych i nieogrzewanych otrzymanych w pH 7. Jak widać z wykresu, różnice pomiędzy krzywymi są bardzo duże, najwyższe rozpraszanie oraz słabo zarysowany pik wykazywała krzywa dla żelu o pH 7. Występowanie piku na krzywej SAXS dla żeli białek globularnych świadczy o regularnym rozmieszczeniu globul w strukturze żelu [Pikus i in. 2000]. Dodatek κ w przypadku ogrzewanego układu spowodował zmniejszenie poziomu rozpraszania w porównaniu z żelem WPI. Obecność polisacharydu zwiększała jednak wysokość piku. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami prowadzonymi przez Mleko i in. [1997], którzy różnice w przebiegu krzywych rozpraszania tłumaczyli tworzeniem kompleksów pomiędzy białkami a polisacharydem w tym pH. W obecności niezdenaturowanych białek serwatkowych pik na krzywej rozpraszania SAXS uległ przesunięciu w kierunku wyższych wartości, co może świadczyć o zmniejszeniu wielkości aglomeratów

utworzonych przez karagen. Natomiast obecność drugiego piku można tłumaczyć obecnością struktur mieszanych białkowo-polisacharydowych, co wskazywałoby na to, że również w nieogrzewanych układach występują oddziaływania pomiędzy tymi hydrokoloidami.



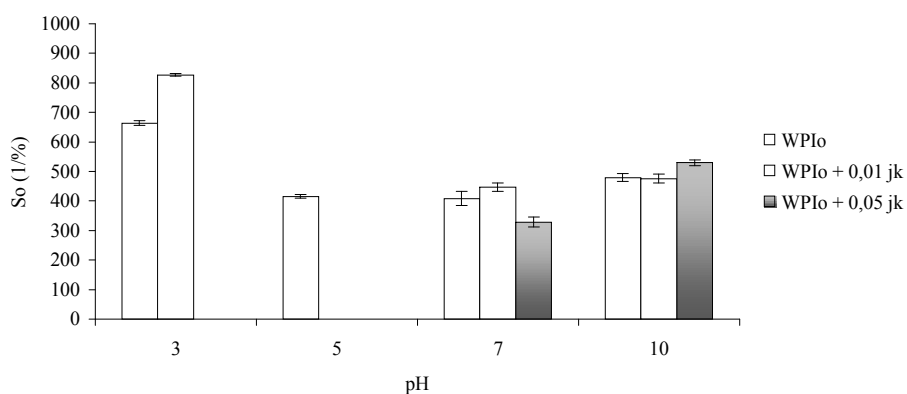
Rycina 2. Wpływ pH na hydrofobowość powierzchniową nieogrzewanych roztworów WPI (WPIIn) i ι- karagenu
 Figure 2. Effect of pH on surface hydrophobicity of unheated WPI (WPIIn) and ι- carrageenan mixed systems



Rycina 3. Wpływ pH na hydrofobowość powierzchniową nieogrzewanych roztworów WPI (WPIIn) i κ- karagenu
 Figure 3. Effect of pH on surface hydrophobicity of unheated WPI (WPIIn) and κ- carrageenan mixed systems

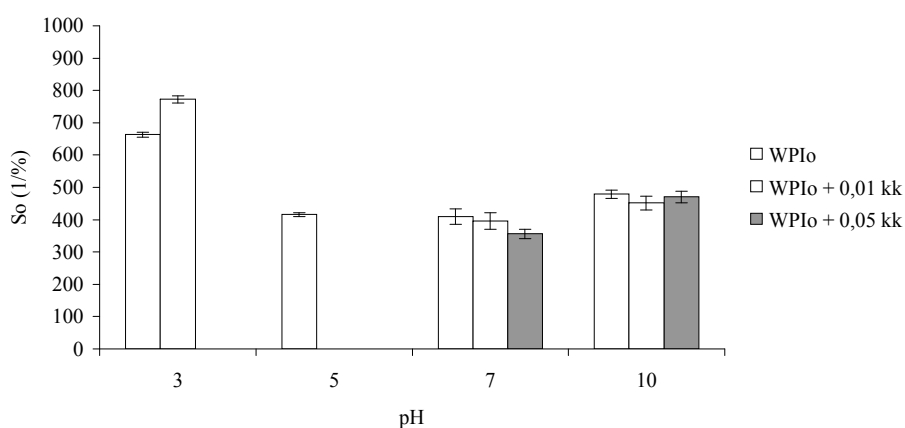
Rycina 2 przedstawia zmiany hydrofobowości powierzchniowej (S_o) ogrzewanych i nieogrzewanych roztworów WPI w zależności do zmiany pH i dodatku jk. Najwyższą hydrofobowością charakteryzowały się nieogrzewane roztwory WPI, sporządzone w pH 3. Alizadeh-Pazdar i Li-Chan [2000] najwyższą wartość hydrofobowości nieogrzewanych roztworów WPI również zanotowali w tym pH. Dodatek jk do nieogrzewanych roztworów WPI spowodował wyraźny wzrost ich hydrofobowości w całym zakresie pH. Wzrost stężenia karagenu także wpłynął na wzrost badanej wielkości. Szczególnie duży wpływ obecności polisacharydu w roztworze białek serwatkowych zaobserwowano w pH 3. Dodatek kk do roztworów WPI niepoddanych ogrzewaniu nie spowodował tak znacznych zmian ich hydrofobowości powierzchniowej, jak w poprzedniej mieszance (ryc. 3). Przy niskim stężeniu karagenu zaobserwowano niewielki wzrost hydrofobowości we wszystkich badanych układach. Wzrost stężenia polisacharydu wpłynął na zwiększenie hydrofobowości w pH 5 i 7, natomiast w skrajnych wartościach pH skutek wzrostu stężenia karagenu był odwrotny. Mleko i inni [1997] stwierdzili wyraźny wzrost hydrofobowości nieogrzewanych roztworów białek serwatkowych po dodaniu kk, szczególnie w niskim pH.

Ogrzewanie roztworów WPI z dodatkiem 0,01% jk spowodowało wzrost hydrofobowości mieszanin poza układem sporządzonym w pH 5, gdzie wystąpiło skłócenie układu (ryc. 4). Hydrofobowość powierzchniowa jest zależna od ilości hydrofobowych aminokwasów odsłoniętych na powierzchni cząsteczki białka, a ogrzewanie powodowało wzrost ilości tych aminokwasów. Wyniki te są zgodne z wynikami otrzymanymi przez Mleko i in. [1997]. Wzrost stężenia



Rycina 4. Wpływ pH na hydrofobowość powierzchniową ogrzewanych roztworów WPI (WPIo) i κ - karagenu

Figure 4. Effect of pH on surface hydrophobicity of heated WPI (WPIo) and κ - carrageenan mixed systems



Rycina 5. Wpływ pH na hydrofobowość powierzchniową ogrzewanych roztworów WPI (WPIo) i κ - karagenu

Figure 5. Effect of pH on surface hydrophobicity of heated WPI (WPIo) and κ - carrageenan mixed systems

karagenu wywołał skłócenie mieszanin w pH 3 i 5, natomiast w pH 7 zanotowano spadek wartości hydrofobowości powierzchniowej. Dodatek 0,01% kk do ogrzewanych roztworów WPI sporządzonych w pH 3 spowodował wzrost hydrofobowości, natomiast w pH 5 wystąpiła flokulacja białka, co miało też miejsce w przypadku roztworów zawierających wyższe stężenie karagenu w pH 3 i 5 (ryc. 5). Natomiast w pH 7 i 10 dodatek polisacharydu spowodował spadek wartości hydrofobowości białek serwatkowych. Dodatek jk i kk do jednego z białek serwatkowych – BSA spowodował spadek hydrofobowości białka zarówno w przypadku natywanych, jak i zdenaturowanych białek w pH 7. W obecności kk zanotowano wyższe wartości hydrofobowości powierzchniowej niż w przypadku mieszanin z drugą frakcją karagenu [Galazka i in. 1999].

WNIOSKI

1. Dodatek jota i kapa karagenów powodował tworzenie żeli indukowanych ogrzewaniem już przy 3% stężeniu białek serwatkowych.
2. W nieogrzewanych mieszaninach białek serwatkowych i karagenu również występowały interakcje pomiędzy tymi polimerami.
3. Ogrzewanie spowodowało wzrost hydrofobowości powierzchniowej roztworów WPI. W obecności polisacharydów hydrofobowość wzrastała w przy-

padku nieogrzewanych roztworów białka, natomiast w przypadku mieszanin ogrzewanych zaobserwowano niewielki wzrost lub nawet spadek hydrofobowości.

4. Oddziaływania pomiędzy jota karagenem a białkami serwatkowymi są wyraźnie słabsze w porównaniu z układami z kappa karagenem.

PIŚMIENNICTWO

- Alizdeh-Pasdar N., Li-Chan E. 2000. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *J. Agric. Food Chem.* 48, 328–334.
- Galazka V., Smith D., Ledward D., Dickinson E. 1999. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chem.* 303–310.
- Gustaw W., Achremowicz B., Mazurkiewicz J. 2003. Właściwości reologiczne żeli κ -karagenu z dodatkiem galaktomannanów. *Żywność* 1, 25–38.
- Gustaw W., Mleko S. 1997. Właściwości funkcjonalne i zastosowanie karagenów w mleczarstwie. *Żywność* 1, 71–80.
- Gustaw W., Mleko S. 2003. The effect of pH and carrageenan concentration on the rheological properties of whey protein gels. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 4, 39–44.
- Gustaw W., Mleko S., Glibowski P. 2001. Synergistyczne interakcje występujące pomiędzy polisacharydami w ich mieszaninach. *Żywność* 3, 5–15.
- Mleko S., Li-Chan E., Pikus S. 1997. Interactions of κ -carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. *Food Res. Inter.* 30, 427–433.
- Pikus S., Gustaw W., Kobylas E. 2001. Examination of heat-induced milk proteins gel structures by the small angle X-rays scattering (SAXS) method. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 4, 61–68.
- Pikus S., Gustaw W., Mleko S., Kobylas E. 2001. Microstructure and rheology of whey protein isolate – carrageenan mixed gels. *Annales UMCS, Sec. AA*, 12, 171–183.

