

## **Tepelná denaturácia srvátkových proteínov ovčieho a kozieho mlieka**

MIROSLAV KOLOŠTA - JURAJ GAŠPERÍK - MAROŠ DRONČOVSKÝ

**SÚHRN.** Na základe denaturácie srvátkových proteínov je možné dokázať akému tepelnému namáhaniu bolo mlieko podrobené počas výrobného procesu. V závislosti od intenzity tepelného ošetrenia mlieka dochádza k rôznemu stupňu denaturácie srvátkových proteínov, ktorá ovplyvňuje výťažnosť výroby a výsledné vlastnosti mliečnych výrobkov. Tepelné ošetrenie ovčieho a kozieho mlieka sa na rozdiel od mlieka kravského prejavuje rozdielnym stupňom denaturácie srvátkových proteínov. Stanovením denaturácie srvátkových proteínov ovčieho a kozieho mlieka by mohli byť determinované podmienky tepelného ošetrenia týchto druhov mliek v závislosti od ich ďalšieho spracovania.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** srvátkové proteíny; denaturácia; teplota

Ovčie a kozie mlieko nepredstavujú v našich podmienkach z hľadiska množstva podstatný zdroj výživy. Predstavujú však určité výživové tradície a z nutričného hľadiska aj cennú potravinu. V podmienkach Slovenskej republiky existuje pre výrobu a spracovanie ovčieho a kozieho mlieka významný výrobný potenciál s možnosťou exportu mliečnych výrobkov z týchto druhov mliek na trhy krajín EÚ. Aj v krajinách EÚ sa v posledných rokoch produkcia ovčieho a kozieho mlieka a výrobkov z nich vyrobených, s ohľadom na nekvótovanú produkciu, neustále zvyšovala [1].

Z hľadiska zabezpečenia zdravotnej bezpečnosti výrobkov sa v mnohých prípadoch vyžaduje pri spracovaní ovčieho alebo kozieho mlieka ich tepelné ošetrenie. Pri zahreве mlieka v závislosti od času a teploty vznikajú rôzne reakcie, ktoré ovplyvňujú nutričnú hodnotu a zdravotnú bezpečnosť mliečnych výrobkov. Problematike tepelného ošetrenia mlieka sa v mliekarenskom výskume vo vyspelých krajinách venuje neustála pozornosť, ktorá

---

Ing. Miroslav KOLOŠTA, Ing. Maroš DRONČOVSKÝ, Výskumný ústav mliekarenský, Dlhá 95, P. O. box C 54, 010 01 Žilina.

Ing. Juraj GAŠPERÍK, CSc., Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava.

Korešpondujúci autor: Ing. Miroslav KOLOŠTA, e-mail: kolosta@vumza.sk

je prednostne zameraná na kravské mlieko. Rastúci ekonomický záujem o spracovanie ovčieho a kozie mlieka však je dôvodom aj postupného skúmania zmien vo vlastnostiach týchto druhov mliek vyvolaných ich tepelným ošetrovaním [2-5].

## Zloženie srvátkových proteínov ovčieho a kozieho mlieka

Proteíny cicavcov sú začlenené do dvoch základných skupín: kazeíny ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) a srvátkové proteíny ( $\alpha$ -laktalbumín,  $\beta$ -laktoglobulín, sérumalbumín, imunoglobulíny, minoritné proteíny). Obsah proteínov v ovčom a kozom mlieku ovplyvňujú také faktory ako sezóna, výživa, vek, zdravotný stav, plemeno, štádium laktácie [5-8]. Ovčie mlieko vykazuje všeobecne vyšší obsah proteínov a iné zastúpenie frakcií kazeínu a srvátkových proteínov (SP) ako kravské mlieko [6, 9]. Ovčie a kozie mlieko majú podstatne vyšší podiel albumínu ako kravské mlieko [10]. Pri sledovaní zastúpenia SP v kravskej, ovčej a kozej srvátke sa zistilo, že ovčia srvátka obsahovala viac  $\beta$ -laktoglobulínu ( $\beta$ -LG) a menej sérumalbumínu (SA) ako kravská srvátka. Zistilo sa, že podiel  $\alpha$ -laktalbumínu ( $\alpha$ -LA) v ovčej srvátke bol rovnaký ako v kravskej srvátke, ale bol výrazne nižší ako v kozej srvátke. Ovčia srvátka obsahovala výrazne viac  $\beta$ -LG ako kozia srvátka [4-5, 11]. Relatívne množ-

TAB. 1. Zloženie a obsah srvátkových proteínov v surovom mlieku kráv, kôz a oviec.

TAB. 1. The composition and content  
of the whey proteins in raw milk of the cow, goat and sheep.

Srvátkové proteíny <sup>1</sup>	Kravské mlieko <sup>2</sup>	Kozie mlieko <sup>3</sup>	Ovčie mlieko <sup>4</sup>
	Celkom <sup>5</sup> [%]		
imunoglobulíny <sup>6</sup>	15,0	11,5	20,0
sérumalbumín/laktoferín <sup>7</sup>	9,5	12,8	8,1
$\beta$ -laktoglobulín <sup>8</sup>	59,3	54,2	61,1
$\alpha$ -laktalbumín <sup>9</sup>	16,2	21,4	10,8
	Koncentrácia <sup>10</sup> [g.l <sup>-1</sup> ]		
imunoglobulíny	0,97	0,71	2,15
sérumalbumín/laktoferín	0,61	0,79	0,87
$\beta$ -laktoglobulín	3,83	3,33	6,58
$\alpha$ -laktalbumín	1,05	1,31	1,16
srvátkové proteíny celkom <sup>11</sup>	6,46	6,14	10,76

1 - whey proteins, 2 - cow milk, 3 - goat milk, 4 - ewe milk, 5 - total, 6 - immunoglobulins, 7 - serum albumin/lactoferrin, 8 -  $\beta$ -lactoglobulin, 9 -  $\alpha$ -lactalbumin, 10 - concentration, 11 - total whey proteins.

stvá a koncentrácie jednotlivých frakcií SP v kravskom, kozom a ovčom mlieku podľa LAWA [4] uvádza tab. 1.

Hlavnou frakciou SP v mlieku prežúvacov je  $\beta$ -LG. U tohto globulárneho proteínu sa uvádza molekulová hmotnosť 18 350 a v mlieku prežúvacov sa vyskytuje ako dimér pozostávajúci z dvoch monomerných subjednotiek [12]. Táto frakcia SP sa skladá zo 162 aminokyselinových zvyškov, pričom porovnanie poradia aminokyselín odhalilo u  $\beta$ -LG prežúvacov vysokú homológiu. Podobne ako boviný, má aj  $\beta$ -LG kozieho mlieka 162 aminokyselinových zvyškov a podobné fyzikálne a chemické vlastnosti [13]. Experimentálne sa pre  $\beta$ -LG kozieho mlieka stanovila molekulová hmotnosť 18 181 [14]. Tento hlavný SP má pravdepodobne transportnú funkciu. Viaz a transportuje retinol, mastné kyseliny, triacylglyceroly, ketóny, ióny a niektoré proteíny. Je veľmi stabilný v kyslom prostredí [15-16].

Kým u kravského mlieka je známych sedem genetických variantov  $\beta$ -LG (líšia sa v niekoľkých aminokyselinových zvyškoch), tak v ovčom mlieku sa potvrdili dva genetické varianty  $\beta$ -LG označené ako A a B [1, 6]. U kozieho mlieka sa uvádza len jeden genetický variant  $\beta$ -LG [1-2].

$\alpha$ -LA, ďalšia frakcia SP ovčieho a kozieho mlieka vykazuje len jeden genetický variant [1] a vyznačuje sa relatívne vysokou tepelnou stabilitou [16]. Pre  $\alpha$ -LA kozieho mlieka sa stanovila experimentálna molekulová hmotnosť 14 180 [14].

### **Tepelná denaturácia srvátkových proteínov**

Pri zohre mlieka dochádza k viacerým charakteristickým zmenám, ako sú: zníženie pH, zrážanie fosforečnanov vápnika, denaturácia SP a ich interakcia s kazeínom, Maillardova reakcia, zmeny v kazeíne (defosforylácia, hydrolyza  $\kappa$ -kazeínu a celková hydrolyza), zmeny v micelárnej štruktúre [15, 17-19].

Srvátkové proteíny (na rozdiel od kazeínu) denaturujú teplom. Denaturované SP sa z mlieka zrážajú spoločne s kazeínom a to ako kyslým, tak aj syridlovým zrážaním. Denaturácia sa primárne prejavuje ako zmena natívnej štruktúry proteínov a sekundárne v zmene natívnych fyzikálno-chemických vlastností proteínov [15]. Kinetika a tepelná denaturácia SP sa pomerne rozsiahlo študovali [17, 20-24]. K denaturácii SP kravského mlieka dochádza, keď je mlieko zahriate na teplotu vyššiu ako 60 °C a zahŕňa počiatočný reverzibilný krok, v ktorom sa intramolekulárne disulfidické väzby prerušia a proteíny strácajú globulárnu konfiguráciu [25-26]. Kinetika týchto reakcií sa usmerňuje stavom zahrievania (teplota, rýchlosť

a čas záhrevu) a chemickými podmienkami (pH, koncentrácia iónov, laktózy a proteínov) [17, 27, 28].

Pri vyššom stupni záhrevu mlieka podstupujú SP ireverzibilnú denaturáciu a asociujú s kazeínmi cez hydrofóbne interakcie a disulfidické väzby [29]. Stupeň a rozsah denaturácie SP a interakcia s kazeínovými micelami závisia od prítomnosti tepelného záhrevu a spracovateľských podmienok [30]. Hlavný komplex vytvorený počas zahriatia zahŕňa pravdepodobne  $\beta$ -LG a  $\kappa$ -kazeín, ale  $\alpha$ -LA môže tiež tvoriť medzimolekulárne disulfidické väzby s inými molekulami [15, 31].

K úplnej denaturácii SP kravského mlieka dochádza pri teplote 77,5 °C za 1 hodinu, pri teplote 80 °C za 30 minút, alebo pri teplote 90 °C za 5 minút [15]. Citlivosť jednotlivých SP voči tepelnému ošetrovaniu umožňuje charakterizáciu tepelného ošetrovania mlieka na báze denaturácie SP [15, 32-33]. Podliehanie ireverzibilnej denaturácii sa u SP kravského mlieka zistilo v postupnosti: imunoglobulín (IgG) > SA >  $\beta$ -LG >  $\alpha$ -LA [32, 34]. Frakcia nepodliehajúca koagulácii sa označuje ako proteozo-peptónová [15]. Na základe väčšej tepelnej citlivosti a lepšej analytickej kvantifikovateľnosti sa dáva  $\beta$ -LG ako indikátoru tepelného ošetrovania pred  $\alpha$ -LA prednosť [32].

Z dôvodu dôležitej úlohy pri stabilite mlieka sa intenzívne študovala najmä tepelná denaturácia bovinného  $\beta$ -LG. V posledných desaťročiach sa získalo veľa informácií o jeho denaturačných teplotách, zmenách entalpie, reverzibility, kooperativity a kinetických parametroch, o vplyve genetických variantov, pH, odolnosti voči iónom a rôznym soliam [35]. Skúmali sa a determinovali reakčné poriadky, rýchlostné konštanty a aktivačné energie ireverzibilnej denaturácie  $\beta$ -LG [36]. Dosiahnuté výsledky ukázali, že tepelná denaturácia bovinného  $\beta$ -LG závisí od faktorov spojených s tepelným médiom (pH, intenzita iónov, zloženie tlmivého roztoku) a rozsahom teploty [37-39].

Spojenie určitých ligandov môže stabilizovať štruktúru proteínov [40]. V prirodzenom stave v mlieku sa zdá byť  $\beta$ -LG viazaný na mastné kyseliny a ostatné lipidy. Demonštrovalo sa, že viazanie lipidov na  $\beta$ -LG značne zvýšilo termostabilitu tohto proteínu [38, 41]. Rozdiely v termostabilite  $\beta$ -LG sa môžu pripisovať zmenám vo väzbe lipidov, ktoré boli indukované malými zmenami v primárnej štruktúre [39].

K ireverzibilnej denaturácii  $\beta$ -LG v kravskom mlieku dochádza pri teplotách vyšších ako 70 °C [15], pričom najvyššia tepelná stabilita sa uvádza u jeho genetického variantu A [32, 42]. Iné práce však uvádzajú vyššiu tepelnú stabilitu genetického variantu B [37-38]. Rozdielna termostabilita oboch variantov bovinného  $\beta$ -LG sa prisudzuje štrukturálnym zmenám vyvolaných nahradením zvyškov glycínu, asparagínu, alanínu a valínu vo variante B [37].

Výsledky ukazujú, že môže dochádzať k interakciám medzi rôznorodými molekulami proteínov tak, že sa zvýši denaturácia jedného alebo oboch proteínov. V prítomnosti kazeínu pri pH 6,5 a teplotách vyšších ako 74 °C bola strata  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA v mlieku väčšia ako v srvátke, keď kazeín napomáhal tepelnej denaturácii SP, čo bolo pravdepodobne následkom interakcie medzi  $\kappa$ -kazeínom,  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA počas zohrevu [15, 43]. Pri pH 4,5 vykazoval  $\alpha$ -LA ešte výraznejšiu interakciu [15].

Kým v oblasti sterilizačných teplôt dochádza k úplnej denaturácii  $\alpha$ -LA a  $\beta$ -LG, v oblasti UHT ošetrenia je možné ešte v mlieku stanoviť natívny obsah  $\alpha$ -LA a  $\beta$ -LG. Pre oblasť UHT a vysokej pasterizácie (86–125 °C) sa obsahy  $\alpha$ -LA a  $\beta$ -LG ukázali ako vhodné indikátory tepelného ošetrenia mlieka [32]. Ku kompletnej denaturácii  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA došlo po 15 minútach zahriatia mlieka na teplotu 95 °C. Viac ako polovica celkového množstva  $\alpha$ -LA v mlieku vydrží 30 minútový zohrev na teplotu 77 °C, zatiaľ čo SA a IgG denaturujú kompletne [15]. Pri zohreve na 86 °C s výdržou 5,8 sekundy bol stupeň denaturácie  $\beta$ -LG na úrovni 13,4 %, pričom denaturácia  $\alpha$ -LA sa nezistila. Denaturácia  $\alpha$ -LA (0,8 %) sa pri tejto teplote zistila až od výdrže 45,9 sekúnd [32].

Nízka krátkodobá pasterizácia predstavuje šetrný postup tepelného ošetrenia mlieka najmä na výrobu syrov. V tejto oblasti, ako aj v oblasti termizácie, je obsah  $\alpha$ -LA a  $\beta$ -LG (vzhľadom na nízky stupeň ich denaturácie) len podmienene vhodný na charakterizáciu tepelného zaťaženia mlieka. Za skúmaných podmienok termizácie (62 °C, 40 sekúnd) sa stanovil stupeň denaturácie  $\beta$ -LG len na úrovni 2,6 % a  $\alpha$ -LA na úrovni 2,1 %. Pri šetrnej pasterizácii mlieka (72 °C, 40 sekúnd) bol stupeň denaturácie  $\beta$ -LG 8,9 % a  $\alpha$ -LA 6,8 %. V oblasti týchto nízkych teplôt sú preto vhodnejšími indikátormi tepelnej záťaže mlieka na teplo citlivejšie IgG, SA a laktoferín [32].

Sledovaním meniacej sa koncentrácie celkových proteínov, SP a kazeínu v mlieku na stupeň denaturácie jednotlivých frakcií SP v závislosti od štádia laktácie sa zistilo, že stupeň denaturácie hlavných troch frakcií SP (SA/laktoferín,  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA) sa zvyšoval s rastúcou koncentráciou celkových proteínov v mlieku. Rozsah denaturácie SA/laktoferínu,  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA (s výnimkou IgG) stúpal aj so zvyšujúcou sa koncentráciou SP [34]. Stupeň denaturácie celkových SP bol podobný v mlieku z rannej a strednej laktácie, ale bol značne vyšší v mlieku od dojnic v neskoršom štádiu laktácie. Stupeň denaturácie jednotlivých frakcií SP bol tiež vyšší v mlieku z neskoršieho štádia laktácie, pričom nárast by sa mohol pripisovať vyšším koncentráciám celkových SP a ľahšie denaturovateľných frakcií, ako sú IgG a SA/laktoferín v mlieku kráv z neskoršieho štádia laktácie. Úroveň denaturácie SP sa neo-

vplynula nárastom koncentrácie micíel kazeínu, ale výrazne sa znížila, keď sa obsah kazeínu v mlieku znížil na menej ako 1/3 obsahu [34].

Pri sledovaní vplyvu pH (rozsah 5,2–8,8) sa stupeň denaturácie SP v odstredenom mlieku pri hodnote pH 4,6 zvýšil s teplotou zohrevu, pričom bol v postupnosti: IgG > SA/laktoferín >  $\beta$ -LG >  $\alpha$ -LA. Kým stupeň denaturácie IgG a SA/laktoferín bol vyšší pri nižších hodnotách sledovaného rozsahu pH, stupeň denaturácie  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA bol vyšší pri vyšších hodnotách skúmaného rozsahu pH [44]. ANEMA a LI [45] nezistili výraznejší vplyv pH na stupeň denaturácie  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA, čo súviselo s malým rozpätím sledovaných hodnôt pH (6,5–6,7).

Informácie týkajúce sa tepelnej denaturácie  $\beta$ -LG a iných frakcií SP ovčieho alebo kozieho mlieka sú vzácnejšie. Pri vzájomnom porovnávaní denaturačnej náchylnosti jednotlivých frakcií SP mlieka kráv, oviec a kôz v rozsahu teplôt 70–90 °C sa u všetkých týchto druhov zistila stupnica denaturácie v poradí: IgG > SA/laktoferín >  $\beta$ -LG >  $\alpha$ -LA. V závislosti od druhu zvierata sa však zistili rozdiely v stupni denaturácie jednotlivých frakcií SP. Pri menej intenzívnom tepelnom ošetrovaní mlieka (70 °C alebo 80 °C, krátka doba ohrevu) sa SP kozieho mlieka menej denaturovali ako SP kravského alebo ovčieho mlieka. Pri silnejšom zohreve (90 °C) bol stupeň náchylnosti na denaturáciu SP v radovej postupnosti: ovčie > kozie > kravské. Pri zahriatí mlieka na 90 °C postupovala denaturácia frakcií IgG a SA/laktoferín rýchlejšie a rozdiely medzi jednotlivými druhmi boli pre tieto proteíny menej výrazné [4].

K výsledku, že  $\beta$ -LG ovčieho mlieka sa denaturoval ľahšie ako jeho homologický proteín z kozieho a kravského mlieka dospeli aj ďalší autori [46, 47]. RAMOS [46] uvádza denaturáciu  $\beta$ -LG v ovčom mlieku pri teplote 63 °C (doba ohrevu 30 minút) na úrovni 34,0 %, v kravskom mlieku na úrovni len 1,8 %, resp. v kozom mlieku sa denaturácia  $\beta$ -LG nezistila. Výsledky CALAVIU a BURGOSA [39] však nepodporujú názor, že natívny  $\beta$ -LG ovčieho mlieka je citlivejší na teplotu ako jeho boviný homológ. Pri podobnom pH a podobnej koncentrácii iónov mlieka je ovčí  $\beta$ -LG stabilnejší ako jeho boviný homológ [39].

Pri porovnaní obsahu a zloženia frakcií kazeínov v kravskom, kozom a ovčom mlieku sa zistilo, že koncentrácie kozieho a ovčieho  $\alpha$ -kazeínu boli výrazne vyššie ako kravského  $\alpha$ -kazeínu. Kozí a ovčí  $\alpha$ -kazeín tiež obsahovali tri –SH skupiny, kravský len dve. V porovnaní s kravským mliekom preto kozie a ovčie mlieka obsahovali na  $\kappa$ -kazeíne takmer dvojnásobnú koncentráciu skupín –SH dostupných pre disulfidické väzby SP. Koncentrácia  $\beta$ -kazeínu v kozom mlieku bola nepatrne vyššia a v ovčom mlieku výrazne vyššia ako v kravskom mlieku. Keďže  $\beta$ -kazeín je najviac hydrofóbny kazeín, jeho

vyššia koncentrácia v ovčom mlieku môže podporovať hydrofóbne interakcie denaturovaných SP a kazeínov. Pri spracovaní ovčieho mlieka tak existuje významný potenciál pre zvýšenie výťažnosti syrov inkorporáciou denaturovaných SP do syreniny [4].

Genetické varianty ovčieho  $\beta$ -LG sa líšia v termostabilite, pričom variant A je viac termostabilný ako variant B. Výrazné rozdiely medzi variantmi A a B, čo sa týka zmien entalpie alebo kooperativity v procese denaturácie, sa nezistili. Denaturáciu ovčieho  $\beta$ -LG sprevádza zjavná reakcia, ktorá závisí od tepelného záhrevu a molarity tlmivého roztoku [39]. Nevýrazné rozdiely v termostabilite medzi oboma variantmi ovčieho  $\beta$ -LG v 0,5 M tlmivom roztoku môžu byť spôsobené rozdielnou účinnosťou obidvoch variantov zvýšením efektu hydrofóbnych interakcií vyvolaných soľami pri koncentráciách vyšších ako 0,2 M [48]. Rozdiely v termostabilite oboch genetických variantov  $\beta$ -LG ovčieho mlieka by mohli byť priamo spojené so štrukturálnymi zmenami vyplývajúcimi zo substitúcie histidínu vo variante B a tyrozínu vo variante A, alebo nepriamo vplyvom tejto substitúcie na kapacitu väzby lipidov. Vyššia hydrofóbnosť postranného reťazca tyrozínu by mohla poukazovať na zvýšenie kapacity väzby lipidov u variantu A, výsledkom čoho by mohla byť vyššia termostabilita [49].

O tepelnom ošetrovaní kozieho mlieka informovali CALVO a OLANO [50]. Pri sledovaní vplyvu tepelného ošetrovania bol stupeň denaturácie SP kozieho mlieka pri teplote vyššej ako 75 °C vyšší ako u SP kravského mlieka [51]. Signifikantné rozdiely v denaturácii  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA kozieho mlieka sa zistili v závislosti od sledovanej hodnoty pH (6,7–7,2) a použitého spôsobu tepelného ošetrovania (priamy a nepriamy UHT ohrev) [52].

Na základe sledovania nezávislých a spoločných účinkov tepelného ošetrovania (85 °C a 95 °C, 30 a 60 minút) a rozdielnej rýchlosti miešania (frekvencia otáčok - 0 alebo 100/min) na rozsah precipitácie SP ovčej a kozej kyslej srvátky v rôznych štádiách laktácie sa zistilo, že najdôležitejším faktorom pri zrážaní  $\beta$ -LG a  $\alpha$ -LA je teplota. V závislosti od štádia laktácie sa v strednej časti laktácie zaznamenali maximálne hodnoty denaturácie  $\alpha$ -LA a  $\beta$ -LG ovčej srvátky vzhľadom na efekt doby zahrievania. Príslušné efekty boli u kozej srvátky veľmi malé [11].

### Metódy stanovenia denaturácie srvátkových proteínov

Pri acidifikácii na pH 4,6 denaturované SP precipitujú spoločne s kazeínom a znížená koncentrácia jednotlivých SP v kyslom filtráte sa môže použiť na stanovenie stupňa ich ireverzibilnej denaturácie [4, 17, 30, 32]. V analý-

ze mliečnych proteínov sa použilo viacero elektroforetických techník ako napr. polyakrylamidová elektroforéza v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE - sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis), izoelektrická fokusácia (IEF - isoelectric focusing), rôzne chromatografické techniky zahŕňajúce vysoko účinnú kvapalinovú chromatografiu (FPLC - fast protein liquid chromatography) s výmenou iónov, kvapalinovú chromatografiu s reverznou fázou (RP-HPLC - reverse-phase high-performance liquid chromatography), gélovú permeačnú chromatografiu (GP-FPLC - gel permeation fast protein liquid chromatography).

Relatívne pomery denaturácie  $\alpha$ -LA a  $\beta$ -LG sa sledovali použitím kvantitatívnej elektroforézy [17], rozsah denaturácie SP sa stanovil použitím gélovej elektroforézy [42]. Na kvantifikáciu SP mlieka sa použila aj kapilárna elektroforéza [53-54]. Viacerí autori použili na kvantitatívne stanovenie natívneho obsahu  $\beta$ -LG, resp. obsahu SP, ktoré zostali v mlieku po jeho tepelnom ošetrovaní, chromatografickú techniku GP-FPLC [2, 4, 30, 34, 55, 56]. Tento postup sa použil tiež na vzájomné porovnanie relatívneho stupňa ireverzibilnej denaturácie jednotlivých frakcií SP kravského, ovčieho a kozieho mlieka [4]. Kinetika a termodynamické agregácie  $\beta$ -LG sa sledovali a vzájomne porovnávali postupom GP-FPLC a postupom SDS-PAGE [56]. Jednotlivé SP ovčej a kozej srvátky sa kvantifikovali postupom SDS-PAGE a digitálnou snímacou technológiou (digital imaging technology) [5]. Denaturácia jednotlivých frakcií SP sa sledovala RP-HPLC [32].

Pri stanovení obsahu SP v mlieku technikou vylučovacej kvapalinovej chromatografie (SC-HPLC - selective coprecipitation HPLC) sa kvantitatívne stanovuje  $\beta$ -LG, pričom celkový obsah SP sa vyjadruje ako suma plôch jednotlivých píkov SP vzťahujúcich sa na štandard  $\beta$ -LG [57]. Táto metóda umožňuje stanovenie všetkých frakcií SP, čím poskytuje podrobné informácie o denaturácii jednotlivých frakcií [15].

Pri stanovení SP v surovom a tepelne ošetrovanom mlieku (pasterizácia, UHT ohrev) sa medzi porovnávanou kapilárnou elektroforézou a absorpčnou spektroskopiou (UV fourth derivate absorption spectroscopy) nezistili štatisticky významné rozdiely [54].

Novú možnosť výskumu primárnej štruktúry proteínov a peptidov poskytuje príchod nových moderných techník hmotnostnej spektrometrie, ako je napr. hmotnostná spektrometria s elektrón-sprejovou ionizáciou (ESI-MS - electrospray ionization mass spectrometry) [58-59]. Spojením RP-HPLC a ESI-MS sa analyzovali proteíny kozieho mlieka [14].

## Záver

Prostredníctvom vplyvu tepla na zmeny (denaturáciu) SP je možné poukázať na intenzitu tepelného namáhania mlieka počas výrobného procesu, pričom úroveň denaturácie ovplyvňuje následné technologické operácie a výsledné vlastnosti produktu. Praktická aplikácia denaturácie srvátkových proteínov ako najcitlivejšieho indikátora tepelného namáhania mlieka sa využíva v praxi pre triedenie sušeného mlieka podľa intenzity tepelného ošetrovania, na výber suroviny na výrobu syrov, na posudzovanie surových mliek a z nich vyrobených tepelne ošetrovaných mliek [15].

Zistenie faktorov ovplyvňujúcich stupeň denaturácie srvátkových proteínov kozieho a ovčieho mlieka môže pomôcť usmerniť technologické výrobné procesy aplikované pri spracovaní týchto druhov mliek, čo sa môže prejavovať vo zvýšení výťažnosti výroby (najmä pri výrobe syrov), ako aj vo zvýšení kvality ovčích a kozích mliečnych výrobkov.

### *Zoznam používaných skratiek*

SP	srvátkové proteíny
SA	sérumalbumín
$\beta$ -LG	$\beta$ -laktoglobulín
$\alpha$ -LA	$\alpha$ -laktalbumín
IgG	imunoglobulín

Táto práca bola podporovaná štátnym podprogramom výskumu a vývoja „Potraviny - kvalita a bezpečnosť“ č. 2003SP270280E010280E01.

## Literatúra

1. PINTADO, M. E. - MALCATA, F. X.: Studies on genetic variants of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from milk of native Portuguese ovine and caprine breeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 1999, s. 245-252.
2. LAW, A. J. - BROWN, J. R.: Compositional changes in caprine milk whey protein. *Milchwissenschaft*, 49, 1994, s. 674-678.
3. QUILES, A. - GONZALO, C. - BARCINA, Y. - FUENTES, F. - HEVIA, M.: Protein quality of Spanish Murciano-Granadina goat milk during lactation. *Small Ruminant Research*, 14, 1994, s. 67-72.
4. LAW, A. J. R.: Heat denaturation of bovine, caprine and ovine whey proteins. *Milchwissenschaft*, 50, 1995, č. 7, s. 384-388.
5. CASPER, J. L. - WENDORFF, W. L. - THOMAS, D. L.: Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *Journal of Dairy Science*, 81, 1998, č. 12, s. 3117-3122.
6. DILANJAN, Z. CH.: Obsah bielkovín v mlieku oviec chovaných v Arménii a niektoré otázky spracovania mlieka. In: Zborník referátov z medzinárodnej konferencie „Získavanie

- a spracovanie ovčieho mlieka“. Žilina : Dom techniky SVTSV, 1974, s. 114-135.
7. NUNEZ, M. - MEDINA, M. - GAYA, P.: Ewe's milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *Journal of Dairy Research*, 56, 1989, s. 303-321.
  8. DE FRUTOS, M. - MOLINA, E. - AMIGO, L.: Applicability of capillary electrophoresis to the study of bovine  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism. *Milchwissenschaft*, 51, 1996, č. 7, s. 374-378.
  9. JELÍNEK, P. - GAJDÚŠEK, S. - ILLEK, J. - HELANOVÁ, I. - HLUŠEK, J.: Změny základního složení a vlastností ovčího mléka v průběhu laktace. *Živočišná výroba*, 35, 1990, č. 9, s. 803-815.
  10. MARK, P. - SCHÖNE, A.: Ziegen und Schafmilch. *Deutsche Molkerei Zeitung*, 121, 2000, č. 10, s. 448-454.
  11. PINTADO, M. E. - MALCATA, F. X.: Effect of thermal treatment on the protein profile of whey from ovine and caprine milk throughout lactation. *International Dairy Journal*, 6, 1996, č. 5, s. 497-518.
  12. MCKENZIE, H. A.:  $\beta$ -lactoglobulins. *Milk proteins. Chemistry and Molecular Biology*, 2, 1971, s. 257-330.
  13. TRUJILLO, A. J. - JORDANA, J. - GUAMIS, B. - SERRADILLA, J. M. - AMILLS, M.: Review: Polymorphism of the caprine  $\alpha_{s1}$ -casein gene and its effect on the production, composition and technological properties of milk and on cheese making and ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 4, 1998, s. 217-235.
  14. TRUJILLO, A. J. - CASALS, I. - GUAMIS, B.: Analysis of major caprine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 83, 2000, č. 1, s. 11-19.
  15. SNÁŠELOVÁ, J. - MARKOVÁ, M. - VEJDOVÁ, M. - VODIČKOVÁ, M.: Vliv tepelného ošetření na změny syrovátkových bílkovin. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 72, 2002, s. 12-16.
  16. TOLKACH, A. - KULOZIK, U.: Fractionation of whey proteins and peptides by means of membrane techniques in connection with chemical and physical pretreatments. *IDF World Dairy Summit & Centenary (Conferences: Papers)*. Bruges : International Dairy Federation, 2003, s. 69-74.
  17. HILLIER, R. M. - LYSTER, L. J.: Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey. *Journal of Dairy Research*, 46, 1979, s. 95-102.
  18. MEISEL, H. - SCHLIMME, E.: Casein-gebundener Phosphor und der Gehalt an freien Aminosäuren in unterschiedlich wärmebehandelter Milch. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 47, 1995, č. 4, s. 289-301.
  19. MORGAN, F. - BOUHALLAB, S. - MOLLÉ, G. - HENRY, G. - MAUBOIS, J. L. - LÉONIL, J.: Lactation of  $\beta$ -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry. *International Dairy Journal*, 8, 1998, s. 95-98.
  20. HARWALKAR, V. R.: Kinetic study of the thermal denaturation of proteins in whey. *Milchwissenschaft*, 41, 1986, s. 206-209.
  21. ANEMA, S. G. - MCKENNA, A. B.: Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1996, s. 422-428.
  22. GALANI, D. - APENTEN, R. K. O.: The effect of heat on whey proteins. *Food Science and Technology Today*, 10, 1996, č. 3, s. 163-168.
  23. VERHEUL, M. - ROEFS, S. P. F. M. - DE KRUIF, C. G.: Kinetics of heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1998, s. 896-903.
  24. SURROCA, Y. - HAVERKAMP, J. - HECK, A. J. R.: Towards the understanding of molecular mechanisms in the early stages of heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin AB. *Journal of Chromatography*, A 970, 2002, č. 1/2, s. 275-285.

25. DE WIT, J. N.-N. - KLARENBECK, G.: Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 1984, s. 2701-2710.
26. PARRIS, N. - PURCELL L. M. - PTASHKIN S. M.: Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1991, s. 2167-2170.
27. HARWALKAR, V. R. - KALAB, M.: Thermal denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 2.5. Effect of ion strength and protein concentration. *Milchwissenschaft*, 40, 1985, s. 31-34.
28. MULVIHILL, D. M. - DONOVAN, M.: Whey proteins and their thermal denaturation - a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 1987, s. 43-75.
29. PARNELL-CLUNIES, E. - KAKUDA, Y. - IRVINE, D. - MULLEN, K.: Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems. *Journal of Dairy Science*, 71, 1988, č. 6, s. 1472-1483.
30. LAW, A. J. R. - BANKS, J. M. - HORNE, D. S. - LEAVER, J. - WEST, I. G.: Denaturation of the whey proteins in heated milk and their incorporation into Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, 49, 1994, s. 63-67.
31. CORREDIG, M. - DALGLEISH, D. G.: The binding of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin to casein micelles in milk treated by different heating system. *Milchwissenschaft*, 51, 1996, č. 3, s. 123-127.
32. SCHLIMME, E. - CLAWIN-RÄDECKER, I. - EINHOFF, K. - KIESNER, C. - LORENZEN, P. CHR. - MARTIN, D. - MEISEL, H. - MÖLKENTIN, J. - PRECHT, D.: Untersuchung über Unterscheidungsmerkmale zur Bewertung der Wärmebehandlung von Milch. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 48, 1996, č. 1, s. 5-36.
33. PELLIGRINO, L. - RESMINI, P. - LUF, W.: Assessment (indices) of heat treatment of milk. In: FOX, P. F. (ed.): Heat-induced changes in milk. Brusel : International Dairy Federation, 1995, s. 409-453.
34. LAW, A. J. R. - LEAVER, J.: Factors affecting the heat denaturation of whey proteins in cows' milk. *International Dairy Journal*, 9, 1999, s. 407-408.
35. RELKIN, P.: Thermal unfolding of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 1996, č. 6, s. 565-601.
36. KESSLER, H. G. - BEYER, H. J.: Thermal denaturation of whey proteins and its effect in dairy technology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 1991, č. 3, s. 165-173.
37. IMAFIDON, G. I. - NG-KWAI-HANG, K. F. - HARWALKAR, V. R. - MA, C. Y.: Differential scanning calorimetric study of different genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal Dairy Science*, 74, 1991, s. 2416-2422.
38. PUYOL, P. - PEREZ, M. D. - PEIRO, J. M. - CALVO, M.: Effect of binding of retinol and palmitic acid to bovine  $\beta$ -lactoglobulin on its resistance to thermal denaturation. *Journal of Dairy Science*, 77, 1994, s. 1494-1502.
39. CALAVIA, M. C. - BURGOS, J.: Thermal denaturation of ovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 81, 1998, č. 10, s. 2572-2579.
40. RELKIN, P. - LAUNAY, B. - EYNARD, L.: Effect of sodium and calcium addition on thermal denaturation of apo- $\alpha$ -lactalbumin: a differential scanning calorimetric study. *Journal of Dairy Science*, 76, 1993, s. 36-47.
41. DÍAZ DE VILLEGAS, M. C. - ORIA, R. - SALA, F. J. - CALVO, M.: Lipid binding by  $\beta$ -lactoglobulin of cow's milk. *Milchwissenschaft*, 42, 1987, s. 357-358.
42. MCSVINEY, M. - SINGH, H. - CAMPANELLA, O. H.: Thermal aggregation and gelation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 8, 1994, č. 5, s. 441-453.
43. ELFAGM, A. A. - WHELOCK, J. V.: Effect of heat on  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin

- in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 44, 1977, s. 367.
44. LAW, A. J. - LEAVER, J.: Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2000, č. 3, s. 672-679.
  45. ANEMA, S. G. - LI, Y.: Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2003, č. 6, s. 1640-1646.
  46. RAMOS, M.: Effect of heating on the nitrogen fractions of ewe's, goat's and cow's milk. In: *Proceedings of XX. International Dairy Congress. Paris : International Dairy Federation*, 1978, s. 626-627.
  47. CALVO, M. M. - AMIGO, L. - OLANO, A. - MARTIN, P. J. - RAMOS, M.: Effect of thermal treatments on the determination of bovine milk added to ovine or caprine milk. *Food Chemistry*, 32, 1989, s. 99-108.
  48. VON HIPPEL, P. H. - SCHLEICH, T.: Effect of salt on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In: TIMASHEFF, S. N. - FASMAN, G. D. (ed.): *Structure and stability of biological macromolecules*. New York : Marcel Dekker, 1969, s. 35-43.
  49. GAYE, P. - HUE-DELAHAIE, D. - MERCIER, J. C. - SOULIER, S. - VILOTTE, J. L. - FURET, J. P.: Ovine  $\beta$ -lactoglobulin messenger RNA: nucleotide sequence and mRNA levels during fractional differentiation of the mammary gland. *Biochimie*, 68, 1986, s. 1097-1107.
  50. CALVO, M. M. - OLANO, A.: Review: thermal treatments of goat's milk. *Revista Espanola de Ciencia y Tecnologia de Alimentos*, 32, 1992, č. 2, s. 139-152.
  51. MINTILLA, A. - BALCONES, E. - OLANO, A. - CALVO, M. M.: Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1995, č. 7, s. 1908-1911.
  52. MONTILLA, A. - CALVO, M. M.: Goat's milk stability during heat treatment: effect of pH and phosphates. *Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1997, č. 3, s. 931-934.
  53. DE FRUTOS, M. - MOLINA, E. - AMIGO, L.: Applicability of capillary electrophoresis to the study of bovine  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism. *Milchwissenschaft*, 51, 1996, č. 7, s. 374-378.
  54. MIRALLES, B. - BARTOLOMÉ, B. - AMIGO, L. - RAMOS, M.: Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk. *Journal of Dairy Science*, 83, 2000, č. 12, s. 2759-2765.
  55. LAW, A. J. R. - LEAVER, J. - BANKS, J. M. - HORNE, D. S.: Quantitative fractionation of whey proteins by gel permeation FPLC. *Milchwissenschaft*, 48, 1993, č. 12, s. 663-666.
  56. GALANI, D. - APENTEN, R. K. O.: Heat-induced denaturation and agregation of  $\beta$ -lactoglobulin: kinetics of formation of hydrohobic and disulphide-linked aggregates. *International Journal of Food and Technology*, 34, 1999, č. 5/6, s. 467-476.
  57. VEJDOVÁ, M. - ČERNÝ, V. - DRÁB, V. - ROUBAL, P. - SNÁŠELOVÁ, J.: Využití techniky HPLC k řešení mlékařské problematiky. In: XXXII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin (sborník přednášek). Kroměříž : Kromilk, 2001, s. 12-13.
  58. LEONIL, J. - MOLLE, D. - FAUQUANT, J. - MAUBOIS, J. L. - PEARCE, R. J - BOUHALLAB, S.: Characterization by ionization mass spectrometry of lactosyl  $\beta$ -lactoglobulin conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. *Journal of Dairy Science*, 80, 1997, č. 10, s. 2270-2281.
  59. BURR, R. - MOORE, C. H. - HILL, J. P.: Evidence of multiple glycosylation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin by electrospray ionization mass spectrometry. *Milchwissenschaft*, 51, 1996, č. 9, s. 488-492.

Do redakcie došlo 6.4.2004.

**Thermal denaturation of whey proteins of ewe and goat milk**

KOLOŠTA, M. - GAŠPERÍK, J. - DRONČOVSKÝ, M.: Bull. potrav. Výsk., 43, 2004, p. 1-13.

SUMMARY. On the basis of the whey proteins denaturation it is possible to prove the thermal treatment to which the milk was exposed during its processing. Depending on the intensity of the thermal treatment of milk, denaturation of whey proteins to various degrees takes place, which influences the production output and the resulting properties of milk products. The thermal treatment of ewe and goat milk leads to different degrees of denaturation of whey proteins in contrast to cow milk. By determination of the whey protein denaturation of the ewe and goat milk, conditions of thermal treatment of these types of milk could be defined in relation to their further processing.

KEYWORDS: whey proteins; denaturation; temperature