

DAGMARA MIERZEJEWSKA, LUCJAN JĘDRYCHOWSKI

MOŻLIWOŚCI OZNACZANIA ZMIAN DENATURACYJNYCH α -LA MLEKA KROWIEGO

Streszczenie

Rozbudowana struktura drugo- i trzeciorzędowa białek serwatkowych: α -la, β -lg, BSA i immunoglobulin, sprawia, że są podatne na procesy denaturacyjne wywoływane czynnikami chemicznymi lub fizycznymi (temperatura czy wysokie ciśnienia). Procesy termiczne, szeroko stosowane w przemyśle mleczarskim, powodują denaturację, zmianę właściwości fizyko-chemicznych i żywieniowych białek serwatkowych. Poznanie tych zmian i technik, którymi można je obserwować jest istotne ze względów badawczych i żywieniowych.

W artykule przedstawiono przegląd kilku technik wykorzystujących zmianę właściwości immunoreaktywnych, termodynamicznych (temperatura i entalpia denaturacji, energia aktywacji), fizyko-chemicznych pozwalających lepiej poznać proces denaturacji tych białek.

Właściwości białek serwatkowych mleka

Mleko i jego składniki skupiają od dawna uwagę żywieniowców i dietetyków. W ostatnim okresie oprócz właściwości funkcjonalnych i wartości biologicznych coraz większą uwagę zwraca się na właściwości immunogenne mleka i produktów mleko pochodnych. Badania statystyczne wykazują, że obecnie około 2–7% ogólnej populacji niemowląt cierpi na alergię na mleko krowie. Obserwuje się ciągły wzrost reakcji uczuleniowych w tej grupie, najprawdopodobniej na skutek zmian środowiskowych. Kliniczne objawy alergii są bardzo uciążliwe i najczęściej obejmują anafilaksję, wymioty, biegunkę, astmę, pokrzywkę, obrzęk naczyniowo-ruchowy, wypryski, i drażliwość [1, 28].

W badaniach nad alergiennością białek mleka Crawford i Grogan [1] wykazali, że bardzo ważnymi frakcjami alergennymi mleka są kolejno α -kazeina, β -laktoglobulina i α -laktoalbumina.

Według Baldo [1] wszystkie białka mleka, zarówno kazeina, α -laktoalbumina, β -laktoglobulina i serum albuminy (BSA), mogą być odpowiedzialne za występowanie odpowiedzi immunologicznej u osób nadwrażliwych na wymieniony produkt.

Białka mleka są głównym składnikiem diety dziecięcej. Ich alergenne właściwości stanowią poważny problem i często zmuszają do zastąpienia tych wysoko odżywczych składników innymi, jak np. białka soi. Fakt ten skłania do poszukiwań metod zmierzających do obniżenia immunoreaktywnych właściwości białek mleka by umożliwić produkcję np. hypoantygenowych lub hypoalergicznymi odżywek dla dzieci.

Prace McLaughlana [18] wykazały, że zastosowanie procesów termicznych w czasie przetwarzania mleka może częściowo obniżyć właściwości alergennych białek mleka. Wiąże się to jednak z obniżeniem wartości żywieniowej poprzez destrukcję składników labilnych termicznie, jak np. lizyna, tiamina, witaminy B₆ czy B₁₂ [18]. Z tego względu przy produkcji odżywek dla dzieci, powstałe straty rekompensuje się poprzez dodanie odpowiednich ilości składników labilnych termicznie [18].

Wiele badań wykazuje, że obróbka cieplna mleka krowiego prowadzi do denaturacji białek w nim zawartych. W zależności od parametrów procesu, które wpływają na zmianę konformacji białek serwatkowych mleka [24, 26], powoduje ona stałe bądź odwracalne zmiany właściwości fizykochemicznych (rozpuszczalności, hydrofobowości, zmianę ładunku cząsteczkowego). Denaturacja termiczna może również powodować zmiany właściwości immunoreaktywnych białek serwatkowych poprzez zmiany konformacyjne w obrębie epitopów (tj. fragmentów odpowiedzialnych za wiązanie z przeciwciałem).

Do badań procesu denaturacji białek serwatkowych mleka stosuje się szereg metod, wykorzystujących różnice właściwości fizycznych i chemicznych białek w postaci natywnej i zdenaturowanej, jak np. elektroforeza kapilarna, elektroforeza na żelu poliakrylamidowym [1, 19], szybka chromatografia cieczowa (FPLC) [3], wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) [23], skręcalność optyczną (ORD) [2], dichroizm kołowy (CD) [2, 26], różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) [8], metody krystalografii rentgenowskiej [7, 29] i metody immunometryczne [1, 16, 18, 22].

Charakterystyka białek serwatkowych

Właściwości białek wiążą się nieodłącznie z ich strukturą pierwszo-, drugo-, trzecio-, i czwartorzędową. W zależności od układu sił wewnątrzcząsteczkowych, rozkładu wiązań wodorowych, mostków dwusiarczkowych, konformacji przestrzennej białka w różny sposób reagują na czynniki zewnętrzne, którym są poddawane.

Wśród białek mleka wyróżnia się frakcję kazeiny i białka serwatkowe [15]. Termin „białka serwatkowe”, „białko serum” lub „białka niekazeinowe” obejmuje te białka mleka, które pozostają rozpuszczone po destabilizacji kazeiny przez ukwaszenie do pH 4,6 lub działanie chymozyny [15, 21]. W skład białek serwatkowych wchodzi: α -

laktoalbumina (α -la) 0.11% mleka, β -laktoglobulina (β -lg) 0.38% mleka, serum albumin (BSA) 0.06% mleka, immunoglobuliny (np. proteozo-peptony, transferazę, laktoferynę, β -2-mikroglobuliny) 0.06% mleka i enzymy natywne mleka (np. lizozym, lipaza, kwaśna i alkaliczna fosfataza) [31].

Udział poszczególnych składników w serwatce przedstawia tabela 1.

Tabela 1

Zawartość białek w stosunku do białek ogółem w serwatce kwaśnej i słodkiej [15].
Content of protein fractions in total protein of sour and sweet whey [15].

Fracje białek serwatki Fractions of whey protein	Serwatka kwaśna [%] Sour whey [%]	Serwatka słodka [%] Sweet whey [%]
β -laktoglobulina	54	45
α -laktoalbumina	23	18
Serum albuminy	6	5
Immunoglobuliny	6	5
Kazeina	2	20
Enzymy	2	2

β -laktoglobulina

Głównym białkiem serwatki jest β -lg stanowiąca około 50% wszystkich białek serwatkowych mleka krowiego. Molekuły β -lg silnie wiążą retinol, stąd wynika biologiczna funkcja tego białka jako transportera witaminy A [15]. Cząsteczki β -lg mają masę cząsteczkową ok. 18 300 Da. Struktura drugorzędowa składa się z 15% formy α -helix, 51% formy β -harmonijki i 34% postaci nieuporządkowanej [15]. Ścisła struktura trzeciorzędowa β -lg nie jest znana, ale badania metodą krystalografii rentgenowskiej wskazują, że monomer jest w przybliżeniu sferą o średnicy ok. 3nm. Czwartorzędowa struktura jest stabilizowana obecnością grup tiolowych. Każdy monomer zawiera pięć reszt cysteinowych, z których cztery związane są wewnętrznymi mostkami dwusiarczkowymi. W zależności od pH i temperatury β -lg może występować jako monomer, dimer lub octamer. Struktura czwartorzędowa utrzymywana jest głównie poprzez siły elektrostatyczne.

Mleko ludzkie w odróżnieniu od mleka krowiego nie zawiera β -laktoglobuliny i być może to jest powodem występowania objawów alergicznych u ludzi, po spożyciu tego mleka [28]. β -lg była przedmiotem wcześniejszych opracowań naszego zespołu

[Copernicus PL NO 94-1010], dlatego też obecnie główną uwagę zwrócono na α -laktoalbuminę – białko immunoreaktywne obecne w mleku matki.

α -laktoalbumina

α -laktoalbumina (α -la) jest małym białkiem globularnym o ciężarze 14 200 Da. Sekwencja aminokwasowa α -laktoalbuminy wołowej jest w około 76% homologiczna do ludzkiej. Mimo tak dużego podobieństwa w strukturze I-rzędowej białko to jest uznawane za jedno z bardziej alergizujących składników mleka krowiego.

α -la zawiera cztery wewnątrzcząsteczkowe mostki dwusiarczkowe. Widmo dichroizmu kołowego (Circular Dichroism- CD) wykazuje, że w fizjologicznym pH, w drugorzędowej strukturze α -la występuje 26% formy α -helix, 14% β -harmonijki i 60% postaci nieuporządkowanej [15]. α -La to metaloproteina wiążąca 1 mol wapnia na 1 mol białka co wpływa na zachowanie natywnej konformacji cząsteczki [26]. W kwaśnym pH (ok. 3.5) α -la ulega denaturacji wskutek dysocjacji wapnia [4, 5].

serum albuminy (BSA)

BSA stanowi około 10% w stosunku do białek serum mleka krowiego. Białko to okazuje się identyczne, do tego, zawartego we krwi wołowej. BSA ma ciężar molekularny 66 267 Da. Zawiera 17 wewnątrzcząsteczkowych mostków dwusiarczkowych rozmieszczonych, w krótkich odstępach, i jedną grupę tiolową dzięki czemu ma dość elastyczną strukturę. Drugorzędowa struktura tego białka globularnego zawiera 55% formy α -helix, 16% β -harmonijki i 25% postaci nieuporządkowanej [15, 21].

kazeina

Kazeina to najważniejsze białko mleka stanowiące jego 24-2,6%. Ze względu na obecność fosforu zalicza się ją do fosfoproteidów. Kazeina to białko niejednorodne złożone z kilku frakcji, główne to: α_{s1} kazeina (MW = 22-23,7·10³), β kazeina (MW ok. 24·10³), χ kazeina (MW ok. 19·10³), γ kazeina (MW = 20,5·10³). W stanie natywnym kazeina występuje w mleku w postaci miceli tworzących roztwór o charakterze koloidalnym.

immunoglobuliny

Frakcja immunoglobulin składa się z mieszaniny dużych glikoprotein o masach w zakresie od 150 000Da do 900 000Da. Wyodrębniono 5 klas Ig w IgA, IgD, IgE, IgM i IgG. Wszystkie klasy występują jako monomery lub polimery [15].

Możliwości analitycznej oceny denaturacji termicznej białek serwatkowych

Metody stosowane do oznaczania termicznej denaturacji białek serwatkowych

Trzeciorzędowa struktura białek globularnych przypisywana jest precyzyjnej, trzykierunkowej konfiguracji powstającej wskutek kompleksowania polipeptydowych łańcuchów. Podstawowe sekwencje aminokwasowe tworzą zwartą, globularną strukturę minimalizującą wolną energię konformacji. Układ ten stabilizowany jest przez wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe, siły „van der Waals”, siły elektrostatyczne i oddziaływania grup tiolowych. Zniszczenie tych stabilizujących sił powoduje, że struktura białka staje się nieuporządkowana.

Nową konformację i stopień jej nieuporządkowania nazywamy białkiem zdenaturowanym. Jeżeli wymienione zmiany wywołane są działaniem wysokiej temperatury to określa się je mianem denaturacji termicznej. Tanford [15] zdefiniował denaturację białek głównie jako zmianę natywnej struktury wysokorzędowej na niżej rzędową, bez niszczenia podstawowych wiązań kowalencyjnych w peptydach.

Denaturacja białek może być wywołana różnymi czynnikami: działaniem hydrolytycznym enzymów, ogrzewaniem, zamrażaniem, działaniem wysokim ciśnieniem, ekstremalnym pH, czynnikami chaotropowymi, działaniem związków chemicznych: mocznika, chlorku guanidyny, SDS, rozpuszczalnikami organicznymi jak etanol, aceton, merkaptoetanol, a w odniesieniu do metaloprotein związkami chelatującymi.

Denaturacja białek globularnych powoduje zmiany ich właściwości fizycznych, chemicznych i funkcjonalnych. W odniesieniu do białek mleka, głównie serwatkowych, termiczna denaturacja jest bardzo ważnym czynnikiem warunkującym ich wartość żywieniową, właściwości funkcjonalne i alergenne. Istotnym wydaje się określenie zależności pomiędzy stopniem denaturacji białek, a zmianą ich właściwości immunoreaktywnych [15] i zachowaniem właściwości żywieniowych i odżywczych.

Istnieje wiele sposobów charakterystyki zmian denaturacyjnych białek mleka. Poszukuje się metod szybkich, wszechstronnych i czułych umożliwiających na bieżąco kontrolowanie zmian denaturacyjnych mleka podczas technologicznej obróbki termicznej (towarzyszy ona wszystkim procesom technologicznym przemysłu mleczarskiego).

Poniżej przedstawiono kilka metod badania denaturacji białek:

Metoda różnicowej kalorymetrii scanningowej (Diferent Scanning Colorymetry-DSC)

Termiczne niszczenie struktury białek globularnych wymaga szybkiej „orientacji” energii termicznej potrzebnej do zerwania wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Wydzielone w ten sposób ciepło może być monitorowane techniką różnicowej kalorymetrii scanningowej (DSC) [8].

W metodzie tej próba natywnego białka i próba odniesienia stymulowane są w tym samym systemie cieplnym. Próba odniesienia może zawierać rozpuszczalnik bez białka, bądź identyczny roztwór białka wcześniej zdenaturowanego w tych samych warunkach.

Termogram DSC dla endotermicznego niszczenia struktury białek globularnych dostarcza nam danych o wielu zmiennych np. temperaturze denaturacji białek (T_d) i entalpii denaturacji (ΔH_d). Wartość T_d odczytywana jest przy maksimum piku, a wartość ΔH_d jest proporcjonalna do powierzchni pod pikiem. T_d jest miernikiem stabilności cieplnej białek podczas gdy ΔH_d jest zależne od drugorzędowej struktury białka, głównie z formą α -helix. Wielkość $\Delta T_{1/2}$ (szerokość piku mierzona w połowie jego wysokości) jest indeksem opisującym naturę przejścia ze stanu natywnego do stanu zdenaturowanego. Charakterystyka DSC może zmieniać się wraz ze zmianą szybkości ogrzewania, głównie wpływa to na zmianę wartości T_d . Jeżeli białko podlega bardzo szybkiemu ogrzewaniu to T_d może być wysokie. W celu otrzymania racjonalnego poziomu wartości T_d Ruegg i wsp. [14] zalecają pomiar T_d przy różnych prędkościach ogrzewania i ekstrapolację wyników taką, by otrzymać temperaturę denaturacji przy szybkości ogrzewania $^{\circ}/_{\min}$.

Metoda DSC pozwala na monitorowanie procesu denaturacji bezpośrednio w trybie ciągłym i z dużą czułością. Próby poddawane analizie są niewielkie (zaledwie kilka mg). Współczesne aparaty są na tyle doskonałe, że można badać wiele prób jednocześnie w porównywalnych warunkach. DSC znalazło zastosowanie do badania odwracalnej denaturacji różnych białek w tym również β -laktoglobuliny [8, 15].

Metoda pomiaru rozpuszczalności

Termiczne niszczenie struktury białek globularnych powoduje zanik wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań. Efekt ten prowadzi do zmniejszenia rozpuszczalności białek, co może być miernikiem zasięgu ich denaturacji [10, 11, 12].

Maksymalną czułość pomiaru rozpuszczalności białek osiąga się przy pomiarze w pH bliskiemu punktowi izoelektrycznemu, wówczas gdy odpychające siły elektrostatyczne pomiędzy białkami są minimalne. Przy pH oddalonym od tego punktu denaturacja nie zawsze prowadzi do zmniejszenia rozpuszczalności. Harwalkar [10] stwierdził, że białka serwatki wykazują wysoką rozpuszczalność podczas intensywnego ogrzewania (90°C, 30 min) w pH 2,5, ale łatwo wypadają przy pH 4,6. To spostrzeżenie stwarza możliwość dalszej interpretacji ilościowej i jakościowej zmian białek przy zastosowaniu metod elektroforezy SDS-PAGE [19], natywnej elektroforezy akrylamidowej lub chromatografii FPLC [3].

Zjawisko to legło u podstaw termicznego wydzielenia białek serwatkowych w nowych procesach technologicznych produkcji serków albuminowych, serwatkowych napojów fermentowanych czy wydzielenia białek serwatkowych metodą Centri-Whey.

Metody immunologiczne

Występowanie specyficznych oddziaływań pomiędzy antygenem (białkiem) i przeciwciałem wyprodukowanym przez żywy organizm w wyniku jego reakcji obronnej pomogło opracować szereg metod tzw. immunochemicznych, immunoenzymatycznych.

Główna zasada tych metod (szeroka grupa obejmująca m.in. RIA, EIA, ELISA) polega na immunologicznej reakcji antygeny z przeciwciałem. Stwarza to możliwość pośredniego ilościowego oznaczenia antygeny w próbie. W przypadku zdenaturowanych białek serwatki dotyczy to możliwości oznaczenia pozostałej ilości natywnej α -la i β -lg. W tej reakcji przeciwciała wyprodukowane specyficznie przeciwko α -la i β -lg będą się łączyć jedynie z niezmienionymi epitopami natywnych pozostałości tych białek [16, 18, 22]. Wykorzystanie do detekcji wysoce specyficznych przeciwciał monoklonalnych, układów biotynaawidynowych lub specyficznych związków fluorescencyjnych jako znaczników pozwala znacznie zwiększyć czułość (ok.10-ciokrotnie) i precyzyjność tej metody w stosunku do metody ELISA wykorzystującej znaczniki enzymatyczne.

Możliwa jest przy tym automatyzacja metody, dzięki czemu można analizować wiele prób w stosunkowo krótkim czasie przy zachowaniu jednakowych warunków i minimalizacji zużycia „szkła” laboratoryjnego i odczynników. Mankamentem metod immunochemicznych jest możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałem i innym białkiem aniżeli antygen.

Właściwości spektralne

Białka serwatkowe są optycznie aktywnymi cząstkami i posiadają dużą ilość asymetrycznych atomów węgla. Zmiany strukturalne (powstałe np. w wyniku denaturacji termicznej) białek pociągają za sobą zmiany ich optycznej aktywności, które mogą być monitorowane przez dyspersję skręcalności optycznej (optical rotatory dispersion-ORD) [2, 11] i dichroizm kołowy (circular dichroism-CD) [2, 27].

Zjawisko dichroizmu kołowego zachodzi wówczas gdy obie kołowo spolaryzowane składowe fali światła liniowo spolaryzowanego absorbowane są przez roztwór w różnym stopniu. Miarą tego zjawiska może być różnica współczynników ekstynkcji światła kołowo spolaryzowanego w lewo i w prawo ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$) [25]. Dichroizm kołowy może być przedstawiony jako eliptyczność molarna θ zależna od długości fali λ , wyrażona wzorem:

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{[\alpha]_{\lambda} M}{100 \cdot l \cdot c} \quad \text{gdzie}$$

M - ciężar molekularny [g]
 l - droga optyczna [dm]
 c - stężenie roztworu [g/cm³]
 $[\alpha]_{\lambda}$ - skręcalność właściwa

Dyspersja skręcalności optycznej (ORD) to zależność skręcalności optycznej od długości fali światła spolaryzowanego. Krzywą ORD można uzyskać przez pomiar skręcalności właściwej $[\alpha]_{\lambda}^r$ w funkcji długości fali λ , co wyraża się wzorem

$$[\alpha]_{\lambda}^r = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad \text{gdzie}$$

c - stężenie roztworu [g/cm³]
 l - droga optyczna [dm]
 α - obserwowany kąt skręcenia

Pomiary ORD i CD przeprowadza się przy użyciu spektropolarymetrów. Analiza przebiegu krzywych dyspersyjnych w szerokim przedziale długości fal pozwala określić konformację związków optycznie czynnych jak steroidy, polipeptydy, proteiny i in.

Do pomiaru zmian denaturacyjnych białek często wykorzystuje się zdolność absorpcji światła UV (293nm) przez reszty aminokwasów aromatycznych tryptofanu [17, 24].

Krystalografia rentgenowska

Technika krystalografii rentgenowskiej wykorzystuje zjawisko dyfrakcji światła czyli ugięcia światła (odchylenia prostoliniowego biegu wiązki świetlnej) przechodzącego przez szczelinę o szerokości rzędu długości fali. Ugięcie to bada się na siatkach dyfrakcyjnych. W przypadku promieni rentgenowskich rolę siatek spełniają kryształy, w których odległości między płaszczyznami sieciowymi są rzędu długości fali promieni X [7].

Dokonując szeregu pomiarów i wyliczeń matematycznych można identyfikować pierwiastki, wyznaczać odległości między płaszczyznami sieciowymi co ma ogromne znaczenie w badaniach strukturalnych związków chemicznych [7].

Metoda dyfrakcji promieni rentgenowskich służy przede wszystkim do identyfikacji substancji krystalicznych. Umożliwia ona określenie składu mieszanin kilku substancji lub składu fazowego związków tego samego pierwiastka. Oprócz tego jest powszechnie stosowana do badania struktury substancji krystalicznych. Obraz dyfrakcyjny zależy od struktury kryształu, ponieważ kształt i rozmiar komórki elementarnej określa położenie linii dyfrakcyjnych, a rozmieszczenie atomów w obrębie komórki elementarnej określa względne natężenie linii. Poza tym metody dyfrakcyjne służą np. do badania przemian fazowych i uporządkowania struktury [7, 29].

Zmiany denaturacyjne α -la mleka krowiego

Labilność struktur konformacyjnych białek mleka pod wpływem wielu procesów, czy czynników jest podstawą szeregu oznaczeń mających na celu zbadanie zmian właściwości fizykochemicznych i odżywczych tych białek. Różnorodność dostępnych technik analitycznych pozwala zbadać różne parametry białek mleka poddawanych procesowi denaturacji.

Na podstawie dotychczasowych badań okazuje się, że α -la jest po β -laktoglobulinie jednym z wrażliwszych termicznie białek mleka [15, 24]. W pH 6,7 denaturuje ona już w temperaturze 65°C. Pomimo dużej skłonności do denaturacji cieplnej α -la okazuje się być odporna na koagulację cieplną. Denaturacja α -la podczas ogrzewania w zakresie temperatur od 20 do 110°C jest w 80–90% odwracalna - co tłumaczy pozorną stabilność α -la przy pomiarze denaturacji metodą pomiaru zmiany rozpuszczalności. Stosunkowo łatwa renaturacja α -la powodowana jest najprawdopodobniej małym rozmiarem tego białka (tylko 123 reszty aminokwasowe) i obecnością czterech wiązań dwusiarczkowych, które ograniczają ilość stanów konformacyjnych występujących w α -la. Białko to jest dużo łatwiej denaturowane w kwaśnym pH co wiąże się z dysocjacją i resocjacją zawartego w nim wapnia. Przy pH 7,5 α -la wykazuje termiczną tranzycję w temperaturze 58°C co jest wykrywalne metodą dichroizmu kołowego, natomiast przy pH 7,5, w obecności 1mM EDTA (czynnik kompleksujący jony wapnia) molekuly denaturują już w temperaturze 32°C [14]. Wiele badań wykazało, że wiązanie jonów Ca^{+2} stabilizuje strukturę α -la, redukuje hydrofobowość, mobilność elektroforetyczną i aktywność α -la podobną do lizozymu oraz podatność na działanie proteinyazy [15, 24]. Ogrzewanie α -la z nadwyżką Ca^{+2} (9mM powoduje wzrost T_m . (temperatura, w której 50% α -la jest w postaci rozfałdowanej) z $34,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ (dla apo α -la) do $47 \pm 2,6^\circ\text{C}$ [24]. Powyższy fakt świadczy o ważnej roli jaką odgrywają jony metali w stabilności termicznej α -la. (podobną zależność stwierdzono dla jonów Mg^{+2} i Mn^{+2} w pierwszorzędowych strukturach, i Zn^{+2} , Al^{+2} , Co^{+2} w strukturach drugorzędowych [5, 26]).

Odwracalność denaturacji α -la maleje ze wzrostem temperatury. Wydłużanie czasu ogrzewania w wysokich temperaturach powoduje nieodwracalność tego procesu i zwiększenie trwałej agregacji cząsteczek [6]. Wiele oligomerów związanych wiązaniami dwusiarczkowymi jest formowanych w miarę wzrostu czasu gotowania, proporcjonalnie rośnie również ich wielkość.

Badania Lyster wykazują, że denaturacja cieplna α -la jest procesem pierwszorzędowym, w wielu przypadkach dwuetapowym [20].

Obróbka cieplna towarzyszy większości procesów w przemyśle mleczarskim. Parametry poszczególnych procesów są zróżnicowane (Tab. 2).

Tabela 2

Parametry procesów termicznych w przemyśle mleczarskim [15].
Parameters of thermal processes in dairy industry [15].

Rodzaj procesu Kind of process	Temperatura/czas Temperature/time
Termizacja	65°C/30s
pasteryzacja w niskiej temperaturze	72°C/15s
pasteryzacja w wysokiej temperaturze	90°C/5min
Sterylizacja	110°C/5-10s
Ultrapasteryzacja	120°C/2-4s
UHT	140°C/3-8s

W Polsce stosuje się parametry zgodne z „Instrukcjami Technologicznymi do Produkcji Artykułów Mleczarskich”(Wyd.II, W-wa 1993): pasteryzacja 75°C/5s, sterylizacja 135°C/1s.

Powyższe warunki w połączeniu z warunkami środowiskowymi układu, w którym są stosowane (np. obecność kazeiny, stężenie soli) będą w różnym stopniu wpływały na jakość produktu finalnego.

Wzrost temperatury i czasu jej działania na mleko powoduje wzrost ilości zdenaturowanych białek serwatki. Prowadzi to jednocześnie do wzmożonej kompleksacji części zdenaturowanych białek z micellami kazeinowymi (ma to szczególne znaczenie przy produkcji niektórych gatunków serwitów, jogurtów i mleka zagęszczonego). Ma to również wpływ na zmiany właściwości fizycznych mleka (np. lekki wzrost lepkości, pogorszenie właściwości żelujących) [8].

Inny efekt na białka wywołuje obróbka cieplna surowej serwatki. W tym układzie duży wpływ na stan białek serwatkowych ma pH. Przy pH bliskim 7,0 zwiększa się mętność serwatki co jest spowodowane przez białka serwatkowe, nie ma to jednak dużego wpływu na ich właściwości sedymentacyjne [15, 21].

Oprócz procesów termicznych również inne procesy jednostkowe, szeroko stosowane w skali przemysłowej, powodują podobne zmiany w białkach produktów spożywczych. Do najważniejszych procesów, których wpływ wydaje się najistotniejszy zaliczyć można homogenizację (zabieg mechaniczno-termiczny), destabilizację, hydrolizę enzymatyczną, zmrażanie, stosowanie ultradźwięków, mikrofal, procesy membranowe i coraz częściej ostatnio stosowane wysokie ciśnienia [13, 23]. Szeroko bada się również modyfikacje chemiczne białek (np.sukcynylacja, acetylacja) i ich wpływ na chemiczne i immunoreaktywne właściwości produktów tych reakcji [29].

Celem określenia wpływu procesów technologicznych w obróbce termicznej białek, nieodzowne jest szybkie i dokładne określenie poziomu zachodzących zmian denaturacyjnych. Nieodzowne do tego wydaje się zastosowanie odpowiednich technik analitycznych. W świetle przedstawionej literatury duże znaczenie przypisać należy szybkim i łatwym w wykonaniu technikom spektrofotometrycznym, i wysoce specyficzne technikom immunoenzymatycznym. Dzięki zastosowaniu tych metod możemy uzyskać szeroki obraz przemian białek zachodzących podczas procesu denaturacji termicznej.

LITERATURA

- [1] Adams S.L., Barnett D., Walsh B.J., Pearce R.J., Hill D.J., Howden M.E.H.: Human IgE-binding synthetic peptides of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin. In vitro cross-reactivity of the allergens, *Immunology and Cell Biology*, **69**, 1991, 191.
- [2] Ananthanarayanan U.S., Ahmad F., Bigelow C.C.: The denaturation of β -lactoglobulin, *Biochem. Biophys. Acta*, **492**, 1977, 194.
- [3] Andrews A.T., Taylor M.D., Owen A.J.: Rapid Analysis of bovine milk proteins by Fast Protein Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, **348**, 1985, 177.
- [4] Bernal V., Jelen P.: Effect of calcium binding on thermal denaturation of α -lactalbumin, *J. Dairy Sci.*, **67**, 1984, 2452.
- [5] Brew K., Grobler J.A.: α -Lactalbumin, in *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. I, Fox P.F., Ed., Elsevier Applied Science, New York, 1992, 191.
- [6] Chaplin L.C., Lyster R.L.J.: Irreversible heat denaturation of bovine α -lactalbumin, *J. Dairy Res.*, **53**, 1986, 249.
- [7] Cygański A.: *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, WNT, Warszawa, 1993.
- [8] De Witt J.N., Swinkels P.A.M.: A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin. Thermal behaviour at temperatures up to 100°C, *Biochem. Biophys. Acta*, **624**, 1980, 40.
- [9] Elfagm A.A., Wheelock J.V.: Effect of heat on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in bovine milk, *J. Dairy Res.*, **44**, 1977, 376.
- [10] Harwalkar V.R.: Comparison of physico-chemical properties of different thermally denatured whey proteins, *Milchwissenschaft*, **34**, 1979, 419.
- [11] Harwalkar V.R.: Measurement of thermal denaturation of β -lactoglobulin at pH 2,5, *J. Dairy Sci.*, **63**, 1980, 1043.
- [12] Hiller R.M.: The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Dairy Res.*, **43**, 1976, 259.
- [13] Hinrichs J., Rademacher B., Kessler H.G.: Reaction kinetics of pressure-induced denaturation of whey proteins, *Milchwissenschaft*, 1996, 51, 9, 504.
- [14] Hiraoka Y., Segawa T., Kuwajima K., Sugai S., Murai N.: α -lactalbumin: a calcium metalloprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1980, 1098.
- [15] Jelen P., Rattray W.: Thermal denaturation of whey proteins, in *heat-induced changes in milk*, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1995, 66.
- [16] Kaminogawa S. et al: Monoclonal antibodies as probes for monitoring the denaturation process of bovine β -lactoglobulin, *Biochem. Biophys. Acta*, **998**, 1989, 50.

- [17] Kella N.K.D., Kinsella J.E.: Enhanced thermodynamic stability of β -lactoglobulin at low pH. A possible mechanism, *J. Biochem.*, **255**, 1988, 113.
- [18] Kilshaw P.J., Heppel L.M.J., Ford J.E.: Effect of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties, *Archives of Disease in Childhood*, **57**, 1982, 842.
- [19] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227 (15)**, 1970, 680.
- [20] Lyster R.L.J.: The denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk, *J. Dairy Res.*, **37**, 1970, 233.
- [21] Morr C.V., Ha E.Y.W.: Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33 (6)**, 1993, 431.
- [22] Morris B.A., Clifford M.N.: *Immunoassays in Food Analysis*, Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1985.
- [23] Nakamura T., Sado H., Syukunobe Y.: Production of low antigenic whey protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis and denaturation with high pressure, *Milchwissenschaft*, **48**, 3, 1993, 141.
- [24] Owusu Apenten R.K.: A three-state denaturation of bovine α -lactalbumin, *Food Chem.*, **52**, 1995, 131.
- [25] Pigoń K., Ruziewicz Z.: *Chemia Fizyczna*, PWN, W-wa, 1986.
- [26] Relkin P.: Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin. A thermodynamic approach, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1966, 36, 6, 565.
- [27] Sawyer W.H., Norton R.S., Nichol L.W., McKenzie G.H.: Thermodenaturation of bovine β -lactoglobulin. Kinetics and the introduction of β -structure, *Biochem. Biophys. Acta*, **243**, 1971, 19.
- [28] Schmidt D.G., Meijer R.J.G.M., Slangen C.J., Van Berestein E.C.: Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates, *Clinical and Experimental Allergy*, **25**, 1995, 1007.
- [29] Stryer L.: *Biochemia*, PWN, Warszawa, 1997.
- [30] Wróblewska B.: *Studia nad eliminacją alergennych właściwości białek serwatkowych mleka w wybranych procesach technologicznych i biotechnologicznych*, praca doktorska, Olsztyn, 1996.
- [31] Wszolek M.: Wartość odżywcza, właściwości fizykochemiczne i biologiczne składników mleka koziego, *Nowa Medycyna*, **9**, IV, 1997, 41-49.

POSSIBILITIES OF MONITORING THE DENATURATION CHANGES OF α -LA IN COW'S MILK

S u m m a r y

Whey proteins: α -la, β -lg, BSA and immunoglobulins due to their complex secondary and tertiary structures undergo denaturation caused by either chemical or physical factors (temperature, high pressure). Thermal processes – commonly employed in the dairy factory – cause denaturation and change physical, chemical and nutritional properties of whey proteins.

This paper reviews different techniques used for monitoring the protein changes important regarding research and nutritional aspects. ❖