

## Reološka i termofizička svojstva modelnih sustava karagenana i $\beta$ -laktoglobulina tretiranih visokim hidrostatskim tlakom

Zoran Herceg, Greta Krešić, Marija Bačić, Edita Juraga

Izvorni znanstveni rad – Original scientific paper

UDK: 637.134

### **Sažetak**

*Svrha ovog rada je ispitati utjecaj tretiranja visokim hidrostatskim tlakom na reološka i termofizička svojstva modelnih sustava  $\beta$ -laktoglobulina i karagenana. Suspenzije  $\beta$ -laktoglobulina tretirane su visokim hidrostatskim tlakom od 300 do 600 MPa. Vrijeme tretiranja bilo je 5 i 10 minuta.*

*Mjerenja reoloških svojstava modelnih sustava karagenana i  $\beta$ -laktoglobulina provedena su rotacionim reometrom, Rheometric Scientific RM-180 (Rheometric Scientific, Inc., Piscataway, USA), na temperaturi od 20 °C. Reološki parametri određeni su upotrebom Ostwald de Waele-ovog zakona. Rezultati ispitivanja pokazuju da su svi ispitivani sustavi imali ne-newtonski, pseudoplastični karakter, te da uzorci tretirani visokim hidrostatskim tlakom imaju promijenjene reološke značajke uslijed djelomične denaturacije proteina proporcionalne primijenjenom tlaku i vremenu tretiranja.*

*Temperature faznih promjena određene su metodom diferencijalne termičke analize (DTA). Utvrđeno je da visoki hidrostatski tlak značajno snižava temperaturu zamrzavanja i odmrzavanja modelnih sustava  $\beta$ -laktoglobulina, te da karagenan posjeduje određena krioprotektorska svojstva.*

*Ključne riječi: visoki hidrostatski tlak,  $\beta$ -laktoglobulin, reološka svojstva, termofizička svojstva, karagenan*

### **Uvod**

U posljednjih petnaest godina potrošači zahtijevaju da proizvedena hrana ima što prirodniji okus, boju i teksturu, te da rok trajanja omogućuje razuman period skladištenja kod kuće prije konzumiranja. Tako definirane zahtjeve koji su postavljeni proizvođačima mogu zadovoljiti namirnice proizvedene metodama minimalnog procesiranja. Kao metoda koja pokazuje najveći potencijal, prepoznata je metoda upotrebe visokog hidrostatskog tlaka. Učinak visokog hidrostatskog tlaka na hranu očituje se kroz uništenje mikroorganizama, te promjenu enzimske aktivnosti. Međutim, visoki tlak može uzrokovati i promjene funkcionalnih, reoloških, te termofizičkih svojstava hrane. Za sada je poznato da visoki tlak utječe samo na nekovalentne

kemijske veze (ionske, vodikove, hidrofobne), ostavljajući kovalentne veze netaknute što omogućuje uništenje mikrobiološke aktivnosti bez značajnijeg utjecaja na sastojke hrane odgovorne za okus, miris i teksturu (Taucher, 1995., De Wit, 1998.).

Osnovne proteinske frakcije koje sačinjavaju proteine sirutke su  $\beta$ -laktoglobulin (60%),  $\alpha$ -laktalbumin (22%), goveđi serum albumin (5,5%) i imunoglobulini (9,1%) (Kinsella i Whitehead, 1989.).

$\beta$ -laktoglobulin je globularan, anfiksilan protein koji je zamotan tako, da je osam antiparalelnih  $\beta$ -nabranih ploča formirano oko centralne šupljine, kaliksa (Damodaran, 1996a, 1996b, 1997.). Slijed amino-kiselina kod  $\beta$ -laktoglobulina sastoji se od 162 aminokiselinskih ostataka, molekularne mase 18 300 g/mol, te je pI = 5,1 (Tanford i sur., 1959.; Qin i sur., 1998.). Od velikog značaja u ovom proteinu je pet Cys/2 ostataka, koji uključuju dvije intermolekularne disulfidne veze: između ostataka 66 i 160 te 106 i 119 ili 121, i jednu slobodnu SH grupu na ostatku 119 ili 121 (Godovac-Zimmermann i Braunitzdzer, 1987., Pittia i sur., 1998.). Četiri disulfidne veze po  $\beta$ -Lg dimeru stupaju u reakciju formirajući intermolekularne veze koje odražavaju strukturni integritet polimera i snižavanjem entropije povećavaju stabilnost proteina.  $\beta$ -laktoglobulin u vodenoj otopini tvori stabilne globule, no tretiranje visokim hidrostatskim tlakom može utjecati na konformaciju proteina i voditi do denaturacije proteina, agregacije ili želiranja, ovisno o proteinskom sistemu, primijenjenom tlaku i trajanju tretmana tlakom, što u konačnici dovodi do promjena funkcionalnih, reoloških i termofizičkih svojstva proteina hrane. Konformacijske promjene proteina dovode do promjena hidratacijskih svojstva koja ovise o reakcijama protein – voda, te do promjena svojstva koja ovise o protein – protein interakcijama, kao i do promjena površinskih svojstava.

Hidrokoloidi su hidrofilni biopolimeri velike molekularne mase koji se u prehrambenoj industriji najčešće upotrebljavaju kao stabilizatori, te kao funkcionalni dodaci (Dickinson, 2003.). Funkcionalnost pojedinih biopolimera pod utjecajem je međudjelovanja s drugim komponentama hrane: proteinima, polisaharidima, lipidima kao i pod utjecajem tehnološkog procesa (tretiranja visokim hidrostatskim tlakom). Priroda i jakost interakcija protein hidrokoloid u otopini i na granici faza značajno utječe na stabilizirajuća svojstva disperznih sustava (Dickinson, 1993.). Trojni polimerni sustav (otapalo, protein i hidrokoloid) predstavljaju složeni sustav, budući da svaki

ima različite monomerne jedinice u različitom slijedu i često polidisperzne. Miješanje unutar trojnog polidisperznog sustava je ponajprije kontrolirano entalpijom, tj. određeno je relativnom snagom interakcija između polimera te između polimera i otapala, uz dodatnu entropiju oslobađanja vezane vode (Syrbe i sur., 1998.). U skladu s navedenim razlikujemo tri osnovna stanja ravnoteže trojnog polimernog sustava: inkompatibilnost, kompleksna koacervacija i mješivost.

Stoga je svrha ovog rada ispitati utjecaj konformacijskih promjena  $\beta$ -laktoglobulina nastalih pod djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka na trojni polidisperzni sustav koji čine otapalo-voda,  $\beta$ -laktoglobulin, te karagenan, na reološka i termofizička svojstva istih.

### ***Materijal i metode rada***

U ovom radu ispitivanja su provedena na 10%-tnim modelnim otopinama pripremljenim s  $\beta$ -laktoglobulinom prethodno tretiranim visokim hidrostatskim tlakom kojemu je dodan hidrokolid karagenan.

Pri pripremi modelnih otopina upotrijebljeni su sljedeći sastojci:

- $\beta$ -LAKTOGLOBULIN (Komercijalni naziv - BioPure- $\beta$ -laktoglobulin), Davisco Foods International, Inc. Kemijski sastav deklarirao je proizvođač:  $\beta$ -laktoglobulin (88,55 %), ostali proteini (4,65 %), voda (4,3 %), masti (0,2 %), pepeo (2,3 %)
- KARAGENAN (Komercijalni naziv – AQUAGEL GU 805), Werba Chemie, Haudelgellsahaft m.b.h Wien

### ***Tretiranje suspenzija $\beta$ -laktoglobulina visokim hidrostatskim tlakom***

Neposredno prije tretiranja visokim hidrostatskim tlakom pripremljene su 10 % (g s.t. /g suspenzije) suspenzije  $\beta$ -laktoglobulina otapanjem odgovarajuće količine proteina u destiliranoj vodi. Pripremljene suspenzije su zatim dobro homogenizirane miješanjem na magnetskoj miješalici. Tretiranje visokim hidrostatskim tlakom provedeno je u laboratorijskom uređaju LAB 50 (SIG, Simonazzi, Parma, Italija).

Prethodno pripremljene suspenzije  $\beta$ -laktoglobulina pune se u fleksibilnu PET ambalažu, promjera 0,45 m, visine 1,35 m, s promjerom čepa 0,30 m. Ovako pripremljene suspenzije tretirane su visokim tlakom u rasponu od 300 do  $600 \cdot 10^6$  Pa, uz vrijeme zadržavanja 5 i 10 minuta. Svi uzorci su tretirani

pri istim uvjetima uzimajući u obzir adijabatsko zagrijavanje koje se javlja u fazi kompresije. Tretiranja su provedena na temperaturi od 40 °C.

Nakon tretiranja visokim tlakom, uzorci su zamrznuti na -40°C, te potom liofilizirani. Proteinski prah je zatim hermetički zatvoren u polietilenske vrećice i čuvan do početka analiza u eksikatoru, na sobnoj temperaturi.

### **Priprema modelnih suspenzija $\beta$ -laktoglobulina tretiranih visokim tlakom sa i bez dodatka hidrokoloida**

Modelne suspenzije  $\beta$ -laktoglobulina bez dodatka hidrokoloida pripremljene su otapanjem određene količine liofiliziranih proteina u destiliranoj vodi, te je uzorak homogeniziran miješanjem na magnetskoj miješalici (Tablica 1).

Modelne suspenzije  $\beta$ -laktoglobulina s dodatkom hidrokoloida pripremljene su otapanjem određene količine liofiliziranih proteina u destiliranoj vodi, a nakon toga je dodana odgovarajuća količina karagenana. Tako pripremljene suspenzije homogenizirane su miješanjem na magnetskoj miješalici. Ukupni udio suhe tvari u svakoj modelnoj suspenziji iznosio je 10 % (g s.t. / g suspenzije) (Tablica 1).

*Tablica 1: Sastav ispitivanih modelnih sustava*

*Table 1: Composition of investigated model systems*

Modelne otopine Model solutions	Način tretiranja Way of treatment		$\beta$ -laktoglobulin $\beta$ -lactoglobulin	Karagenan Carragenan	Voda Water
	Vrijeme Time (min.)	Tlak Pressure (MPa)	(g)	(g)	(g)
A	Netretirani / Untreated		10,4	-	89,6
A1	Netretirani / Untreated		9,9	0,5	89,6
A2	5 minuta 5 minutes	300	9,9	0,5	89,6
A3		400	9,9	0,5	89,6
A4		500	9,9	0,5	89,6
A5		600	9,9	0,5	89,6
A6	10 minuta 10 minutes	300	9,9	0,5	89,6
A7		400	9,9	0,5	89,6
A8		500	9,9	0,5	89,6
A9		600	9,9	0,5	89,6

### **Skenirajuća mikroskopija**

Neposredno prije pripreme modelnih sustava izvršena je skenirajuća mikroskopija  $\beta$ -laktoglobulina u prahu, prije i nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom. Skenirajuća mikroskopija provedena je pobuđivanjem

elektrona na površini uzorka, pri čemu odgovarajući detektor hvata pobuđene elektrone, te na taj način dobivamo sliku uzorka. Da bi na ovakav način mogli pobuditi elektrone, potrebno je pozlatiti uzorak radi pospješivanja vodljivosti. Priprema uzorka se vrši u uređaju Edwards S-150, (Sputter coater). Sva snimanja obavljena su na skenirajućem mikroskopu JOEL-JSM-5800.

### **Određivanje reoloških svojstava**

Reološka svojstva 10%-tnih modelnih sustava  $\beta$ -laktoglobulina određena su rotacionim reometrom RM-180 (Rheometric Scientific, Inc., Piscataway, USA) na temperaturi od 25°C, neposredno nakon pripreme uzoraka. Za mjerenje je upotrijebljeno vreteno broj 3 ( $\varnothing = 14$  mm;  $l = 21$  mm) s pripadajućom posudom za uzorak broj 3 ( $\varnothing = 15,18$  mm). Viskoznost 10%-tnih modelnih sustava određena je tako da je brzina smicanja postepeno povećavana od  $0 \text{ s}^{-1}$  do maksimalne brzine od  $1290 \text{ s}^{-1}$ , a potom je smanjivana do  $0 \text{ s}^{-1}$ . Prividna viskoznost izračunata je primjenom Newtonovog zakona /1/ kod maksimalne brzine smicanja od  $1290 \text{ s}^{-1}$ .

$$\tau = \mu \cdot \gamma \quad /1/$$

gdje je:  $\tau$  = napon smicanja (Pa)  
 $\mu$  = viskozitet (Pas)  
 $\gamma$  = brzina smicanja ( $\text{s}^{-1}$ )

Na osnovi izmjerenih podataka (brzina i napon smicanja) izračunati su reološki parametri (koeficijent konzistencije i indeks tečenja) primjenom metode linearne regresije, pri čemu je upotrijebljen Ostwald de Waele-ov zakon /2/.

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad /2/$$

gdje je:  $\tau$  = napon smicanja (Pa)  
 $k$  = koeficijent konzistencije ( $\text{Pas}^n$ )  
 $\gamma$  = brzina smicanja ( $\text{s}^{-1}$ )  
 $n$  = indeks tečenja

### **Određivanje termofizičkih svojstava**

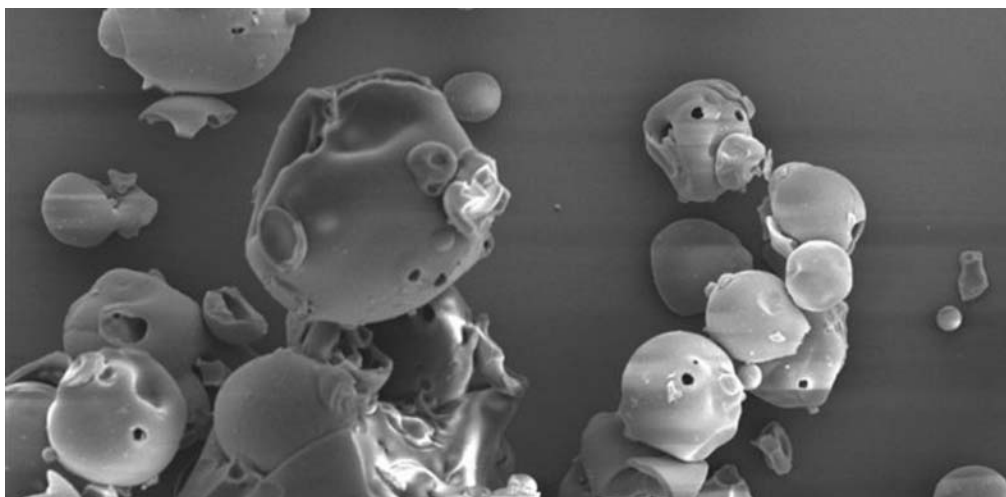
Temperature faznih promjena (zamrzavanje, odmrzavanje) određene su upotrebom diferencijalne termičke analize (DTA). Za njihovo određivanje

upotrijebljen je laboratorijski uređaj za DTA «MP  $\Delta T$ -Pt-L» (Elektron d.d., Stubičke Toplice) pri čemu je kontinuirano mjerena temperatura kao i temperaturna razlika između uzorka i referentnog materijala (kvarcni pijesak). Hlađenje je provedeno upotrebom etanola i tekućeg dušika (brzina hlađenja bila je 10°C/min) dok je odmrzavanje provedeno na sobnoj temperaturi (20 °C) s okolnim zrakom. Brzina odmrzavanja bila je 0,5 °C/min. Za obradu podataka korišten je software (STEP 7-Micro, STEP 7/WIN32), Siemens (Energy and Automatisation, Inc.). Povezanost mjernog uređaja s računalom omogućila je neposredno on-line praćenje procesa zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka s velikom osjetljivošću na mjerenja temperature (10 mK) i visokom frekvencijom uzorkovanja (10 mjerenja u sekundi). Kao rezultat mjerenja dobivene su krivulje smrzavanja i odmrzavanja. Početak DTA pika predstavlja početak fazne promjene (zamrzavanje, odnosno odmrzavanje).

Sva mjerenja provedena su tri puta, a njihova aritmetička sredina uzeta je kao konačni rezultat.

### *Rasprava*

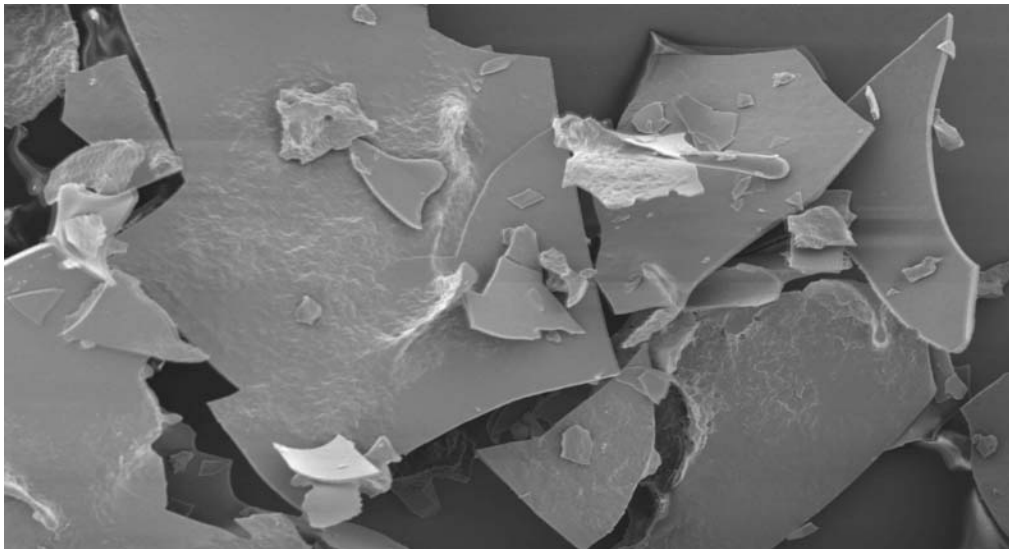
Tretiranje visokim hidrostatskim tlakom mijenja konformaciju molekule  $\beta$ -laktoglobulina, a posljedica su promjene reoloških i termofizičkih svojstva. Konformacijske promjene na molekulama proteina praćene su upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije (Slike 1, 2). Pri većim koncentracijama



*Slika 1: Veličina i oblik netretiranih globula  $\beta$ -laktoglobulina*

*Figure 1: Size and shape of untreated globules of  $\beta$ -lactoglobulin*

proteina (oko 10%) tijekom tretiranja visokim tlakom dolazi do intermolekularnih interakcija i ireverzibilnih agregacija (Wong i Heremens, 1988.) što u konačnici dovodi do denaturacije proteina koje mogu biti reverzibilne i ireverzibilne, ovisno o uvjetima tretiranja. Pod denaturacijom proteina podrazumijeva se svaka konformacijska promjena bilo da se radi o sekundarnoj, tercijarnoj ili kvaternoj strukturi proteina koja nije praćena puknućem kovalentnih veza uključenih u primarnu strukturu proteina (Messens i sur., 1997.). Konačna konformacija poslije denaturacije odgovara nasumičnoj klupki ili djelomično odmotanoj polipeptidnoj strukturi. Denaturacija pod djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka kompleksan je fenomen koji ovisi o strukturi proteina, intenzitetu primijenjenog tlaka, temperaturi, pH, ionskoj jakosti i sastavu otapala (Masson, 1992.; Krešić i sur., 2005.). Prijašnja istraživanja (Futenberger i sur. 1995., Tanaka i sur. 1996.) pokazala su da tretiranjem  $\beta$ -laktoglobulina tlakom od 450 MPa nastaju agregati velike molarne mase (dimer do heksamer) uslijed stvaranja intermolekularnih S-S veza. Kao potvrda navedenih pretpostavki poslužila nam je skenirajuća mikroskopija (slike 1, 2). Iz navedenih je slika vidljivo da



*Slika 2: Veličina i oblik globula  $\beta$ -laktoglobulina nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom*

*Figure 2: Size and shape of high hydrostatic pressure treated globules of  $\beta$ -lactoglobulin*

je kompaktna globularna struktura proteina djelomično razorena djelovanjem visokog tlaka, te je za očekivati da će kod ovakvih molekule  $\beta$ -laktoglobulina, u novonastaloj konformaciji, hidrofobne skupine - koje su prije bile skrivene unutar proteinske globule - sada biti izloženije, čime će im biti omogućeno lakše stupanje u reakcije tipa protein-otapalo ili protein-protein (Smith, 1994., Verheul i Roefs, 1998.). Navedene promjene u konačnici dovode do značajnih promjena reoloških i termofizičkih svojstava  $\beta$ -laktoglobulina.

Reološka svojstva ispitivanih suspenzija izražena su koeficijentom konzistencije i indeksom tečenja, te su adekvatno opisana Ostwald de Waeleovim zakonom budući da je koeficijent determinacije za navedene suspenzije bio izrazito visok (od 0,9762 do 0,9996) (Tablica 2).

*Tablica 2: Reološke karakteristike modelnih sustava pripremljenih  $\beta$ -laktoglobulinom, te dodatkom karagenana*

*Table 2: Rheological characteristics of model systems prepared with  $\beta$ -lactoglobulinom and carragenan addition*

Modelne otopine Model solutions	Prividna Viskoznost Apparent viscosity (mPa s)	Indeks tečenja Flow index (n)	Koeficijent konzistencije Consistency coefficient (mPa s) <sup>n</sup>	Koeficijent determinacije Determination Coefficient r <sup>2</sup>
A	7,0	1,6720	0,0730	0,9920
A1	7,0	1,5764	0,1270	0,9939
A2	8,0	1,7220	0,1503	0,9889
A3	10,0	1,5780	0,1737	0,9992
A4	9,0	1,5620	0,1820	0,9995
A5	11,0	1,5213	0,2293	0,9980
A6	10,0	1,5484	0,2100	0,9992
A7	10,0	1,4873	0,3085	0,9982
A8	14,0	1,4501	0,4374	0,9843
A9	15,0	1,3409	0,4451	0,9762

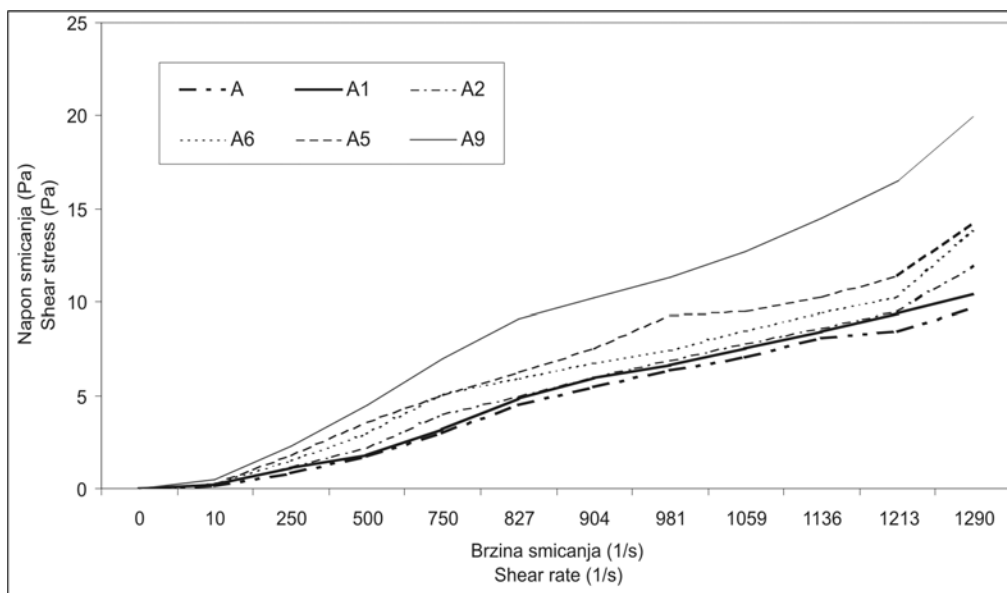
Na temelju oblika krivulja, te odnosa napona smicanja i brzine smicanja (slika 3) te rezultata određivanja reoloških parametara (tablica 2) utvrđeno je da svi ispitivani sustavi ulaze u kategoriju ne-newtonskih sustava (pokazuju pseudoplastična svojstva).

Tretiranje visokim hidrostatskim tlakom značajano je utjecalo na tip tečenja modelnih sustava, budući da je tip tečenja modelnih sustava pripremljenih netretiranim  $\beta$ -laktoglobulinom kao i tretiranim  $\beta$ -laktoglobulinom na nižim tlakovima (300 i 400 MPa) bio izrazito pseudoplastičan. No, povećanjem tlaka i vremena tretiranja, kao i dodatkom



karagenana, došlo je do značajnog smanjenja indeksa tečenja, te je time pseudoplastičan karakter modelnih sustava bio manje izražen (tablica 2).

Tretiranjem visokim hidrostatskim tlakom suspenzija  $\beta$ -laktoglobulina povećana je viskoznost što je direktna posljedica konformacijskih promjena proteinskih molekula (Kanno i sur., 1998.). Usljed promjena u terciarnoj strukturi proteinskih globula tijekom djelovanja visokog tlaka dolazi do djelomičnog odmotavanja proteinske uzvojnice te oslobađanja novih mjesta za vezanje vode, čime se u značajnoj mjeri povećava sposobnost vezanja vode proteina, a samim time i viskoznost cijelog sustava (Mishra i sur., 2001.; Herceg i Lelas., 2005.). Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu, da povećanje primijenjenog tlaka i vremena tretiranja uzrokuje intenzivnije promjene u terciarnoj strukturi proteina, a samim time i veću viskoznost cijelog sustava (tablica 2, slika 3).



Slika 3: Odnos napona smicanja i brzine smicanja modelnih suspenzija pripremljenih sa  $\beta$ -laktoglobulinom i karagenanom

Figure 3: Shear rate and shear stress relationship of model systems prepared with  $\beta$ -lactoglobulin and carragenan

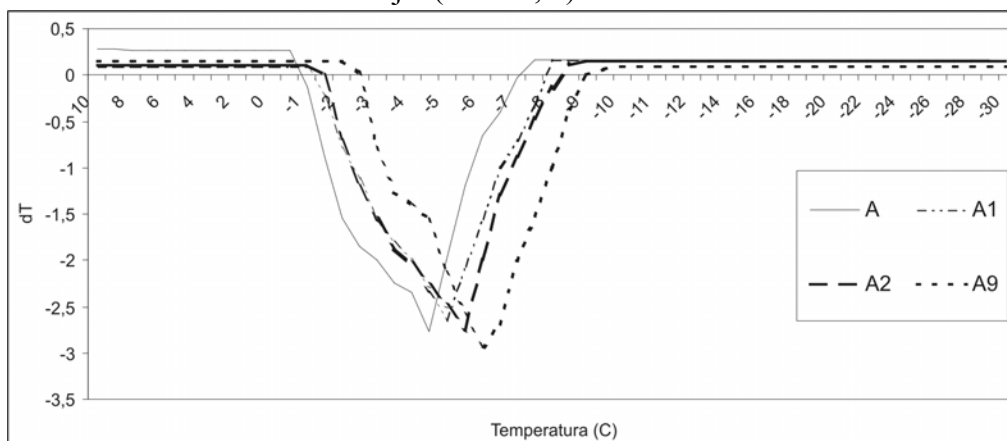
Također je uočeno, da dodatak karagenana značajno povećava viskoznost modelnih sustava (tablica 2). Međutim, na povećanje viskoznosti u većoj mjeri

utječe tretman visokim hidrostatskim tlakom nego dodatak karagenana (Tablica 2).

Temperature faznih promjena (zamrzavanje, odmrzavanje) određene su upotrebom diferencijalne termičke analize (DTA). Geometrija mjernih udubljenja uređaja za DTA osiguravala je jednodimenzionalni prijelaz topline u sustavu tijekom mjerenja, budući da omjer mase mjernog bloka i uzorka iznosi približno 750 : 1 što omogućava pretpostavku da latentna toplina kristalizacije ili taljenja leda ne utječe na raspodjelu temperature u mjernom bloku.

Primijenjena brzina sniženja temperature ( $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), te porasta temperature ( $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) omogućavala je kvazistacionarnost procesa smrzavanja odnosno odmrzavanja, te dobro definiranje i ponovljivost DTA-krivulja.

Kao rezultat mjerenja metodom diferencijalne termičke analize dobivene su karakteristične DTA-krivulje (Slike 4, 5).

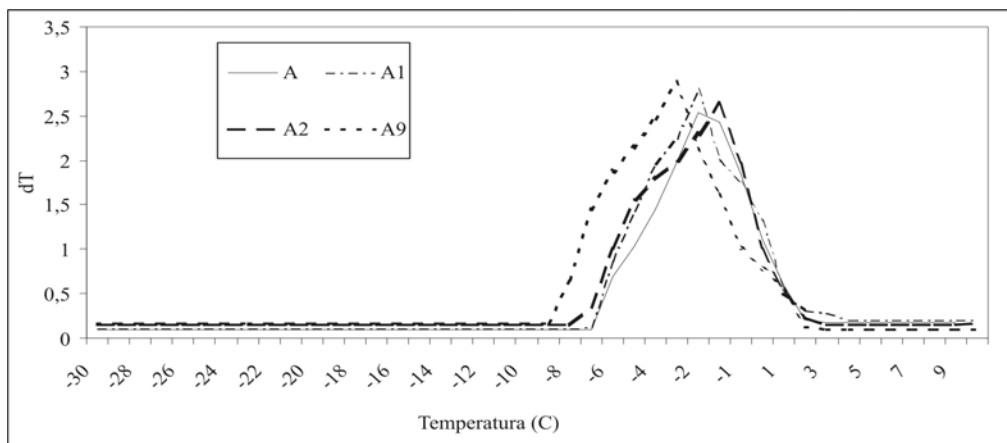


Slika 4: DTA krivulje zamrzavanja modelnih suspenzija betalaktoglobulina s dodatkom karagenana

Figure 4: DTA curves of freezing model suspension of betalactoglobulin with carragenan addition

Obradom rezultata dobivenih diferencijalnom termičkom analizom utvrđene su temperature zamrzavanja, odnosno odmrzavanja (početak vrha krivulje zamrzavanja i odmrzavanja) (Tablica 3).

Modelne suspenzije pripremljene  $\beta$ -laktoglobulinom tretiranim visokim hidrostatskim tlakom imale su nižu temperaturu zamrzavanja i odmrzavanja od modelnih suspenzija pripremljenih netretiranim  $\beta$ -laktoglobulinom (Tablica 3).



Slika 5: DTA krivulje odmrzavanja modelnih suspenzija betalaktoglobulina s dodatkom karagenana

Figure 5: DTA curves of thawing model suspension of betalactoglobulin with carragenan addition

Tablica 3: Temperature zamrzavanja i odmrzavanja suspenzija  $\beta$ -laktoglobulina s dodatkom karagena

Table 3: Freezing and thawing temperatures of  $\beta$ -lactoglobulina with carragenan addition

Uzorak Sample	Početak zamrzavanja Freezing temperature (°C)	Vrh zamrzavanja Peak of freezing curve (°C)	Početak odmrzavanja Thawing temperature (°C)	Vrh odmrzavanja Peak of thawing curve (°C)
A	-0,87	-4,73	-6,83	-1,63
A1	-1,03	-5,16	-6,96	-1,69
A2	-1,49	-5,52	-7,13	-1,84
A3	-1,72	-5,77	-7,24	-1,92
A4	-2,03	-5,83	-7,39	-1,98
A5	-2,13	-6,01	-7,66	-2,03
A6	-2,26	-6,10	-7,94	-2,15
A7	-2,29	-6,25	-8,52	-2,21
A8	-2,35	-6,22	-8,91	-2,27
A9	-2,41	-6,30	-8,87	-2,34

Ovakvo ponašanje proteina moguće je objasniti činjenicom da molekule  $\beta$ -laktoglobulina u vodenoj otopini tvore globule kod kojih je unutarnji dio

globule hidrofoban a vanjski dio izrazito hidrofilan, pri čemu karboksilne skupine (-COO<sup>-</sup>) elektrostatskim (Coulombo-vim) silama vežu dipolne molekule vode, pa se dio vode - uslijed promjene prostorne orijentacije aminokiselinskih ostataka - imobilizira u trodimenzionalnu strukturu gela (bubrenje) (Herceg i sur., 2004.). Posljedica navedenih pojava je povećanje entropije sustava i zahtijeva veću količinu latentne topline fazne promjene što rezultira pomakom točke smrzavanja prema nižim temperaturama kod modelnih sustava pripremljenih  $\beta$ -laktoglobulinom tretiranim visokim tlakom. Osim toga, proteini tretirani u otopini vežu na sebe veće količine vode, zbog čega nastaju veće količine malih kristala leda tijekom zamrzavanja. Tijekom procesa odmrzavanja mali kristali leda su na nižim temperaturama topljiviji od velikih kristala, pa na nižim temperaturama zahtijevaju veću količinu latentne topline taljenja što uzrokuje i niže temperature odmrzavanja.

Rezultati dobiveni nakon provedene diferencijalne termičke analize potvrđuju dosadašnja istraživanja da karagenan pokazuje određena krioprotektorska svojstva (Slika 4) (Boye, 1997.).

Ovakav učinak karagenana moguće je objasniti sposobnošću aktivnih grupa da izgrađuju vodikove mostove s dipolnim molekulama vode kao i disociranim polarnim grupama  $\beta$ -laktoglobulina, pa na taj način snižavaju temperature zamrzavanja ispitivanih sustava. Navedeni mehanizam, odnosno interakcije karagenana i proteina bili su izraženiji u suspenzijama pripremljenim  $\beta$ -laktoglobulinom tretiranim pri višim vrijednostima tlaka (500-600 MPa), te duljim vremenom tretiranja, što je direktna posljedica intenzivnijih konformacijskih promjena molekularne strukture  $\beta$ -laktoglobulina.

### ***Zaključci***

Tijekom tretiranja visokim hidrostatskim tlakom dolazi do konformacijskih promjena molekule  $\beta$ -laktoglobulina, te do ireverzibilne denaturacije iste.

Reološka svojstva modelnih sustava  $\beta$ -laktoglobulina pripremljenih dodatkom karagenana adekvatno su opisana Ostwald de Waele-ovim zakonom, te je na temelju reoloških parametara utvrđeno da svi ispitivani sustavi ulaze u kategoriju ne-newtonskih sustava koji pokazuju izrazito pseudoudoplastičan karakter.

Utvrđeno je, da uzorci tretirani visokim hidrostatskim tlakom imaju promijenjene reološke značajke koje se očituju u povećanoj viskoznosti, odnosno povećanom koeficijentu konzistencije.

Metodom diferencijalne termičke analize utvrđeno je da modelni sustavi pripremljeni  $\beta$ -laktoglobulinom tretiranim visokim hidrostatskim tlakom pokazuju pomak točke zamrzavanja i odmrzavanja prema nižim temperaturama, te da navedeni pomak progresivno prati porast tlaka i produljivanje vremena tretiranja.

Diferencijalna termička analiza potvrdila je da karagenan posjeduje određena krioprotektorska svojstva, odnosno da značajno snižava točku zamrzavanja modelnih sustava  $\beta$ -laktoglobulina.

## *RHEOLOGICAL AND THERMOPHYSICAL PROPERTIES OF CARRAGENAN AND $\beta$ -LACTOGLOBULIN MODEL SYSTEMS TREATED WITH HIGH HYDROSTATIC PRESSURE*

### *Summary*

*The aim of this paper is to examine the influence of high hydrostatic pressure treatment on the rheological and thermophysical properties of  $\beta$ -lactoglobulin and carragenan model systems. Suspensions of  $\beta$ -lactoglobulin were treated with a high hydrostatic pressure in a range of 300 to 600 MPa. Holding period was 5 and 10 minutes.*

*Measurements were performed using rotational viscosimeter Rheometric Scientific RM-180 at 20 °C. The rheological parameters were determined by the Ostwald de Waele law. The results of the investigation have shown that all investigated systems are non-Newtonian – pseudoplastic. All samples treated with high hydrostatic pressure have changed rheological characteristics. The extent of protein denaturation was proportional to the intensity of applied pressure and holding time.*

*The phase transition temperatures were determined by differential thermal analysis (DTA). High pressure treatment caused depression of freezing point and melting point, respectively. Carragenan acts as a cryoprotectant.*

*Key words: high hydrostatic pressure,  $\beta$ -lactoglobulin, rheological properties, thermophysical properties, carragenan*

### Literatura

- BOYE, J.I., ALLI, I., RAMASWAMY, H., RAGHAVAN, V.G.S. (1997.): Interactive effects of factor affecting gelation of whey proteins, *J. Food Sci.*, **62**, 57-65.
- DAMODARAN, S. (1996a) Amino acids, peptides and proteins. In: *Food Chemistry*, pp. 321-430. Fennema O R, ed. New York: Dekker.
- DAMODORAN, S. (1997.): Food proteins: an overview. In *Food Proteins and their Applications*; Damadoran, S., Paraf, A. Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1-24.
- DAMODORAN, S. (1996b): Amino acids, peptide and proteins, Marcel Dekker.Inc., New York, 15-21.
- DE WIT, J.N. (1998.): Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products, *Journal of Dairy Science*, **81**, 597-608.
- DICKINSON, E., (1993.): Protein-polysaccharide interaction in food colloids. U: *Food colloids and polymers: stability and mechanical properties*. (Dickinson, E, Walstra, P., ured.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 77-93.
- DICKINSON, E. (2003.): Hydrocolloids at the interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, **17**, 25-39.
- FUTENBERGER, S., DUMAY, E., CHEFTEL, J.C. (1995.): Pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin in pH 7.0 buffers, *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, **28**, 410-418.
- GODOVAC-ZIMMERMANN, J., BRAUNITZER, G. (1987.): Modern aspects of the primary structure and function of  $\beta$ -lactoglobulin. *Milchwissenschaft*, **42**, 294-297.
- HERCEG, Z., LELAS, V. (2005.): The influence of temperature and solid matter content on the viscosity of whey protein concentrates and skim milk powder before and after tribomechanical treatment, *Journal of Food Engineering*, **66**, 433-438.
- HERCEG, Z., LELAS, V., REŽEK, A. (2004.): Funkcionalna svojstva  $\alpha$ -lactalbumina i  $\beta$ -lactoglobulina, *Mljekarstvo*, **54**, 195-208.
- KANNO, C., MU, T-H., HAGIWARA, T., AMETANI, M., AZUMA, N. (1998.): Gel formation from industrial milk whey proteins under hydrostatic pressure: effect of hydrostatic pressure and protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 417-424.
- KINSELLA J.E. & WHITEHEAD D.M. (1989.): Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Solubility of Whey Proteins, *J. Dairy Sci.*, **67**, 2701-2710.
- KREŠIĆ, G., LELAS, V., HERCEG, Z., (2005.): Possibility of nutritional enrichment of whipped dairy products with whey proteins treated with high pressure, *Mljekarstvo*, **55**, 83-89.
- MASSON, P. (1992.): Pressure denaturation of proteins. U: *High pressure and biotechnology*, (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P., ured.), Colloques INSERM, John Libbey Eurotext Ltd.: Montrouge, Vol. 224, 89-99.
- MESSENS, W., VAN CAMP, J., HUYGEBART, A. (1997.): The use of high pressure to modify the functionality of food proteins, *Trends in Food Science & Technology*, **8**, 107-112.

- MISHRA, S., MANN, B., JOSHY, V.K. (2001.): Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin, *Food Hydrocolloids*, 15, 9-15.
- QIN, B.Y., BEWLEY, M.C., CREAMER, L.K., BAKER, H.M., BAKER, E.N., JAMESON, G.B. (1998.): Structural basis of the Tanford transition of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemistry*, 37, 14014-14023.
- PITTIA, P., WILDE, P.J., HUSBAND, F.A., CLARK, D.C. (1996.): Functional and structural properties of  $\beta$ -lactoglobulin as affected by high pressure treatment, *Journal of Food Science*, 61, 1123-1128.
- SMITH, D.M. (1994.): Protein interactions in gels, Protein-protein interactions, In: Thermal analysis of food, Elsevier Applied Sci. New York: 209-224.
- SYRBE, A., FERNANDES, P.B., DANNDNERBERG F., BAUER, W., KLOSTERMEYER, H. (1998.): Whey protein and polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its application. U: *Food macromolecules and colloids*, (Dickinson, E., Lorient, D., ured.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 238-339.
- TANFORD, C., BUNVILLE, L.G., NOZAKI, Y., (1959.): The reversible transformation of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 7.5, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4032-4036.
- TANAKA, N., TSURUI, Y., KOBAYASHI, I., KUNUGI, S. (1996.): Modification of the single unpaired sulfhydryl group of  $\beta$ -lactoglobulin under high pressure and the role of intermolecular S-S exchange in the pressure denaturation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 63-68.
- TAUCHER, B. (1995.): Pasteurization of food by hydrostatic high pressure, Chemical Aspects, Z: Lebensmi.-Unters. Forsch. 200, 3-13.
- VERHEUL, M., ROEFS, S.P.F.M. (1998.): Structure of whey protein gels, studies by permeability, scanning electron microscopy and rheology, *Food Hydrocolloids*, 12, 17-24.
- WONG, P.T.T., HEREMANS, K. (1988.): Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen deuterium exchange in chymotrypsinogen: a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta*, 956, 1-9.

**Adresa autora – Author's addresses:**

Dr. sc. Zoran Herceg, docent  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet,  
Dr. sc. Greta Krešić, viši asistent  
Fakultet za turistički i hotelski menadžment u Opatiji  
Marija Bačić, Kovinska 23, Dubrovnik  
Edita Juraga,  
Vindija d.d., Varaždin

**Prispjelo – Received:** 10. 01. 2006.

**Prihvaćeno – Accepted:** 24. 02. 2006.