

MAŁGORZATA DAREWICZ, JERZY DZIUBA

STRUKTURA A WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE BIAŁEK MLEKA

Streszczenie

W pracy przedstawiono i zanalizowano wyniki badań dotyczących zależności między strukturą białek mleka a ich wybranymi właściwościami funkcjonalnymi. Ważnymi czynnikami wpływającymi na właściwości funkcjonalne białek są wymiary molekularne, hydrofobowość, ładunek i elastyczność. Na właściwości funkcjonalne mają wpływ także takie czynniki zewnętrzne, jak: temperatura, pH, siła jonowa czy obecność innych cząsteczek. Podstawową przyczynę różnic we właściwościach funkcjonalnych między białkami upatruje się w ich odmiennej strukturze. Właściwości funkcjonalne można modyfikować metodami fizycznymi, chemicznymi, enzymatycznymi i genetycznymi. Rozpuszczalność jest właściwością fizykochemiczną, od której mogą zależeć inne właściwości funkcjonalne. Białka mogą adsorbować na granicy faz olej/woda i powietrze/woda i obniżać napięcie powierzchniowe, zmieniając jednocześnie swoją strukturę. Dobre właściwości powierzchniowe białek łączy się ze specyficzną dystrybucją ich reszt hydrofobowych i hydrofilowych w ściśle odizolowane obszary, połączoną z zapewnieniem minimalnej masy cząsteczkowej. Stwierdzono istnienie związku między udziałem struktury α -helikalnej, indukowanej adsorpcją na hydrofobowej powierzchni, a kształtowaniem się zdolności do tworzenia emulsji przez peptydy. W opisywaniu zależności między strukturą a funkcją białek coraz większą rolę zaczynają odgrywać wielowymiarowe metody statystyczne. Znajomość molekularnych podstaw kształtowania się rozpuszczalności, zdolności do tworzenia/stabilizowania emulsji/piany przez białka jest podstawową wiedzą w badaniach nad zastosowaniami białek mleka w żywności o pożądanym i zaprojektowanym cechach.

Słowa kluczowe: białka mleka, emulsje, modele statystyczne, piany, rozpuszczalność, struktura.

Wprowadzenie

Istnieje wiele definicji funkcjonalnych właściwości białek żywności. Pour-El [44] określa właściwości funkcjonalne jako „jakikolwiek właściwości produktu żywnościowego lub składników żywności, wyłączając funkcję odżywczą, które decydują o ich zastosowaniu”. Według Kinselli [30], funkcjonalne właściwości białek obecnych w produktach żywnościowych „to te fizyczne i chemiczne właściwości, które wpływają na zachowanie się białek w produktach żywnościowych podczas ich

wytwarzania, przechowywania i spożywania”. Z kolei Sikorski [50] definiuje właściwości funkcjonalne białek jako „te, dzięki którym w produkcie żywnościowym zawierającym białka w odpowiednich ilościach, poddanym obróbce przy optymalnych parametrach, wytwarzają się pożądane cechy sensoryczne”. Białka mogą pełnić w produktach surowcach i produktach żywnościowych rolę składników o określonych właściwościach funkcjonalnych i biologicznych, co może być wykorzystane w produkcji żywności funkcjonalnej [32]. W Europie, za żywność funkcjonalną przyjęto uważać żywność, co do której „udowodniono korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu ponad efekt odżywczy, który to wpływ polega na poprawie stanu zdrowia oraz samopoczucia i/lub zmniejszeniu ryzyka chorób” [28]. Biologiczna aktywność białek przypisywana jest obecności w sekwencjach ich łańcuchów polipeptydowych, fragmentów obdarzonych specyficzną aktywnością [18, 19, 32].

Właściwości funkcjonalne można rozpatrywać jako: właściwości powierzchniowe, np. zdolność do tworzenia i stabilizowania emulsji (powierzchnia międzyfazowa olej/woda), zdolność do tworzenia i stabilizowania piany (powierzchnia międzyfazowa powietrze/woda) czy rozpuszczalność (oddziaływania woda/białko); właściwości hydrodynamiczne (oddziaływania międzycząsteczkowe) np. żelifikujące czy właściwości tekstury oraz sensoryczne (smak i zapach). Właściwości funkcjonalne białek są pochodną specyficznych cech ich cząsteczek [29]: wielkości, kształtu, elastyczności, podatności na denaturację, sekwencji aminokwasów oraz ich hydrofilowości i hydrofobowości, ładunku i jego rozmieszczenia, charakteru i liczby struktur mikrodomenowych, zdolności adaptacji całej cząsteczki lub jej domen składowych do zmiennych warunków środowiskowych, charakteru wzajemnych interakcji białek z innymi składnikami żywności, a także najważniejszych cech środowiska: pH, temperatury, ciśnienia oraz siły jonowej. Na kształtowanie się właściwości funkcjonalnych wpływa fakt tworzenia przez białka kompleksowych układów z innymi składnikami żywności [53]. Procesy technologiczne, jakim poddawane są surowce żywnościowe, również odgrywają znaczącą rolę w kształtowaniu właściwości funkcjonalnych białek.

Prężnie rozwijające się metody bioinformatyczne oraz wielowymiarowe metody statystyczne skutecznie poszerzyły spektrum metod badawczych stosowanych w charakterystyce białek jako nośników zdefiniowanych właściwości funkcjonalnych. Wykorzystując wielowymiarowe metody statystyczne opracowano modele matematyczne umożliwiające przewidywanie właściwości funkcjonalnych białek na podstawie znajomości ich właściwości molekularnych [13, 34, 36, 59, 60]. Metody bioinformatyczne mogą być pomocne w hierarchicznym klasyfikowaniu białek w tzw. homologiczne rodziny z uwzględnieniem poziomu organizacji ich struktury, a następnie w prawidłowym formułowaniu hipotez na temat zależności między właściwościami funkcjonalnymi a molekularnymi i ich weryfikowaniu jako uniwersalnych hipotez w stosunku do homologicznych grup białek [17, 38, 39].

Strukturalne właściwości białek

W większości białek prawie wszystkie hydrofilowe grupy funkcyjne zlokalizowane są na powierzchni cząsteczek białkowych, ale nie wszystkie grupy hydrofobowe umieszczone są w ich wnętrzu. W przypadku białek globularnych 40-50% powierzchni cząsteczek mogą zajmować reszty aminokwasowe o charakterze hydrofobowym [50]. Ich specyficzne rozmieszczenie w łańcuchach polipeptydowych wpływa na ukształtowanie powierzchni cząsteczek białek, zdolności do tworzenia oligomerów i struktur micelarnych oraz właściwości funkcjonalne. Przykładowo, w kazeinach- α_{s1} i - β prawie 2/3 ich łańcuchów polipeptydowych jest silnie hydrofobowa [52]. W kazeinie- β wszystkie reszty fosfoserynowe i większość wolnych grup karboksylowych umieszczone są we fragmentach N-końcowych, zaś w kazeinie- α_{s1} w obrębie między pozycją 40. a 80. w liczącym 199 aminokwasów łańcuchu peptydowym. Amfifilowy charakter łańcuchów polipeptydowych obydwu białek, z dużym udziałem łatwo dostępnych niepolarnych reszt aminokwasowych powoduje, że wykazują one silną tendencję do adsorbowania na powierzchniach hydrofobowych [14]. Stwierdzono, że N-końcowa i C-końcowa części łańcuchów polipeptydowych kilku cząsteczek kazeiny- α_{s1} mogą łączyć się, tworząc układ liniowy [25]. Z kolei cząsteczki kazeiny- β w wyniku oddziaływań hydrofobowych mogą łączyć się w micelle ze zwartym, położonym centralnie, hydrofobowym rdzeniem okrytym luźną warstwą pozostałych części łańcuchów polipeptydowych. Obok specyficznej dystrybucji reszt aminokwasowych na właściwości funkcjonalne ma wpływ skład aminokwasowy. Około 17% reszt aminokwasowych w kazeinie- β i 8,5% w kazeinie- α_{s1} to reszty prolinowe. Ich w miarę jednolite rozmieszczenie wzdłuż łańcuchów polipeptydowych ww. białek oraz brak reszt cysteiny utrudnia formowanie struktur uporządkowanych. Darewicz i wsp. [10, 11], stosując metodę dichroizmu kołowego ustalili, że ok. 10% cząsteczki kazeiny- β ma strukturę α -helikalną, ok. 15% – pofałdowanej kartki, a ok. 73% – nieuporządkowanego kłębka. Holt i Sawyer [24] zaproponowali, aby zaliczyć kazeinę- β do tzw. białek reomorficznych.

Dużą rolę w kształtowaniu struktury i funkcji białek przypisuje się aminokwasom siarkowym [3]. Grupy tiolowe mogą ulec utlenieniu, tworząc wewnątrz- i międzycząsteczkowe mostki dwusiarczkowe. W wyniku takich interakcji zmienia się struktura, a wraz z nią funkcje pełnione przez białka. Tworzenie poprzecznych mostków dwusiarczkowych stabilizuje strukturę trzeciorzędową białek oraz wpływa na właściwości funkcjonalne np. ma znaczenie w poprawie cech jakościowych pieczywa wyprodukowanego z dodatkiem odtłuszczonego proszku mlecznego [41].

Podstawową przyczynę różnic we właściwościach funkcjonalnych między białkami upatruje się w ich odmiennej strukturze [58], stąd jako skrajne przykłady takich różnic można przytoczyć kazeinę- β i laktoglobulinę- β . Kazeina- β to fosfoproteina o masie cząsteczkowej ok. $24 \cdot 10^3$ Da stanowiąca ok. 35% ogólnej ilości

kazeiny w mleku [26]. Model cząsteczki kazeiny- β ma wygląd „krabopodobny” z dwoma dużymi, wykrzywionymi ramionami [33]. Kształt cząsteczki w przybliżeniu może być przedstawiony jako elipsoida, ze stosunkiem osi 2:1. Gdy pH wynosi 6,6, N-końcowy segment kazeiny- β obejmujący 21 reszt aminokwasowych jest źródłem wypadkowego ujemnego ładunku netto (-12), pozostała część cząsteczki jest praktycznie pozbawiona ładunku. Polarna domena białka, mimo że zawiera mniej reszt aminokwasowych niż domena hydrofobowa, wykazując większą elastyczność zajmuje większą objętość molekularną. Wyjątkową cechą kazeiny- β jest amfifilowa natura jej cząsteczki [15]. W temp. poniżej 4°C kazeina- β występuje jako monomer [25], w wyższej temperaturze i powyżej stężenia krytycznego tj. 1,5 mg/ml podlega samoasocjacji [51]. Z kolei laktoglobulina- β stanowi ok. 50% ogólnej ilości białek serwatkowych w mleku [4]. Jest ona białkiem globularnym zawierającym pięć reszt cysteinowych, z których cztery są zaangażowane w tworzenie mostków dwusiarczkowych, stabilizujących strukturę czwartorzędową. Wolna grupa tiolowa ułatwia tworzenie nowych struktur. W mleku, lub bardziej ogólnie w zakresie pH od 5,2 do 7,5, natywna laktoglobulina- β występuje jako dimer dwóch identycznych podjednostek o masie ok. $18 \cdot 10^3$ Da [23]. Przy pH powyżej 7,5 laktoglobulina- β denaturuje nieodwracalnie. Przy pH poniżej 3,5 ulega odwracalnej dysocjacji tworząc monomery, a przy pH między 3,5 i 5,2 odwracalnie tworzy formy tetramerów/oktamerów. W drugorzędowej strukturze laktoglobuliny- β udział struktury α -helikalnej wynosi ok. 1,5%, pofałdowanej kartki – ok. 43%, a nieuporządkowanego kłęбка – ok. 47%. Należy się więc spodziewać, że zarówno właściwości powierzchniowe, jak hydrodynamiczne zachowanie się globularnej laktoglobuliny- β i reomorficznej kazeiny- β będą całkowicie odmienne.

Rozpuszczalność

Spośród właściwości funkcjonalnych na szczególną uwagę zasługuje rozpuszczalność, która jest uważana za podstawową właściwość funkcjonalną białek żywności. Kinsella [30] podkreśla, że rozpuszczalność białek jest fizykochemiczną właściwością, od której mogą zależeć inne właściwości funkcjonalne. Właściwość ta w dużym stopniu określa możliwości zastosowania preparatów białkowych w przetwórstwie spożywczym. Dobrą rozpuszczalność białka często kojarzy się z jego dobrymi właściwościami funkcjonalnymi [48], chociaż niektórzy autorzy wskazują na brak zależności między tym wyróżnikiem a np. właściwościami emulgującymi białek [1]. Utrata rozpuszczalności wskutek obróbki żywności w drastycznych warunkach jest w wielu przypadkach wskaźnikiem denaturacji i następczego sieciowania białka [36]. Rozpuszczalność białek zależy od budowy i właściwości rozpuszczalnika, temperatury, pH środowiska, stężenia i ładunku jonów oraz charakteru oddziaływań z innymi cząsteczkami [6, 27]. Hydrofobowość powierzchniowa oraz wypadkowy ładunek

elektryczny to najważniejsze cechy charakterystyczne cząsteczki białka determinujące jego zachowanie wobec rozpuszczalnika. Hydrofobowość powierzchniowa jest wskaźnikiem charakteryzującym zróżnicowany potencjał elektrostatyczny różnych fragmentów powierzchni białka, decydującym o jej przestrzennym kształcie oraz zachowaniu wobec polarnych i apolarnych rozpuszczalników [47, 56]. Jednym ze sposobów modyfikowania charakteru hydrofobowego/hydrofilowego powierzchni cząsteczki białka mogą być modyfikacje chemiczne np. glikozylacja, a gęstości ładunku – modyfikacje enzymatyczne np. defosforylacja. Do modyfikowania właściwości kazeiny- β Darewicz i Dziuba [12] oraz Dziuba i wsp. [16] wykorzystali spontaniczny proces przyłączania pojedynczych cząsteczek cukrów redukujących, niekontrolowany przez enzymy, zwany nieenzymatyczną glikacją. Pod wpływem modyfikacji glukozą zaobserwowano poprawę rozpuszczalności kazeiny- β . Z kolei usunięcie reszt fosforanowych z kazeiny- β spowodowało spadek jej rozpuszczalności [11]. Nie zawsze białka zachowują się zgodnie z ogólnie przyjętym mechanizmem towarzyszącym ich wsalaniu i wysalaniu. W badaniach białek nasion bobiku Darewicz i wsp. [6] stwierdzili, że wyizolowane z nich albuminy i globuliny charakteryzują się odmiennymi cechami rozpuszczalności. Istniała graniczna wartość siły jonowej, powyżej której rozpuszczalność albumin nasion bobiku malała. Zaś globuliny bobiku, w przeciwieństwie do albumin, paradoksalnie zwiększały swoją rozpuszczalność wraz ze wzrostem siły jonowej nawet powyżej granicznej wartości, przy której albuminy ulegały wysalaniu. Zjawisko to tłumaczono oddysocjowaniem frakcji białkowych oraz zmianą stanu poligonowego cząsteczek białkowych, powodowanego zmianą wartości hydrofobowości powierzchniowej w wyniku ekranizującego wpływu jonów soli. Wynikiem takich zmian mogła być preferencyjna hydratacja molekuł białkowych. Znajomość opisanego mechanizmu zmian rozpuszczalności albumin i globulin może mieć znaczenie podczas ekstrakcji tych białek z roztworów wodnych oraz opracowywania technologii otrzymywania izolatów tych białek.

Zastosowanie białek zdecydowanie wzrasta wszędzie tam, gdzie zachowana jest ich wysoka rozpuszczalność. Szczególne znaczenie odgrywa ta właściwość w środowisku kwaśnym. Wówczas istnieje możliwość zastosowania białek jako dodatków do soków i napojów bez obawy, że zajdzie ich koagulacja.

Właściwości powierzchniowo czynne

Zjawisko stabilizowania emulsji lub piany przez białka jest spowodowane ich zdolnością do adsorbowania się na granicy faz, zmniejszania napięcia powierzchniowego i tworzenia spójnej warstwy wokół kropelek oleju lub pęcherzyków powietrza [57]. Eksperymenty dotyczące kinetyki adsorpcji białek globularnych dowiodły, że większość z nich musi pokonać barierę energetyczną, aby zaadsorbować się na granicy faz. Natura tej bariery nie jest do końca poznana, ale przypuszcza się, że jest to bariera ciśnienia i elektrostatyczna [56]. W najprostszym przypadku przy

nieobecności obu tych barier dyfuzja byłaby uzależniona od rozmieszczenia grup hydrofilowych i hydrofobowych na powierzchni cząsteczki białka i ich wzajemnych proporcji [5]. Jeżeli powierzchnia cząsteczek ma charakter hydrofilowy wówczas adsorpcja na granicy faz może nie zachodzić. Jeśli jednak zawiera dodatkowo tylko kilka reszt hydrofobowych i wejdą one w oddziaływanie z powierzchnią faz, wówczas adsorpcja może zachodzić. Innymi słowy adsorpcja na granicy faz powietrze/woda, olej/woda zależy od statystycznego prawdopodobieństwa zderzeń grup hydrofobowych znajdujących się na powierzchni cząsteczek białka z granicą faz.

Szczególny wpływ na adsorpcję i formowanie błon ma stabilność konformacji, zdolność do jej przearanżowania na granicy faz oraz symetria/asymetria rozmieszczenia polarnych i apolarnych grup funkcyjnych, a w konsekwencji amfifilowość struktur białkowych. Wielu autorów wskazywało na amfifilowość struktur białkowych jako warunek konieczny, po którego spełnieniu białka/peptydy charakteryzowały się dobrymi właściwościami powierzchniowymi, w tym emulgującymi i pianotwórczymi [9, 10, 15, 57]. Silnie amfifilowa natura kazeiny- β ułatwia jej koncentrację na powierzchni międzyfazowej, co jest wstępnym etapem procesu formowania emulsji lub piany [11, 15].

Piany

Piana powstaje wskutek zdyspergowania pęcherzyków powietrza w fazie ciekłej. Dodatek białka powoduje wzrost lepkości fazy wodnej, co zwiększa trwałość filmu międzyfazowego, a tym samym wytworzonej piany [58]. Białka obniżają napięcie powierzchniowe przez interakcje zarówno z cząsteczkami wody, jak i powietrzem, co pozwala na formowanie większej ilości pęcherzyków piany. Po adsorpcji cząsteczek białka na powierzchni pęcherzyków powietrza polarne reszty aminokwasów znajdujące się na powierzchni cząsteczek białek zwracają się w stronę cieczy, zaś niepolarne – w stronę powietrza. Wokół pęcherzyków powietrza powstaje spójny, elastyczny film międzyfazowy. Pęcherzyki nie łączą się ze sobą, gdyż stykają się jednoimiennie naładowanymi fragmentami cząsteczek białek. Objętość pęcherzyków powietrza może stanowić nawet 99% ogólnej objętości piany, a ich średnice zawierają się w przedziale 0,1–1 mm [55]. Do czynników wpływających na tworzenie piany można zaliczyć hydrofobowość powierzchniową, umiejscowienie hydrofobowych reszt aminokwasowych na powierzchni białka, obecność grup tiolowych, kationów i anionów, węglowodanów, lipidów. Dowiedziono, że białko o idealnych właściwościach pianotwórczych powinno mieć dużą hydrofobowość powierzchniową, dobrą rozpuszczalność, niski ładunek netto przy wartości pH produktu spożywczego, a jego łańcuch polipeptydowy powinien ulegać łatwo rozfałdowaniu [43]. Bigelow [2] podaje, że minimalna wartość hydrofobowości białka umożliwiająca adsorpcję na granicy faz wynosi ok. 1000 kJ/mol. Adsorpcja białka na powierzchni międzyfazowej powietrze/woda czy olej/woda związana jest z prawdopodobieństwem zetknięcia się

cząsteczki białka z powierzchnią międzyfazową. Im większa liczba obszarów hydrofobowych, tym większe będzie prawdopodobieństwo zetknięcia się tych obszarów z powierzchnią międzyfazową [5]. Dobre właściwości pianotwórcze wykazują białka podobne budową do kazeiny- β , która łatwo adsorbuje się na powierzchni powietrze/woda, zmniejszając w ten sposób napięcie powierzchniowe [7, 9, 10]. Jednakże piana utworzona z jej udziałem jest mało stabilna ze względu na słabe właściwości lepkosprężyste [43].

Stabilność uformowanych pian nie jest zjawiskiem niezmiennym. Stabilność piany zależy od zdolności białka do ochrony utworzonej piany przed działaniem sił grawitacji i mechanicznymi interakcjami. Stabilne piany są zwykle tworzone przy pH bliskim punktowi izoelektrycznemu białka, kiedy to siły oddziaływań elektrostatycznych są najmniejsze.

Procesy, które podwyższają wartość hydrofobowości polepszają właściwości pianotwórcze. Pianotwórcze właściwości białka można zwiększyć przez krótkotrwałe ogrzanie. Termiczna denaturacja w zakresie temp. 40-60°C przez 30 min poprawia właściwości pianotwórcze białek serwatkowych. Optymalne warunki ogrzewania zależą od rodzaju i stężenia białka [36].

Emulsje

Emulsjami nazywamy układy dyspersyjne, składające się z dwóch lub więcej niemieszających się ze sobą cieczy, z których jedna występuje w postaci fazy ciągłej, a druga w formie rozproszonych kropelek. Podczas mieszania oleju i roztworów wodnych białek pojawia się tendencja do ograniczenia kontaktu między nimi i separacja faz. Początkowo minimalny kontakt jest osiągany wskutek formowania sferycznych kropelek przy nakładzie energii z zewnątrz. Emulsje stabilizowane białkami zapewniają minimalny kontakt grup hydrofobowych z wodą. Jest to stan najkorzystniejszy energetycznie [56]. Czas niezbędny do utworzenia spójnej warstwy wokół kropelek oleju i ustalenia się równowagi termodynamicznej zależy od rodzaju białka. Zjawiska te przebiegają szybko z udziałem białek o luźnej, elastycznej strukturze (np. kazeina- β), ze średnią szybkością w przypadku białek globularnych (np. bydlęca albumina serum) oraz wolno z białkami o zwartej strukturze (np. lizozym). Wielkość kropelek fazy rozproszonej jest podstawową wielkością charakteryzującą emulsje. Średnica tych kropelek w emulsjach produktów spożywczych waha się w granicach od 0,2 do 10 μm i zależy od metody wytwarzania emulsji, różnicy lepkości obu faz, rodzaju użytego emulgatora oraz od nakładu energii przy tworzeniu emulsji [55]. W produktach o niskiej jakości występują krople o średnicy ok. 10 μm i powyżej. W majonezie dobrej jakości krople wynoszą 2–4 μm .

W celu ułatwienia powstawania emulsji, a także poprawy jej stabilności należy wprowadzić do układu czynnik stabilizujący. Może nim być działanie polegające na wprowadzeniu emulgatora, np. białka [56]. W przeciwieństwie do

niskocząsteczkowych emulgatorów struktura białek może ulec zmianie pod wpływem adsorpcji. Po adsorpcji na hydrofobowej powierzchni struktura kazeiny- β ulega zmianie [40]. Pierwsze 50 aminokwasów części N-końcowej łańcucha polipeptydowego ma bezpośredni kontakt z polarnym środowiskiem. Tworzą one pętlę, która jest „zakotwiczona” na powierzchni międzyfazowej dzięki obecności aminokwasów hydrofobowych. Pozostała część cząsteczki kazeiny- β jest „przyczepiona” do hydrofobowej powierzchni w postaci powyginanego łańcucha.

Dobry emulgator powinien nie tylko tworzyć, ale również stabilizować nowo utworzoną powierzchnię międzyfazową. Dowiedziono, że emulsje stabilizowane przez białka są bardziej stabilne przy pH różnym od wartości punktów izoelektrycznych białek np. właściwości emulgujące laktoglobuliny- β zależą od wartości pH środowiska [56, 57]. Wykazuje ona lepsze właściwości przy pH powyżej 7,0. Stabilność emulsji zależy m.in. od lepkości fazy ciągłej, sił ciężenia, ładunku wypadkowego i struktury białka. Rodzaj urządzenia do wytwarzania emulsji, ilość energii dostarczanej podczas emulgowania w dużym stopniu wyznaczają zakres i charakter zmian emulsji w czasie [35]. Również czynniki środowiskowe, np. stężenie białka, kwasowość czynna, stosunek faz olej/woda i siła jonowa decydują o stabilności emulsji [9, 10, 11]. Kazeina- β jest najbardziej efektywnym stabilizatorem spośród wszystkich białek mleka, ponieważ w najwyższym stopniu zmniejsza napięcie powierzchniowe. Zdolność obniżania napięcia powierzchniowego maleje według kolejności: kazeina- β > $-\alpha_{s1}$ > $-\kappa$ > laktoglobulina- β > laktoalbumina- α > albumina serum [16, 31].

Zmieniając strukturę białka można doprowadzić do zmian jego konformacji, co z kolei może wpływać na zmiany jego zdolności do tworzenia i stabilizowania emulsji. Wzrost hydrofilowości może w niektórych przypadkach odegrać pozytywną rolę w kształtowaniu właściwości emulgujących. Glikozylacja β -laktoglobuliny powoduje wzrost masy cząsteczkowej, zmniejszenie wypadkowego ładunku netto, zwiększenie hydrofobowości powierzchniowej, a co za tym idzie poprawę właściwości emulgujących [21, 45]. Podobne zmiany emulgujących właściwości glikozyłowanej kazeiny- β obserwowali w swoich badaniach Darewicz i Dziuba [12] oraz Dziuba i wsp. [16]. Zmiany te obejmowały nowy sposób aranżacji struktury kazeiny- β na hydrofobowej powierzchni. Zaobserwowano wówczas zmniejszenie udziału struktury nieuporządkowanej i większy stopień „upakowania” cząsteczek na hydrofobowej powierzchni. Zmniejszona hydrofobowość powierzchniowa tak zmodyfikowanej cząsteczki, jej zwiększony ładunek wypadkowy netto promowały siły elektrostatycznego i sterycznego odpychania, stabilizując emulsję i zapobiegając jej koalescencji. Z kolei stosując w swoich badaniach fosfatazę alkaliczną, Darewicz i wsp. [8, 10, 11] modyfikowali wartość ładunku wypadkowego netto cząsteczki kazeiny- β . Paradoksalnie mimo usunięcia reszt fosforanowych, będących źródłem oddziaływań elektrostatycznych i sterycznych, emulsja stabilizowana defosforylowaną kazeiną- β nie uległa destabilizacji. Zjawisko to tłumaczono wciąż amfifilowym

charakterem całej cząsteczki kazeiny- β oraz, co bardziej istotne, zmianami strukturalnymi tj. indukowaniem przyrostu struktury α -helikalnej. Zmniejszenie sił odpychania o charakterze elektrostatycznym i sterycznym było kompensowane przez bardziej zwartą architekturę struktury defosforylowanej kazeiny- β , co w konsekwencji zapobiegało destabilizacji emulsji.

Wielu autorów [20, 42, 46] sugeruje istnienie zależności między obecnością struktury drugorzędowej w roztworach naturalnych i syntetycznych peptydów a ich biofizycznymi właściwościami. Zwracano m.in. uwagę na związek między udziałem amfifilowej struktury α -helikalnej w drugorzędowej strukturze laktoferyny i białek hemowych oraz ich peptydów a ich właściwościami antybakteryjnymi. Starano się także udowodnić istnienie statystycznie istotnej korelacji między udziałem procentowym amfifilowego α -heliksu w strukturze drugorzędowej peptydów syntetycznych a ich zdolnościami do tworzenia i stabilizowania emulsji. Darewicz i wsp. [7, 10, 11] stwierdzili istnienie związku między udziałem struktury α -helikalnej, indukowanej adsorpcją na hydrofobowej powierzchni, a kształtowaniem się zdolności do tworzenia emulsji przez peptydy.

Matematyczna formalizacja zależności struktura-funkcja

Pomimo dość dużej liczby publikacji, w których autorzy podejmują problem relacji pomiędzy strukturą a funkcjami białek i peptydów, wciąż w wyjaśnieniach mechanizmów leżących u podstaw kształtowania się zależności między strukturą białek a ich funkcją trudno znaleźć pewne uniwersalne tezy. Nakai i wsp. [36] próbowali sformułować zależności między strukturą białek żywności a ich właściwościami funkcjonalnymi. Stwierdzili wówczas, że rozpuszczalność, ładunek wypadkowy netto, zdolność do asocjacji cząsteczek białkowych, zawartość grup tiolowych lub mostków dwusiarczkowych oraz hydrofobowość bocznych reszt aminokwasowych w białkach mają wpływ na ich właściwości emulgujące i pianotwórcze. Jednocześnie Nakai i wsp. [36] oraz Giuliani i wsp. [22] twierdzą, że zależności między strukturą białek a ich właściwościami funkcjonalnymi są w wielu przypadkach nieliniowe. Z tego powodu coraz większym zainteresowaniem cieszą się wielowymiarowe metody statystyczne wykorzystujące analizę regresji wielokrotnej, regresji metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów, regresji składowych głównych czy sieci neuronowe [34, 49]. Nakai i wsp. [36, 37], posługując się równaniami regresji, zwrócili uwagę na znaczenie rozpuszczalności białek w matematycznej interpretacji wyników oceny ich właściwości funkcjonalnych. Wprowadzenie wyników oznaczeń hydrofobowości powierzchniowej i rozpuszczalności do zaproponowanego modelu regresji wielokrotnej, pozwalającego oszacować właściwości emulgujące badanych białek, spowodowało wzrost współczynnika determinacji [37]. Podobną metodę analizy matematycznej wykorzystali też Voutsinas i wsp. [54] w badaniach właściwości emulgujących białek różnego pochodzenia po ich

obróbce cieplnej. Autorzy wskazali na możliwość przewidywania właściwości pianotwórczych i emulgujących za pomocą równań regresji uwzględniających rozpuszczalność i hydrofobowość.

Van der Ven i wsp. [59, 60] wykorzystali w charakterze narzędzia statystycznego analizę regresji metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów, opracowując model umożliwiający przewidywanie właściwości pianotwórczych i emulgujących hydrolizatów białek mleka na podstawie mas cząsteczkowych obecnych w nich peptydów oznaczonych metodą chromatografii żelowej. Ponadto van der Ven i wsp. [60] zastosowali tę metodę do opracowania modelu matematycznego wyjaśniającego różnice we właściwościach pianotwórczych, emulgujących oraz gorzkim smaku hydrolizatów białkowych na podstawie różnic w ich widmach FTIR [60].

Wyniki dotychczasowych badań Darewicz i wsp. [13] pozwoliły na zastosowanie metody regresji wielokrotnej do opisu zależności między zdolnościami do tworzenia oraz stabilizacji piany oraz tworzenia emulsji przez białka i peptydy a ich rozpuszczalnością oraz czasem retencji (analiza chromatograficzna) lub parametrami spektroskopowymi (analiza widm UV). Poniżej przedstawiono przykładowe równanie opisujące zależności między zdolnością do tworzenia piany (F_0) przez białka i peptydy a ich rozpuszczalnością i czasem retencji (t_R), dla którego współczynniki korelacji wielokrotnej były istotne statystycznie ($p < 0,05$).

$$F_0^a = 105,4843 - 0,9379 \times \text{Rozp} + 0,5216 \times t_R$$

Analizując wyniki badań uzyskiwane w różnych ośrodkach naukowych można stwierdzić, że obok licznych procesów i zjawisk, w przypadku których matematyczne modele zależności są stosunkowo dobrze poznane, występują także liczne procesy i zjawiska, których struktura lub prawa działania nie zostały jeszcze poznane i opisane w stopniu wystarczającym do tego, żeby zbudować ich efektywne modele. Co więcej, w przypadku niektórych zjawisk sam problem przyczynowości bywa otwarty, gdyż często nie ma pewności, jakie czynniki naprawdę wpływają na rozważane procesy, determinując ich przebieg oraz rezultaty. Ogromną zaletą wielowymiarowych metod statystycznych jest fakt, że pozwalają one poszukiwać modeli opisujących takie właśnie słabo znane zjawiska i procesy.

Podsumowanie

Jako podstawową przyczynę różnic we właściwościach funkcjonalnych między białkami wymienia się ich odmienne właściwości strukturalne. Modyfikacje łańcuchów polipeptydowych białek oraz zmiany warunków środowiska wpływają na konformacje ich cząsteczek i w konsekwencji na rozpuszczalność, zdolności do tworzenia/stabilizowania emulsji/pian. Sugeruje się, że warunkiem koniecznym występowania korzystnych właściwości emulgujących i pianotwórczych białek jest amfifilowość ich struktur. Zależności między strukturą białek i ich właściwościami funkcjonalnymi mogą być opisane z wykorzystaniem wielowymiarowych metod

statystycznych, co może znaleźć zastosowanie przy projektowaniu żywności o pożądanym i przewidywalnym cechach.

Praca finansowana w ramach badań własnych Katedry Biochemii Żywności UWM w Olsztynie, temat nr 522-0712-0203.

Literatura

- [1] Aoki T.: Emulsifying properties of soy protein: characteristics of 7S and 11S proteins. *J. Food Sci.*, 1980, **45**, 534-538.
- [2] Bigelow C. C.: On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theor. Biol.*, 1967, **16**, 187-211.
- [3] Bryant C.M., McClements D.J.: Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.*, 1998, **9**, 143-151.
- [4] Creamer L.K., Harris D.P.: Relationship between milk protein polymorphism and physicochemical properties. *Int. Dairy Fed. Spec. Issue*, 1997, **97-02**, 110-123.
- [5] Damodaran S.: Protein-stabilized foams and emulsions. In: *Food proteins and their applications* – eds. S. Damodaran, A. Paraf. Marcel Dekker Inc., New York 1997, pp. 57-110.
- [6] Darewicz M., Kostyra H., Dziuba J.: Rozpuszczalność i stabilność cieplna albumin i globulin nasion bobiku – charakterystyka i zmiany pod wpływem przechowywania. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olszt.*, 1996, **29**, 125-138.
- [7] Darewicz M., Dziuba J., Caessens P. W. J. R., Gruppen H.: Effect of dephosphorylation on the functionality of bovine β -casein and its plasmin-derived peptides. In: *Functional foods – a new challenge for the food chemists* – eds. R. Lasztity, W. Pfannhauser, L. Simon-Sarkadi, S. Tomoskozi. Publ. Com. TUB, Budapest 1999, pp. 665-671.
- [8] Darewicz M., Dziuba J., Mioduszevska H., Minkiewicz P.: Modulation of physico-chemical properties of bovine β -casein by non-enzymatic glycation associated with enzymatic dephosphorylation. *Acta Aliment. Hung./Int. J. Food Sci.*, 1999, **4**, 339-354.
- [9] Darewicz M., Dziuba J., Caessens P. W. J. R.: Effect of enzymatic hydrolysis on emulsifying and foaming properties of milk proteins – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2000, **9**, 3-8.
- [10] Darewicz M., Dziuba J., Caessens P. W. J. R., Gruppen H.: Dephosphorylation-induced structural changes in β -casein and its amphiphilic fragment in relation to emulsion properties. *Biochimie*, 2000, **82**, 191-195.
- [11] Darewicz M.: Wpływ enzymatycznych modyfikacji kazeiny- β na jej strukturę i wybrane właściwości funkcjonalne. Wyd. UWM, Olsztyn 2001.
- [12] Darewicz M., Dziuba J.: The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine β -casein. *Nahrung/Food*, 2001, **45**, 15-20.
- [13] Darewicz M., Dziuba J., Panfil T.: Zaawansowane metody statystyczne jako nowe narzędzia w analizie danych w nauce o żywności i żywieniu. Materiały XXXVI Sesji Naukowej KNoŻ PAN, Szczecin 2005.
- [14] Dickinson E., Horne D.S., Pinfield V.J., Leermakers F.A.M.: Self-consistent Fidel modeling of casein adsorption: comparison of results for α_{s1} -casein and β -casein. *J. Chem. Soc. Faraday Transactions*, 1997, **93**, 425-432.
- [15] Dickinson E.: Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 305-312.
- [16] Dziuba J., Darewicz M., Mioduszevska H.: Physico-chemical characteristics of different genetic variants of bovine β -casein, modified covalently by glucose, galactose and lactose. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1998, **2**, 166-170.

- [17] Dziuba J., Darewicz M.: Structural aspects of functional properties of milk proteins. *Natur. Sci.*, 2000, **4**, 257-272.
- [18] Dziuba J., Iwaniak A., Niklewicz M.: Database of protein and bioactive peptide sequences – BIOPEP.2003, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>.
- [19] Dziuba J., Iwaniak A., Niklewicz M., Darewicz M., Minkiewicz P.: Bioinformatic-aided prediction for release possibilities of bioactive peptides from plant proteins. *Acta Aliment./Int. J. Food Sci.*, 2004, **33**, 227-235.
- [20] Enser M., Bloomberg G. B., Brock C., Clark D. C.: De novo design and structure-activity relationships of peptide emulsifiers and foaming agents. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1990, **12**, 118-124.
- [21] Foegeding E.A., Davis J.P., Doucet D., McGuffey M.K.: Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends Food Sci. Technol.*, 2002, **13**, 151-159.
- [22] Giuliani A., Benigni R., Zbilut J. P., Webber Jr. C. L., Sirabella P., Colosimo A.: Nonlinear signal analysis methods in the elucidation of protein sequence-structure relationships. *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1471-1491.
- [23] Hambling S.G., McAlpine A.S., Sawyer L.: β -Lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry. Proteins. Vol.1* – eds. P.F. Fox. Elsevier Applied Science, London 1992, pp.141-190.
- [24] Holt C., Sawyer L.: Caseins as rheomorphic proteins: Interpretation of primary and secondary structures of the α_{s1} - and β - and κ -caseins. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1993, **89**, 2683-2692.
- [25] Horne D.S.: Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.*, 1998, **8**, 171-177.
- [26] Inafidon G. I., Farkye N. Y., Spanier A. M.: Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1997, **37**, 663-689.
- [27] Ismond M.A., Georgiu C., Arntfield S.D., Murray E.D.: Role of noncovalent forces in micellization using legumin from Vicia faba as a study system. *J. Food Sci.*, 1990, **55**, 1638-1642.
- [28] Katan M.B., De Roos N.M.: Promises and problems of functional foods. *Crit. Rev. Food Sc. Nutr.*, 2004, **44**, 369-377.
- [29] Kilara A., Harwalker V.R.: Denaturation. In: *Food Proteins: Properties and characterization* – eds. S. Nakai, H.W. Modler. VCH Publishers Inc., 1996, pp. 71-135.
- [30] Kinsella J. E.: Physical properties of food and milk components. Research needs to expand uses. *J. Dairy Sci.*, 1987, **70**, 2419-2429.
- [31] Klemaszewski J. L., Das K. P., Kinsella J. E.: Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. *J. Food Sci.*, 1992, **57**, 366-371.
- [32] Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A.: Milk protein-derived bioactive peptides – novel opportunities for health promotion. *Biul. IDF*, 2001, **363**, 17-26.
- [33] Kumosinski T. F., Brown E. M., Farrel H. M. Jr.: Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: Energy minimized β -casein structure. *J. Dairy Sci.*, 1993, **76**, 931-945.
- [34] Lavine B. K., Workman J. J.: Chemometrics. *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2763-2770.
- [35] Leman J.: Właściwości emulgujące albuminy serum krwi. *Przegl. Mlecz.*, 2002, **5**, 225-228.
- [36] Nakai S., Li-Chan E., Hayakawa S.: Contribution of protein hydrophobicity to its functionality. *Nahrung*, 1986, **3-4**, 327-336.
- [37] Nakai S., Li-Chan E. C. Y., Artega G. E.: Measurement of surface hydrophobicity. In: *Methods of testing protein functionality* – ed. G. M. Hall. Chapman, London 1996, pp. 226-260.
- [38] Nakai S., Chan J. C. K., Li-Chan E. C., Dou J., Ogawa M.: Homology similarity analysis of sequences of lactoferricin and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 1215-1223.
- [39] Nakai S., Alizadeh-Pasdar N., Dou J., Buttamor R., Rousseau D., Paulson A. Pattern similarity analysis of amino acid sequences for peptide emulsification. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 927-934.
- [40] Nylander T., Tiberg F., Wahlgren N.M.: Evaluation of the structure of adsorbed layers of β -casein from ellipsometry and surface force measurements. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 313-317.
- [41] Pomerantz Y.: New and novel foods. In: *Functional properties of food components* – ed. S. L. CH. Taylor, Academic Press Inc., London 1991.
- [42] Poon S., Clarke A., Currie G., Schultz C. 2001. Influence of α -helices on the emulsifying properties of proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, **65**, 1713-1723.

- [43] Poole S., Fry J. Developments in Food Proteins. In: *Advances in food emulsions and foam* – ed. B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science Publishers, London 1987, pp. 257-298.
- [44] Pour-El A. Preface. In: *Functionality and protein structure* – ed. A. Pour-El., ACS Symp. Ser. 92, Am. Chem. Soc., Washington D. C. 1979, s. ix-xii.
- [45] Rahali V., Chobert J. M., Haertle T., Gueguen J. Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin: characterization of the peptides adsorbed at the interface. *Nahrung*, 2000, **44**, 89-95.
- [46] Saito M., Ogasawara M., Chikuni K., Schimizu M.: Synthesis of a peptide emulsifier with an amphiphilic structure. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, **3**, 388-392.
- [47] Scarsi M., Majeux N., Caflisch A.: Hydrophobicity at protein surface. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 1999, **37**, 565-575.
- [48] Schein C.: Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Biotechnology*, 1990, **8**, 308-318.
- [49] Schlehel-Zawadzka M., Przystawski J., Babicz-Zielińska E., Wądołowska L.: Sieci neuronowe – nowe narzędzie w analizie danych w naukach żywieniowych. *Żyw. Czł. Met.*, 2001, **28**, Supl., 898-903.
- [50] Sikorski Z.E.: *Chemia żywności*. WNT. Warszawa 2002.
- [51] Sood S. M., Slattery Ch. W.: Monomer characterization and studies of self-association of the major β -casein of human milk. *J. Dairy Sci.*, 1987, **80**, 1554-1560.
- [52] Swaisgood H. E.: Chemistry of the caseins. In: *Advanced Dairy Chemistry*. Vol 1. Dairy Proteins – eds. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, pp. 63-110.
- [53] Thomas M.E.C., Scher J., Desobry-Banon S., Desobry S.: Milk powders ageing: Effect on physical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sc. Nutr.*, 2004, **44**, 297-322.
- [54] Voutsinas L. P., Cheung E., Nakai S.: Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J. Food Sci.*, 1983, **48**, 26-32.
- [55] Walstra P.: Overview of emulsion and foam stability. In: *Food emulsions and foams* – ed. E. Dickinson. Royal Society of Chemistry, London 1987, pp. 242-257.
- [56] Walstra P., de Roos A. L.: Proteins at air-water and oil-water interfaces: static and dynamic aspects. *Food Rev. Int.*, 1993, **9**, 503-525.
- [57] Walstra P.: Emulsion stability. In: *Encyclopaedia of emulsion technology*. Vol. 4 – eds. P. Becher, M. Dekker, New York 1996, pp. 1-62.
- [58] Wilde P.J.: Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2000, **5**, 176-181
- [59] Van der Ven C., Gruppen H., de Bont D. B. A., Voragen A. G. J.: Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and –stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 2938-2946.
- [60] Van der Ven C., Muresan S., Gruppen H., de Bont D. B. A., Merck K. B., Voragen A. G. J.: FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 6943-6950.

THE STRUCTURE OF MILK PROTEINS VERSUS THEIR FUNCTIONAL PROPERTIES

Summary

In the paper, results of the study on the relationship between a structure of milk proteins and some selected functional properties of them were presented and analyzed. Several factors, such as: molecular size, hydrophobicity, charge, and flexibility are important for the functional properties of proteins. Additionally, external factors, such as: temperature, pH, ionic strength, and the presence of other molecules influence these functional properties. A distinct structure of individual proteins is considered

the main reason why there are differences in functional properties of the proteins. Functional properties can be modified in several ways, e.g. by the physical, chemical, enzymatic, or genetic modification. Other functional properties may also depend on solubility which is a physical-chemical feature. Proteins can adsorb at oil/water and air/water interfaces, and, thereby, they can lower the surface tension; at the same time, they also change their structure. Good interfacial properties of proteins are attributed both to the specific distribution of clustering hydrophilic and hydrophobic residues into exactly isolated zones and to the minimum molecular mass of the peptide enabling this distribution. It was stated that there was a relationship between the α -helical adsorption-induced structure on the hydrophobic surface and the emulsion forming ability of peptides. Advanced statistical methods become more and more popular and they are used to describe the structure-function relationships of proteins. The knowledge of molecular basis of proteins solubility, and foam/emulsion forming/stabilizing abilities is fundamental for the purpose of studying the milk proteins applications in food with required and design properties.

Key words: emulsion, foam, milk proteins, solubility, statistical models, structure 