

ŻYWNOSĆ

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 4 (41)

Kraków 2004

Rok 10

SPIS TREŚCI

Od Redakcji	3
RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, TOMASZ JANKOWSKI: Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania – stan obecny i możliwości rozwoju tej metody	5
KAMILA MYSZKA, KATARZYNA CZACZYK: Rola egzopolisacharydów mikrobiologicznych w technologii żywności	18
ELIZA KOSTYRA: Interakcje substancji smakowych i zapachowych ze składnikami żywności – aspekty fizykochemiczne	30
AGATA MARZEC, PIOTR P. LEWICKI: Właściwości sorpcyjne pieczywa chrupkiego	44
MAŁGORZATA PIECYK, MIROSŁAWA KLEPACKA: Właściwości funkcjonalne preparatów białkowych otrzymanych z nasion fasoli (<i>phaseolus vulgaris</i>) metodą krystalizacji i izolacji klasycznej	57
BEATA DRUŻYŃSKA, MIROSŁAWA KLEPACKA: Właściwości przeciwutleniające preparatów polifenoli otrzymanych z okrywy nasiennej fasoli czarnej, różowej i białej (<i>Phaseolus</i>)	69
WIOLETTA TUR, EWA SZCZEPANIK, WOJCIECH KRZYŻANIAK, WOJCIECH BIAŁAS, WŁODZIMIERZ GRAJEK: Charakterystyka maltodekstryn otrzymanych ze skrobi ziemniaczanej przy użyciu preparatów amyloliitycznych	79
DOROTA PŁASKOTA: Wyznaczenie obszaru optymalnych szybkości ścinania jogurtów o różnym czasie dojrzewania	95
MAGDALENA MIKA, AGNIESZKA WIKIERA, KRZYSZTOF ŻYŁA, PRZEMYSŁAW PEREK: Interakcje pektynaz i fosfataz w procesie zmian biodostępności białka z paszy dla drobiu	107
IRENA PERUCKA, MAŁGORZATA MATERSKA: Wpływ dolistnego stosowania jonów Ca ²⁺ oraz procesu suszenia na zawartość α-tokoferolu, β-karotenu i ksantofili w owocach papryki słodkiej	117
JOANNA TRAFIAŁEK, DANUTA KOŁOŻYŃSKA-KRAJEWSKA, EMILIA FRONC: Stopień wdrożenia systemów zapewnienia bezpieczeństwa żywności w polskich zakładach	126
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie krajowym	137
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Współczesny leksykon wiedzy o żywności	145
STANISŁAW POPEK: Nowe książki	148
BOGUSŁAW KRÓL, KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK: XXXV Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności Polskiej Akademii Nauk	152
JADWIGA WILSKA-JESZKA, KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK: Forum Dyskusyjne: Żywność funkcjonalna – potrzeby, możliwości i szanse produkcji	156
Technolog Żywności	161
Spis treści kwartalnika „Żywność” Nr 38–41	165
Wykaz nazwisk Autorów w 2004 roku	171
Wykaz nazwisk Recenzentów w 2004 roku	174

Zamieszczone artykuły są recenzowane

Czasopismo jest referowane przez: AGRO-LIBREX, Chemical Abstracts Service i IFIS

FOOD

The Scientific Organ of Polish Food Technologists' Society (PTTŻ) – quarterly

No 4 (41)

Kraków 2004

Vol. 10

CONTENTS

From the Editor	3
RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, TOMASZ JANKOWSKI: Cell encapsulation – current practice and future applications.....	5
KAMILA MYSZKA, KATARZYNA CZACZYK: The role of microbial exo-polysaccharides in food technology	18
ELIZA KOSTYRA: Interactions of the volatiles and non-volatiles with food components: physicochemical aspects	30
AGATA MARZEC, PIOTR P. LEWICKI: Water sorption properties of the crispbread	44
MAŁGORZATA PIECYK, MIROSŁAWA KLEPACKA: Functional properties of the bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>) seed preparations obtained using the crystallization and classical isolation methods.....	57
BEATA DRUŻYŃSKA, MIROSŁAWA KLEPACKA: The antioxidant properties of polyphenol preparations obtained from black, pink, and white bean seed coats (<i>Phaseolus</i>).....	69
WIOLETTA TUR, EWA SZCZEPANIK, WOJCIECH KRZYŻANIAK, WOJCIECH BIAŁAS, WŁODZIMIERZ GRAJEK: The characteristics of maltodextrins obtained from potato starch using amylolytic preparations gamalpha	79
DOROTA PLASKOTA: Determining a range of optimal shearing rates in yogurts showing different aging times.....	95
MAGDALENA MIKA, AGNIESZKA WIKIERA, KRZYSZTOF ŻYŁA, PRZEMYSŁAW PEREK: Interactions between pectinases and phosphatases during a process of altering the protein bioavailability in feed stuff for poultry	107
IRENA PERUCKA, MAŁGORZATA MATERSKA: The Ca ²⁺ treatment and drying process and their influence on the contents of α-tocopherol, β-carotene, and xanthophyll in sweet pepper fruits.....	117
JOANNA TRAFIAŁEK, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, EMILIA FRONC: The progress made in implementing food safety systems in polish plants.....	126
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in polish legislation.....	137
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Food Science Lexicon – Contemporary Terms ...	145
STANISŁAW POPEK: Book reviews	148
BOGUSŁAW KRÓL, KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK: The 35 th Scientific Session Held by the Board of Food Sciences, Polish Academy of Science (PAN).....	152
JADWIGA WILSKA-JESZKA, KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK: A Discussion Forum: Functional food – needs, potentials and chances of the production	156
The food technologist.	161
Annual contents.....	165
Index of Authors.....	171
Index of Reviewers	174

Only reviewed papers are published

Covered by: AGRO-LIBREX and Chemical Abstracts Service and IFIS

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Tadeusz Sikora; tel./fax 012/ 293-50-54

Sekretarz redakcji: dr Ewa Ślawska; tel. 012/ 662-51-61; e-mail:

ewaslawska@wp.pl

Redaktorzy: prof. dr hab. Bohdan Achremowicz, prof. dr hab. Włodzimierz Grajek,
prof. dr hab. Danuta Kolożyn-Krajewska, prof. dr hab. Bogusław Król, prof. dr hab. Krzysztof
Krygier, prof. dr hab. Stefan Ziajka, prof. dr hab. Mieczysław Pałasiński, dr Teresa Woźniakiewicz

Stali współpracownicy: prof. dr hab. Teresa Fortuna (Kraków), prof. dr hab. Jacek Kijowski
(Poznań), dr Grażyna Morkis (Warszawa), dr hab. inż. Stanisław Popek (Kraków), prof. dr hab.
Maria Soral-Śmietana (Olsztyn)

RADA PROGRAMOWA:

prof. dr Antoni Rutkowski (*przewodniczący*), dr hab. Kazimierz Dąbrowski (*sekretarz*),
prof. dr hab. Zbigniew Duda, prof. dr hab. Nina Baryłko-Pikielna, prof. dr hab. Janusz Czapski,
prof. dr hab. Mirosław Fik, prof. dr hab. Józef Fornal, prof. dr hab. Roman A. Grzybowski,
prof. dr hab. Jan Kiszka, prof. dr hab. Henryk Kostyra, prof. dr hab. Andrzej Lenart,
prof. dr hab. Helena Oberman, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, prof. dr hab. Stanisław
Tyszkiewicz

RADA KONSULTACYJNA:

prof. dr Henryk Daun (USA), prof. dr Jerzy Jankun (USA), dr Józef Korolczuk (Francja),
prof. dr Marian Naczka (Kanada), prof. dr Jan Pokorny (Czechy), prof. dr Roman Przybylski
(Kanada), dr Andrzej Sośnicki (USA), dr Leszek Stepaniak (Norwegia), dr Alina Surmacka-
Szcześniak (USA), dr John Wojciak (Kanada).

WYDAWCA:

POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI
WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994-1999 wydawcą kwartalnika był Oddział Małopolski PTTŻ

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2003

Printed in Poland

Wydawanie publikacji dofinansowane przez Komitet Badań Naukowych

ISSN 1425-6959
ISBN 83-

ADRES REDAKCJI:

31-425 KRAKÓW, AL. 29 LISTOPADA 46

Nakład: 800 egz.

SKŁAD I DRUK:



Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków

tel./fax (012) 280-71-51; www.akapit.krakow.pl

e-mail: wn@akapit.krakow.pl

ISSN 1425-6959
ISBN 83-89541-31-9

Warunki prenumeraty

Szanowni Państwo,
uprzejmie informujemy, że przyjmujemy zamówienia na prenumeratę naszego kwartalnika, zarówno od Czytelników indywidualnych, jak i od instytucji, co powinno Państwu zapewnić bieżące otrzymywanie kolejnych wydawanych przez nas numerów.
Szczegółowe informacje znajdują się na stronie **www.pttz.org**

Zamówienia na prenumeratę, jak i na poszczególne numery prosimy kierować na adres:

Wydawnictwo Naukowe PTTŻ

31-425 Kraków, Al. 29 Listopada 46

Nr konta: Deutsche Bank Oddz. w Krakowie

70 1910 1048 0009 1444 1121 0001

RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, TOMASZ JANKOWSKI

UNIERUCHAMIANIE KOMÓREK DROBNOUSTROJÓW METODĄ KAPSUŁKOWANIA – STAN OBECNY I MOŻLIWOŚCI ROZWOJU TEJ METODY

Streszczenie

W pracy przedstawiono podstawowe informacje na temat unieruchamiania komórek drobnoustrojów. Scharakteryzowano właściwości alginianu jako najpowszechniej stosowanego materiału do unieruchamiania komórek oraz omówiono podstawowe techniki kapsułkowania materiałów komórkowych. Przedstawiono także przykłady praktycznego wykorzystania kapsułkowanych komórek.

Słowa kluczowe: unieruchomienie, alginian, kapsułki z ciekłym rdzeniem, kulki pełnożelowe, bakterie fermentacji mlekowej.

Pojęcie i zalety unieruchomienia (immobilizacji) komórek mikroorganizmów

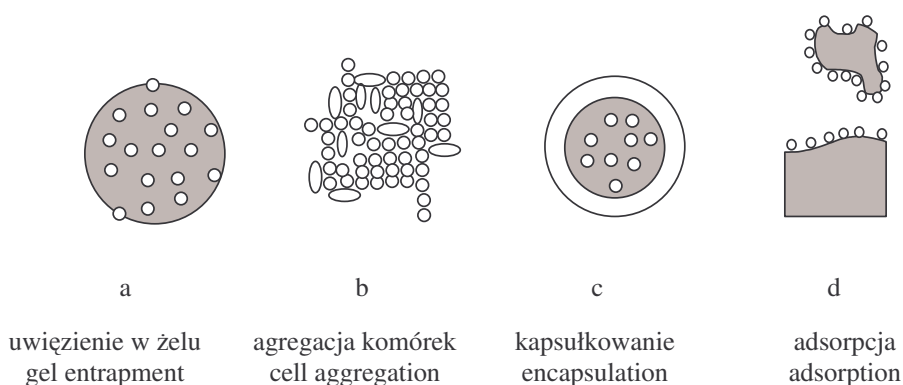
Unieruchomienie komórek polega na ich umieszczeniu w pewnej ograniczonej, zdefiniowanej przestrzeni z zachowaniem ich aktywności katalitycznej i żywotności [56]. Technika ta jest alternatywą dla unieruchamiania enzymów, gdyż przez wyeliminowanie procesów oczyszczania wewnątrzkomórkowych enzymów następuje obniżenie kosztów produktu końcowego. Unika się także problemów związanych z utratą aktywności oczyszczonych enzymów [6].

Unieruchomione komórki można wykorzystywać w procesach ciągłych lub wielokrotnie w procesach okresowych bez obawy, że zostaną wymyte z bioreaktora. Inne korzyści to: możliwość prowadzenia hodowli o dużych gęstościach komórek, większa odporność unieruchomionych mikroorganizmów na niekorzystne czynniki, takie jak np. zmiana parametrów hodowlanych – pH, temperatura, obecność toksyn czy wahania stężenia substancji pokarmowych, ochrona przed stresem spowodowanym mieszaniem mechanicznym czy napowietrzaniem. Unieruchomienie komórek gwarantuje stabilność przemian biochemicznych, umożliwia ich intensyfikację i zapewnia ekonomiczną opłacalność [23].

Wiele drobnoustrojów wykazuje zdolność adhezji do powierzchni. W naturalnym środowisku drobnoustrojów występuje zwykle niedostatek substancji odżywczych. Stężenie substancji pokarmowych jest jednak zwykle nieco wyższe w pobliżu powierzchni, stąd komórki przyczepione do powierzchni mają przewagę metaboliczną w stosunku do komórek zawieszonych swobodnie w roztworze. Można więc stwierdzić, że mikroorganizmy w swym naturalnym środowisku częściej występują jako unieruchomione na powierzchni niż w postaci zawiesiny wolnych komórek [53].

Metody unieruchamiania drobnoustrojów

Metody unieruchamiania zostały przedstawione na rys. 1. i obejmują [28, 30, 49]:



Rys. 1. Metody unieruchamiania komórek.

Fig. 1. Methods of cell immobilization.

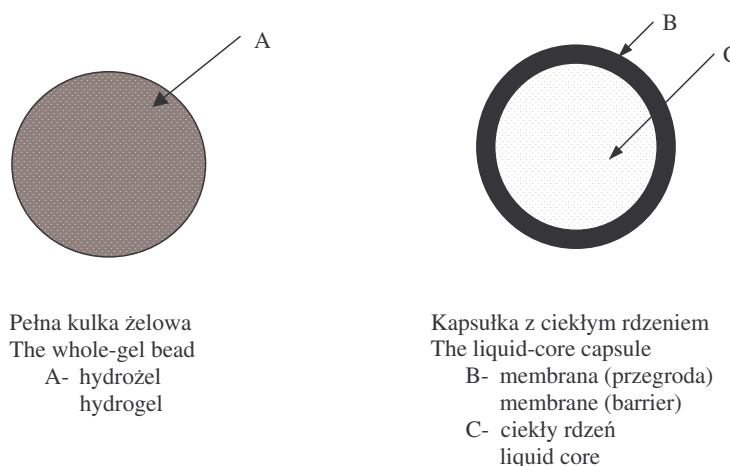
- uwięzienie w usieciowanej matrycy,
- agregowanie się komórek (samoflokulacja lub poprzez zastosowanie związków sieciujących),
- zamknięcie za przegrodą półprzepuszczalną (np. kapsułkowanie),
- przyczepianie lub adsorpcja do odpowiednio spreparowanych porowatych nośników czy adhezja do powierzchni.

Najczęściej stosowaną metodą w biotechnologii jest pułapkowanie w pełnych matrycach żelowych w kształcie kuli. Komórki są uwięzione w trójwymiarowej matrycy, w której wielkości porów są mniejsze od wymiarów komórek. Metoda ta jest dobrze poznana, zarówno pod względem warunków wpływających na formowanie nośników, ich właściwości, a także zastosowania do hodowli wielu drobnoustrojów [42].

Ostatnio pojawia się coraz więcej doniesień na temat unieruchamiania mikroorganizmów poprzez kapsułkowanie za porowatą przegrodą. Zaletą tej metody, w porównaniu z unieruchamianiem w kulkach z pełnego żelu, jest większa przeżywalność komórek umieszczonych w ciekłym rdzeniu kapsułki [2]. Kapsułkowanie i unieruchomienie mikroorganizmów w kulkach z pełnego żelu

umożliwia uzyskanie większego zagęszczenia biomasy, w porównaniu z metodami przyczepiania komórek na powierzchni nośnika.

Na rys. 2. przedstawiono porównanie budowy kulek pełnożelowych i kapsułek.



Rys. 2. Schematyczne porównanie podstawowych typów nośników do unieruchamiania komórek.

Fig. 2. A schematic comparison of the main systems applied to immobilize cells.

Kapsułka składa się z rdzenia otoczonego przez ścianę lub przegrodę o jednorodnej bądź niejednorodnej grubości. Rdzeń może być zbudowany z jednego lub kilku składników, natomiast ściana może mieć budowę jedno- lub wielowarstwową. Technikami wykorzystywanymi do formowania kapsułek są: odparowanie rozpuszczalnika, żelowanie za pomocą jonów, suszenie rozpyłowe, powlekanie, ekstruzja, koacercwacja, denaturacja termiczna i suszenie sublimacyjne [40, 51].

Materiały do unieruchamiania komórek drobnoustrojów i stawiane im wymagania

Materiałami służącymi do produkcji matryc pełnożelowych i membran kapsułek są związki chemiczne syntetyczne i pochodzenia naturalnego, które żelują poprzez wytworzenie pomiędzy cząsteczkami wiązań wodorowych, hydrofobowych, kowalencyjnych lub oddziaływań jonowych [27]. Muszą one spełniać następujące wymagania [22]:

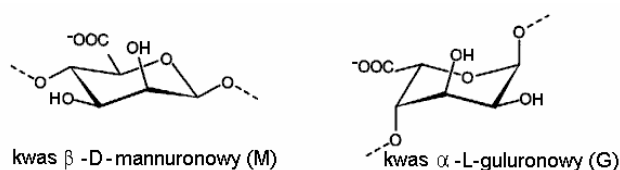
- brak cytotoksyczności w stosunku do unieruchamianych komórek (biokompatybilność),
- łagodna procedura tworzenia żelu (temperatura, nietoksyczne odczynniki sieciujące),
- odpowiednia porowatość tworzonego żelu,
- odpowiednie właściwości mechaniczne oraz chemiczna odporność na działanie składników pożywek mikrobiologicznych,

- dostępność i niski koszt.

Materiał nośnika wpływa na żywotność komórek, ich funkcjonowanie, wzrost i podziały [55]. Syntetyczne polimery (np. żywice epoksydowe, poliuretany, poliakrylamidy), tworzą żełe w warunkach bardzo niekorzystnych dla mikroorganizmów, co sprawia, że w uformowanych nośnikach śmiertelność komórek często przekracza 90%. Często toksyczny jest odczynnik sieciujący, nie zaś sam syntetyczny polimer [32].

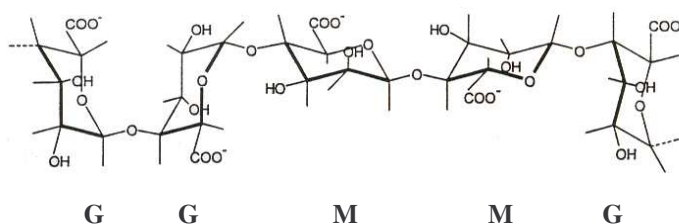
W biotechnologii i przemyśle spożywczym do produkcji matryc do unieruchamiania używa się głównie białek, polisacharydów i alkoholu poliwinylowego. Alkohol poliwinylowy jest syntetycznym związkiem nietoksycznym, może jednak wywoływać spadek żywotności unieruchomionych komórek i utratę ich aktywności [12]. Najpowszechniej stosowanymi związkami są polisacharydy pochodzenia naturalnego, takie jak: alginiany, karageny, agar, agarozę i chitozan [24, 32, 55]. Ich zalety to biokompatybilność oraz dopuszczenie tych związków do stosowania jako dodatków do żywności [17].

Najczęściej stosowanym materiałem do unieruchamiania biokatalizatorów są alginiany [39]. Alginiany to jednowartościowe sole kwasu alginowego, tworzące hydrofilowe koloidy. W biotechnologii, przemyśle spożywczym i farmaceutycznym stosuje się głównie alginian sodu [57]. Alginiany są naturalnymi polisacharydami ściany komórkowej morskich, brązowych glonów (*Phaeophyceae*), a także występują w śluzach niektórych gatunków bakterii [15]. Cząsteczka alginianu jest liniowym kopolimerem zbudowanym z dwóch typów monomerów: kwasu α -L-guluronowego (G) i β -D-mannuronowego (rys. 3). Cząsteczki monomerów są epimerami i mają odwrotne ułożenie przestrzenne w położeniu C5. Umożliwia to utworzenie wiązań glikozydowych 1,4 usytuowanych w przestrzeni, w czterech możliwych pozycjach (rys. 4).

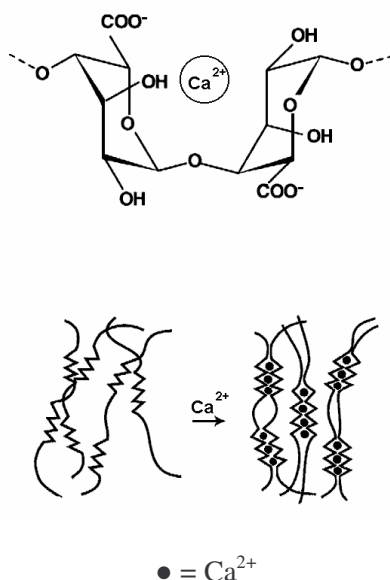


Rys. 3. Monomery alginianu.

Fig. 3. Alginate monomers.



Rys. 4. Fragment łańcucha cząsteczki alginianu.



Rys. 6. Schemat reakcji żelowania alginianu sodu [38].

Fig. 6. A schematic comparison of the sodium alginate gelling reaction.

Zastosowanie kapsułek oraz metody ich wytwarzania

Unieruchamianie substancji aktywnych nie ogranicza się jedynie do komórek drobnoustrojów w procesach biotechnologicznych, ale jest bardzo rozpowszechnione w medycynie [44], przemyśle farmaceutycznym [45], rolnictwie [48], przemyśle spożywczym [25], kosmetycznym i chemicznym [29] oraz ochronie środowiska [12].

Kapsułkowanie jest wykorzystywane na szeroką skalę w medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i chemicznym, w systemach kontrolowanego uwalniania substancji czynnych (np. enzymów, leków) i konstruowaniu sztucznych organów [26]. Zakapsułkowane środki farmakologiczne są uwalniane stopniowo, w ilościach umożliwiających utrzymanie ich stężenia w organizmach ludzi i zwierząt na poziomie leczniczym przez dłuższy okres. Szczególnie interesującą aplikacją, która zapoczątkowała kapsułkowanie komórek zwierzęcych, jest unieruchamianie w kapsułkach fragmentów trzustki produkujących insulinę (tzw. wysepek Langerhansa) w terapii cukrzycy. Podawanie insuliny za pomocą iniekcji nie zapewnia równego poziomu glukozy we krwi i z czasem prowadzi do uszkodzeń wielu tkanek i organów, głównie nerek. Rozwiązaniem może być zastosowanie „sztucznej trzustki” czyli wszczepienie kapsułek z komórkami wytwarzającymi insulinę ludziom, u których trzustka nie produkuje tego hormonu lub produkuje jej zbyt mało. Membrana kapsułek powinna mieć odpowiednią porowatość umożliwiającą swobodny dopływ do komórek tlenu oraz substancji odżywczych i transport na zewnątrz kapsułek produktów

przemiany materii i przede wszystkim heksamerów insuliny o masie cząsteczkowej $36 \cdot 10^3$ Da. Jednocześnie membrana powinna stanowić barierę uniemożliwiającą wnikanie przeciwciał do wnętrza kapsułek i w ten sposób chroniącą komórki unieruchomione w ich rdzeniu przed działaniem układu odpornościowego. Kapsułkowanie umożliwia więc zaprzestanie stosowania leków immunosupresyjnych, nawet gdy wszczep stanowią ksenogeniczne komórki trzustki. Komórki w kapsułkach są w stanie zachować żywotność nawet przez kilka miesięcy [21].

Metoda wytwarzania kapsułek do unieruchamiania wysepek Langerhansa została po raz pierwszy opisana przez Lima i Suna [33]. Formowanie membrany odbywało się w procesie obejmującym 3 etapy. Komórki zawieszono w roztworze alginianu sodu wkroplono do roztworu zawierającego jony wapnia, otrzymując pełne kulki żelowe. Następnie przenoszono je do roztworu polilizyny. Koacerwacja dwóch polielektrolitów – ujemnie naładowanego alginianu i niosącej ładunek dodatni polilizyny prowadziła do powstania membrany koacerwacyjnej. Proces formowania kapsułek kończyło pokrycie ich warstwą polietylenoiminy i upłynnienie rdzenia alginianowego za pomocą cytrynianu sodu. Modyfikacja dokonana przez O'Shea i wsp. [43] polegała na zastąpieniu polietylenoiminy kolejną warstwą alginianu, w celu osiągnięcia większej biokompatybilności. W większości prac badawczych, dotyczących wytwarzania kapsułek, modyfikowano metodę opisaną przez Lima i Suna, np. zastępując polilizynę chitozanem, czy też zwiększając liczbę kolejnych warstw membrany, nawet do pięciu. Identyczne mechanizmy formowania kapsułek, polegające na koacerwacji anionowego siarczanu celulozy z kationowym chlorkiem polimetyloamonowym lub alginianu, siarczanu celulozy, chlorku wapnia i polimetylenoguanidyny (żelowanie jonowe i koacerwacja) opisał Hunkeler [21].

W biotechnologii dominuje unieruchamianie komórek i innych substancji aktywnych w pełnych żelach, głównie z alginianu wapnia. Wynika to z prostoty i niskiego kosztu tej metody. Istnieją jednak prace badawcze, w których stosuje się z powodzeniem kapsułkowanie materiałów biologicznych, np. produkcja przeciwciał monoklonalnych [20, 50, 61], hodowla komórek zwierzęcych [59], wspólne unieruchomienie drożdży i enzymu [35] oraz kapsułkowanie komórek bakterii [16, 47]. Większość tych aplikacji wykorzystuje identyczne metody preparowania kapsułek, znane z zastosowań medycznych, czy odwołuje się do informacji z tej dziedziny, odnośnie formowania membrany. Zastosowanie przez Posillico [50] kapsułek preparowanych zgodnie z metodą opisaną przez Lima i Suna umożliwiło hodowlę komórek hybrydomy do produkcji przeciwciał monoklonalnych na skalę przemysłową. Przeszkodą w masowej produkcji kapsułek była wysoka cena odczynników (polilizyna) oraz skomplikowana procedura wytwarzania kapsułek, np. rozpuszczanie alginianowego rdzenia w cytrynianie uszkadza często kapsułki i prowadzi do ich pęcznienia [44].

Perspektywy wykorzystania kapsułkowania do produkcji skoncentrowanych starterów bakterii fermentacji mlekowej

Interesującym przykładem zastosowania unieruchomionych drobnoustrojów jest hodowla bakterii fermentacji mlekowej w pełnych żelach, w której łączy się etap namnażania komórek z ich zagęszczaniem. Początkowo unieruchomione bakterie były najczęściej wykorzystywane do produkcji kwasu mlekowego [52]. Zastosowanie bakterii unieruchomionych w pełnych żelach okazało się także korzystne w produkcji starterów mleczarskich, ponieważ zagęszczenie komórek hodowanych w żelach alginianowych było do 100 razy wyższe niż w tradycyjnych hodowlach zawiesinowych (tab. 1).

Tabela 1

Przykłady hodowli unieruchomionych komórek bakterii fermentacji mlekowej w pełnych kulkach żelowych [1, 7, 34, 37].

Cell densities of lactic acid bacteria immobilized in the whole-gel beads.

Gatunek bakterii Bacteria species	Typ fermentacji Type of fermentation	Materiał do unieruchamiania Material used to immobilize cells	Uzyskana gęstość komórek Cell density obtained
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i>	ciągła	alginian wapnia	2×10^{10} jtk g^{-1} kulek żelowych
	ciągła	alginian wapnia	$1,6 \times 10^{10}$ jtk $\cdot \text{cm}^{-3}$ kulek żelowych
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var <i>diacetylactis</i>	ciągła	alginian wapnia	90-175 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ kulek żelowych
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	okresowo-dolewowa	karagen	$2,5 \times 10^{10}$ jtk $\cdot \text{cm}^{-3}$ kulek żelowych
	okresowa	alginian wapnia	6×10^{10} jtk g^{-1} kulek żelowych
<i>Bifidobacterium longum</i>	okresowo-dolewowa	karagen	$4,7 \times 10^{10}$ jtk g^{-1} kulek żelowych

Z uwagi na wysokie koszty separacji komórek z zawiesin (czasami dochodzące do 60% ogólnych kosztów), unieruchomienie komórek w żelach jest ekonomicznie uzasadnione. Żelowe nośniki mają wymiary milimetrowe, dlatego po hodowli mogą być oddzielone od pożywki wraz z komórkami za pomocą zwykłych sit. Separacja nie wymaga zatem stosowania kosztownych, specjalistycznych urządzeń (wirówki, filtry). Unieruchomienie w żelach umożliwia łatwe wydzielenie komórek bakterii fermentacji mlekowej z pożywek zawierających dużą frakcję cząstek stałych, np. z pożywek serwatkowych. W celu oddzielenia komórek od żelu, rozpuszcza się żelowe matryce w buforach cytrynianowych lub fosforanowych (alginiany) lub rozdrabnia mechanicznie (karageny). Można także liofilizować unieruchomione komórki łącznie z

żelowym nośnikiem, gdy kultury starterowe są przeznaczone do produktów, w których stosuje się zagęstniki hydrokoloidowe [7].

Podstawową wadą pełnych kulek żelowych jest ucieczka komórek z nośników do pożywki. Przyczyną tego zjawiska są znaczne opory w transporcie substratów i produktów pomiędzy matrycą i nośnikiem. W rezultacie prawie cała biomasa koncentruje się w pobliżu powierzchni kulek. Intensywny wzrost komórek na obrzeżach matrycy powoduje erozję żelu, czego wynikiem jest uszkodzenie nośnika i uwalnianie się komórek [31].

Obiecującym sposobem przezwyciężenia tych niedogodności może być zastosowanie kapsułkowania. Zainteresowanie kapsułkowaniem wzrasta, o czym świadczą prace dotyczące charakterystyki różnych typów kapsułek pod względem warunków ich formowania, cech mechanicznych i dyfuzyjnych [3, 9, 10, 41]. Kapsułki próbuje się zastosować do unieruchamiania enzymów np. oksydazy glukozowej, katalazy czy ureazy [4, 19]. W literaturze spotyka się także pojedyncze prace dotyczące kapsułkowania komórek bakterii fermentacji mlekowej do produkcji kwasu mlekowego [60]. Nieliczne są jednak informacje dotyczące wykorzystania kapsułkowania do produkcji skoncentrowanych kultur bakterii fermentacji mlekowej [11].

Wykorzystanie w pełni potencjału kapsułkowania w biotechnologii będzie możliwe po opracowaniu prostych i tanich metod produkcji kapsułek, z jak najmniejszą liczbą etapów formowania membrany, korzystających z niedrogich odczynników, dzięki czemu możliwa będzie wydajna produkcja kapsułek na dużą skalę. Przeszkodą w bezpośrednim przeniesieniu do biotechnologii procedur kapsułkowania stosowanych w medycynie, oprócz dużego stopnia ich skomplikowania, jest także wytrzymałość mechaniczna otrzymywanych kapsułek. Komórki stosowane do celów terapeutycznych nie dzielą się i nie rosną w kapsułkach, po wszczepieniu do organizmu kapsułki nie są narażone na naprężenia mechaniczne. Wystarczająca jest więc wytrzymałość kapsułek na ściskanie rzędu 0,5 N. Kapsułki odporne na ściskanie siłą 7 N określane są jako bardzo wytrzymałe [21]. Wydaje się, że wytrzymałość tego rzędu byłaby niewystarczająca w procesach biotechnologicznych, biorąc pod uwagę siły ścinające, powstające podczas mieszania w fermentorach czy warunki panujące w złożach upakowanych kapsułek. Prowadzi się więc badania nad warunkami formowania membrany kapsułek poprzez kompleksowanie różnych substancji np. kationowego chitozanu z polianionitami: alginianami, karagenami czy gumą ksantanową w celu opracowania nowych metod kapsułkowania [14, 54, 58].

Podsumowanie

Wykorzystanie kapsułek do produkcji skoncentrowanej biomasy bakterii może być alternatywą dla hodowli zawiesinowych i hodowli komórek unieruchomionych w pełnych hydrożelach. Komórki umieszczone w kapsułkach mają lepsze warunki wzrostu niż w nośnikach pełnożelowych i nie wymagają złożonych technik separacji.

Opracowanie w przyszłości nowych, tanich metod wytwarzania kapsulek o dużej wytrzymałości mechanicznej i odporności na czynniki hodowlane powinno przyczynić się do zwiększenia popularności metody kapsułkowania komórek drobnoustrojów.

Literatura

- [1] Audet P., St-Gelais D., Roy D.: Production of mixed cultures of non-isogenic *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* using immobilized cells. *Milchwissenschaft*, **50**, 1995, 18-22.
- [2] Berger A., Marison I., Stark D., von Stockar U., Widmer F., Heinzen Ch.: Production and characterization parameters of liquid core capsules (LCC) for biological and non-biological applications. In: "Bioencapsulation in biomedical, biotechnological and industrial applications" IX International BRG Workshop and 62th ICB Seminar Proc., Warsaw, Poland 2001, S. III-3.
- [3] Blandino A., Macías M., Cantero D.: Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics. *J. Bioscie. Bioengin.*, **88**, 1999, 686-689.
- [4] Blandino A., Macías M., Cantero D.: Modelling and simulation of a bienzymatic reaction system co-immobilised within hydrogel-membrane liquid-core capsules. *Enzyme Microb. Technol.*, **31**, 2002, 556-565.
- [5] Braccini I., Grasso R. P., Pérez S.: Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydr. Res.*, **317**, 1999, 119-130.
- [6] Castillo E., Rodríguez M., Casas L., Quintero R. and López-Munguía A.: Design of two immobilized cell catalysts by entrapment on gelatin: Internal diffusion aspects. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 1991, 127-133.
- [7] Champagne C. P., Lacroix C. and Sodini-Gallot I.: Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **14**, 1994, 109-134.
- [8] Decho A. W.: Imaging an alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy. *Carbohydr. Res.*, **315**, 1999, 330-333.
- [9] Dembczyński R., Jankowski T.: Characterization of small molecules diffusion in hydrogel-membrane liquid core capsules. *Bioch. Engin. J.*, **6**, 2000, 41-44.
- [10] Dembczyński R., Jankowski T.: Determination of pore diameter and molecular weight cut-off of hydrogel-membrane liquid-core capsules for immunoisolation. *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **12**, 2001, 1051-1058.
- [11] Dembczyński R., Jankowski T.: Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. *Enzymes Microb. Technol.*, **31**, 2002, 111-115.
- [12] Dos Santos V. A. P., Vasilevska T., Kajuk B., Tramper J., Wijffels R. H.: Production and characterization of double-layer beads for coimmobilization of microbial cells. *Biotechnol. Ann. Rev.*, **3**, 1997, 227-244.
- [13] Draget K. I., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O.: Alginate based new materials. *Inter. J. Biol. Macromol.*, **21**, 1997, 47-55.
- [14] Dumitriu S., Chornet E., Vidal P. F., Moresoli C.: Polyionic hydrogels as support for immobilization of lipase. *Biotechnol. Techniques*, **9**, 1995, 833-836.
- [15] Ertesvåg H., Valla S.: Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stabil.*, **59**, 1998, 85-91.
- [16] Förster M., Mansfeld J., Dautzenberg H., Schellenberger A.: Immobilization in polyelectrolyte complex capsules: Encapsulation of a gluconate-oxidizing *Serratia marcescens* strain. *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 1996, 572-577.
- [17] Groboillot A., Boadi D. K., Poncelet D., Champagne C.P., Neufeld R. J.: Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **14**, 1994, 75-107.
- [18] Gröhn P., Klöck G., Zimmermann U.: Collagen-coated Ba²⁺-alginate microcarriers for the culture of anchorage-dependent mammalian cells. *BioTechniques*, **22**, 1997, 970-975.
- [19] Hearn E., Neufeld R. J.: Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease. *Process Biochem.*, **35**, 2000, 1253-1260.

- [20] Hsu Y. L., Chu I. M.: Poly(ethylenimine)-reinforced liquid-core capsules for the cultivation of hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1992, 1300-1309.
- [21] Hunkeler D.: Polymers for bioartificial organs. *Trends Polym. Sci.*, **5**, 1997, 286-293.
- [22] Hunkeler D., Prokop A., Powers A., Haralson M., Di Mari S., Wang T. A.: Screening of polymers as biomaterials for cell encapsulation. *Polym. News*, **22**, 1997, 232-240.
- [23] Húska J., Závadská I., Tóth D., Gemeiner P.: Performance of immobilized cells for dihexyl sulfosuccinate biotransformation. *Folia Microbiologica*, **42**, 1997, 505-508.
- [24] Jankovský M., Vašáková L.: Immobilization in alginate gels. *Veterinary Medicine - Czech*, **5**, 1996, 159-164.
- [25] Jankowski T.: Mikrokapsułkowanie składników żywności. W: Food product development – opracowywanie nowych produktów żywnościowych - pod red. J. Czapskiego, Wyd. AR Poznań 1995, 259-276.
- [26] Jankowski T.: Biohybrydowe, sztuczne narządy w terapii chorób układowych. *Biotechnologia*, **44**, 1999, 45-58.
- [27] Jen A. C., Wake M. C., Mikos A. G.: Review: Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 1996, 357-364.
- [28] Kennedy J. F., Cabral J. M. S.: Immobilized living cells and their applications. In: *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 4, Chibata and Wingard L. B., Jr., Eds., Academic Press, New York 1983, 189.
- [29] King A. H.: Encapsulation of food ingredients. A review of available technology focusing on hydrocolloids. In: ACS Symposium Series No. 590. "Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients". Risch S. J. and Reineccius G. A., Eds., Washington 1995, 26-39.
- [30] Klein J., Vorlop, K. D.: Immobilization techniques – cells. In: *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2, Moo-Young M., Cooney C. L., Humphrey A. E. Eds., Pergamon Press, Oxford, New York 1985.
- [31] Lacroix Ch., Pavillon P.-C.: Control and modulation of probiotic cultures characteristics using immobilized cell technology. In: "Cell physiology and interactions of biomaterials and matrices" COST 840 and X International BRG Workshop on Bioencapsulation, Physiology and morphology of immobilized cells, Prague, Czech Republic 2002, 50.
- [32] Leenen E. J. T. M., Dos Santos V.A. P., Grolle K. C. F., Tramper J., Wijffels R.: Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewaters treatment. *Water Resources*, **30**, 1996, 2985-2996.
- [33] Lim F., Sun A. M.: Microencapsulated islets as a bioartificial endocrine pancreas. *Science*, **210**, 1980, 908-910.
- [34] Maitrot H., Paquin C., Lacroix Ch. and Champagne C.P.: Production of concentrated freeze-dried cultures of *Bifidobacterium longum* in κ-carrageenan-locust bean gum gel. *Biotechnol. Tech.*, **11**, 527-531.
- [35] Mansfeld J., Förster M., Hoffmann T., Schellenberger A.: Coimmobilization of *Yarrowia lipolytica* cells and invertase in polyelectrolyte complex microcapsules. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 1995, 11-17.
- [36] Mofidi N., Aghai-Moghadam M., Sarbolouki M. N.: Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochem.*, **35**, 2000, 885-888.
- [37] Morin N., Bernier-Cardou M., Champagne C.P.: Production of concentrated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suspensions in calcium alginate beads. *App. Envir. Microbiol.*, **58**, 1992, 545-550.
- [38] Morris V. J. Gelation of polysaccharides. In: *Gum and stabilizers for the food industry*. Philips G. O., Wedlock W., Williams P. A., Eds., Pergamon Press, Oxford 1984, **2**, 57.
- [39] Navrátil M., Sturdik E.: Bioactive components in productions using immobilized biosystems. *Biologia*, **54**, 1999, 635-648.
- [40] Neau S. H., Goskonda S. R., Upadrashta S. M., Thies C. A., Tripp S. I.: Encapsulation of a volatile oil by ionic gelation of alginate. *Am. J. Pharm. Educ.*, **57**, 1993, 126-129.
- [41] Nussinovitch A., Gershon Z., Nussinovitch M.: Liquid-core hydrocolloid capsules. *Food Hydrocolloids*, **10**, 1996, 21-26.
- [42] Nussinovitch A., Gershon Z., Nussinovitch M.: Temperature stable liquid core hydrocolloid capsules. *Food Hydrocolloids*, **11**, 1997, 209-215.
- [43] O'Shea G. M., Goosen M. F. A., Sun A. M.: Prolonged survival of transplanted islets of langerhans encapsulated in a biocompatible membrane. *Bioch. Bioph. Acta*, **804**, 1984, 133-135.

- [44] Orive G., Ponce S., Hernández R. M., Gascón A. R., Igartua M., Pedraz J. L.: Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different types of alginates. *Biomaterials*, **23**, 2002, 3825-3831.
- [45] Østberg T., Graffner Ch.: Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration. I. Pilot investigations of production method. *Acta Pharmaceutica Nordica*, **4**, 1992, 201-208.
- [46] Palmieri G., Giardina P., Desiderio B., Marzullo L., Giamberini M., Sannia G.: A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 1994, 151-158.
- [47] Park J. K., Jung J. Y.: Production of benzaldehyde by encapsulated whole-cell benzoylformate decarboxylase. *Enzyme Microb. Technol.*, **30**, 2002, 726-733.
- [48] Pepperman A., Kuan J.-Ch. W.: Controlled release formulations of alachlor based on calcium alginate. *J. Contr. Release*, **34**, 1995, 17-23.
- [49] Pilkington P. H., Margaritis A., Mensour N. A.: Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **18**, 1998, 237-255.
- [50] Posillico E. G.: Microencapsulation technology for large-scale antibody production. *Biotechnology*, **4**, 1986, 114-117.
- [51] Pothakamury U. R., Barbosa-Cánovas G. V.: Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 1995, 397-406.
- [52] Roukas T., Kotzekidou P.: Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 1998, 199-204.
- [53] Ryder D. S., Immobilized yeast in brewing: to immobilize or not to immobilize – that is the question ? In: “Cell physiology and interactions of biomaterials and matrices” COST 840 and X International BRG Workshop on Bioencapsulation, Physiology and morphology of immobilized cells, Prague, Czech Republic 2002, IL-1,1.
- [54] Sakiyama T., Chu Ch.-H., Fuji T., Yano T.: Preparation of a polyelectrolyte complex gel from chitosan and κ-carrageenan and its pH-sensitive swelling. *J. App. Polym. Scie.*, **50**, 1993, 2021-2025.
- [55] Shoichet M. S., Li R. H., White M. L., Winn S. R.: Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 1995, 374-381.
- [56] Sundaram P. V., Pye E. K.: *Enzyme Engineering 2*, Plenum Press, New York. 1974, 449.
- [57] Takka S., Acartürk F.: Calcium alginate microparticles for oral administration: III: The effect of crosslink agents and various additive polymers on drug release and drug entrapment efficiency. *Pharmazie*, **54**, 1999, 137-139.
- [58] Tay L.-F., Khoh L.-K., Loh Ch.-S., Khor E.: Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1993, 449-454.
- [59] Wang F. F., Wu C. R., Wang Y. J.: Preparation and application of poly(vinylamine)/alginate microcapsules to culturing of a mouse Erythroleukemia cell line. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1992, 1115-1123.
- [60] Yoo I., Seong G. H., Chang H. N., Park J. K.: Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 1996, 428-433.
- [61] Yoshioka T., Hirano R., Shioya T., Kako M.: Encapsulation of mammalian cell with chitosan-CMC capsule. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1990, 66-69.

CELL ENCAPSULATION – CURRENT PRACTICE AND FUTURE APPLICATIONS

S u m m a r y

In the paper, the basic information on cell immobilization by encapsulation was described. Properties of the alginate, the most popular material used for immobilization, were characterized. The main encapsulation techniques were reviewed, as were some examples of the encapsulated cell applications.

Key words: immobilization, alginate, liquid-core capsules, whole-gel beads, and lactic acid bacteria. ☒

KAMILA MYSZKA, KATARZYNA CZACZYK

ROLA EGZOPOLISACHARYDÓW MIKROBIOLOGICZNYCH W TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI

Streszczenie

Poznanie wszystkich czynników determinujących biosyntezę egzopolisacharydów drobnoustrojowych jest bardzo istotne. Wykorzystując bowiem odpowiednio skomponowane podłoże hodowlane, pod względem źródła węgla, energii, mikroelementów czy pH, możliwe jest otrzymanie materiału o funkcjonalnym charakterze. Wydzielane na zewnątrz komórki polisacharydy (głównie w formie śluzu) mają duże znaczenie w technologii żywności. Węglowodany pochodzenia mikrobiologicznego, takie jak: ksantan, kurdlan, pululan czy alginian, charakteryzują się wieloma cechami, których nie mają polimery roślinne. Dodatek tych związków do produktów spożywczych ma na celu utrzymanie pożądanej konsystencji, zwiększenie lepkości, zmniejszenie strat wody w czasie obróbki i przechowywania oraz produkcję żywności niskokalorycznej. Obecnie substancje te stosowane są również do produkcji wytrzymałych i jadalnych powłok, które zabezpieczają produkt przed zepsuciem. W niniejszej pracy przedstawiono także aspekt higieniczny syntezy egzopolisacharydów mikrobiologicznych, jako potencjalnego źródła skażenia gotowych wyrobów przeznaczonych do obrotu handlowego. Substancje te uczestniczą w procesach tworzenia się stabilnego mechanicznie biofilmu, co utrudnia utrzymanie czystości w zakładach produkcyjnych. Mikroorganizmy wytwarzają pozakomórkowo ściśle zdefiniowane pod względem struktury polisacharydy, które mogą być wskaźnikami występujących w danym środowisku zanieczyszczeń. Ta właściwość ma kluczowe znaczenie w poszukiwaniach efektywnych metod higienizacyjnych różnych powierzchni użytkowych.

Słowa kluczowe: egzopolisacharydy, higiena, biofilm.

Wstęp

Badania naukowe nad istotą oraz właściwościami egzopolisacharydów mikrobiologicznych doprowadziły do zwiększenia ich znaczenia w różnych gałęziach gospodarki. Poprawa jakości, w tym i tekstury produktów spożywczych, a także produkcja żywności „nowej generacji” nie byłaby możliwa bez zastosowania polisacharydów. Przy wysokich kosztach izolacji węglowodanów z masy roślinnej i ich przetwarzania do formy użytecznej, na szczególną uwagę zasługuje otrzymywanie

tych związków na drodze mikrobiologicznej. Wykorzystując aktywne szczepy mikroorganizmów możliwe jest pozyskanie w krótkim czasie tego, co w świecie organizmów wyższych powstaje znacznie dłużej.

Polisacharydy, podobnie jak białka, stanowią główne związki EPS (ang. extracellular polymeric substances) syntetyzowane przez komórki drobnoustrojów. Egzopolisacharydy są słabo lub w ogóle niezwiązane z komórką mikroorganizmu. Wydzielane do podłoża bądź akumulowane na powierzchni komórki w formie śluzu tworzą struktury wyższego rzędu [2, 3, 4, 9].

W przemyśle spożywczym znaczenie mają następujące grupy polisacharydów mikrobiologicznych [9, 20, 28]:

- Homopolisacharydy – syntetyzowane przez bakterie wykorzystujące sacharozę jako źródło węgla. Nieobecność tego związku nie hamuje wzrostu komórek drobnoustrojów, lecz uniemożliwia syntezę EPS. Homopolisacharydy drobnoustrojowe zawierają w cząsteczce tylko jeden typ monosacharydu: D-glukozę lub L-fruktozę. Egzopolisacharydy tej grupy wytwarzane są przede wszystkim przez bakterie z rodzajów *Streptococcus* oraz *Leuconostoc*;
- Heteropolisacharydy – syntetyzowane przez większość organizmów eukariotycznych i prokariotycznych. Biopolimery tej grupy charakteryzują się powtarzającymi cyklicznie sekwencjami monosacharydów: D-glukozy, D-galaktozy, L-fruktozy, L-ramnozy czy kwasów: D-glukuronowego, L-guluronowego i D-mannuronowego;
- Alginian – biopolimer złożony jedynie z dwóch monomerów (kwasu D-mannuronowego oraz kwasu L-guluronowego) o wolnych grupach acetylowych. W odróżnieniu od heteropolisacharydów poprzedniej grupy, alginian w swojej strukturze nie zawiera cyklicznie powtarzających się sekwencji.

Stwierdzono, że struktura EPS wykazuje specyficzność gatunkową lub szczepową zarówno co do składu cukrów prostych (stanowiących podjednostkę EPS), jak i rodzaju wiązań chemicznych czy podstawników niecukrowych. Niekiedy postać egzopolisacharydów może także zależeć od intensywności wzrostu komórek [5].

Warunki środowiskowe syntezy egzopolisacharydów mikrobiologicznych

Badania dowodzą, że rozmaite związki inicjują syntezę bądź mogą ulec przekształceniu w polisacharydy. Każdy mikroorganizm wykorzystuje ściśle zdefiniowane źródła węgla, azotu i mikroelementów, przy jednoczesnym braku korelacji pomiędzy strukturą wytwarzanych biopolimerów a rodzajem substratów tej reakcji. Wykazano, że drogi metaboliczne formowania się egzopolisacharydów i innych rodzajów polisacharydów mikrobiologicznych mają na pewnych etapach zbliżony przebieg. Takie pozakomórkowe systemy zaangażowane w biosyntezę danego związku, przez swoją lokalizację w membranie, mogą być wykorzystywane przez komórki współtworzące mikrokolonie [28].

Obecnie w wielu ośrodkach na całym świecie prowadzone są badania nad technologią otrzymywania mikrobiologicznych polimerów, sprecyzowaniem warunków hodowlanych, w jakich drobnoustroje syntetyzowałyby polisacharydy o danych cechach i z wysoką wydajnością oraz nad metodami oczyszczania końcowego produktu. Za istotne czynniki procesu biosyntezy uważa się temperaturę hodowli, kwasowość środowiska, skład podłoża oraz jego natlenienie.

W zależności od specyfiki aparatu enzymatycznego, np. grzybów z rodzaju *Aureobasidium*, bezpośrednim induktorem biosyntezy EPS są cukry (głównie glukoza, ale także fruktoza, mannoza, maltoza, ksyliza, ryboza, arabinoza, sacharoza i laktoza), a w przypadku *Myxococcus xanthus* – aminokwasy [9, 15, 19, 25, 26, 28]. Gandhi i wsp. [8], badając różne gatunki bakterii z rodzaju *Bacillus*, izolowanych z zainfekowanych części roślin, wykazali istotny (indukujący) wpływ siarczanu amonu oraz chlorku amonu na wytwarzanie egzopolisacharydów. U wybranych szczepów *Escherichia coli* wydzielanie pozakomórkowych polisacharydów odbywa się zwykle w warunkach ograniczonej podaży związków: azotu, fosforu, siarki i potasu, a u *Enterobacter aerogenes* – przy wysokiej koncentracji jonów magnezu, potasu i wapnia w podłożu hodowlanym [28].

Jednym z czynników determinujących postać morfologiczną drobnoustrojów jest kwasowość środowiska. Synteza biopolimerów zależy od kształtu komórek, a zatem odczyn środowiska wzrostu wpływa znacząco na efektywność produkcji zewnątrzkomórkowych polisacharydów. Wysoka kwasowość (pH 2–3) lub silnie alkaliczny odczyn środowiska (pH \geq 10) są skutecznymi inhibitorami wzrostu komórek i syntezy EPS większości bakterii saprofitycznych oraz patogennych [24]. W tych warunkach pewne gatunki grzybów rosną jedynie w postaci mycelium, wytwarzając tylko śladowe ilości egzopolisacharydów [9, 17]. Intensywna produkcja pozakomórkowych węglowodanów, w zależności od rodzaju mikroorganizmu, obserwowana jest na pożywce o pH 5–7 [8, 9, 17, 27].

Optymalna temperatura syntezy egzopolisacharydów przez większość grzybów, w tym szczepów rodzaju *Aureobasidium*, kształtuje się w zakresie 25–28°C, a dla bakterii z rodzaju *Bacillus* wynosi 36–44°C [9, 17]. W obu powyższych przypadkach odnotowano analogiczną zależność, a mianowicie żaden z przebadanych drobnoustrojów nie wytwarzał efektywnie pozakomórkowo węglowodanów poniżej optymalnego zakresu temperatury.

Aspektem fizycznym istotnym w biosyntezie EPS, obok ruchu podłoża, jest napowietrzanie hodowli, np. *Enterobacter aerogenes* wymaga silnego napowietrzania podłoża w bioreaktorze, natomiast *Rhizobium meliloti* – bardzo małego [28].

Egzopolisacharydy bakteryjne są wytwarzane najintensywniej na etapie logarytmicznego wzrostu komórek. Wykazano, że tempo syntezy powyższych biopolimerów utrzymywane jest na stałym poziomie w czasie rozmnażania wegetatywnego komórek. Jakiegokolwiek zmiany w biosyntezie substancji EPS zaobserwowano w momencie utraty integralności komórek spowodowanej deficytem

jonów magnezu w otaczającym medium [28]. Wpływ fazy wzrostu na wytwarzanie polisacharydów drobnoustrojowych jest cechą gatunkową, a nawet szczepową. U pewnych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* najintensywniejsza synteza biopolimerów odnotowana została w czasie trwania fazy stacjonarnej oraz przy końcu fazy logarytmicznej, u innych podczas całej fazy wykładniczego wzrostu komórek [28].

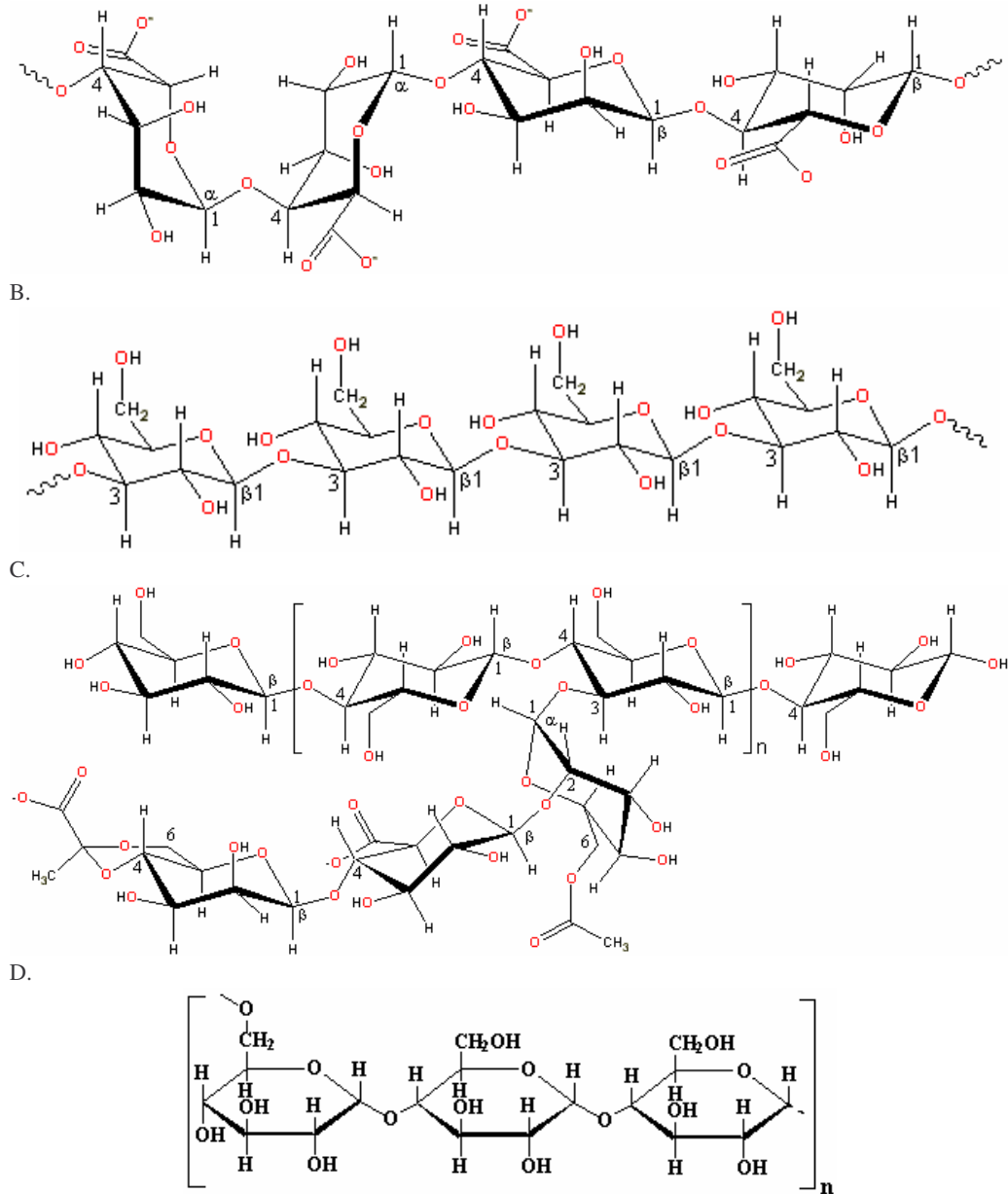
Obecnie w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności prowadzone są badania nad znaczeniem wybranych czynników hodowlanych (temperatura, pH oraz dostępność składników odżywczych) w syntezie zewnątrzkomórkowych polisacharydów i ich rolę w adhezji komórek *Bacillus* sp. do powierzchni stałych. Przeprowadzone dotychczas eksperymenty potwierdziły wpływ wyżej opisanych czynników środowiskowych na syntezę egzopolisacharydów drobnoustrojowych (dane niepublikowane).

Zastosowanie egzopolisacharydów mikrobiologicznych w produkcji żywności

Literatura przedmiotu dostarcza częstych porównań mikrobiologicznych egzopolisacharydów z węglowodanami wytwarzanymi przez rośliny. Biomasa komórek drobnoustrojów traktowana jest obecnie jako nowe, potencjalne źródło biopolimerów, mogących znaleźć liczne zastosowania, przede wszystkim w technologii żywności. W przemyśle spożywczym nadal dominują polisacharydy pochodzenia roślinnego. Produkcja mikrobiologicznych polimerów, ze względu na koszt całego procesu biotechnologicznego i trudności w prowadzeniu hodowli, nie jest na razie wystarczająco konkurencyjna. Czynnikiem decydującym o opłacalności produkcji egzopolisacharydów jest odpowiednia aktywność drobnoustrojów otrzymywanych za pomocą metod mutagenizacji bądź manipulacji genetycznych. Szczepy wykorzystywane na skalę przemysłową do produkcji biopolimerów powinny być stabilne genetycznie i charakteryzować się obniżoną zdolnością utleniania monosacharydów do kwasów organicznych [12].

Egzopolisacharydy bakteryjne ze względu na trwałość, funkcjonalność oraz odtwarzalność fizycznych czy chemicznych właściwości mogłyby okazać się pomocne w dążeniach producentów żywności do ciągłej poprawy jakości i tekstury produktów. Ogólnie, za użyteczne w przetwórstwie żywności uważa się m.in. takie polisacharydy zewnątrzkomórkowe, jak: alginian, ksantan, pululan czy kurdlan. Wzory strukturalne powyższych biopolimerów przedstawiono na rys. 1.

A.



Rys. 1. Wzory strukturalne egzopolisacharydów mikrobiologicznych: A – alginian, B – kurdlan, C – ksantan, D – pululan [32, 33, 34, 35].

Fig. 1. Structural models of microbiological exopolysaccharides: A – alginate, B – curdlan, C – xanthan, D – pululan [32, 33, 34, 35].

Alginian występuje w ścianach komórkowych *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz brunatnic (*Phaeophyta*) w ilości 13-38% suchej masy [25]. Właściwości tego biopolimeru zależą od stopnia spolimeryzowania oraz stosunku

kwasu guluronowego do mannuronowego w makrocząsteczce. Alginiany nadają roztworom wodnym dużą lepkość oraz właściwości pseudoplastyczne. Za najważniejszą jednak właściwość tych polisacharydów uważa się zdolność tworzenia elastycznych żeli (około 1/3 wszystkich aplikacji w przetwórstwie żywności), które nie ulegają zjawisku retrogradacji. Właściwości żelujące alginianów mikrobiologicznych wykorzystuje się przy produkcji niskokalorycznych zup oraz deserów. Zdolność tych polimerów do obniżania napięcia powierzchniowego na granicy dwóch faz pozwala na ich zastosowanie w technologii produkcji sosów do sałatek, kremów do ciast czy bitej śmietany [25, 28].

Ksantan jest heteropolisacharydem syntetyzowanym przez bakterie z rodzaju *Xanthomonas* (tj. *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. oryzae*). W 1969 r. organizacja FDA (Food and Drug Administration, USA) uznała powyższy biopolimer za związek niestanowiący zagrożenia dla zdrowia człowieka i dopuściła go do powszechnego stosowania w Stanach Zjednoczonych. Dostępne publikacje dowodzą, że ksantan zastąpił polisacharydy pozyskiwane z roślin bądź z alg na drodze ekstrakcji. W przemyśle koncentratów spożywczych ksantan może być użyty jako środek zagęszczający i stabilizujący. W technologii produkcji sosów do sałatek czy produktów typu „dressing” powyższy polisacharyd może zapobiec dyspersji nierozpuszczalnych cząstek zewnętrznej fazy olejowej oraz ułatwić łączenie ze sobą poszczególnych komponentów danych produktów. Ksantan pochodzenia mikrobiologicznego nadaje roztworom wysoką lepkość, a wyroby otrzymane z jego udziałem są trwałe w szerokim spektrum pH, temperatury oraz siły jonowej podłoża. W piekarstwie oraz cukiernictwie ksantan, poprzez kohezję z cząsteczkami skrobi, może poprawić strukturę, a także przedłużyć czas przechowywania produktów gotowych. Ponadto, powyższy zewnątrzkomórkowy polisacharyd wiążąc wolną wodę, odpowiedzialną za zjawisko synerezy, stabilizuje i poprawia jakość wyrobów mrożonych. Jako środek słodzący i teksturotwórczy ksantan kształtuje właściwą konsystencję, aromat oraz smak niskokalorycznych napojów i produktów przeznaczonych dla diabetyków. Wykorzystując synergistyczne interakcje pomiędzy ksantanem a galaktomannanem (stosunek 1:1), można także doprowadzić do wzrostu lepkości i uzyskać pożądaną strukturę mlecznych produktów pasteryzowanych, co nie byłoby możliwe stosując czyste roztwory hydrokoloidów [10, 25, 30].

Kurdlan należy do egzopolisacharydów syntetyzowanych przez *Alcaligenes faecalis* oraz rodzaj *Agrobacterium* [29]. Możliwości zastosowania w przetwórstwie spożywczym kurdlanu związane są głównie ze zdolnością zestalania (żelowania) tego związku. Kurdlan tworzy termoplastyczne żele, które są stabilne w szerokim zakresie pH (od 3 do 9,5) oraz temperatury (od 140 do 160°C). Powyższa właściwość wskazuje na możliwość wykorzystania tego polimeru w produkcji wyrobów cukierniczych. Nie ulega on trawieniu w przewodzie pokarmowym, przez co charakteryzuje się niską wartością kaloryczną. Polisacharyd ten może być wykorzystywany w produkcji zup oraz deserów, ponieważ jest dodatkiem nadającym płynom pseudoplastyczny

charakter, zagęszczającym oraz stabilizującym żywność [4, 29]. Podobnie jak pululan, kurdlan wykorzystywany jest również przy tworzeniu biodegradowalnych i nierozpuszczalnych w wodzie błon, stanowiących formę opakowania wyrobów cukierniczych [29].

Pululan jest pozakomórkowym węglowodanem szeroko opisywanym w dostępnej literaturze, produkowanym w skali technicznej przez trzy przedsiębiorstwa: Sigma Chemical (USA), Hayashibara Biochemical Laboratories (Japonia) oraz Sumitomo Company (Japonia). Pululan syntetyzuje rozpowszechniony w przyrodzie saprofit *Aureobasidium pullulans*, występujący głównie na powierzchni owoców, takich jak wiśnie, jabłka i gruszki. Wodny, 5-10% roztwór pululanu jest substancją bezbarwną, bez zapachu, jadalną, stąd może być zastosowany w formie nieprzepuszczalnej dla tlenu powłoki produktów spożywczych, chroniąc wyrób gotowy przed niepożądanymi reakcjami oksydacyjnymi. W tym celu wystarczy na powierzchni wyrobu gotowego rozprowadzić, z użyciem natrysku, cienką warstwę roztworu pululanu. W procesie częściowej lub całkowitej estryfikacji pululanu otrzymuje się folie nierozpuszczalne w wodzie, których elastyczność można kształtować przez dodatek sorbitolu bądź glicerolu. Przetłaczanie sproszkowanego pululanu z niewielką ilością wody pod ciśnieniem umożliwia otrzymywanie materiału o właściwościach zbliżonych do polistyrenu. Otrzymane w ten sposób tworzywo charakteryzuje się dużą trwałością, wytrzymałością oraz rozpuszczalnością w wodzie i mogłoby zastąpić wiele opakowań stosowanych w przetwórstwie żywności z racji swej nietoksyczności i biodegradowalności [9]. Celem obniżenia kaloryczności produktów spożywczych i jednocześnie nadaniu im odpowiedniej struktury, pululan można również dodawać bezpośrednio do żywności jako zamiennik skrobi. Na potrzeby przemysłu spożywczego pululan modyfikuje się także poprzez kowalencyjne przyłączenie do łańcucha węglowego polisacharydu różnych niezbędnych dla organizmu człowieka związków chemicznych, np. tiaminy [7, 15]. Dzięki dobrej rozpuszczalności i lepkości opisywany polisacharyd może być stosowany w technologii produkcji napojów dietetycznych [9]. W literaturze opisano również możliwości zastosowania roztworu pululanu w procesie aglomeracji, (np. ekstraktów kawy), jako czynnika ułatwiającego łączenie się cząsteczek produktu [9].

Należy również nadmienić, że pewne egzopolisacharydy mikrobiologiczne są niepożądane w przetwórstwie żywności i pojawiają się dość często jako zanieczyszczenie wina, piwa oraz soków owocowych i warzywnych. Przyczyną strat jest między innymi dekstran, syntetyzowany przez bakterie mlekowe (rodzaje: *Leuconostoc* oraz *Streptococcus*). Obecność wspomnianych drobnoustrojów na powierzchni buraków oraz trzciny cukrowej powoduje duże straty ekonomiczne oraz trudności technologiczne w przemyśle cukrowniczym. Mikroorganizmy te obniżają jakość technologiczną surowca poprzez wytwarzanie enzymu dekstranosacharazy, przekształcającej sacharozę w dekstran oraz fruktozę. W dalszych etapach tego procesu syntetyzowany jest lewan (głównie przez bakterie z rodzaju *Aerobacter* oraz *Bacillus*).

Występowanie powyższych egzopolisacharydów w soku buraczanym utrudnia proces filtracji (dekstran, przechodząc z masy surowca do soku dyfuzyjnego, powoduje wzrost lepkości soku). Ponadto obecność dekstranu zakłóca proces tworzenia się kryształów cukru, jednocześnie zawyżając polarymetryczne odczyty zawartości sacharozy w materiale [22].

Egzopolisacharydy drobnoustrojowe a higiena w zakładach produkcyjnych

Biomasa komórek drobnoustrojów stanowi potencjalne źródło wielu cennych produktów, ale może też stanowić element zagrożenia w praktyce produkcyjnej. W przemyśle spożywczym mikrobiologiczne zanieczyszczenie powierzchni roboczych może być przyczyną skażenia żywności drobnoustrojami powodującymi jej zepsucie, a także drobnoustrojami chorobotwórczymi. Mikrobiologiczny rozkład farb, tekstyliów i betonu zachodzi powszechnie w środowiskach wilgotnych. Drobnoustroje w praktyce przemysłowej mogą powodować duże straty materialne, gdyż niszczone przez nie materiały najczęściej nie nadają się do dalszego użytkowania.

Do utrzymania wysokiego poziomu czystości w zakładach produkcyjnych, pomocne okazać się mogą substancje EPS. Mikroorganizmy wytwarzają pozakomórkowo ściśle zdefiniowane pod względem struktury polisacharydy, które mogą być wskaźnikami występujących w danym środowisku zanieczyszczeń. Egzopolisacharydy, jako integralna część wszystkich błon biologicznych, warunkują szybką adaptację komórek do danych warunków otoczenia [3, 4, 5, 14, 16, 20, 31]. Powstałe na drodze asocjacji lub polimeryzacji skupiska tych biopolimerów wypełniają puste przestrzenie między komórkami w każdym biofilmie. Substancje EPS należą do czynników strukturalnych, nadających błonom biologicznym trójwymiarową, heterogenną postać. Synteza pozakomórkowych polisacharydów przez drobnoustroje osiadłe na powierzchni sprzyja tworzeniu się populacji złożonych z kilku bądź kilkunastu różnych gatunków (w tym z mikroorganizmów niewytwarzających EPS, jak np. *Listeria* sp.). Mikroorganizmy, poprzez syntezę egzopolisacharydów, wykazują tendencję do kolonizowania nowych terytoriów i wiązania się z płaszczyzną różnych substancji, stąd często określane są mianem „polisacharydów adhezyjnych” [13]. Najintensywniejsza produkcja tych substancji występuje we wczesnych etapach tworzenia się biofilmu, co wspomaga przyczepianie się komórek do płaszczyzn stałych [3, 18]. Egzopolisacharydy uczestniczą w powstawaniu warstwy kontaktowej, stwarzając korzystniejsze warunki do adhezji. Wykorzystanie substancji specyficznie wiążących polimery cukrowe może okazać się skuteczną metodą badania ich wpływu na adhezję drobnoustrojów do powierzchni stałych. Do powyższych związków zalicza się między innymi: kationy metali, lecytynę oraz niektóre barwniki [13].

Wykazano, że błona biologiczna powstała w wyniku sekrecji zewnątrzkomórkowej EPS i umocniona przez tę strukturę jest trudna do usunięcia. Biofilm bakteryjny jest zagrożeniem mikrobiologicznym (higienicznym), gdyż po osiągnięciu pewnej grubości krytycznej większe jego fragmenty samoistnie odrywają

się od powierzchni. Praktycznie każda płaszczyzna może zostać pokryta warstwą biofilmu. Substancje EPS (w tym polisacharydy) efektywnie utrzymują komórki na powierzchni wymienników ciepła, systemów przewodów odprowadzających i doprowadzających media czy membran separacyjnych [3, 4, 5]. Matryca biofilmu, cechująca się stabilnością mechaniczną, nie zostaje skutecznie usunięta przez stosowane powszechnie detergenty i środki dezynfekujące [11]. Jest to zwykle wyjaśniane wolniejszą i utrudnioną dyfuzją czynnika przez matrycę biofilmu. Ponadto egzopolisacharydy zabezpieczają dojrzałą postać błony biologicznej przed zmianami ciśnienia osmotycznego, pH środowiska, chroniąc komórki przed wysuszeniem oraz fagocytozą. Matryca EPS również skutecznie inaktywuje działanie promieniowania UV (niszczącego DNA komórek) i adsorbuje czynniki toksyczne, zapobiegając ich dyfuzji do cytoplazmy [1]. Pozakomórkowe polisacharydy, także poprzez wymianę jonową, neutralizują wpływ środków antymikrobiologicznych na drobnoustroje (głównie antybiotyków).

Z punktu widzenia higieny produkcji mechaniczne czyszczenie urządzeń czy powierzchni roboczych jest najbardziej efektywne, ale nie zawsze możliwe ze względów konstrukcyjnych aparatów. Stąd, aby zminimalizować skutki syntezy egzopolisacharydów i tworzenia biofilmów przez drobnoustroje, konieczne jest szybkie usuwanie zanieczyszczeń z powierzchni, stosowanie preparatów zawierających związki silnie chelatujące wapń, w miarę potrzeb wydłużanie czasu mycia i dezynfekcji. Ważna jest również optymalizacja proporcji czasu działania środka myjącego do czasu działania środka dezynfekującego, jak również dobór odpowiednich środków dezynfekujących. Najbardziej skuteczne w stosunku do drobnoustrojów tworzących błony biologiczne są kwaśne czwartorzędowe zasady amoniowe, dwutlenek chloru oraz kwas nadoctowy [11]. Mycie detergentami alkalicznymi i kwasem azotowym nadaje hydrofilowy, a etanolem czy acetonem – hydrofobowy charakter powierzchniom produkcyjnym. Powyższa zależność może mieć także istotny wpływ na sekrecję zewnątrzkomórkową polisacharydów i tworzenie się dojrzałej postaci biofilmu na płaszczyznach. Uważa się bowiem, że proces powstawania błon biologicznych jest zjawiskiem uzależnionym zarówno od właściwości materiałów, jak i od charakteru powierzchni komórek, które je tworzą.

W celu skutecznego zapobiegania negatywnym skutkom syntezy egzopolisacharydów, inicjującej proces adhezji komórek do danych płaszczyzn, istotne jest poznanie mechanizmów powstawania biofilmu, dynamiki jego nawarstwiania oraz czynników, które wpływają na ich stabilność [21, 23]. Dążąc do rozwiązania tego problemu konieczne jest zaprojektowanie nowych powierzchni roboczych, które będą wpływały na początkową adsorpcję cząstek, a przez to na ograniczenie zjawiska adhezji. Konieczne jest także zastosowanie antymikrobiologicznych barier adhezji i nowoczesnych metod likwidacji błon biologicznych [4, 5, 6].

Podsumowanie

Doskonalenie procesu mutagenizacji szczepów nadało egzopolisacharydom drobnoustrojowym nowy, funkcjonalny charakter. Odpowiednio dobrane podłoże hodowlane (dostępność określonego źródła węgla, jonów, właściwe pH) indukuje syntezę pozakomórkowych biopolimerów, wykorzystywanych w różnych gałęziach przemysłu spożywczego. Egzopolisacharydy mikrobiologiczne pozwoliły zmodyfikować produkty żywnościowe pod względem strukturalnym, odżywczym, smakowym oraz użytkowym. Za ich pośrednictwem możliwe jest również wytwarzanie jadalnych powłok produktów spożywczych, które nie tylko cechują się daną barierowością w stosunku do np. tlenu, ale także wysoką trwałością i wytrzymałością, co stanowi istotny przełom w produkcji opakowań.

Biosynteza zewnątrzkomórkowych polisacharydów warunkuje trwałe przyleganie komórek do powierzchni użytkowych. Zjawisko tworzenia się biofilmu jest często przyczyną zanieczyszczenia produktów spożywczych drobnoustrojami chorobotwórczymi lub powodującymi zepsucie żywności. Przemysł chemiczny nadal nie opracował efektywnie działających preparatów myjących i dezynfekujących, dlatego też znajomość szlaków biosyntezy egzopolisacharydów i mechanizmów powstawania błon biologicznych ułatwi utrzymanie wysokiego poziomu higieny w zakładach produkcyjnych.

Publikacja opracowana w ramach projektu badawczego KBN nr 3P06T 01024

Literatura

- [1] Costerton J. W., Stewart P. S.: Groźne biowarstewki. Świat Nauki, 2001, **10**, 61-67.
- [2] Cunliffe D., Smart C. A., Alexander C., Vulfson E. N.: Bacterial adhesion at synthetic surfaces. Appl. Environ. Microbiol., 1999, **65**, 4995-5002.
- [3] Czaczyk K., Wojciechowska K.: Tworzenie biofilmów bakteryjnych - istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. Biotechnologia, 2003, **62**, 180-192.
- [4] Flemming H. C., Wingender J.: Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part I: Structural and ecological aspects. Water Sci. Tech., 2001, **43**, 1-8.
- [5] Flemming H. C., Wingender J.: Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part II: Technical aspects. Water Sci. Tech., 2001, **43**, 9-16.
- [6] Flint S. H., Brooks J. D., Bremer P. J.: The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel. J. Appl. Microbiol., 1997, **83**, 508-517.
- [7] Galas E., Tarabasz-Szymańska Ł., Pankiewicz T.: Drobnoustrojowy polisacharyd - pullulan, właściwości, biosynteza i zastosowanie. Biotechnologia, 1998, **41**, 57-65.
- [8] Gandhi H. P., Ray R. M., Patel R. M.: Exopolymer production by *Bacillus* species. Carbohydr. Polym., 1997, **34**, 323-327.
- [9] Gniewosz M., Sobczak E.: Możliwości wykorzystania *Aureobasidium pullulans* i pullulanu w biotechnologii żywności. Biotechnologia, 1999, **45**, 81-91.
- [10] Gustaw W., Mleko S., Glibowski P.: Synergistyczne interakcje występujące pomiędzy polisacharydami w ich mieszaninach. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2001, **3 (28)**, 5-15.
- [11] Kitzman P.: Tworzenie się biofilmów i sposoby ich likwidacji. Gosp. Mięś., 1998, **4**, 44-47.

- [12] Krystynowicz A., Turkiewicz M., Dryńska E., Galas E.: Celuloza bakteryjna-biosynteza i zastosowanie. *Biotechnologia*, 1995, **30**, 120-132.
- [13] Langille S. E., Geesey G. G., Weiner R. M.: Polysaccharide-specific probes inhibit adhesion of *Hyphomonas rosenbergii* strain VP-6 to hydrophilic surfaces. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **25**, 81-85.
- [14] Le Thi T.-T., Prigent-Combaret C., Dorel C., Lejeune P.: First stages of biofilm formation: Characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. *Met. Enzymol.*, 2001, **336**, 152-159.
- [15] Lee J. W., Yeomans W., Allen A. L., Deng F., Gross R. A., Kaplan D.: Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, **65**, 5265-5271.
- [16] Lehtola M. J., Miettinen T., Martikainen P. J.: Biofilm formation in drinking water affected by low concentrations of phosphorus. *Can. J. Microbiol.*, 2002, **48**, 494-499.
- [17] Lindsay D., Brózel V. S., Mostert J. F., von Holy A.: Physiology of dairy-associated *Bacillus* ssp. over a wide pH range. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **54**, 49-62.
- [18] Liu Y., Tay J.-H.: Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **17**, 111-117.
- [19] Looijesteijn P. J., Boels I. C., Kleerebezem M., Hugenholtz J.: Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 5003-5008.
- [20] Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R.-M., Remaud-Simeon M.: Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 675-685.
- [21] Parkar S. G., Flint S. H., Palmer J. S., Brooks J. D.: Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **90**, 901-908.
- [22] Pleszczyńska M.: Dekstran i dekstranazy-źródła mikrobiologiczne, właściwości i zastosowanie. *Biotechnologia*, 1999, **47**, 45-61.
- [23] Rijnaarts H. M., Norde W., Bouwer E. J., Lyklema J., Zehnder J. B.: Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 3255-3265.
- [24] Schlegel H. G.: *Mikrobiologia ogólna*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 2000.
- [25] Sikorski Z., Drozdowski B., Samotus B., Pałasiński M.: *Chemia żywności*. PWN. Warszawa 1988.
- [26] Stredansky M., Conti E., Navarini L., Bretocchi C.: Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. *Process Biochem.*, 1999, **34**, 11-16.
- [27] Stredansky M., Conti E.: Xanthan production by solid state fermentation. *Process Biochem.*, 1999, **34**, 581-587.
- [28] Sutherland I. W.: Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. In: *Advances in microbial physiology*. Red. Rose A. H., Morris J. G., Academic Press, London, 1982, s. 79-150.
- [29] Turkiewicz M., Czub W.: Kurdlan-struktura, właściwości, wykorzystanie. *Biotechnologia*, 1997, **38**, 16-26.
- [30] Udeh K., Janas P., Grobelski M.: Microbial synthesis of xanthan gum and application. *Biotechnologia*, 2002, **57**, 113-129.
- [31] Vandevivere P., Kirchman L.: Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 3280-3286.
- [32] <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>.
- [33] <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyxan.html>
- [34] <http://www.martin.chaplin.btinternet.co.uk/hycurdlan.html>.
- [35] <http://www.hayashibara.co.jp/hdl/product-spec/pv101.html>.

THE ROLE OF MICROBIAL EXO-POLYSACCHARIDES IN FOOD TECHNOLOGY

S u m m a r y

It is very important to identify all the agents determining the exo-polysaccharides synthesis. Using a culture medium that is adequately composed as regards carbon, energy, microelements, or pH, it is possible to obtain a desirable and functional biomaterial. Polysaccharides that are secreted outside the cell (usually in the form of mucus) are very important for the food technology. Microbiological carbohydrates such as: xanthan, curdlan, pullulan, and alginate show many specific characteristics, which other plant polymers do not have at all. The function of these compounds added to food products is to keep a desired consistency level, to increase viscosity, to reduce water losses during processing and storage, and to manufacture low calories food products. Presently, they are also applied to manufacture durable and edible covers protecting food products against spoiling. In this paper, there are presented some hygienic aspects of synthesis of microbiological exo-polysaccharides that constitute a potential risk of contaminating final food products to be marketed. These substances take part in the process of forming a mechanically stable biofilm that makes it difficult to keep a required cleanness level within the food manufacturing factories. Owing to the fact that micro-organisms extra-cellularly produce polysaccharides with exactly defined structures, and they can be indicators of contaminants probably occurring in a given environment. This property may be of essential importance if seeking effective methods for higienisation of various application surfaces.

Key words: extra-cellular polysaccharides, hygiene, biofilm. ☒

ELIZA KOSTYRA

INTERAKCJE SUBSTANCJI SMAKOWYCH I ZAPACHOWYCH ZE SKŁADNIKAMI ŻYWNOSCI – ASPEKTY FIZYKOCHEMICZNE

Streszczenie

W artykule dokonano przeglądu piśmiennictwa na temat wpływu różnych składników żywności, a także układów dwufazowych (emulsji) na uwalnianie się sensorycznie aktywnych związków lotnych i nielotnych oraz ich dostępność dla receptorów węchu i smaku. Dostępność ta zależy z jednej strony od właściwości hydrofilowych i hydrofobowych substancji lotnych, z drugiej zaś od zawartości, struktury i właściwości lipidów, polisacharydów oraz białek. Lipidy wpływają na ilościową, jakościową i czasową percepcję substancji lotnych i nielotnych, modyfikując aromat i smakowość produktu. Polisacharydy wiążą sensorycznie aktywne substancje oraz tworzą z nimi kompleksy inkluzyjne, obniżając ich prężność par w przestrzeni nad próbką. Natomiast pomiędzy białkami i substancjami zapachowymi zachodzą dwa typy oddziaływań: adsorpcja odwracalna poprzez siły van der Waalsa oraz reakcje chemiczne poprzez wiązania kowalencyjne i elektrostatyczne. Pomimo licznych prac dotyczących interakcji substancji sensorycznie aktywnych z matrycą produktu, wiele istotnych szczegółów pozostaje w sferze hipotez.

Słowa kluczowe: interakcje, lipidy, polisacharydy, białka, układy dwufazowe, sensorycznie aktywne substancje lotne i nielotne.

Wprowadzenie

Problem interakcji dodatków aromatyzujących ze składnikami produktu oraz ich wpływ na ostateczny efekt aromatyzujący jest od lat przedmiotem rozważań teoretycznych i badań eksperymentalnych. Dotyczą one zarówno fizycznej strony uwalniania się substancji lotnych z produktu (ang. flavour release), przez co stają się one dostępne dla receptorów węchowych, jak i różnych rozwiązań aparaturowych do instrumentalnych pomiarów ilości uwalnianych aktywnych sensorycznie związków lotnych i ich chemicznej identyfikacji. Odnoszą się one także do psychofizycznych aspektów percepcji zapachu drogą orto- lub retronosową oraz relacji: stężenie bodźca zapachowego/intensywność wrażenia i wpływu na nią rodzaju oraz stężenia medium

Dr inż. E. Kostyra, Katedra Dietetyki i Żywności Funkcjonalnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa

(albo matrycy), w której bodziec zapachowy/smakowy występuje. Jako „matrycę odniesienia” traktuje się zwykle wodę destylowaną.

Wpływ lipidów na uwalnianie związków lotnych z żywności

Tłuszcz odgrywa szczególną i wielostronną rolę w percepcji sensorycznej żywności: wpływa na uczucie „pełni” (ang. *moutfeel/richness*) smakowitości, jest „zbiornikiem” oraz prekursorem wielu substancji zapachowych, maskuje obce zapachy (ang. *off-flavours*), kształtuje smakowitość i teksturę produktów oraz wpływa na uwalnianie substancji zapachowych z produktów [12, 17, 20]. Według Plug i Haring [39], tłuszcz wpływa na ilościową, jakościową oraz czasową (ang. *temporal*) percepcję zarówno substancji lotnych (zapachowych), jak i nielotnych (smakowych), w sposób bardzo kompleksowy modyfikując aromat i smakowitość produktu.

Tłuszcz jest rozpuszczalnikiem wielu substancji zapachowych oraz powoduje obniżenie prężności par substancji w zależności od ich właściwości chemicznych [7, 8, 41].

De Ross [12] sformułował hipotezy uwalniania substancji zapachowych z układów prostych (wodnych) i bardziej złożonych (dwufazowych). Według niego substancja wprowadzona do wody i doprowadzona do równowagi pomiędzy wodą i powietrzem w zamkniętym układzie rozmieszcza się między tymi fazami zgodnie ze współczynnikiem podziału powietrze/woda (P_{pw}):

$$P_{pw} = C_p/C_w,$$

gdzie C_p i C_w – stężenia substancji zapachowej w powietrzu i wodzie [g/l].

Opisany stosunek jest miarą *lotności* danej substancji zapachowej rozpuszczonej lub zdyspergowanej w wodzie.

Natomiast substancja smakowo-zapachowa wprowadzona do układu dwufazowego, jakim jest emulsja (faza wodna i tłuszczowa), zachowuje się inaczej i rozmieszcza się w 3 fazach: wodnej, tłuszczowej i powietrznej. Po osiągnięciu równowagi w zamkniętym układzie substancja zapachowa rozmieszcza się pomiędzy fazą wodną i tłuszczową zgodnie ze współczynnikiem podziału olej/woda (P_{ow}):

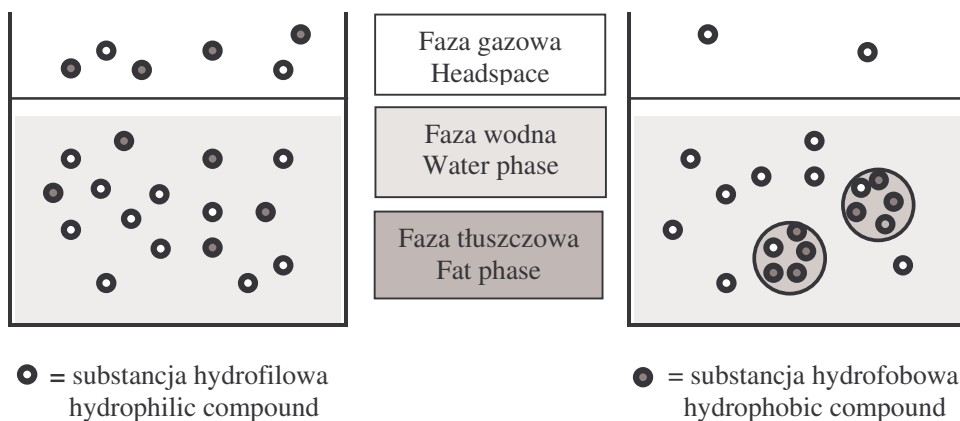
$$P_{ow} = C_o/C_w,$$

gdzie: C_o i C_w – stężenia substancji zapachowej w oleju i wodzie [g/l].

Wyższy współczynnik P_{ow} charakteryzuje substancję wykazującą większe właściwości lipofilowe (hydrofobowe) [12].

Według de Rossa [12], wpływ tłuszczu zemulgowanego w wodzie na stężenie substancji zapachowej w przestrzeni nad próbką, czyli jej prężność par w fazie gazowej (ang. *headspace*), zależy od charakteru hydrofilowego bądź hydrofobowego substancji lotnej, jak i od zawartości tłuszczu w układzie woda/tłuszcz (rys. 1). W przestrzeni nad próbką produktu niezawierającego tłuszczu (0%, jogurt pitny), stężenie lipofilowych związków jest dość wysokie. Natomiast w jogurcie pitnym zawierającym 3,5% tłuszczu lipofilowy związek znajduje się głównie w fazie

tłuszczowej i wykazuje niskie stężenie w fazie wodnej oraz gazowej (powietrznej) i w konsekwencji wpływa na niską wyczuwalność zapachu [12].



Rys. 1. Wpływ tłuszczu na „headspace”¹ substancji lotnych w emulsji [12].

Fig. 1. The effect of fat on the headspace of volatiles in emulsion [12].

Zazwyczaj bardzo małe ilości oleju (1%) dodane do układu wodnego znacząco obniżają prężność par lipofilowej substancji zapachowej w przestrzeni nad próbką [29]. Potwierdziły to również badania przeprowadzone przez Schirle-Keller i wsp. [41], w których określano wpływ zawartości tłuszczu (0, 0,1, 1, 2, 5, 10 i 20%) na uwalnianie substancji lipofilowych (limonenu i etyloheptanoatu) oraz hydrofilowych (diacetylu i propanolu) przy użyciu metody statycznego pomiaru „headspace” połączonego z chromatografią gazową. Badania wykazały, że ilość substancji lipofilowych w przestrzeni nad próbką była uzależniona od zawartości oleju i już przy 1% zawartości tłuszczu zaobserwowano znaczne obniżenie prężności par limonenu i etyloheptanoatu, które pogłębiało się wraz z zawartością tłuszczu. Natomiast prężność par związków hydrofilowych (diacetylu) w znacznie mniejszym stopniu zależała od procentowego udziału fazy olejowej i zmniejszała się dopiero przy 5% udziale fazy tłuszczowej oraz w większym stopniu przy 10 i 20% udziale fazy tłuszczowej. Niewielkie zmiany w „headspace” wraz z poziomem tłuszczu zaobserwowano także w odniesieniu do propanolu, wykazującego większe właściwości hydrofilowe niż diacetyl [41].

Według Matheis [29], triacyloglicerole obniżają prężność par lipofilowych związków zapachowych, podwyższając ich progi wyczuwalności, co powoduje

¹ W dalszej części artykułu używany będzie termin angielski „headspace” oznaczający stężenie substancji zapachowej w przestrzeni nad próbką

konieczność stosowania wyższych stężeń substancji zapachowych w celu osiągnięcia określonej intensywności zapachu. Jest to bardzo ważne oddziaływanie, ponieważ większość związków zapachowych wykazuje charakter lipofilowy. Wśród czynników wpływających na podniesienie progu wyczuwalności substancji lotnych wymienia się także rodzaj i fizyczne właściwości tłuszczu, takie jak:

- długość łańcucha kwasów tłuszczowych – wzrost długości łańcucha kwasów tłuszczowych powoduje mniejszy wpływ na zwiększenie progu wyczuwalności związku,
- wzrost stopnia nienasycenia tłuszczu,
- punkt mięknięcia i topnienia – oleje w większym stopniu podnoszą próg wyczuwalności niż tłuszcze stałe,
- temperaturę – szczególnie, jeśli jest ona bliska punktowi topnienia tłuszczu.

Wendin i wsp. [45] badali wpływ poziomu tłuszczu (0,1 i 4,2%) na właściwości sensoryczne (wyróżniki zapachu, smaku i tekstury) ukwaszonego mleka aromatyzowanego substancjami wykazującymi charakter polarny (maltol) i niepolarny (maślan metylu). Stwierdzono, że wraz ze wzrostem zawartości tłuszczu w ukwaszonym mleku z dodatkiem maltolu wzrastała intensywność zapachu i smaku maltolu, malało natężenie zapachu kwaśnego i nie zmieniała się intensywność smaku kwaśnego, słodkiego i wrażenia „ostrości”. Natomiast nie zaobserwowano wpływu poziomu tłuszczu na zmiany profilu sensorycznego mleka z dodatkiem maślanu metylu. Przy wyższej zawartości tłuszczu i aromatyzacji maltolem stwierdzono wyższe sensorycznie wrażenie gęstości mleka, a przy aromatyzacji maślanem wyższą gładkość mleka.

Bennett [4] i Hegenbart [18] sformułowali hipotezę uwalniania substancji lotnych w czasie (na podstawie badań metodą Time–Intensity) z produktów niezawierających i zawierających tłuszcz. Według tych autorów uwalnianie związków lotnych z produktów niezawierających tłuszczu i ich percepcja powinna być szybsza i trwać krócej niż w produktach zawierających tłuszcz, w których uwalnianie związków powinno przebiegać wolniej, a wrażenie trwać dłużej.

Brauss i wsp. [6] przeprowadzili badania instrumentalne (stosując jonizacyjną spektroskopię masową pod ciśnieniem atmosferycznym) i sensoryczne (metodą Time–Intensity) wpływu poziomu tłuszczu (0,2, 3,5, 10%) na czasowe aspekty uwalniania hydrofobowych substancji zapachowych (octanu trans-2-heksenylu, anetolu i terpinolu) z modelowych jogurtów. W badaniach instrumentalnych mierzono parametry I_{max} (maksymalna intensywność wrażenia) i T_{max} (czas do osiągnięcia maksimum intensywności), natomiast w analizach sensorycznych parametry T_o (czas opóźnienia do pojawienia się wrażenia), T_{max} , I_{max} , T_{end} (całkowity czas trwania wrażenia) i T_{plat} (czas trwania maksymalnej intensywności). Stwierdzono, że uwalnianie substancji lotnych z jogurtów niskotłuszczowych (0,2% tłuszczu) było

szybsze i charakteryzowało się wyższą intensywnością, ale trwało krócej niż w jogurtach o zawartości tłuszczu 3,5 i 10%. Zaobserwowano, że uwalnianie związków lotnych było zbliżone w jogurtach o zawartości tłuszczu 3,5 i 10%. Według wymienionych autorów, 3,5% poziom zawartości tłuszczu był wystarczający do działania tłuszczu jako „zbiornika” substancji lotnych; dalsze zwiększanie zawartości tłuszczu nie obniżało już uwalniania się substancji lotnych. W badaniach sensorycznych stwierdzono podobną zależność, przy czym istotne różnice zaobserwowano w parametrach T_o , I_{max} i T_{max} uwalniania się dwóch substancji (octanu heksenyli i terpinolu) w zależności od poziomu tłuszczu.

Wpływ polisacharydów na uwalnianie związków lotnych z żywności

Polisacharydy są szeroko stosowane jako dodatki funkcjonalne do żywności (w tym do produktów mięsnych) ze względu na ich właściwości zagęszczające lub żelujące już przy niskich stężeniach.

Polisacharydy, podobnie jak tłuszcze, obniżają prężność par substancji zapachowych. W literaturze podkreśla się, że odgrywają one mniejszą rolę w uwalnianiu substancji niż tłuszcze, ich oddziaływanie jest słabsze i zależy od struktury oraz właściwości polisacharydów [24].

Według wielu badaczy istotną przeszkodą w transporcie substancji zapachowych do fazy gazowej, powodującą obniżenie stężenia substancji lotnej w przestrzeni nad próbką, jest lepkość polisacharydów [14, 19, 37]. Chociaż mechanizm tego zjawiska nie jest dokładnie poznany, to uważa się, że przestrzenna struktura polisacharydów tworzy obszary lipofilowe, które przyłączają cząsteczki substancji lotnych [28, 39].

Zdaniem Kinsella [20], mniejsza ilość substancji zapachowych w „headspace” może być spowodowana zarówno wysoką lepkością matrycy (zagęstników), jak i interakcjami polegającymi na wiązaniu substancji przez matryce, ich adsorpcji, „zatrzymaniu” w mikroregionach cząsteczek matrycy, tworzeniu kompleksów i wiązań wodorowych pomiędzy substancjami i stosowanymi matrycami.

Próbowano ustalić, w jakim stopniu lepkość różnych zagęstników polisacharydowych wpływa na uwalnianie substancji zapachowych oraz jakie zależności zachodzą pomiędzy substancjami zapachowymi a tymi zagęstnikami.

Malkki i wsp. [27] przeprowadzili badania na wodnych roztworach różnych polisacharydów o takiej samej lepkości, w których wykazali, że różnice w uwalnianiu substancji zapachowych były spowodowane interakcjami polegającymi na wiązaniu substancji przez zagęstniki. Podobne zależności wykazano w innych badaniach, w których intensywność sensoryczna substancji zapachowej nie zależała od stężenia polisacharydowego zagęstnika (jego lepkości), ale od współdziałania związku zapachowego z zagęstnikiem (związania przez zagęstnik) [38].

Roberts i wsp. [40] badali wpływ dwóch poziomów lepkości i rodzaju zagęstnika

(sacharozy, gumy guar, karboksymetylocelulozy) na dynamiczne uwalnianie substancji zapachowych z modelowych roztworów o takiej samej lepkości. Badania przeprowadzono przy użyciu specjalnego aparatu symulującego warunki jamy ustnej w temp. 37°C. Stwierdzono, że zarówno rodzaj zagęstnika, jak i jego stężenie wpływały na zmniejszenie się substancji lotnych, zwłaszcza tych wykazujących charakter niepolarny.

W innej pracy określano wpływ polisacharydów (0,1% gumy ksantan, 0,3% gumy guar) na retencję substancji zapachowych: 0,9 ppm diacetylu (nota maślana), 0,4 ppm dwusiarczku diallilu (nota czosnkowa) i 7 ppm 1-okten-3-olu (nota grzybowa), wykorzystując do tego celu zarówno metody sensoryczne (metodę skalowania), jak i metody instrumentalne (analiza „headspace” i HPLC) [46]. Stwierdzono, że polisacharydy (guma guar > guma ksantan) wpływały na obniżenie (efekt maskowania) ogólnej intensywności zapachowej oraz natężenie noty czosnkowej w porównaniu z ich intensywnością w roztworach wodnych, traktowanych w doświadczeniu jako próbka porównawcza. Natomiast nie zaobserwowano takiego oddziaływania w przypadku pozostałych not: maślanej i grzybowej.

Identyczne zależności stwierdzono w wyniku pomiaru „headspace” analizowanych substancji. Zarówno guma guar, jak i guma ksantan zmniejszały uwalnianie substancji zapachowych (w największym stopniu dwusiarczku diallilu – ok. 50% obniżenie „headspace” w porównaniu z wodą). Autorzy podali, że przyczyną znacznego zmniejszenia „headspace” tego związku był jego najwyższy współczynnik podziału powietrze/woda, który decydował o jego wyższej lotności w wodzie i związaniu przez matrycę [46].

Badano eksperymentalnie i rozważano teoretycznie wpływ skrobi na wiązanie i uwalnianie przez nią substancji zapachowych. Uważa się, że wiązanie substancji zapachowych przez skrobię zachodzi na zasadzie tworzenia inkluzyjnych kompleksów z różnymi substancjami zapachowymi oraz interakcji związków polarnych z tymi substancjami [14, 28, 39, 43].

Kompleksy inkluzyjne definiuje się jako wynik współdziałania pomiędzy związkami, gdzie cząsteczka jednego związku wpasowuje się i jest otaczana przez rozgałęzioną strukturę cząsteczki innego związku [14]. W tego typu oddziaływaniach rolę „gospodarza” pełnią na ogół cząsteczki o dużych rozmiarach (skrobia), a „gościa” – cząsteczki o mniejszych rozmiarach (związki lotne). Pomiedzy „gospodarzem”, a „gościem” nie zachodzą żadne chemiczne interakcje, a przyłączenie ma charakter fizyczny – „dopasowywanie” obu związków wynika z interakcji hydrofobowych pomiędzy nimi. W połączeniach tego typu ważniejsze są rozmiary wnęki w strukturze cząsteczki „gospodarza” oraz wielkość i stereostruktura cząsteczki „gościa” (związku inkludowanego) niż jego charakter chemiczny.

Skrobia jako „gospodarz” tworzy struktury helikalne, w których grupy hydroksylowe znajdują się na zewnątrz heliksu, natomiast obszary hydrofobowe w

jego wnętrzu. Hydrofobowość wnętrza heliksu sprzyja powstawaniu kompleksów z lipofilowymi związkami zapachowymi [39, 43, 44]. Według tych autorów oddziaływanie skrobi na substancje zapachowe polega na „pułapkowaniu” (ang. entrapped) substancji wewnątrz heliksu amylozowego w wyniku wiązań hydrofobowych.

Skrobie charakteryzujące się niskim stężeniem amylozy lub zawierające wyłącznie amylopektynę (skrobia woskowa) wywierają mniejszy wpływ na adsorpcję substancji zapachowych w przeciwieństwie do skrobi o wyższej zawartości amylozy (jak np. skrobia ziemniaczana, kukurydziana) [44].

Interakcje polarne polegają na tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi skrobi i substancji zapachowych [26].

Boutboul i wsp. [5] badali wpływ różnych matryc skrobiowych na retencję substancji aromatycznych (d-limonenu, etyloheksanoatu, octanal, 1-heksanolu) stosując IGC (inverse gas chromatography). Stwierdzili, że niezależnie od rodzaju skrobi i zawartości amylozy w skrobiach natywnych retencja substancji zapachowych wzrastała wraz z ich polarnością w następującej sekwencji: d-limonen < etyloheksanoate < octanal < 1-heksanol. Według tych autorów interakcje skrobi z substancjami aromatycznymi polegały na zjawisku adsorpcji wskutek tworzenia wiązań wodorowych, a nie na powstawaniu kompleksów inkluzyjnych.

Wpływ białek na uwalnianie związków lotnych z żywności

W literaturze podkreśla się, że istnieje wiele niezgodności dotyczących wiązania czy przyłączania substancji zapachowych przez białka. Ogólnie wymienia się dwa typy interakcji zachodzących pomiędzy białkami i substancjami zapachowymi: adsorpcję odwracalną (fizyczną) poprzez siły van der Waalsa oraz reakcje chemiczne poprzez wiązania kowalencyjne i elektrostatyczne [16]. W pierwszym przypadku siły oddziaływania są relatywnie słabsze, natomiast w drugim – tworzone są mocne (stabilne) wiązania chemiczne. Efekt tych interakcji zależy zarówno od struktury białek, jak i właściwości oraz struktury substancji zapachowych. Ponieważ efektu interakcji nie można dokładnie prześledzić w tak złożonym produkcie, jakim jest żywność, badania realizowane były na prostych układach modelowych [44].

Niektórzy badacze próbowali ustalić czy istnieją relacje pomiędzy molekularną strukturą substancji aromatyzujących a ich wiązaniem przez białka [1, 10, 11, 36]. Wykazano, że białka wiążą substancje lotne w różny sposób: węglowodory przez siły van der Waalsa, alkohole przez wiązania wodorowe, natomiast aldehydy częściowo nieodwracalnie (wiązania kowalencyjne) i częściowo odwracalnie. Zauważono, że w przypadku aldehydów interakcje są tak silne, że białka sojowe nie powinny być stosowane do produktów aromatyzowanych aldehydami.

Damodaran i Kinsella [9] badali interakcje pomiędzy substancjami karbonylowymi (2-heptanonem, 2-nonanonem i nonanalem) i roztworem wodnym albuminy wołowej (BSA), stosując metodę chromatografii gazowej. Wykazali oni wiązania natury hydrofobowej pomiędzy białkiem i ketonami, których wydajność wzrastała wraz z długością łańcucha węglowego ketonów. W innych pracach określano termodynamiczne efekty interakcji substancji karbonylowych z natywnym i zdenaturowanym białkiem sojowym w temp. 5, 25 i 45°C, wykorzystując dializę równowagową. Stwierdzono, że interakcje pomiędzy karbonylami i białkiem sojowym były relatywnie słabe i odwracalne, natomiast zdolność wiązania substancji przez białko było identyczne w temp. 25 i 45°C oraz niższe w 5°C [10]. W badaniach przeprowadzonych przez Li i wsp. [25] zauważono, że z obniżeniem temperatury z 12 do 4°C następuje wzrost liczby miejsc wiążących wanilinę przez kazeinę, białko serwatki i białko sojowe.

Damodaran i Kinsella [11], badając interakcje natywnych białek (sojowych, albuminy wołowej, aktomiozyny rybiej) z wybranymi substancjami zapachowymi (aldehydami i ketonami), stwierdzili, że białka wykazywały różny stopień hydrofobowego wiązania tych substancji (albumina wołowa > białko sojowe > aktomiozyna rybia).

W innych badaniach stwierdzono, że niewielki poziom białek (0,5% albuminy wołowej i albuminy jaja kurzego) w wodzie powoduje dość duże zmniejszenie lotności substancji zapachowej (diacetylu), która zwiększa się wraz ze wzrastającym stężeniem białka [22].

Wśród czynników wpływających na konformację cząsteczki białka (rozdział obszarów hydrofilowych i hydrofobowych, kształt, struktura) i wiązanie przez nią substancji zapachowych wymienia się zawartość innych składników żywności, a także pH, temperaturę i czas. Białka charakteryzujące się dużą powierzchnią hydrofobową w większym stopniu oddziałują (wiążą) na substancje zapachowe poprzez interakcje hydrofobowe niż białka o małej powierzchni hydrofobowej [16].

Uważa się, że podczas denaturacji białek pod wpływem ogrzewania dochodzi do zwiększenia dostępności miejsc hydrofobowych wiążących substancje niepolarne i obniżenia ich prężności par w przestrzeni nad próbką [16].

Mills i Solms [33] badali wpływ pH (4,66 i 6,89) i temperatury (25, 36 i 50°C) na wiązanie heptanal i 2-nonanonu przez częściowo zdenaturowane białko serwatki. Wykazali oni, że wraz z redukcją pH zmniejszało się wiązanie heptanal i wzrastało 2-nonanonu. Natomiast przy wzroście temp. z 25 do 50°C odnotowano wzrost wiązania heptanal przez białka i brak takiego oddziaływania w przypadku 2-nonanonu. Badacze stwierdzili, że w temp. 25°C i środowisku o pH 6,89 następowało nieodwracalne wiązanie heptanal z białkiem. Zjawisko to pogłębiało się wraz ze

wzrostem temperatury i stężeniem heptanal; w temp. 50°C był on w 90% związany przez białko nieodwracalnie.

Podobne zależności stwierdzono w innych badaniach dotyczących wpływu natywnego i zdenaturowanego w różnym stopniu (81, 84 i 95°C) białka bobiku na wiązanie waniliny. Przy zwiększającym się stężeniu białka (1, 2,5, 5 i 10%) ilość związanej waniliny wzrastała proporcjonalnie do jej stężenia. Częściowa lub całkowita denaturacja białka wpłynęła wyraźnie na większą procentową ilość związanej waniliny. Na podstawie badań sensorycznych stwierdzono, że intensywność zapachu waniliowego była proporcjonalna do ilości wolnej, niezwiązanej waniliny przez białko [34, 35].

Uwalnianie sensorycznie aktywnych substancji lotnych i nielotnych z emulsji

Emulsje typu o/w oraz w/o są często występującymi układami w żywności. Przykładem pierwszego typu emulsji są produkty takie, jak: mleko, śmietana, majonezy, sosy sałatkowe, lody i sery topione, a drugiego – masło, margaryny i tłuszcze mieszane.

W literaturze można spotkać informacje nt. prac eksperymentalnych, dotyczących uwalniania substancji lotnych lub smakowych z emulsji różniących się zawartością tłuszczu, rodzajem stosowanych zamienników tłuszczu i dodatkiem substancji lotnych i/lub smakowych oraz wpływem typu emulsji (o/w, w/o) na percepcję substancji aromatyzujących.

De Vor [13] przeprowadził badania wpływu zawartości tłuszczu (3 i 10%) na jakość sensoryczną (smak słodki, „kremowy”, „waniliowy”, „mleczny”, „karmelowy” i „maślany”) lodów waniliowych. Intensywność wszystkich wyróżników, za wyjątkiem smaku „waniliowego”) była niższa w lodach niskotłuszczowych, natomiast natężenie smaku „waniliowego” nie zależało od zawartości tłuszczu w lodach i utrzymywało się na zbliżonym poziomie w wersji lodów niskotłuszczowych i o normalnej zawartości tłuszczu.

W innej pracy badano zmiany intensywności smaku słonego, słodkiego, kwaśnego oraz „tymiankowego” i „chrzanowego” w emulsjach typu majonezu o zawartości tłuszczu w granicach 40–70%, do których dodawano wzrastające ilości NaCl (0,0–4,5 g/kg), sacharozy (0,0–10,0 g/kg), kwasu cytrynowego (0,0–6,0 g/kg) oraz stosowano 6 poziomów olejku tymiankowego i 4 poziomy olejku chrzanowego [3]. Do stabilizacji emulsji o różnej zawartości tłuszczu (40, 50 i 60%) użyto gumy guar. Stwierdzono, że redukcja zawartości oleju i jednocześnie dodatek gumy guar do emulsji powodował zmniejszenie intensywności smaku słonego, słodkiego i kwaśnego, natomiast nie wpływał na natężenie wyróżników: „tymiankowego” i „chrzanowego”.

Wyniki te pozostają w sprzeczności z uzyskanymi wcześniej przez Shamila i wsp. [42] w badaniach (metodą profilową i Time–Intensity) uwalniania się i percepcji

wrażeń smakowych z wybranych produktów (sery, sosy sałatkowe) o normalnej i obniżonej zawartości tłuszczu. Wykazano, że zmniejszenie zawartości tłuszczu wpłynęło na wzrost intensywności wrażeń smakowych (goryczy i kwaśności) za wyjątkiem wrażenia słoności oraz wzrost wrażeń ostrości i pieczenia. Autorzy podali, że częściowym wyjaśnieniem otrzymanych wyników mogą być: fizykochemiczne właściwości substancji smakowo-zapachowych (charakter hydrofobowy lub hydrofilowy) oraz ich rozkład w fazie wodnej i tłuszczowej produktu. Zmniejszenie zawartości tłuszczu w serze wpłynęło prawdopodobnie na wzrost np. wrażenia goryczy, pod wpływem zwiększenia stężenia w fazie tłuszczowej substancji wywołujących uczucie smaku gorzkiego, które wykazują charakter hydrofobowy, natomiast zmniejszenie wrażenia słoności mogło być spowodowane charakterem jonowym soli i powinowactwem do wody.

W innej pracy określano metodą Time-Intensity wpływ dodatku oleju canola (0, 6,75 i 13%) i olejku czosnkowego (0,12, 0,36 i 0,6%) do sosów sałatkowych na intensywność i przebieg czasowy wrażenia „czosnkowego”, „pieprzowego” i słonego [15]. Stwierdzono, że czas do osiągnięcia maksymalnej intensywności wrażenia (T_{max}) i całkowity czas jego trwania (T_{tot}) nie zależał od zawartości tłuszczu w sosach; zaobserwowano natomiast wyższą maksymalną intensywność wrażenia (I_{max}) do noty „czosnkowej” i „pieprzowej” oraz większe całkowite pole powierzchni pod krzywą (T_{integ}) tych wyróżników w sosach o obniżonej zawartości tłuszczu. Wszystkie parametry T-I słoności były zbliżone, niezależnie od poziomu tłuszczu oraz dodatku olejku.

Mialon i Ebeler [32] wykorzystali metodę T-I do badań wpływu interakcji lotnych substancji polarnych (wanilina) i niepolarnych (limonen) z matrycą – emulsją o/w na percepcję ich zapachu drogą retronosową. Badania przeprowadzono na emulsjach o zawartości tłuszczu (oleju): 0% (woda), 10 i 50%, z dodatkiem emulgatora (Tween 60). Stwierdzono zbliżone wartości parametrów T_{max} i I_{max} w emulsjach aromatyzowanych waniliną, niezależnie od zawartości tłuszczu, oraz nieznaczny wzrost całkowitego czasu trwania wrażenia (T_{tot}) wraz z udziałem tłuszczu w emulsjach. Natomiast maksymalna intensywność wrażenia (I_{max}) drugiego związku – limonenu (niepolarnego) malała wraz ze wzrostem tłuszczu w emulsjach, a intensywność pozostałych parametrów (T_{max} , T_{tot}) nie zmieniała się wraz ze zmianą jego udziału. Według autorów, zmniejszenie I_{max} limonenu, wraz ze wzrostem zawartości tłuszczu w emulsjach, mogło wynikać z mniejszej ilości tego związku w fazie gazowej jamy ustnej i ślinie oraz utrudnioną jego dyfuzją na skutek wzrostu lepkości emulsji.

Overbosch i wsp. [37] założyli w teoretycznym modelu, że uwalnianie związków lotnych z emulsji o/w i w/o powinno być identyczne. Na podstawie przeprowadzonych badań eksperymentalnych wykazano jednak, że szybkość uwalniania diacetylu i jego

ilość przechodząca do fazy gazowej („headspace”) była 2 razy większa z emulsji o/w niż w/o.

W innych badaniach określano w emulsjach o/w i w/o (o 50% zawartości tłuszczu) z dodatkiem różnych stężeń sacharozy, NaCl i kwasu cytrynowego intensywność wrażeń smakowych – słodkiego, słonego i kwaśnego oraz wrażenia lepkości [2]. Nie stwierdzono wpływu rodzaju emulsji na postrzeganie wrażeń smakowych oraz zmian nachylenia krzywych charakteryzujących zależność: stężenie bodźca/intensywność wrażenia. Natomiast dodatek NaCl i kwasu cytrynowego do emulsji spowodował wzrost ich lepkości; efekt ten był bardziej widoczny w emulsji o/w.

W literaturze są również publikacje dotyczące teoretycznych podstaw mechanizmu uwalniania się substancji w jamie ustnej. McNulty i Karel [31] przedstawili modele uwalniania substancji lotnych z emulsji o/w zachodzące w jamie ustnej zakładając, że: 1) substancja lotna jest przenoszona z oleju do wody, kiedy równowaga międzyfazowa jest zakłócona przez rozcieńczenie śliną pobranej porcji emulsji i 2) tylko stężenie tych substancji w fazie wodnej stymuluje percepcję. Zgodnie z modelem uwalniania substancji zapachowych z emulsji w jamie ustnej, percepcja substancji zapachowej obecnej w fazie olejowej zachodzi pod wpływem jej uwalniania oraz przechodzenia do fazy wodnej (śliny) i podlega wtedy takim samym zjawiskom, jak substancje obecne w fazie wodnej (wiązaniami wodorowym, tworzenia soli, dimeryzacji).

Szybkość uwalniania się substancji zapachowych z emulsji zależy nie tylko od ich właściwości fizykochemicznych, ale także od czynników takich, jak: objętość jednorazowo pobieranej próbki, czasu mastyfikacji (rozdrabniania) próbki i mieszania jej ze śliną oraz ogólnego czasu przebywania ocenianej próbki w jamie ustnej [30].

Podsumowanie

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że jakkolwiek przeprowadzono wiele badań na temat współdziałania składników aromatyzujących i smakowych z różnymi matrycami, to wiele elementów dotyczących mechanizmów tego procesu i jego efektów sensorycznych pozostaje nadal w sferze hipotez, a nowe badania eksperymentalne skłaniają do ich weryfikacji.

Podkreśla się, że śledzenie interakcji w tak złożonym układzie jak żywność jest bardzo trudne. Zastosowanie w miarę prostych układów modelowych umożliwiłoby poznanie i wyjaśnienie różnego rodzaju oddziaływań, a wyniki jakie uzyskuje się z tego typu badań, prowadzonych w kontrolowanych warunkach, dają ogólną wiedzę o istniejących zależnościach i czynnikach zmienności, które powinny być uwzględniane przy opracowywaniu różnych produktów [23].

Rozpatrując efekty interakcji matryc żywnościowych z dodatkami aromatyzującymi należy pamiętać, że nie ograniczają się one jedynie do zjawisk

chemicznych i/lub fizycznych. Zachodzą one także w procesie integracji odbieranych jednostkowych wrażeń w obrębie aparatu zmysłowego człowieka i uczestniczą w powstawaniu zintegrowanych i świadomych wrażeń sensorycznych, jakich dostarcza nam różnorodna żywność. Wrażenia te należą do priorytetowych czynników decydujących o wyborze i akceptacji żywności przez konsumentów.

Literatura

- [1] Aspelund T.G., Wilson L.A.: Adsorption of off-flavor compounds onto soy protein: A thermodynamic study. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, **31**, 539-545.
- [2] Baryłko-Pikielna N., Martin A., Mela D.J.: Perception of taste and viscosity of oil-in-water and water-in-oil emulsion. *J. Food Sci.*, 1994, **59** (6), 1318-1321.
- [3] Baryłko-Pikielna N., Szczecińska A.: Taste and flavour perception in mayonnaise-type emulsion of various fat level. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1994, **3/44**, 57-70.
- [4] Bennett C.: Formulating low-fat foods with good taste. *Cereal Foods World*, 1992, **37**, 429-432.
- [5] Boutboul A., Giampaoli P., Feigenbaum A., Ducruet V.: Influence of the nature and treatment of starch on aroma retention. *Carbohydr. Polym.*, 2002, **47**, 73-82.
- [6] Brauss M.S., Linforth R.S.T., Cayeux I., Harvey B., Taylor A.J.: Altering the fat content affects flavor release in a model yogurt. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 2055-2059.
- [7] Buttery R.G., Guadagni D.G., Ling L.C.: Flavor compounds: volatiles in vegetable oil and oil-water mixtures. Estimation of odor thresholds. *J. Agric. Food Chem.*, 1973, **17**, 681-685.
- [8] Buttery R.G., Bomben J.L., Guadagni D.G., Ling L.C.: Some considerations of the volatilities of organic flavor compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 1971, **19**, 1045-1048.
- [9] Damodaran S., Kinsella J.E.: Flavor protein interaction. Binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects. *J. Agric. Food Chem.*, 1980, **28** (3), 567-571.
- [10] Damodaran S., Kinsella J.E.: Interaction of carbonyls with soy protein: thermodynamic effects. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, **29** (96), 1249-1253.
- [11] Damodaran S., Kinsella J.E.: Interaction of carbonyls with soy protein: Conformational effects. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, **29** (96), 1253-1257.
- [12] De Ross K.B.: How lipids influence food flavor. *Food Technol.*, 1997, **51**, **1**, 60-62.
- [13] De Vor H.: Flavours and functional ingredients for low calorie foods. *Food Ingredients Europe Conference Proc.*, 1989, p. 214.
- [14] Godshall M.A.: How carbohydrates influence flavor. *Food Technol.*, 1997, **51**, **1**, 63-67.
- [15] Guinard J.X., Wee Ch., McSunas A., Fritter D.: Flavor release from salad dressing varying in fat and garlic flavor. *Food Qual. Pref.*, 2002, **13**, 129-137.
- [16] Fisher R.G., Widder S.: How proteins influence food flavor. *Food Technol.*, 1997, **51**, **1**, 68-70.
- [17] Hatchwell L.C.: Overcoming flavor challenges in low-fat frozen desserts. *Food Technol.*, 1994, **48**, **2**, 98-102.
- [18] Hegenbart S.: Navigating the road map: A case study of fat reduction. *Food Prod. Design*, 1993, **2**, **12**, 32-62.
- [19] Jaime I., Mela D.J., Bratchwell N.: A study of texture-flavor interaction using free-choice profiling. *J. Sensory Stud.*, 1993, **8**, 177-188.
- [20] Kinsella J.E.: Flavor perception and binding to food components. *Flavor Chem. Lipid Foods*, 1989, 376-403.

- [21] Koeflerli Ch.R.S., Piccinali P., Sigrist S.: The influence of fat, sugar and non-fat milk solids on selected taste, flavor and texture parameters of a vanilla ice-cream. *Food Qual. Pref.*, 1996, **7**, **2**, 69-79.
- [22] Land D.G., Reynolds J.: The influence of food components on the volatility of diacetyl. *Flavour* 81, 3rd Weurman Symp., De Gruyter, Berlin 1981.
- [23] Lawless H.T.: Sensory interactions in mixtures. *J. Sensory Stud.*, 1986, **1**, 259-274.
- [24] Leland J.V.: Flavor interaction. The greater whole. *Food Technol.*, 1997, **51**, **1**, 75-80.
- [25] Li Z., Grün I.U., Fernando L.N.: Interaction of vanillin with soy and dairy proteins in aqueous model systems: A Thermodynamic study. *J. Food Sci.*, 2000, **65**, **6**, 997-1001.
- [26] Maier H.G.: Bindung flüchtiger Aromastoffe an Lebensmittel. *Lebensm.l-Wiss. u. Technol.*, 1972, **5**, 1-6.
- [27] Malkki Y, Heinio R.L., Autio K.: Influence of oat gum, guar gum and carboxymethylcellulose on the perception of sweetness and flavor. *Food Hydrocol.*, 1993, **6**, 525-532.
- [28] Matheis G.: Interaction between volatile flavoring substances and food constituents, Part 1: Carbohydrates, proteins and amino acids. *Dragoco Flavoring Information Service Rept.*, 1993, **38** (**3**), 98-114.
- [29] Matheis G.: Interaction between volatile flavoring substances and food constituents. Part 2: Lipids, inorganics salts, fruit acids, purine alkaloids, phenolic compounds, ethanol and complex systems. *Dragoco Flavoring Information Service Rept.*, 1993, **38** (**4**), 148-161.
- [30] McNulty P.B.: Flavour release – Elusive and dynamic. In: *Food Structure and Behaviour* – ed. J.M.V. Blanshard, P. Lillford, Academic Press, London 1987, 245-258.
- [31] McNulty P.B., Karel M.: Factors affecting flavour release and uptake in O/W emulsions, I. Release and uptake models. *J. Food Technol.*, 1973, **8**, 309-318.
- [32] Mialon V.S., Ebeler S.E.: Time-Intensity measurement of matrix effects on retronasal aroma perception. *J. Sensory Stud.*, 1997, **12**, 303-316.
- [33] Mills O.E., Solms J.: *Lebensm-Wiss u. Technol.*, 1984, **17**, 331-335, cit. after Solms J.: Interactions of non-volatile and volatile substances in foods. In: *Interactions of food components* - eds Birch G.G. and Lindley M.G., Elsevier Applied Science Publishers, London 1986, pp. 189-209
- [34] Ng, P.K.W., Hoehn E., Bushuk W.: Binding of vanillin to fababean proteins. *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 105-107.
- [35] Ng, P.K.W., Hoehn E., Bushuk W.: Sensory evaluation of binding of vanillin to fababean proteins. *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 324-346.
- [36] O'Keefe S.F., Resurreccion A.P., Wilson L.A., Murphy P.A.: Temperature effect on binding of volatile flavor compounds to soy protein in aqueous model systems. *J. Food Sci.*, 1991, **56**, 802-806.
- [37] Overbosch P., Afterof W.G.M., Harring P.G.M.: Flavor release in the mouth. *Food Rev. Int.*, 1991, **7**, 137-184.
- [38] Pangborn R.M., Szcześniak A.: Effect of hydrocolloids and viscosity on flavor and odor intensities of aroma and flavor compounds. *J. Texture Stud.*, 1973, **4**, pp. 224-241.
- [39] Plug H., Haring P.: The role of ingredient-flavour interaction in the development of fat-free foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 1993, **4**, 150-152.
- [40] Roberts D.D., Elmore J.S., Langley K.R., Bakker J.: Effects of sucrose, guar gum and carboxymethylcellulose on the release of volatile flavor compounds under dynamic conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1321-1325.
- [41] Schirle-Keller J.P., Reineccius G.A., Hatchwell L.C.: Flavor interaction with fat replacers: effect of oil level. *J. Agric. Food Sci.*, 1994, **4**, 815-817.
- [42] Shamil S., Wyeth L.J., Kilcast D.: Flavor release and perception in reduced-fat foods. *Food Qual. Pref.*, 1992, **3**, 51-60.

- [43] Solms J.: Interaction of non-volatile substances in foods. In: Interactions of Food Components - ed. G.G. Birch, M.G. Lindley. Elsevier Applied Science, London 1986, pp. 189-210.
- [44] Van Osnabrugge W.: How to flavor baked goods and snacks effectively. Food Technol., 1989, **43**, **1**, 74-82.
- [45] Wendin K., Solheim R., Allmere T., Johansson L.: Flavor and texture in sour milk affected by thickeners and fat content. Food Qual. Pref., 1997, **8**, **4**, 281-291.
- [46] Yven C., Guichard E., Giboreau, Roberts D.D.: Assessment of interactions between hydrocolloids and flavor compounds by sensory, headspace and binding methodologies. J. Agric. Food Chem., 1998, **46**, 1510-1514.

INTERACTIONS OF THE VOLATILES AND NON-VOLATILES WITH FOOD COMPONENTS: PHYSICOCHEMICAL ASPECTS

S u m m a r y

This paper is a review of specialist literature dealing with the influence of various food components including emulsions (two-phase systems) on the release of sensory active volatile and non-volatile compounds and their availability to olfactory and gustatory receptors. This availability depends on the hydrophobic and hydrophilic properties of volatile compounds, as well as on the level, structure and property of fats, polysaccharides and proteins in food matrix. Lipids influence the quality, quantity and temporal perception of the volatiles and non-volatiles; they modify the food aroma and the flavour perception. Polysaccharides bind the sensory active components and form inclusion complexes with them, thus, they reduce their headspace. There are two different types of interaction between the compounds and protein: a reversible physical adsorption owing to the 'van der Waals' forces and chemical reactions through covalent or electrostatic linkages. Although many studies have been made on the interaction of the volatile and non-volatile sensory compounds with food matrix many important fine points still remain in the sphere of hypotheses.

Key words: interaction, lipids, polysaccharides, protein, sensory active compounds, and sensory effects ☒



AGATA MARZEC, PIOTR P. LEWICKI

WŁAŚCIWOŚCI SORPCYJNE PIECZYWA CHRUPKIEGO

Streszczenie

Celem pracy było określenie właściwości sorpcyjnych ekstrudowanego pieczywa chrupkiego pszennego i żytniego. Właściwości sorpcyjne obu rodzajów produktów badano metodą statyczną i dynamiczną. Zakres pracy obejmował analizę izoterm oraz kinetyk sorpcji wyznaczonych w środowisku o aktywności wody 0; 0,329; 0,648; 0,903 i 1. Zmierzona zawartość i aktywność wody w pieczywie pochodzącym bezpośrednio z produkcji nie odpowiadała wartościom wyznaczonym na podstawie izoterm sorpcji pary wodnej. Podobnie pomiary właściwości sorpcyjnych w warunkach dynamicznych nie korelowały z wyznaczonymi na podstawie pomiarów w warunkach statycznych. Z równania GAB wyznaczono pojemność monowarstwy pieczywa chrupkiego pszennego, która wyniosła 5,13 g/100 g s.s., co odpowiada aktywności wody 0,110. W przypadku pieczywa żytniego wartość ta wyniosła 4,68 g/100 g s.s., przy aktywności wody 0,109. Badane rodzaje pieczywa różniły się wyjściową aktywnością wody i jej zawartością, stąd w zależności od aktywności wody środowiska sorpcja przebiegała z różną intensywnością. Desorpcja wody jest bardzo wolna i prowadzi do uzyskania stanu pseudorównowagi. Adsorpcja zależy od różnicy pomiędzy aktywnością wody pieczywa i aktywnością wody środowiska. Im różnica ta jest większa, tym ilość adsorbowanej wody jest większa, a czas osiągnięcia stanu równowagi dłuższy. Wartości równowagowej zawartości wody obliczone na podstawie kinetyki adsorpcji były bliskie wartościom uzyskanym metodą statyczną. Jednak metodą dynamiczną uzyskiwano z reguły wartości wyższe o ponad 4% w stosunku do wartości mierzonych statycznie. Wydaje się, że obserwowane zmiany ilości adsorbowanej wody przez pieczywo chrupkie, w zależności od aktywności wody środowiska, wynikały z przemian strukturalnych określonych składników pieczywa.

Słowa kluczowe: pieczywo chrupkie, izoterm sorpcji, kinetyka sorpcji.

Wstęp

W technologii żywności duże znaczenie ma zjawisko sorpcji pary wodnej przez produkty żywnościowe i dotyczy ono procesów, podczas których następuje przenoszenie jednego lub więcej składników między fazami. Zdolność sorpcji pary

*Dr inż. A. Marzec, prof. dr hab P.P. Lewicki, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydział Technologii Żywności, SGGW, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa,
e-mail: danak@alpha.sggw.waw.pl*

wodnej jest cechą charakterystyczną danego produktu i zależy wyłącznie od jego budowy i składu chemicznego. Graficzne lub analityczne przedstawienie zależności między ilością zaadsorbowanej wody przez produkt a wilgotnością względną otaczającego powietrza nosi nazwę izotermy sorpcji. Znajomość przebiegu izoterm sorpcji pary wodnej produktu dostarcza wielu cennych informacji na temat struktury produktów spożywczych. Pozwala na teoretyczną interpretację zjawisk fizycznych zachodzących na powierzchni kontaktu żywność – substancja lotna, jest podstawą do projektowania procesu suszenia, przewidywania charakteru zepsucia produktu, jak również określenia optymalnej zawartości wody w produkcie [11]. Każdy produkt ma tzw. krytyczną zawartość wody, której przekroczenie w wyniku np. sorpcji pary wodnej powoduje niekorzystne zmiany cech jakościowych. Zmiany te mogą mieć charakter fizyczny, fizykochemiczny, mikrobiologiczny i enzymatyczny [4, 5].

Izotermy adsorpcji wyznaczane są metodą statyczną, która jest czasochłonna i nie daje możliwości poznania niektórych mechanizmów odpowiedzialnych za proces sorpcji pary wodnej w produktach spożywczych. Wpływ struktury adsorbentu, rodzaju adsorbentu, warunków prowadzenia procesu i innych czynników na pojemność adsorbentu analizowany jest na podstawie pomiarów statycznych.

Kinetyka adsorpcji jest nauką o szybkości procesu adsorpcji. Zależność przyrostu zawartości wody w funkcji czasu nosi nazwę krzywej kinetycznej i jest podstawą do interpretacji procesu sorpcji pary wodnej przez produkt. Zastosowanie pomiarów dynamicznych sorpcji pary wodnej przez produkty spożywcze ma wiele zalet w porównaniu z metodą statyczną. Pozwala na skrócenie czasu oznaczania oraz daje możliwość analizy wpływu wielu czynników na szybkość procesu [6].

Celem pracy było określenie właściwości sorpcyjnych pieczywa chrupkiego pszenne i żytnie wyznaczonych metodą statyczną i dynamiczną. Zakres pracy obejmował analizę izoterm oraz kinetykę sorpcji pary wodnej.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiło pieczywo chrupkie ekstrudowane, pszenne i żytnie, naturalne bez cukru, pochodzące bezpośrednio z linii produkcyjnej.

W próbkach zerowych (pochodzących bezpośrednio z linii produkcyjnej) oraz przechowywanych wykonano oznaczenie aktywności wody za pomocą higrometru Hygroskop DT 2 firmy Rotronic o dokładności $\pm 0,001$, w temp. 25°C oraz wilgotności zgodnie z polską normą PN-84/A-86361 [14].

Właściwości sorpcyjne pieczywa badano metodą statyczną i dynamiczną. Badania właściwości sorpcyjnych próbek pieczywa chrupkiego o masie około 1 g, odważanych na wadze Metler AG, wykonywano z dokładnością $\pm 0,00001\text{g}$.

Metodą statyczną wyznaczano izotermy adsorpcji pary wodnej pieczywa pochodzącego bezpośrednio z linii produkcyjnej. Próbki przechowywano 3 miesiące w

higrostatach zawierających roztwory kwasu siarkowego i nasycone roztwory soli, które zapewniały wilgotność względną powietrza od 0 do 90%, w temp. 25°C.

Metodą dynamiczną badano kinetykę sorpcji pary wodnej w próbkach pochodzących bezpośrednio z linii produkcyjnej przy poziomie aktywności wody środowiska 0; 0,329; 0,648; 0,903 i 1, w temp. 25°C, w ciągu 24 h, na stanowisku zapewniającym ciągły pomiar masy próbek. Zmianę masy podczas sorpcji rejestrowano, co 1-5 min, wykorzystując program komputerowy „Pomiar dla DOS”.

Obliczenia

Zmiany zawartości wody przedstawiono w układzie współrzędnych czas – zawartość wody, uzyskując krzywe kinetyczne, które opisano równaniami:

$$u = a + \frac{b}{c + t} \quad (1)$$

$t \rightarrow \infty$, równowagowa zawartość wody równa jest (a)

$$u = a + b \left(1 - \frac{1}{1 - bct} \right) \quad (2)$$

$t \rightarrow \infty$, równowagowa zawartość wody równa jest (a + b)

$$u = a + b(1 - \exp(-ct)) + d(1 - \exp(-ct)) \quad (3)$$

$t \rightarrow \infty$, równowagowa zawartość wody równa jest (a + b + d)

Oznaczenia:

a, b, c, d – stałe,

t – czas [h],

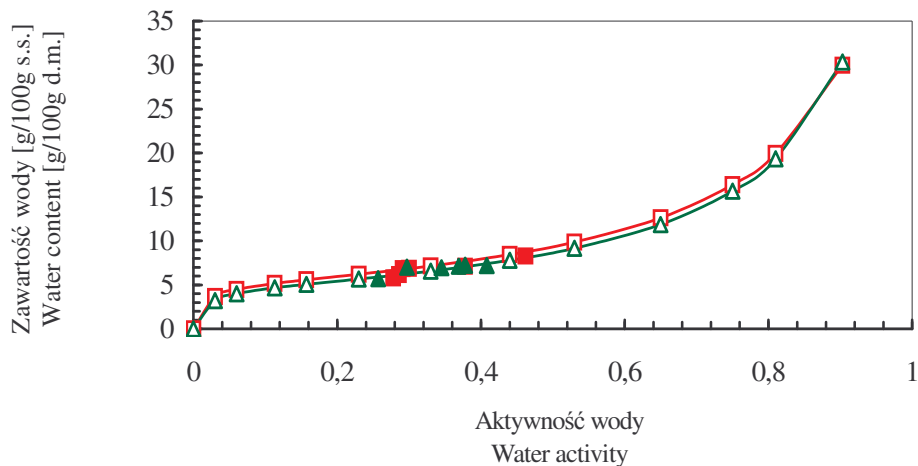
u – zawartość wody [g/100g s.s.],

a_w – aktywność wody.

Wyniki

Izotermy sorpcji pary wodnej pieczywa chrupkiego pszennego i żytniego

Uzyskane izotermy adsorpcji pary wodnej pieczywa chrupkiego pszennego i żytniego charakteryzują się typowym sigmoidalnym kształtem wykazując podobieństwo do izoterm typu II według klasyfikacji Brunauera i wsp. [1] (rys. 1). Ten typ izoterm sorpcji pary wodnej jest powszechny w przypadku produktów zawierających duże ilości skrobi. Kształt związany jest z występowaniem zakresu adsorpcji monomolekularnej w atmosferze o niskiej aktywności wody (a_w poniżej 0,30), zakresu adsorpcji wielowarstwowej (a_w pomiędzy 0,30 a 0,65) oraz zakresu kondensacji kapilarnej (a_w powyżej 0,65).



- – pszenne / wheat bread
- – bezpośrednio z produkcji pszenne / wheat bread taken direct from the production line
- △ – żytnie / rye bread
- ▲ – bezpośrednio z produkcji żytnie / rye bread taken direct from the production line

Rys. 1. Izotermi adsorpcji pary wodnej pieczywa chrupkiego.

Fig. 1. Sorption isotherms of crispbread.

Izoterma adsorpcji pieczywa chrupkiego pszennego przebiega nad izotermą pieczywa chrupkiego żytniego. W zakresie niskich aktywności wody od 0 do około 0,157 i wysokich powyżej 0,753 nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy równowagową zawartością wody w badanych produktach. Największe różnice między produktami wystąpiły w przedziale średnich aktywności wody, przy $a_w = 0,438$ równowagowa zawartość wody w pieczywie pszenным była o około 8% wyższa niż w pieczywie żytnim (rys. 1).

Zmierzona zawartość i aktywność wody w pieczywie pochodzącym bezpośrednio z produkcji nie odpowiadała wartościom wyznaczonym na podstawie izoterm sorpcji pary wodnej. Podobnie pomiary właściwości sorpcyjnych w warunkach dynamicznych nie korelowały z wyznaczonymi na podstawie pomiarów statycznych. Sytuacja taka spowodowana była prawdopodobnie zmianami składników pieczywa w trakcie długiego czasu przechowywania. Większość produktów zbożowych w temperaturze pokojowej, to produkty amorficzne i przy niskiej zawartości wody ich składniki (skrobia i gluten) są w stanie szklistym [2, 7, 18]. Woda powoduje przejście stanu amorficznego w stan lepkosprężysty, w którym ruchliwość molekuł jest znacznie większa niż w stanie amorficznym i obserwuje się w żywności zmiany chemiczne, m.in. przyspieszenie krystalizacji składników [3, 13, 15, 16].

Przebieg izoterm opisano równaniem GAB. W przypadku pieczywa chrupkiego pszennego pojemność monowarstwy była równa 5,13 g/100 g s.s., co odpowiadało aktywności wody 0,110, zaś w odniesieniu do żytniego wartość ta wynosiła 4,68 g/100 g s.s., przy aktywności wody 0,109 (tab. 1). Na ilość zaadsorbowanej wody w tego typu produktach wpływ ma ruchliwość łańcuchów biopolimerów. Wzrost zawartości wody powoduje rozluźnienie struktury i odsłonięcie nowych centrów adsorpcji, na skutek czego zdolność do adsorpcji wzrasta.

Tabela 1

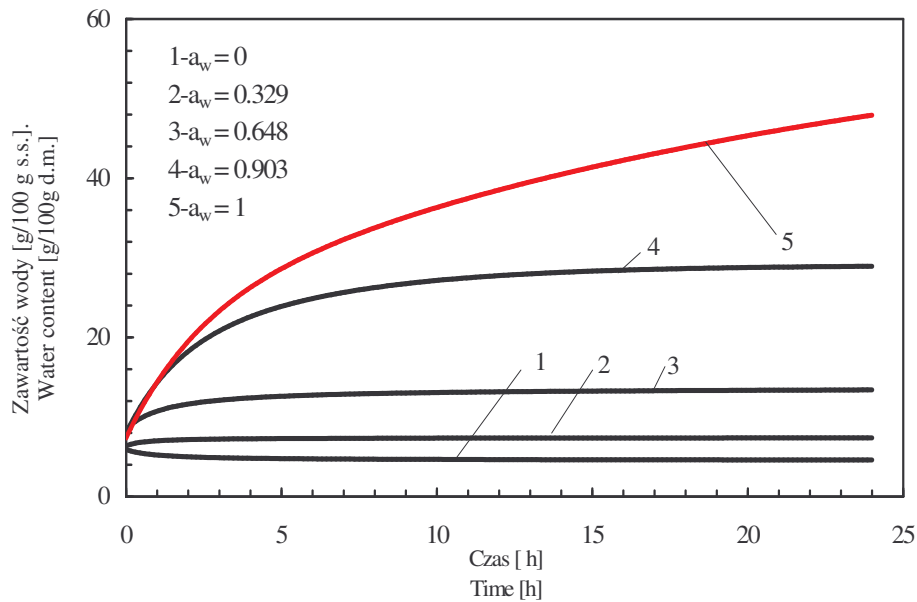
Współczynniki równania GAB użytego do opisu izoterm sorpcji pary wodnej przez pieczywo chrupkie.
Parameters in the GAB equation used to describe isotherms of water vapour sorption by crispbread.

Rodzaj pieczywa chrupkiego Kind of crispy bread	Pszenne Wheat crispbread	Żytnie Rye crispbread
Parametry równania GAB Parameters in the GAB equation	$u_m = 5,1295$	$u_m = 4,6819$
	$c = 80,4526$	$c = 69,4979$
	$k = 0,9184$	$k = 0,9370$
	$r^2 = 0,9980$	$r^2 = 0,9985$

Kinetyki sorpcji pary wodnej pieczywa chrupkiego pszennego i żytniego

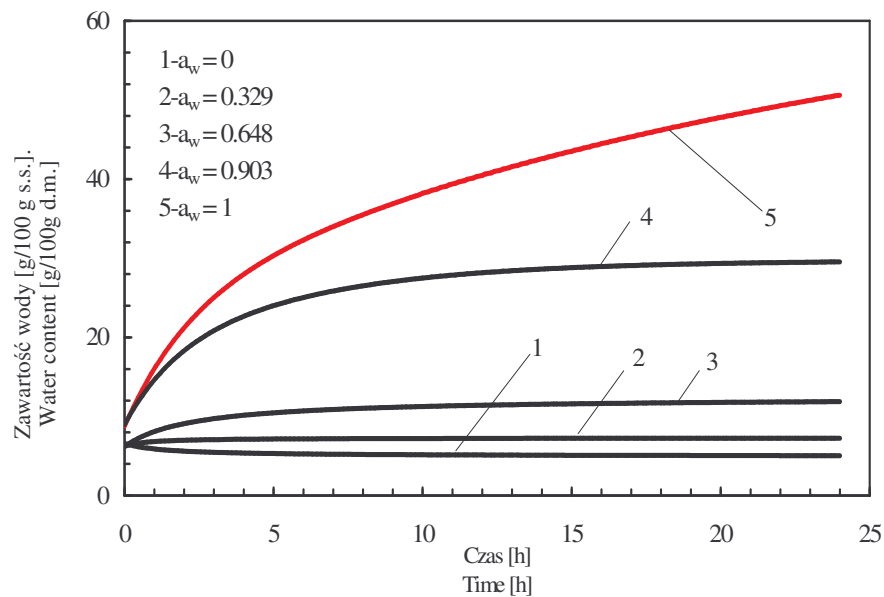
Na mechanizm sorpcji pary wodnej w pieczywie chrupkim pszenym i żytnim znacznie wpływa aktywność wody środowiska (rys. 2 i 3). W środowisku o aktywności wody 0 pieczywo chrupkie oddawało wodę. Największe zmiany jej zawartości wystąpiły do 5 h procesu desorpcji; w pieczywie pszenym zawartość wody zmniejszyła się o około 21% w stosunku do wartości początkowej (rys. 2), zaś w pieczywie żytnim zmniejszenie to wynosiło około 15%.

Dalszy czas desorpcji do 24 h spowodował zmniejszenie zawartości wody o około 24% w pieczywie chrupkim pszenym i o około 19% w pieczywie chrupkim żytnim. Porównując ilość oddanej wody przez pieczywo po czasie desorpcji 5 i 24 h należy stwierdzić, że oba rodzaje badanych produktów desorbują wodę bardzo wolno i w zasadzie osiągają stan pseudorównowagi. Jednak obliczona teoretyczna równowagowa zawartość wody na podstawie równania (2) w przypadku pieczywa chrupkiego pszennego była na poziomie 4,54 g/100 g s.s. (tab. 2), a żytniego 4,97



Rys. 2. Wpływ aktywności wody środowiska na kinetykę sorpcji pary wodnej pieczywa chrupkiego pszennego.

Fig. 2. The water activity effect on the kinetics of water vapour sorption by wheat crispbread.



Rys. 3. Wpływ aktywności wody środowiska na kinetykę sorpcji pary wodnej pieczywa chrupkiego żytniego.

Fig. 3. The water activity effect on the kinetics of water vapour sorption by rye crispbread.

Tabela 2

Współczynniki równań (1), (2) i (3) adsorpcji i desorpcji wody pieczywa chrupkiego pszennego pochodzącego bezpośrednio z produkcji.

Parameters in equations (1), (2), and (3) for the kinetics of water adsorption and desorption by wheat crispbread.

Pieczywo chrupkie pszenne / Wheat crispbread					
Początkowa aktywność wody i zawartość wody w pieczywie Initial water activity and water content in crispbread					
aw	0,278	0,286	0,462	0,300	0,378
Zawartość wody [g/100 g s.s.] Water content [g/100 g d.m.]	5,80	6,17	8,17	6,89	7,12
Współczynniki Parameters	Aktywność wody środowiska Water activity				
	0,00	0,329	0,648	0,903	1,00
A	4,5403	6,3608	8,4319	7,9805	7,3546
B	1,3639	1,0374	5,5231	8,6174	15,6530
C	1,0032	0,6035	1,2728	0,6701	0,4246
D	-	-	-	12,4721	38,6137
E	-	-	-	0,1880	0,0432
r ²	0,991	0,983	0,998	0,999	0,999
Obliczona równowagowa zawartość wody [g/100 g s.s.] The calculated Equilibrium Water Content [g/100 g d.m.]					
ur	4,54	7,39	13,95	29,07	61,62
Zawartość wody po 24 h procesu [g/100 g s.s] Water content after the 24h sorption process [g/100 g d.m.]					
u	4,60	7,37	13,90	29,00	47,37
Równowagowa zawartość wody wyznaczona z izotermy sorpcji [g/100 g s.s] The Equilibrium Water Content calculated from the sorption isotherms [g/100 g d.m.]					
ur	0	7,15	12,63	29,87	-

g/100 g s.s. (tab. 3), a więc kinetyka desorpcji nie prowadzi do właściwych wilgotności równowagowych. Teoretycznie w środowisku o $a_w = 0$ materiał powinien oddać całą wodę i jego równowagowa wilgotność powinna wynosić zero.

Osiągnięta przez pieczywo chrupkie pszenne oraz żytnie zawartość wody w środowisku o $a_w = 0$ była bliska jej ilości zaadsorbowanej w monowarstwie i w tym zakresie była ona najsilniej związana z materiałem. Ilość związanej wody zależy od

zawartości hydrofilowych polimerów, takich jak białka i polisacharydy. Wielu badaczy wykazało, że znaczna część wody jest silnie powiązana z pozostałymi składnikami żywności, nie wymarza podczas zamrażania, a także jest niedostępna do przebiegu reakcji chemicznych [4, 10, 11].

Tabela 3

Współczynniki równań (1), (2) i (3) adsorpcji i desorpcji wody pieczywa chrupkiego żytniego pochodzącego bezpośrednio z produkcji.

Parameters in equations (1), (2), and (3) for the kinetics of water adsorption and desorption by rye crispbread.

Pieczywo chrupkie żytnie / Rye crispbread					
Początkowa aktywność wody i zawartość wody w pieczywie Initial water activity and water content in crispbread					
aw	0,297	0,345	0,257	0,378	0,408
Zawartość wody [g/100 g s.s.] Water content [g/100 g d.m.]	6,04	6,95	5,71	7,24	7,35
Współczynniki Parameters	Aktywność wody środowiska Water activity				
	0,00	0,329	0,648	0,903	1,00
A	4,9654	6,2271	6,2071	8,9803	8,7581
B	1,6245	1,0685	6,2153	7,9353	15,3261
C	1,3502	0,7830	2,2983	0,6212	0,4524
D	-	-	-	12,8119	42,3949
E	-	-	-	0,1755	0,0409
r ²	0,995	0,988	0,999	0,999	0,999
Obliczona równowagowa zawartość wody [g/100 g s.s.] The calculated water content [g/100 g d.m.]					
ur	4,97	7,29	12,42	29,73	66,48
Zawartość wody po 24 h procesu [g/100 g s.s.] Water content after the 24h sorption process [g/100 g d.m.]					
u	5,08	7,24	12,41	29,72	50,64
Równowagowa zawartość wody wyznaczona z izotermy sorpcji [g/100 g s.s.] The equilibrium water content calculated from the sorption isotherms [g/100 g d.m.]					
ur	0	6,56	11,86	30,34	-

W materiale żywnościowym woda jest utrzymywana przez różne mechanizmy fizyczne i chemiczne. Stopień związania wpływa na ruchliwość jej cząsteczek. Im są one silniejsze, tym mniejsza szybkość z jaką cząsteczki zamieniają się miejscami.

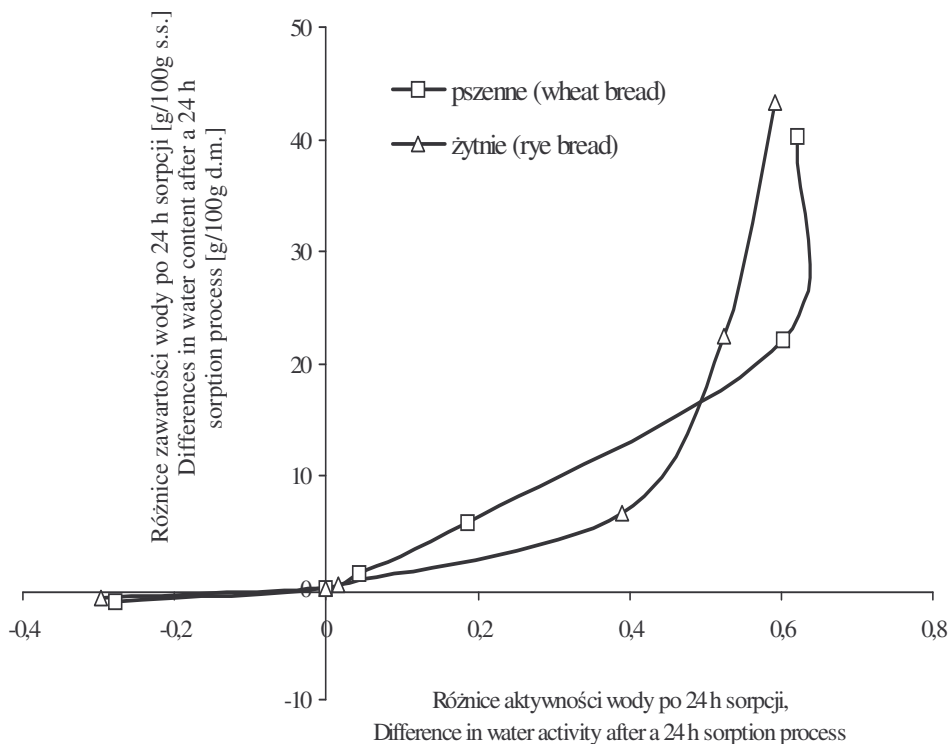
Cząsteczki wody związanej nigdy nie są nieruchome. Sposób związania może się zmieniać wraz z zawartością wody. W sensie praktycznym wiązanie oznacza zdolność żywności do trwałego utrzymywania wody w czasie obróbki i przechowywania [5, 15].

Kinetykę adsorpcji pary wodnej przez badane produkty określono w środowisku o aktywności wody: 0,329; 0,648; 0,903; 1,00. Krzywe kinetyczne pieczywa chrupkiego pszennego i żytniego przedstawiono na rys. 2. i 3. W przypadku procesu adsorpcji pary wodnej w środowisku o aktywności wody 0,329 po 5 h procesu, zawartość wody w pieczywie chrupkim pszennym wzrosła o około 15,5% i wynosiła 7,28 g/100 g s.s.. Dalszy wzrost zawartości wody był nieznaczny, po 24 h procesu adsorpcji zawartość wody wzrosła już tylko nieznacznie i była równa 7,37 g/100 g s.s. (rys. 2). Podobną tendencję tych zmian zaobserwowano w pieczywie chrupkim żytnim (rys. 3). Ilość zaadsorbowanej wody po 5 h procesu adsorpcji była o około 13% wyższa w stosunku do wartości początkowej i wynosiła 7,18 g/100 g s.s.. Dalsza adsorpcja w czasie 24 h spowodowała już tylko nieznaczny wzrost zawartości wody do 7,24 g/100 g s.s. (rys. 3). Jednocześnie stwierdzono, że już po 5 h procesu adsorpcji pary wodnej zarówno pieczywo pszenne, jak i żytnie osiągało stan zbliżony do równowagi. Natomiast dwudziestoczterogodzinna adsorpcja pary wodnej w środowisku o aktywności wody 0,329 umożliwiła osiągnięcie przez pieczywo stanu równowagi. Świadczy o tym obliczona równowagowa zawartość wody, która w przypadku pieczywa pszennego wynosiła 7,39 g/100 g s.s. (tab. 2), a żytniego 7,29 g/100 g s.s. (tab. 3).

Krzywe kinetyki adsorpcji pary wodnej przez badane pieczywa w środowisku o aktywności wody 0,648 charakteryzowały się ciągłym wzrostem zawartości wody do 10 h procesu adsorpcji (rys. 2 i 3). Ilość zaadsorbowanej wody przez pieczywo pszenne po 10 h procesu adsorpcji była o około 39% wyższa niż początkowa zawartość wody i wynosiła 13,07 g/100 g s.s.. Dalszy proces adsorpcji do 24 h spowodował nieznaczny, bo około 1% wzrost zawartości wody w tym pieczywie (rys. 2). Natomiast w pieczywie żytnim ilość zaadsorbowanej wody po 10 h procesu była o około 50% większa od początkowej zawartości. Kontynuowanie adsorpcji do 24 h spowodowało już tylko niewielki wzrost zawartości tego składnika wynoszący około 1,5% (rys. 3). Zaobserwowano, że w środowisku o aktywności wody 0,648 oba badane produkty osiągały stan zbliżony do równowagi już po 10 h procesu adsorpcji pary wodnej. Z obliczeń równowagowej zawartości wody wynika, że po 24 h procesu w środowisku o aktywności wody 0,648 adsorpcja została zakończona (tab. 2 i 3).

Krzywe kinetyczne pieczywa chrupkiego pszennego i żytniego w środowisku o aktywności wody 0,903 miały podobny kształt. Obserwowano ciągły wzrost zawartości wody do 15 h trwania procesu (rys. 2 i 3). Pieczywo pszenne osiągało około 3,9-krotnie większą zawartość wody, tj. 28,27 g/100 g s.s. (rys. 2), zaś żytnie około 3,4-krotnie tj. 28,78 g/100 g s.s. (rys. 3), w stosunku do początkowej jej zawartości. Badane produkty w

środowisku o aktywności wody 0,903 osiągały stan równowagi po 24 h procesu adsorpcji (tab. 2 i 3).



Rys. 4. Zmiany zawartości wody w funkcji różnicy aktywności wody w pieczywie chrupkim.

Fig. 4. Changes in the water content as a function of water activity difference in crispbreads.

Najwyższą zawartością wody charakteryzowały się produkty podczas adsorpcji pary wodnej w środowisku o aktywności wody 1. Zarówno w pieczywie chrupkim pszennym, jak i żytnim obserwowano duże zmiany zawartości wody w całym przedziale czasowym procesu (rys. 2 i 3). Badane pieczywa nie uzyskały stanu równowagi po 24 godzinach procesu adsorpcji w środowisku o $a_w = 1$. Po 15 h procesu adsorpcji pieczywo chrupkie pszenne osiągało około 6-krotnie większą zawartość wody, a pieczywo żytnie około 5,3-krotnie wyższą w stosunku do wartości wyjściowej (rys. 2 i 3). Obliczona równowagowa zawartość wody obu rodzajów badanego pieczywa, w środowisku o aktywności wody 1 jest o około 23% wyższa niż zawartość wody otrzymana po 24 h procesu adsorpcji (tab. 2 i 3).

Stwierdzono, że równowagowa zawartość wody obliczona na podstawie kinetyki adsorpcji pary wodnej po 24 h procesu była nieznacznie wyższa niż równowagowa

zawartość wody wyznaczona z izoterm sorpcji (tab. 2 i 3). Różnice te były statystycznie nieistotne. Potwierdziły to wyniki pomiarów aktywności wody próbek po adsorpcji pary wodnej w badaniach kinetycznych i statycznych.

Badane rodzaje pieczywa różniły się między sobą początkową aktywnością wody i jej zawartością. Stąd w zależności od aktywności wody środowiska sorpcja przebiegała z różną intensywnością. Na rys. 4. przedstawiono różnice między ilością zaadsorbowanej wody po 24 h a początkową zawartością wody, (przyrost lub ubytek zawartości wody) w funkcji różnicy aktywności wody środowiska i produktu. Stwierdzono, że niezależnie od rodzaju produktu, zmiany zawartości wody przypadające na jednostkową zmianę jej aktywności są większe po stronie adsorpcji niż po stronie desorpcji. Oznacza to, że proces adsorpcji przebiega szybciej niż proces desorpcji, czyli produkt łatwiej chłonie wodę niż ją oddaje.

Wydaje się, że obserwowane zmiany w ilości adsorbowanej wody przez pieczywo chrupkie, w zależności od aktywności wody środowiska, wynikają z przemian strukturalnych określonych składników pieczywa. Może to być związane ze zwiększeniem ruchliwości łańcuchów skrobi i białek. Rozluźnienie struktury prowadzi do odsłonięcia nowych centrów adsorpcji i szybkość sorpcji bardzo wzrasta [6, 12]. Ponadto, po procesie ekstruzji składniki pieczywa tworzą stan amorficzny [8, 9, 18], który po wchłonięciu pewnej ilości wody przechodzi w lepkosprężysty. Umożliwia on ruchy translacyjne i rotacyjne polimerów. W rezultacie obserwuje się intensyfikację procesu sorpcji.

Wnioski

1. Pieczywo chrupkie pszenne i żytnie silnie adsorbują parę wodną z otoczenia i charakteryzują się izotermą sorpcji typu II, zgodnie z klasyfikacją Brunauera i wsp. W zakresie średnich aktywności wody pieczywo pszenne adsorbuje więcej pary wodnej niż pieczywo żytnie.
2. Kinetyka adsorpcji zależy od różnicy pomiędzy aktywnością wody pieczywa i aktywnością wody środowiska. Im różnica ta jest większa tym ilość adsorbowanej wody jest większa, a czas osiągnięcia stanu równowagi dłuższy
3. Desorpcja wody z pieczywa jest bardzo wolna i w czasie 24 h uzyskuje się stan pseudorównowagi.
4. Równowagowe zawartości wody obliczone na podstawie kinetyki adsorpcji są bliskie wartościom uzyskanym metodą statyczną. Jednak metodą dynamiczną uzyskuje się z reguły wartości wyższe o ponad 4% w stosunku do wartości statycznych.

Literatura

- [1] Attenburrow G.E., Davies A.P., Goodband R.M., Ingman S.J., Nicholls R.J.: The fracture behavior of starch and gluten in the glassy state, *J. Cereal Sci.*, 1992, **16** (1).
- [2] Brunauer S., Deming L.S., Deming W. E., Teller E.: On the theory of van der Waals adsorption of gases. *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 1723-1732.
- [3] Chang Y.P., Cheah P.B., Seow C.C.: Plasticizing-antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state. *J. Food Sci.*, 2000, **65** (3), 445-451.
- [4] Czapski J.: Zmiany jakości żywności w czasie przechowywania. W: *Opakowania żywności – pod red. Czarniawskiego B. i Michniewicz J.* Agro Food Technology sp. z o. o., Czeladź 1998, s. 235-246.
- [5] Cybulska E. B.: Woda jako składnik żywności. W: *Chemia żywności. Skład, przemiany i właściwości żywności – pod red. Sikorskiego Z.E.* Wyd. 3 zmienione. WNT, Warszawa 2000, s. 59-94.
- [6] Domian E.: Adsorpcja pary wodnej przez żywność w proszku. Praca doktorska. Katedra Inżynierii i Maszynoznawstwa Przemysłu Spożywczego. SGGW, Warszawa 1997.
- [7] Hoseney R.C., Zeleznak K.J., Lai C.S.: Wheat gluten: a glassy polymer. *Cereal Chem.*, 1986, **63**, 285-286.
- [8] Keetels C.J.A.A., van Vliet T., Walstra P.: Relationship between the sponge structure of starch bread and its mechanical properties. *J. Cereal Sci.*, 1996, **24** (1), 27-31.
- [9] Le Meste M., Roudaut G., Davidou S.: Thermomechanical properties of glassy cereal foods. *J. Thermal. Anal.*, 1996, **47**, 1361-1376.
- [10] Lewicki P.P.: A three parameter equation for food moisture sorption isotherms. *J. Food Process Eng.*, 1998, **21**, 127-144.
- [11] Lewicki P.P.: Właściwości wody w produktach spożywczych, *Zesz. Nauk. Politechniki Łódzkiej. Inżynieria Chemiczna i Procesowa*, 1999, **24**, 29-46.
- [12] Lewicki P.P.: Raoult's law based food water sorption isotherm. *J. Food Eng.*, 2000, **43**, 31-40.
- [13] Peleg M.: On modeling changes in food and biosolids and around their glass transition temperature range. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1996, **36**, 46-67.
- [14] PN-84/A-8636. Wyroby specjalne. Oznaczanie zawartości suchej masy.
- [15] Ross Y.H.: Glass transition – related physicochemical changes in foods. *Food Technol.*, 1995, **10**, 97-102.
- [16] Slade L., Levine H.: Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1991, **30**, 115-360.
- [17] Van Hecke E., Allaf K., Bouvier J. M.: Texture and structure of crispy – puffed food products. II. Mechanical properties in puncture. *J. Texture Stud.*, 1998, **29** (6), 617-632.
- [18] Zeleznak K.J., Hoseney R.C.: The glass transition in starch. *Cereal Chem.*, 1987, **64** (2), 121-124.

WATER SORPTION PROPERTIES OF THE CRISPBREAD

S u m m a r y

The main objective of the paper was to determine sorption properties of extruded wheat and rye crispbreads. Those sorption properties were tested using static and dynamic methods. The scope of this study included the analysis of isotherms and kinetics of sorption, which were measured in an environment showing the following water activities: 0; 0.329; 0.648; 0.903; and 1. The tested wheat and rye crispbreads were taken directly from the production line. The water content and water activity in them did not correspond to values as

determined on the basis of water vapour sorption isotherms. Similarly, the sorption properties measured under the dynamic conditions did not correlate with the values determined on the basis of measurements taken under the static conditions. From the GAB equation, the volume of a wheat crispbread monolayer was measured. It was 5.13 g/100 g d.m., and this figure corresponded to the water activity being 0.110. As for the rye crispbread, this parameter equalled 4.68 g/100 g d.m. with the water activity being 0.109. The two types of the crispbread tested differed on the initial water activity and water contents. Thus, the intensity of the sorption process varied depending on the water activity in a given environment. The water desorption was stated to be very slow and led to a state of pseudo-equilibrium. The adsorption depended on the difference between the water activity in the crispbreads and in the environment. The greater this difference was, the higher the adsorbed water amount was, and the more time was necessary to reach the state of equilibrium. The values of equilibrium water content, calculated on the basis of the adsorption kinetics, were close to the values obtained by using the static method. However, while using the dynamic method, the values obtained were usually higher by more than 4% if compared with the statically measured ones. It seems that the changes observed in the quantities of water adsorbed by the crispbreads, depending on the water activity in a given environment, result from structural transformations of some particular components of the crispbread.

Key words: crispbread, sorption isotherms, sorption kinetics ☒

MAŁGORZATA PIECYK, MIROSŁAWA KLEPACKA

WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE PREPARATÓW BIAŁKOWYCH OTRZYMANÝCH Z NASION FASOLI (*PHASEOLUS VULGARIS*) METODĄ KRYSZALIZACJI I IZOLACJI KLASYCZNEJ

Streszczenie

W pracy porównano właściwości funkcjonalne – rozpuszczalność białek w funkcji pH, powierzchnię hydrofobowość aromatyczną w pH 2,8 i 8,0 oraz indeks aktywności emulgowania (IAE) – preparatów białkowych otrzymanych z nasion fasoli dwoma metodami: izolacji klasycznej i krystalizacji w środowisku kwaśnym. Podczas izolacji klasycznej białka odzyskiwano z ekstraktów alkalicznych w punkcie najmniejszej rozpuszczalności, w postaci amorficznej (PBA). W drugiej metodzie wykorzystano właściwości białek fasoli do tworzenia struktur krystalicznych w środowisku kwaśnym (PBK). Otrzymane preparaty białek krystalicznych miały mniejszą powierzchnię hydrofobowość aromatyczną zarówno w pH 2,8, jak i 8,0; mniejszą zdolność absorpcji wody i niższy indeks aktywności emulgowania (IAE) w porównaniu z PBA. Duża hydrofobowość w środowisku kwaśnym zarówno białek krystalicznych, jak i amorficznych wskazuje, że mogą mieć one lepsze właściwości funkcjonalne w tym środowisku. Stwierdzono, że w trakcie podgrzewania preparatów w $t=100^{\circ}\text{C}$ przez 30 min, hydrofobowość, wodochłonność i IAE wzrosły bardziej w PBK niż w PBA. Preparaty białek krystalicznych miały gorsze właściwości funkcjonalne w porównaniu z amorficznymi, co wynikało z odmiennego składu i struktury tych białek.

Słowa kluczowe: fasola, białka krystaliczne (PBK), białka amorficzne (PBA), rozpuszczalność, hydrofobowość, wodochłonność, indeks aktywności emulgowania (IAE).

Wprowadzenie

Izolacja białek jest procesem technologicznym, w wyniku którego otrzymuje się preparaty wysokobiałkowe. Opracowano wiele technologii, dzięki którym uzyskano preparaty białkowe z obniżoną zawartością oligosacharydów i fitynianów [20].

W zależności od zastosowanej metody izolacji uzyskuje się białka o różnej strukturze, amorficznej lub krystalicznej i o różnych właściwościach funkcjonalnych [1, 21].

Dr M. Piecyk, prof. dr hab. M. Klepacka, Zakład Oceny Jakości Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Jakości Żywności, SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

Powszechnie stosowana jest metoda otrzymywania preparatów białkowych przez wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4,4–4,6) z alkalicznych ekstraktów mąki [20]. Metodą tą otrzymuje się białka bezpostaciowe, tzw. amorficzne. Inną metodą stosowaną do otrzymywania preparatów białkowych jest krystalizacja w środowisku kwaśnym, pozwalająca na otrzymanie różnych form kryształów [2, 8, 17].

Wśród białek nasion roślin strączkowych najłatwiej krystalizuje faseolina (główna frakcja białek fasoli) przy zastosowaniu prostych technik krystalizacji. Glicynina, główna frakcja białek soi, nie krystalizuje ze względu na jej heterogeniczność oraz polimorfizm struktury pierwszorzędowej [22, 23].

O zastosowaniu preparatów białkowych jako dodatków do żywności, obok wartości odżywczej i jakości mikrobiologicznej, decydują również właściwości funkcjonalne. Parametry zastosowanego procesu technologicznego do otrzymywania preparatów białkowych, takie jak rodzaj ekstrahenta, kwasowość środowiska, temperatura czy siła jonowa mają wpływ na zmiany konformacyjne białka, a tym samym zmieniają jego właściwości funkcjonalne, np. DiLollo i wsp. [8] wykazali różnice w powierzchniowej hydrofobowości alifatycznej między białkami amorficznymi a krystalicznymi.

Zdolność emulgowania i właściwości pianotwórcze są rezultatem zachowania się białek na powierzchni faz tłuszcz–woda czy powietrze–woda. Interakcje białko–woda są uwarunkowane nie tylko obecnością aminokwasów polarnych, ale także ich dostępnością na powierzchni cząsteczki białka. Dlatego uważa się, że powierzchniowa hydrofobowość białek jest jedną z najlepszych metod ich charakterystyki i przewidywania ich rozpuszczalności oraz zachowania podczas tworzenia emulsji i pian [9].

Celem pracy było wyznaczenie właściwości funkcjonalnych: wodochłonności, zdolności emulgowania, rozpuszczalności i związanej z nimi powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej w preparatach białkowych otrzymanych w dwojaki sposób: metodą izolacji klasycznej tj. odzyskania białek z ekstraktów alkalicznych w punkcie ich najmniejszej rozpuszczalności oraz poprzez krystalizację w środowisku kwaśnym. Ponadto porównywano wpływ ciepła (temp. 100°C) na te właściwości.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły nasiona fasoli białej (*Phaseolus vulgaris*) trzech odmian (Mela, Proсна, Wenta), które poddano obłuszczeniu, przemiałowi i przesianiu przez sita o średnicy oczek 0,15 mm.

Do badań użyto preparatów białek amorficznych (PBA), otrzymanych przez wytrącenie białek w punkcie najmniejszej rozpuszczalności (pH 4,3) z ekstraktów wodnych mąki po doprowadzeniu pH do 9,0. Preparaty białek krystalicznych (PBK) otrzymywano przez ekstrahowanie białek z mąki kwasem cytrynowym i odzyskiwanie

ich z ekstraktów przez oziębienie w temp. 5°C w ciągu 18 godz. [1, 14]. Do ekstrakcji stosowano roztwór kwasu cytrynowego o stężeniu 0,03 mol/l i wartości pH 5,5 [17].

W celu przeprowadzenia charakterystyki chemicznej w preparatach białkowych oznaczano zawartość popiołu, białka oraz suchej masy znormalizowanymi metodami według AOAC [4].

W celu zbadania wpływu ciepła na właściwości funkcjonalne badanych białek, uzyskane preparaty, po zamknięciu w fiolkach w atmosferze azotu, ogrzewano w łaźni wodnej w temp. 100°C przez 30 min, po czym natychmiast chłodzono. Do pomiaru zmian powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej wskutek ogrzewania, 0,1% roztwory białek poddawano działaniu identycznych warunków.

Rozpuszczalność białek oznaczano przez doprowadzenie pH 0,1% wodnych roztworów preparatów białek amorficznych i krystalicznych do żądanej wartości, a następnie prowadzono ekstrakcję przez godzinę w wytrząsarce laboratoryjnej. Po odwirowaniu (10 min; 8000 x g) w otrzymanym ekstrakcie oznaczano zawartość białka rozpuszczalnego metodą Lowry'ego [14]. Badania prowadzono do osiągnięcia takiego pH (w środowisku alkalicznym i kwaśnym), w którym białka wykazywały rozpuszczalność powyżej 90%.

Wodochłonność oznaczano na podstawie ilości zaabsorbowanej wody dodanej w kilkunastokrotnym nadmiarze do preparatu białkowego [19].

Powierzchniową hydrofobowość aromatyczną białek oznaczano w mące, preparatach białek amorficznych i krystalicznych metodą fluorescencyjną z ANSA (kwas 8-anilino-1-naftaleno-sulfonowy) [10]. Do oznaczeń przygotowywano około 0,1% ekstrakty białek w 0,01 M buforze fosforanowym (pH 8,0) oraz w buforze McIlvaine'a (pH 2,8). Po 45 min od dodania ANSA (10 µl roztworu 0,1 M do 5 ml próbki) dokonywano pomiarów intensywności fluorescencji (FI) w spektrofлуorymetrze Shimadzu RF-1501 przy długości fali wzbudzenia 390 nm i emisji 470 nm. Naturalną fluorescencję białek eliminowano przez pomiar FI prób ślepych bez dodatku ANSA. Powierzchnię hydrofobową wyrażano w jednostkach umownych jako stosunek intensywności fluorescencji będącej wynikiem połączenia ANSA z hydrofobowymi aminokwasami aromatycznymi do stężenia białka w roztworze oznaczonego metodą Kjeldahla [FI/% białka].

Indeks aktywności emulgowania (IAE) oznaczano metodą Pearce'a i Kinselli [16], przygotowując emulsje przez zhomogenizowanie (Ultra Turrax T 25 przy 20500 obr./min przez 30 s), 15 g oleju rzepakowego i 45 g wodnego roztworu preparatu zawierającego 0,5% białka. W otrzymanej emulsji mierzono zmętnienie poprzez pomiar absorbancji przy 500 nm rozcieńczonej emulsji w stosunku 1:100 0,1% SDS (sodowy siarczan dodecylu) oraz zawartość oleju metodą suszarkową.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której badano istotność różnic między średnimi wartościami w próbach stosując test Duncana ($p \leq 0,05$) oraz

określono korelację między hydrofobowością białek a IAE. Analizy te wykonano przy użyciu programu komputerowego Statgraphics Plus 2.1.

Wyniki i dyskusja

Analiza podstawowego składu chemicznego wykazała, że procesy izolacji przyczyniły się do uzyskania preparatów o wysokiej zawartości białka w stosunku do surowca wyjściowego (tab. 1). Preparaty białek krystalicznych otrzymane ze wszystkich badanych odmian charakteryzowały się wyższą zawartością białka (75–82%) w porównaniu z preparatami białek amorficznych (75–77%).

Tabela 1

Podstawowy skład chemiczny mąki i preparatów białkowych z nasion fasoli Mela, Prosna i Wenta.
Basic chemical composition of flours and protein preparations from bean (variety Mela, Prosna and Wenta).

Odmiana fasoli Variety	Rodzaj próbki Kind of sample	Zawartość wody [%] Water content [%]	Zawartość białka g/100g s.m. Protein content g/100g d.m.	Zawartość popiołu g/100g s.m. Ash content g/100g d.m.
Mela	Mąka	8,4 (± 0,005) ^a	21,9 (± 0,303)	4,29 (± 0,089)
	PBA	7,3 (± 0,012)	76,9 (± 0,424)	5,43 (± 0,069)
	PBK	7,0 (± 0,012)	82,4 (± 0,292)	5,68 (± 0,012)
Prosna	Mąka	8,0 (± 0,017)	18,5 (± 0,335)	4,19 (± 0,038)
	PBA	4,3 (± 0,005)	68,0 (± 0,391)	7,03 (± 0,027)
	PBK	4,3 (± 0,018)	74,9 (± 0,267)	3,99 (± 0,079)
Wenta	Mąka	9,4 (± 0,028)	25,0 (± 0,399)	5,43 (± 0,011)
	PBA	8,1 (± 0,022)	76,7 (± 0,197)	4,98 (± 0,033)
	PBK	1,6 (± 0,037)	81,5 (± 0,200)	4,17 (± 0,054)

a – Wartości średnie ± odchylenie standardowe;

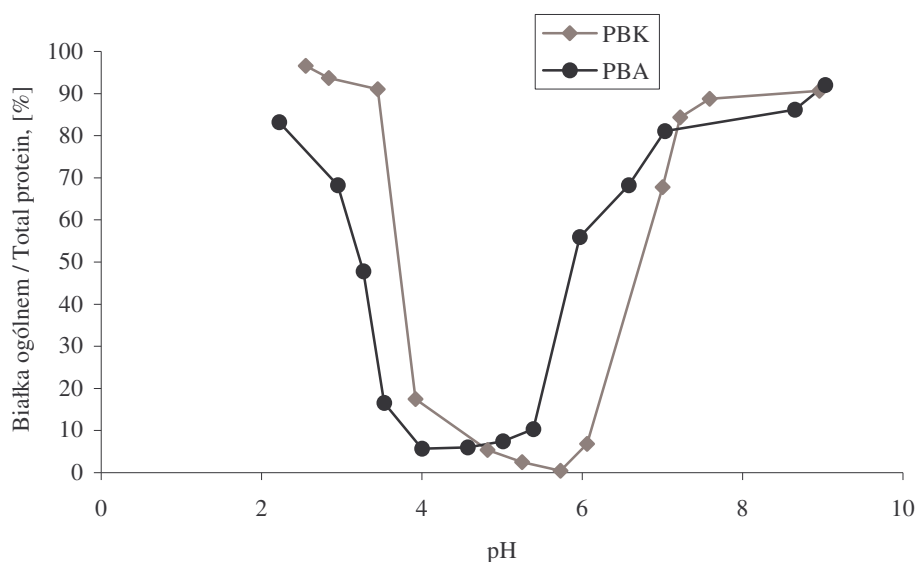
a – Mean values ± standard deviation.

Wyższą zawartość białka w preparatach białek krystalicznych niż amorficznych uzyskali Alli i Baker [1], która zależała od stężenia kwasu cytrynowego i jego pH, uzyskanych form krystalicznych oraz gatunku i odmiany badanych nasion, przy czym różnice międzyodmianowe były znacznie mniejsze.

Przykładowe profile rozpuszczalności białek amorficznych i krystalicznych w funkcji pH preparatów z fasoli odmiany Prosna* przedstawiono na rys. 1. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że białka krystaliczne

*W dalszym tekście, w celu uproszczenia analizy, preparaty z fasoli będą określane nazwą danej odmiany.

i amorficzne różniły się zakresem pH, w którym wykazywały niską rozpuszczalność. Najmniejszą rozpuszczalność białek krystalicznych (maksymalnie do 2,5%) stwierdzono w środowisku o pH między 5,0 a 5,5. Natomiast białka amorficzne wykazywały najmniejszą rozpuszczalność (maksymalnie do 7%) w pH 4,0–4,5. Obserwowane różnice zarówno w zakresie pH, w którym badane białka wykazują najmniejszą rozpuszczalność, jak i wielkości tej rozpuszczalności wynikają z odmiennej ich budowy. Białko krystaliczne zbudowane jest z globuliny 7S (78%), której pI wynosi 5,5 i 11S (11%), natomiast białko amorficzne zbudowane jest również z faseoliny i leguminy, ale ich udział jest mniejszy (64%), natomiast więcej jest frakcji o niskich masach cząsteczkowych [18].

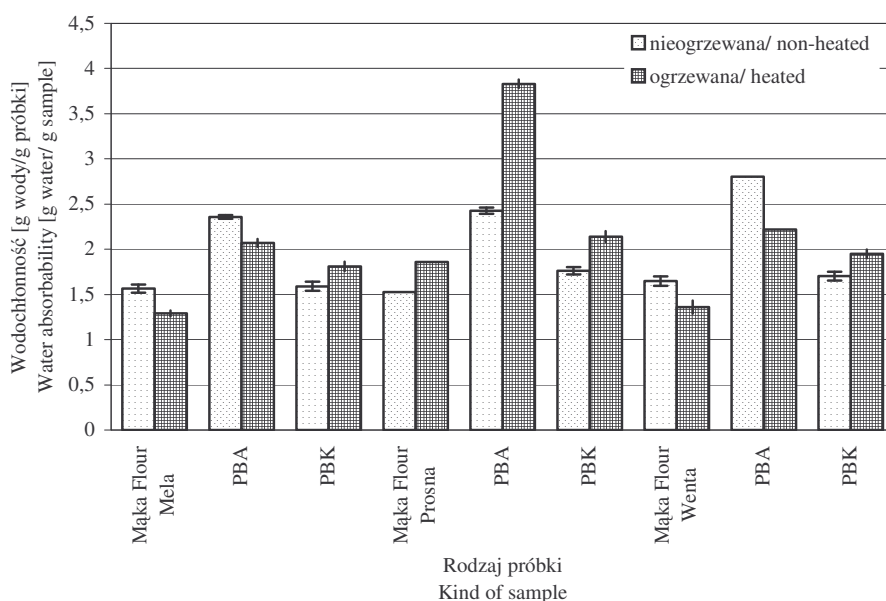


Rys.1. Rozpuszczalność białek amorficznych (PBA) i krystalicznych (PBK) z nasion fasoli odmiany Prosna w funkcji pH.

Fig. 1. The solubility of amorphous (PBA) and crystalline (PBK) proteins obtained from bean (the 'Prosna' variety) seeds as a function of pH.

Porównując rozpuszczalność białek amorficznych i krystalicznych poza odmiennym zakresem najmniejszej rozpuszczalności można również stwierdzić, że białka krystaliczne były bardziej rozpuszczalne w środowisku kwaśnym (pH= 3,0) niż amorficzne. Natomiast w środowisku alkalicznym (powyżej pH 8,0) rozpuszczalność białek krystalicznych i amorficznych była podobna. Ilość białek rozpuszczalnych uzyskana w tym zakresie pH nie odbiegała od danych podawanych przez innych autorów [5].

Izolacja białek przez ich wytrącenie z ekstraktów alkalicznych w punkcie najmniejszej rozpuszczalności przyczyniała się do poprawy wodochłonności w porównaniu z mąką i wynosiła 2,4–3,0 g H₂O/ g s.m. próbki (rys. 2). Natomiast pozyskanie białek przez ich krystalizację z kwasowych ekstraktów nie wpłynęło na poprawę zdolności absorpcji wody w porównaniu z mąką (wyjątek Proсна). Wpływ ciepła na wodochłonność preparatów białek amorficznych zależał od odmiany nasion, z których zostały otrzymane. Ogrzewanie (w temp. 100°C) wpłynęło na poprawę wodochłonności tylko w preparacie białek amorficznych z odmiany Proсна (58%), natomiast w pozostałych preparatach z odmian Mela i Wenta następowało jej obniżenie, odpowiednio o 12 i 21% (różnice istotne statystycznie). Porównując wyniki wodochłonności białek krystalicznych nieogrzewanych i ogrzewanych stwierdzono, że ogrzewanie przyczyniło się do poprawy wodochłonności we wszystkich badanych odmianach.

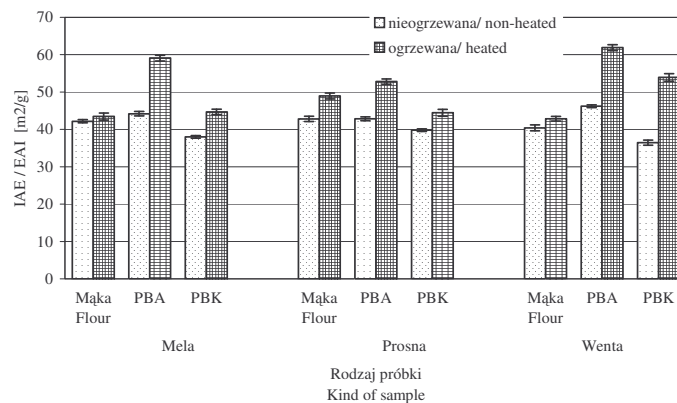


Rys. 2. Wodochłonność mąki i preparatów białek amorficznych i krystalicznych otrzymanych z nasion fasoli odmiany Mela, Proсна i Wenta.

Fig. 2. The water absorbability of a flour and amorphous & crystalline protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Proсна, and Wenta varieties).

We wszystkich badanych próbkach białek nieogrzewanych i ogrzewanych oznaczono indeks aktywności emulgowania IAE (rys. 3). Białka amorficzne charakteryzowały się podobną lub nieco niższą wartością IAE w porównaniu z mąką. W wyniku krystalizacji otrzymano białka o niższej wartości IAE w porównaniu z mąką

i PBA (różnice statystycznie istotne). Otrzymane wartości IAE mąki i preparatów białkowych są podobne do wyników izolatów sojowych (42–65 m²/g) i izolatów z grochu (42–54 m²/g) [11, 24]. Poddanie działaniu ciepła (w temp. 100°C) powodowało istotne zwiększenie wskaźnika aktywności emulgowania we wszystkich badanych preparatach, który w przypadku mąki był niewielki. Uzyskane wyniki są podobne do prezentowanych przez innych autorów dotyczących poprawy właściwości emulgujących białek na skutek zmian denaturacyjnych [12, 24]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki IAE preparatów białek fasoli wskazują na słabe właściwości emulgujące w środowisku obojętnym. Dlatego w dalszych badaniach określano powierzchnię hydrofobową aromatyczną białek badanych preparatów oraz mąki w pH, w których ustalono ich dużą rozpuszczalność tj. w pH 8,0 i 2,8.

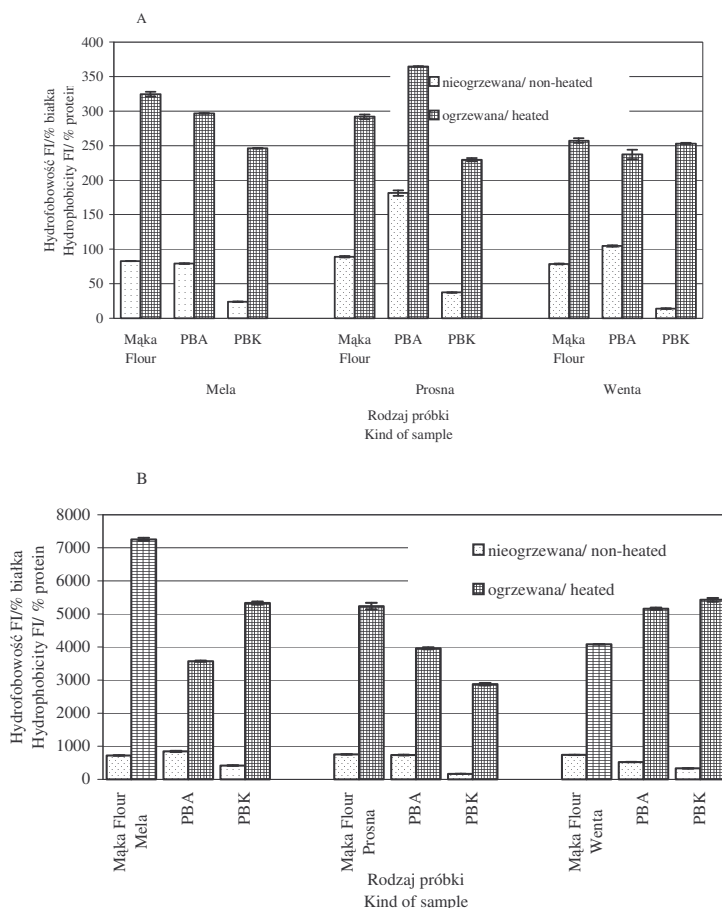


Rys. 3. Indeks aktywności emulgowania (IAE) mąki i preparatów białek amorficznych i krystalicznych otrzymanych z nasion fasoli odmian Mela, Prosna i Wenta.

Fig. 3. The emulsifying activity index (EAI) of a flour and amorphous & crystalline protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wenta varieties).

Na podstawie wyników uzyskanych w środowisku o pH 8,0 (rys. 4A) stwierdzono, że białka krystaliczne miały znacznie niższą hydrofobowość niż białka mąki czy białka amorficzne. W białkach krystalicznych powierzchnia hydrofobowa była niższa około 3–7 razy niż w białkach amorficznych. Wyniki uzyskane w pH 2,8 (rys. 4B) wskazywały na znacznie wyższą hydrofobowość powierzchnię wszystkich badanych białek w porównaniu z wynikami otrzymanymi w pH 8,0. Otrzymane wyniki świadczą o znacznie większych zmianach w strukturze białek w środowisku kwaśnym. Porównując hydrofobowość badanych białek krystalicznych z białkami mąki i białkami amorficznymi stwierdzono podobne zależności jak w pH 8,0. Białka krystaliczne charakteryzowały się niższą hydrofobowością, 1,5–4,5 razy mniejszą niż białka amorficzne.

Ogrzewanie białek (w temp. 100°C) wpłynęło na znaczny wzrost ich hydrofobowości w stosunku do prób niepoddanych działaniu ciepła zarówno w pH 2,8, jak i 8,0. Jednak większe zmiany w strukturze badanych białek pod wpływem obróbki termicznej obserwowano w środowisku kwaśnym.



Rys. 4. Hydrofobowość w pH 8,0 (A) i pH 2,8 (B) białek mąki i preparatów amorficznych i krystalicznych nieogrzewanych i ogrzewanych, otrzymanych z nasion fasoli odmian Mela, Prosna i Wentka.

Fig. 4. The protein hydrophobicity of flour proteins and preparations of amorphous & crystalline proteins, non heated and heated, obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wentka varieties), at pH equaling 8.0 (A) and 2.8 (B).

W tym środowisku, pod wpływem ciepła, szczególnie duże zmiany zachodziły w białkach krystalicznych, w których powierzchniowa hydrofobowość w pH 8,0 zwiększała się od 6 razy (Prosna) do 17 razy (Wentka), natomiast w środowisku o pH 2,8

zaobserwowano wzrost od 13 (Mela) do 18 razy (Prosna). W białkach amorficznych oddziaływanie ciepła wywołało zmianę ekspozycji aminokwasów hydrofobowych na powierzchni cząsteczki, ale w mniejszym stopniu niż w białkach krystalicznym. W białkach amorficznych preparatów Prosna i Wenta (pH 8,0) obserwowano około dwukrotne zwiększenie się hydrofobowości pod wpływem ciepła, natomiast w białku z Meli było ono około czterokrotne. Natomiast w pH 2,8 wzrost ten był znacznie większy i również zależał od odmiany fasoli. W białku amorficznym z Meli i Prosny hydrofobowość zwiększyła się po ogrzaniu odpowiednio 4 i 5 razy natomiast z Wenty 9-krotnie. Otrzymane wyniki wskazały na większą ekspozycję aminokwasów aromatycznych w wyniku rozwinięcia łańcucha polipeptydowego w środowisku kwaśnym.

Kato i wsp. [13] oraz Voutsinas i wsp. [24] podają, że powierzchniowa hydrofobowość białek skorelowana jest z właściwościami emulgującymi. Ponieważ w zakresie pH 7,0–10,0 nie zmienia się znacząco ekspozycja aminokwasów hydrofobowych na powierzchni globulin 7S i 11S, dlatego sprawdzono czy istnieje zależność między IAE a hydrofobowością białek w pH = 8,0 niepoddanych działaniu ciepła. Analiza regresji potwierdziła istnienie zależności ($IAE = 38,137 + 0,04298 \cdot FI/\%$ białka) o współczynniku korelacji $r = 0,70$ (poziom istotności $p = 0,034$). Uzyskano dobrą korelację, ale dotyczy ona tylko hydrofobowości aromatycznej, ponieważ badania nie obejmowały oznaczeń hydrofobowości spowodowanej obecnością aminokwasów alifatycznych. Jednak w badaniach hydrofobowości alifatycznej, prowadzonych przez DiLollo i wsp. [8], wykazano, że białka krystaliczne mają mniejszą powierzchnię hydrofobową niż białka amorficzne. Ponadto oznaczenia hydrofobowości prowadzono tylko na białkach rozpuszczalnych, a w badaniach właściwości emulgujących izolatów białkowych oraz frakcji białek rozpuszczalnych dowiedziono, że lepsze właściwości emulgujące mają frakcje rozpuszczalne [7]. Badając, czy występuje korelacja między hydrofobowością a IAE, nie uwzględniano próbek poddanych działaniu ciepła ze względu na różne warunki obróbki termicznej (na sucho i w roztworze).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań wskazują, że zastosowana metoda izolacji miała istotny wpływ na właściwości funkcjonalne badanych białek. Warunki procesu technologicznego, takie jak pH czy rodzaj ekstrahenta, mogą wpływać na zmiany w białku. Izolowanie białek powoduje, że zachodzą w nim oddziaływania typu jonowego, prowadzące do nieodwracalnych zmian w ładunku cząsteczki białka [3], co może mieć wpływ na jego rozpuszczalność. Ponadto izolacja białek w punkcie najmniejszej rozpuszczalności może powodować częściowe rozfałdowanie łańcuchów polipeptydowych, dzięki czemu zwiększa się ekspozycja aminokwasów na powierzchni białka. Wzrost ekspozycji aminokwasów polarnych (cystyny i treoniny) wpływa na poprawę wodochłonności, natomiast niepolarnych na poprawę zdolności

emulgowania. Drugim czynnikiem wpływającym na właściwości funkcjonalne białek jest ich budowa. Rozdziały elektroforetyczne i filtracja żelowa wykazały, że białka krystaliczne zbudowane są głównie z globuliny 7S, natomiast w białku amorficznym udział globuliny 7S jest mniejszy [18].

Alli i wsp. [9] stwierdzili, że białka globulinowe (zarówno 7S, jak i 11S) nasion roślin strączkowych charakteryzują się niską powierzchnią hydrofobową. Jednak globulina 7S ma mniejszą powierzchnię hydrofobowość niż 11S, co związane jest z jej kompaktową strukturą [6]. Ponadto struktura globulin 7S i 11S zależy od pH środowiska. W zakresie pH 7,0–10 nie ulegają one znacznym zmianom i nie obserwuje się zmian ich powierzchniowej hydrofobowości. Natomiast w środowisku kwaśnym (zwłaszcza w pH 2,4) białka te ulegają dysocjacji do podjednostek czemu towarzyszy rozwinięcie łańcuchów polipeptydowych. Wynikiem tych zmian jest wzrost powierzchniowej hydrofobowości białek. Jednak większa ekspozycja aminokwasów hydrofobowych na powierzchni cząsteczki w pH 2,4 występuje w globulinie 11S niż 7S. Związane jest to z jej dysocjacją do sześciu podjednostek, podczas gdy globulina 7S dysocjuje do trzech podjednostek. Otrzymane w tej pracy różnice między białkami amorficznymi i krystalicznymi wskazują, że na powierzchnię hydrofobową miała wpływ obecność frakcji leguminopodobnej (11S) w białkach amorficznych.

Uzyskane wyniki w przypadku próbek PBK poddanych działaniu ciepła (temp. 100°C) świadczą o zmianach zachodzących w białkach, które prowadzą do zwiększenia ekspozycji aminokwasów polarnych i niepolarnych (wzrost hydrofobowości aromatycznej) na powierzchni cząsteczki białka, w wyniku czego wzrasta wodochłonność i zdolność emulgowania.

Wnioski

1. Preparaty białkowe z nasion fasoli, otrzymane w procesie krystalizacji, wykazują niższą powierzchnię hydrofobowość aromatyczną, słabszą zdolność emulgowania oraz mniejszą zdolność absorpcji wody w porównaniu z preparatami uzyskanymi w wyniku izolacji klasycznej.
2. Wyższa hydrofobowość w środowisku kwaśnym niż alkalicznym białek krystalicznych i amorficznych wskazuje, że mogą mieć lepsze właściwości funkcjonalne w tym środowisku.
3. Obróbka termiczna w większym stopniu wpłynęła na poprawę właściwości funkcjonalnych białek krystalicznych w porównaniu z preparatami otrzymanymi metodą izolacji klasycznej.

Literatura

- [1] Alli I., Baker B.E.: Constitution of leguminous seeds: the microscopic structure of proteins isolated from *Phaseolus* beans. J. Sci. Food Agric., 1980, **31**, 1316-1322.
- [2] Alli I., Baker B.E.: Constitution of leguminous seeds. a note on protein- phytic acid interactions during isolation of acid-soluble protein from *Phaseolus* beans. J. Sci. Food Agric, 1981, **32**, 588-592.
- [3] Alli I., Gibbs B.F., Okoniewska M.K., Konishi Y., Dumas F.: Identification and characterization of phaseolin polypeptides in a crystalline protein isolated from White Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Agric. Food Chem., 1993, **41**, 1830-1834.
- [4] AOAC 1990: Official Methods of Analysis. 15th edition, Virginia USA.
- [5] Carbonaro M., Cappelloni M., Nicoli S., Lucarini M., Carnovale E.: Solubility- digestibility relationship of legume proteins. J. Agric. Food Chem., 1997, **45**, 3387-3394.
- [6] Chang K.C., Satterlee L.D.: Isolation and characterisation of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci., 1981, **46**, 1368-1373.
- [7] Dagorn-Scaviner C., Gueguen J., Lefebvre J.: Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorptions behaviors, J. Food Sci., 1987, **52**, 335-341.
- [8] DiLollo A., Alli I., Biliardieris C., Barthakur N.: Thermal and surface active properties of citric acid-extracted and alkali- extracted proteins from *Phaseolus* beans. J. Agric. Food Chem., 1993, **41**, 24-29.
- [9] Gueguen J.: Relation between conformation and surface hydrophobicity of pea (*Pisum sativum* L.) globulins. J. Agric. Food Chem., 1989, **37**, 1236-1241.
- [10] Hayakawa S., Nakai S.: Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. J. Food Sci., 1985, **50**, 486-491.
- [11] Jackman L.R., Yada R.Y.: Functional properties of whey- pea protein composite blends in model system. J. Food Sci., 1989, **54**, 1287-1292.
- [12] Kato A., Osako Y., Matsudomi N., Kobayashi K.: Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. Agric. Biol. Chem., 1983, **47**, 33-37.
- [13] Kato A., Tsutsui N., Matsudomi N., Kobayashi K., Nakai S.: Effects of partial denaturation on surface properties of ovalbumin and lysozyme. Agric. Biol. Chem., 1981, **45**, 2755-2760.
- [14] Lowry O.H., Rosenbrough W.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, **193**, 265-275.
- [15] Musakhanian J., Alli I.: Crystalline nature of acid extracted proteins from *Phaseolus* beans. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 1990, **23**, 47-52.
- [16] Pearce K. N., Kinsella J. E.: Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem., 1978, **26**, 716-723.
- [17] Piecyk M., Worobiej E., Klepacka M.: Digestibility of crystalline proteins from *Phaseolus* beans. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2000, **9/50**, 29-33.
- [18] Piecyk M.: Filtracja żelowa białek amorficznych i krystalicznych z nasion fasoli przy użyciu HPLC. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2000, **3 (24)**, 48-54.
- [19] Rutkowski A., Kozłowska H.: Preparaty żywnościowe z białka roślinnego, WNT. Warszawa 1981.
- [20] Sosulski F. W., McCurdy A. R.: Functionality of flours, protein fractions and isolates from Field peas and Faba bean. J. Food Sci., 1987, **52**, 1010-1014.
- [21] Utsumi S., Gidamis A.B., Kanamori J., Kang I.-J., Kito M.: Effects of deletion of disulfide bonds by protein engineering on the conformation and functional properties of soybean proglycinin, J. Agric. Food Chem., 1993, **41**, 687-691.
- [22] Utsumi S., Khono M., Mori T.: An alternate cDNA encoding glycinin A_{1a} B_x subunit. J. Agric. Food Chem., 1987, **35**, 210-214.
- [23] Utsumi S., Kim Ch-S., Kohano M., Kito M.: Polymorphism and expression of cDNAs encoding glycinin subunits. Agric. Biol. Chem., 1987, **51**, 3267-3273.

- [24] Voutsinas L.P., Cheung E., Nakai S.: Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J. Food Sci.*, 1983, **48**, 26-32.

**FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*) SEED
PREPARATIONS OBTAINED USING THE CRYSTALLIZATION AND CLASSICAL
ISOLATION METHODS**

S u m m a r y

In this paper, there were compared some functional properties of the protein preparations obtained from bean seeds using two methods: a classical isolation and crystallization under the acidic conditions. The compared functional properties were: the protein solubility as a function of pH, the surface aromatic hydrophobicity at pH 2.8 and 8.0, and the emulsifying activity index (EAI). During the classical isolation process, the proteins were recovered from an alkaline extract at a minimum solubility pH, and their form was amorphous (PBA). While using the second method, the ability of bean proteins to create crystalline structures under the acidic conditions (PBK) was utilized. The crystalline proteins obtained had a lower surface aromatic hydrophobicity at both pH values: 2.8 and 8.0, a lower water absorbability and EAI comparing to PBA. The high hydrophobicity of the crystalline and amorphous proteins under the acidic conditions implies that they might have better functional properties in this environment. It was stated that while heating the preparations at 100°C for 30 minutes, their hydrophobicity, water absorbability, and EAI values rose higher in PBK than in PBA. Crystalline proteins preparations had worse functional properties if compared to the amorphous ones, and this fact results from their different composition and structure.

Key words: bean, amorphous and crystalline proteins, solubility, hydrophobicity, water absorbability, EAI ☒

BEATA DRUŻYŃSKA, MIROŚŁAWA KLEPACKA

**WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE PREPARATÓW
POLIFENOLI OTRZYMANYCH Z OKRYWY NASIENNEJ FASOLI
CZARNEJ, RÓŻOWEJ I BIAŁEJ (*PHASEOLUS*)**

Streszczenie

Celem pracy było określenie właściwości przeciwutleniających preparatów polifenoli uzyskanych z okrywy nasiennej fasoli czarnej, różowej i białej. Preparaty otrzymano przez ekstrakcję polifenoli 0,5% roztworem HCl w metanolu, zagęszczanie pod próżnią i liofilizację. Charakterystyka chemiczna otrzymanych preparatów obejmowała określenie zawartości tanin skondensowanych oraz antocyjanów. Ponadto oznaczono zdolność polifenoli do chelatowania jonów żelaza (II).

Badania właściwości przeciwutleniających preparatów polifenoli obejmowały oznaczanie zdolności preparatów do unieczynniania kationorodników ABTS⁺ oraz rodników wodorotlenowych.

Stwierdzono, że wszystkie badane preparaty wykazywały aktywność przeciwrodnikową zarówno wobec kationorodników ABTS⁺ (od 18 do 28,5%), jak i wobec rodników wodorotlenowych (od 25 do 95%). Największą aktywnością charakteryzowały się preparaty z fasoli czarnej i różowej, natomiast najmniejszą preparat z fasoli białej. Spowodowane to było prawdopodobnie większą zawartością polifenoli, a zwłaszcza tanin skondensowanych w preparatach z okryw fasoli kolorowych.

Słowa kluczowe: polifenole, właściwości przeciwutleniające, kationorodniki ABTS⁺, rodniki wodorotlenowe.

Wstęp

Wolne rodniki są dużym zagrożeniem dla zdrowia, ponieważ są metabolizowane w organizmie człowieka i atakują molekuly czynne biologicznie: białka, kwasy tłuszczowe i nukleinowe. Wynikiem ich działania jest uszkodzenie komórek i tkanek, co prowadzi do wielu chorób i przyspiesza procesy starzenia [6, 16].

Efektom działania wolnych rodników w żywności jest przede wszystkim utlenianie lipidów. Niekorzystnym efektem tego działania sprzyja również produkowanie żywności o długim okresie przydatności do spożycia [4]. Procesom

oksydacyjnym zapobiega się przez dodatek przeciwutleniaczy. W przemyśle spożywczym stosowane są syntetyczne przeciwutleniacze (pochodne fenolu) o dużej skuteczności w powstrzymaniu reakcji utleniania. Ich zastosowanie jest jednak ograniczone ze względu na toksyczność [21]. Spowodowało to, że w ostatnich latach obserwuje się coraz większe zainteresowanie naturalnymi przeciwutleniaczami, które są lepiej akceptowane przez konsumentów i uważane za bardziej bezpieczne.

Największą grupę wśród naturalnych przeciwutleniaczy, bardzo zróżnicowaną pod względem struktury i właściwości, stanowią polifenole. Są to drugorzędowe metabolity rozpowszechnione w świecie roślin, natomiast nie syntetyzowane w organizmach zwierząt [22]. Oddziałują one jako związki unieczynnające wolne rodniki, tworzą kompleksy z metalami przejściowymi, hamują działanie lipooksygenaz i innych enzymów katalizujących reakcje utleniania [2, 4, 5]. Właściwości przeciwutleniające niektórych polifenoli są dobrze udokumentowane w literaturze. Dotyczy to przede wszystkim herbaty, czerwonego wina i soi [17, 23, 27]. Niewiele jest prac opisujących działanie antyoksydacyjne polifenoli zawartych w krajowych nasionach roślin strączkowych, a szczególnie fasoli.

Celem niniejszej pracy było określenie właściwości przeciwutleniających wybranych polifenoli zawartych w okrywie nasiennej fasoli.

Materiał i metody badań

Materiałem badawczym były preparaty o właściwościach przeciwutleniających otrzymane z okrywy nasiennej fasoli czarnej (Green Mung), różowej (Malinka) i białej (Jaś Tyczny). Nasiona fasoli moczo w wodzie przez 24 godz., a następnie ręcznie obłuszczano. Okrywę suszono w temperaturze $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i mielono. Polifenole ekstrahowano 0,5% roztworem kwasu solnego w metanolu, wytrząsając przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Otrzymany ekstrakt zagęszczano pod próżnią w temp. 50°C i poddawano liofilizacji [20].

Charakterystyka chemiczna preparatów obejmowała oznaczenie dwóch grup polifenoli: tanin skondensowanych wanilinową metodą Price'a [13] i antocyjanów metodą Sodheimera-Kertesza w modyfikacji Swaina i Hillisa [19]. Zawartość tanin skondensowanych wyrażono w ekwiwalencie (+)katechiny (Fluka) [21].

Badanie zdolności chelatowania jonów żelaza(II) przez polifenole przeprowadzono w wodnych roztworach preparatów polifenoli dodając chlorek żelaza(II) i ferrozynę. Absorbancję barwnego kompleksu mierzono po 10 min od dodania ferrozyny przy długości fali 562 nm, w spektrofotometrze Shimadzu UV-160A [10].

Zdolność preparatów polifenoli do dezaktywacji wolnych rodników badano wytwarzając rodnik ferrylioglobinowy z metmioglobiny aktywowanej nadtlakiem wodoru. Rodnik ten w reakcji z syntetycznym substratem generował kationorodniki

ABTS^{•+}. Zawartość tych rodników oznaczano spektrofotometrycznie [11]. Aktywność badanych preparatów obliczano korzystając z krzywej wzorcowej, wykonanej z roztworów Troloxu (analogu α -tokoferolu o zwiększonej rozpuszczalności w wodzie) i zgodnie z danymi literaturowymi wyrażano w jednostkach TEAC (pojemność przeciwutleniająca równoważna Troloxowi, *ang.* Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), czyli jako stężenie Troloxu wykazujące aktywność przeciwutleniającą identyczną z 1 mM roztworem preparatu. Przeciwdrobnikowe właściwości polifenolowych preparatów oznaczano również przez pomiar fluorescencji wywołanej formowaniem rodników wodorotlenowych generowanych z nadtlenu wodoru i benzoesu sodu w obecności jonów miedzi(II) i DTET (ditiocytrytol) w buforze fosforanowym o pH 7,2. DTET stosowano w celu przyspieszenia reakcji rodnikowej. Fluorescencję pochodnych hydroksylowych mierzono spektrofluorymetrycznie [7]. Wszystkie oznaczenia wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

W omawianej pracy oznaczono zawartość dwóch grup polifenoli: tanin skondensowanych i antocyjanów. Wyniki przeliczono na zawartość suchej masy i przedstawiono w tab. 1. Zdecydowano się na oznaczenie tych związków, ponieważ według danych literaturowych są to główne grupy polifenoli występujące w fasoli [3].

T a b e l a 1

Zawartość antocyjanów i tanin skondensowanych w preparatach polifenoli.
Content of anthocyanins and condensed tannins in polyphenol preparations.

Preparat Preparation	Antocyjany Anthocyanins	Taniny skondensowane Condensed tannins
	[mg/100 mg s. m.] [% d.m.]	
PFCz	11,6 ($\pm 0,15$) ^{* a^{*1}}	61,2 ($\pm 0,24$) a
PFR	0,7 ($\pm 0,03$) b	29,4 ($\pm 0,37$) b
PFBł	nw ^{*2}	15,3 ($\pm 0,16$) c

* – w nawiasach podano wartości odchyłeń standardowych / standard deviation is given in brackets;

*¹ – wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie między sobą ($\alpha=0,05$) / mean values in the same column, which are denoted by different superscripts, differ statistically significant among each other ($\alpha=0,05$)

*² – nie wykryto / not detected

PFCz – preparat z fasoli czarnej / preparation made of black bean;

PFR – preparat z fasoli różowej, / preparation made of pink bean;

PFBł – preparat z fasoli białej / preparation made of white bean.

We wszystkich preparatach dominowały taniny skondensowane. Najwyższą ich zawartością charakteryzował się preparat z fasoli czarnej (61,2 mg/100 mg), co stanowi aż 90% wszystkich polifenoli w tym preparacie. Zawartość tanin skondensowanych w preparacie z fasoli różowej kształtowała się na poziomie 30 mg/100 mg suchej masy. Preparat z okrywy fasoli białej zawierał najmniej tanin skondensowanych (15,3 mg/100 mg).

Należy jednak zauważyć, że zawartość tanin skondensowanych zależy w dużym stopniu od sposobu ekstrakcji (temperatury, czasu, rodzaju rozpuszczalnika) oraz od odmiany nasion. Według Deshpande i Cheryana [5], zawartość tanin skondensowanych w różnych odmianach fasoli po 6 godz. ekstrakcji w metanolu z dodatkiem 1% HCl waha się w granicach od 26 do 291 mg/100 g suchego ziarna. W badanych odmianach (po przeliczeniu otrzymanych wyników na 100 g suchego ziarna) zawartość tanin skondensowanych zawierała się w tych granicach i wynosiła od 32 mg/100 g ziarna w preparacie z okrywy fasoli białej do 114 mg/100 g ziarna w preparacie z fasoli czarnej. Pomimo, że autorzy zajmowali się badaniem całego ziarna, wydaje się, że wyniki te można porównać, gdyż liścienie fasoli, zwłaszcza kolorowej, zawierają niewielką ilość związków polifenolowych [18].

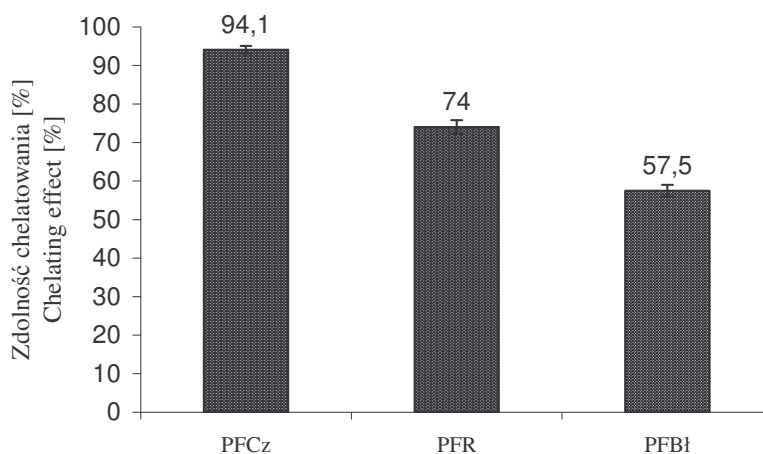
W badanych preparatach dominowały taniny skondensowane. Znajduje to również potwierdzenie w literaturze. Wilska-Jeszka i Stasiak [25], badając różne rośliny strączkowe, także stwierdziły dominację tej grupy związków polifenolowych. Należy jednak zaznaczyć, że zawartość tanin skondensowanych oznaczana metodami chemicznymi może być często obarczona błędem, co spowodowane jest m.in. stopniem polimeryzacji. Należy również zachować dużą ostrożność przy porównywaniu ogólnej zawartości tanin skondensowanych oznaczanych różnymi metodami chemicznymi, przez różnych autorów [24].

Antocyjany w badanych preparatach występowały w zróżnicowanych ilościach. Najwięcej tych polifenoli stwierdzono w preparacie z okrywy nasiennej fasoli czarnej (11,6 mg/100 mg). Takeoka i wsp. [20] badali skład antocyjanów w fasoli czarnej i uzyskali podobną zawartość ogólną tych związków w okrywie (9%), stosując ten sam sposób ekstrakcji. Najmniejszą zawartość antocyjanów, 0,7 mg/100 mg stwierdzono w preparacie z fasoli różowej, co mogło być spowodowane połączeniem tych polifenoli z cukrami. Połączenia takie są niewykrywalne metodą z czerwienią Kongo. Natomiast w preparacie z okrywy fasoli białej w ogóle nie stwierdzono ich obecności. Ma to oczywisty związek z intensywnością zabarwienia okrywy nasiennej.

Analiza statystyczna wykazała, że wyniki pomiędzy poszczególnymi odmianami różniły się istotnie między sobą ($\alpha = 0,05$).

Właściwości wiązania jonów metali grup przejściowych mają bardzo duży wpływ na działanie przeciwutleniające polifenoli, dlatego w pracy wykonano oznaczenie ich zdolności do chelatowania jonów żelaza(II). Wyniki przedstawiono na rys. 1.

Preparaty z okryw fasoli kolorowych charakteryzowały się lepszymi właściwościami chelatującymi niż preparat z okrywy fasoli białej. Wśród dwóch odmian fasoli kolorowych wyższą zdolność do chelatowania jonów żelaza(II) wykazywał preparat z okrywy fasoli czarnej (94%). Być może lepsze właściwości chelatujące preparatów z fasoli kolorowych wynikają z większego udziału w nich tanin skondensowanych. Według niektórych badań, to właśnie te polifenole wykazują najsilniejsze zdolności wiązania jonów metali grup przejściowych [15]. Podobną zależność wykazali Yu i wsp. [27], badając korelację pomiędzy zawartością tanin skondensowanych a zdolnością chelatowania jonów żelaza(II) w otrębach pszennych.



Rys. 1. Zdolność chelatowania jonów żelaza(II) przez preparaty polifenoli.

Fig. 1. Chelating effect of polyphenol preparations on the Fe(II) ions.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes- see Tab. 1

W pracy stwierdzono korelację pomiędzy występowaniem tanin skondensowanych a zdolnością chelatowania jonów żelaza w przypadku preparatu z fasoli różowej ($r = 0,82$) oraz pomiędzy zawartością tanin skondensowanych a właściwościami chelatującymi w preparacie z okrywy fasoli białej ($r = 0,83$).

Aktywność przeciwutleniającą badanych preparatów oznaczano w metodzie z rodnikami ABTS⁺. Wyniki przedstawiono w tab. 2.

Aktywność badanych preparatów polifenolowych zawierała się w granicach od 0,70 do 0,42 mM Troloxu, przy czym preparaty pochodzące z odmian kolorowych wykazywały większą aktywność przeciwrodnikową niż preparat uzyskany z fasoli białej. Różnice pomiędzy badanymi preparatami z odmian kolorowych były nieznaczne. Omówione powyżej wartości wskazują na niezbyt dużą zdolność preparatów polifenolowych do wiązania kationorodników ABTS⁺. Wniosek taki można sformułować na podstawie danych literaturowych, według których kwas

askorbinowy wykazuje aktywność przeciwrodnikową 0,9 mM, β -karoten – 1,9 mM, a preparaty albuminowe roślin strączkowych w granicach 1,8–2,2 mM [14, 26].

Tabela 2

Aktywność preparatów polifenoli wobec kationorodników ABTS^{•+}.
Antioxidant activity of polyphenol preparations against ABTS^{•+} radicals.

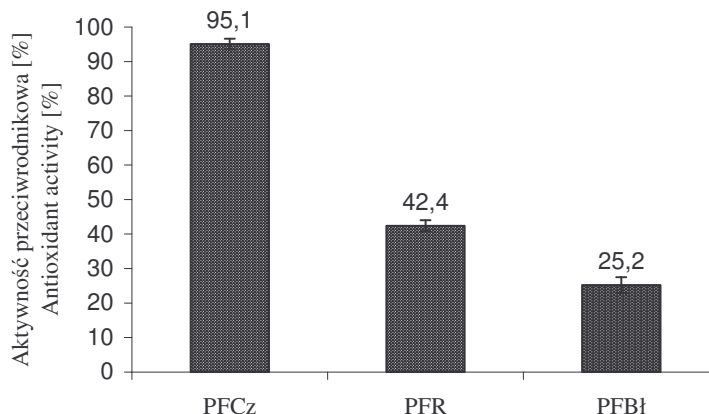
Preparat Preparation	Aktywność przeciwrodnikowa Antioxidant activity	
	TEAC [Mm Trolox]	[%]
PFCz	0,70 (\pm 0,005)*	28,5 (\pm 0,35)
PFR	0,65 (\pm 0,005)	26,2 (\pm 0,23)
PFBł	0,42 (\pm 0,008)	18,2 (\pm 0,40)

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes- see Tab. 1

Kirakosyan i wsp. [9] porównali aktywność poszczególnych wzorcowych roztworów polifenoli z aktywnością etanolowych ekstraktów z owoców głogu. Z badań tych wynika, że preparaty uzyskane z głogu wykazują bardzo duże zdolności do unieczynniania kationorodników ABTS^{•+} (aktywność przeciwrodnikowa rzędu 2,3 mM Troloxu) i o prawie 30% większe niż wolna (-)epikatechina. Autorzy wysuwają hipotezę, że wynik taki sugeruje synergizm poszczególnych polifenoli zawartych w preparacie. Do innych wniosków doszli natomiast Natella i wsp. [12], porównując działanie przeciwrodnikowe niektórych polifenoli pojedynczo i w mieszaninach w różnych układach rodnikowych (w tym także wobec kationorodników ABTS^{•+}). Polifenole badane osobno i w mieszaninach uzyskiwały aktywność podobnego rzędu, a niekiedy (np. w przypadku kwasu cytrynowego i kawowego) w mieszaninie działały nieco słabiej niż pojedynczo. Można to tłumaczyć skomplikowanymi mechanizmami zachodzącymi między poszczególnymi polifenolami, a także między polifenolami a innymi składnikami badanych roztworów.

Omawiając wyniki aktywności przeciwrodnikowej wobec kationorodników ABTS^{•+} trzeba wspomnieć, że trudno jest odnieść wyniki uzyskane w niniejszej pracy do danych zawartych w bogatej na ten temat literaturze, gdyż niektóre badane przez innych autorów preparaty osiągały aktywności powyżej 2,5 mM Troloxu. Związane to było z istotną zmianą w metodyce odnoszącą się do wyboru maksymalnego stężenia standardu powodującego całkowitą dezaktywację rodników.

Rodniki hydroksylowe tworzą się zarówno w organizmach żywych, jak i w żywności i mogą wchodzić w reakcje praktycznie ze wszystkimi jej składnikami. Uznawane są za najbardziej reaktywne twory chemiczne i m.in. mają zdolność do inicjowania procesu autooksydacji lipidów.



Rys. 2. Aktywność preparatów polifenoli wobec rodników wodorotlenowych.

Fig. 2. Antioxidant activity of polyphenol against hydroxyl radicals.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes- see Tab. 1.

Na podstawie uzyskanych wyników (rys. 2) można stwierdzić, że podobnie jak w przypadku oznaczania stopnia unieczynniania kationorodników ABTS⁺ większą aktywnością przeciwrodnikową charakteryzowały się preparaty pochodzące z odmian fasoli kolorowych. Największą aktywność obserwowano w preparacie otrzymanym z okrywy nasiennej fasoli czarnej (95%), natomiast najmniejszą w preparacie z fasoli białej (25%). Polifenole zawarte w preparatach wykazywały aktywność przeciwutleniającą wobec rodników hydroksylovych zaraz po zapoczątkowaniu reakcji, a także po 10, 20 i 30 min (tab. 3). Największą aktywność przeciwrodnikową wykazywały preparaty po 30 min reakcji, wyjątek stanowił preparat otrzymany z fasoli czarnej, którego maksymalną aktywność zarejestrowano po 20 min. Z przedstawionych danych wynika, że w pierwszym okresie pomiarów unieczynnianie rodników wodorotlenowych zachodziło w największym stopniu, natomiast w miarę upływu czasu inkubacji reakcje te zachodziły coraz wolniej. Po 30 min. inkubacji próbka bez dodatku preparatu osiągnęła maksymalną wartość fluorescencji. Aktywność przeciwutleniająca po tym czasie spadła, zarówno w przypadku preparatów z fasoli kolorowych, jak i z fasoli białej. Lepsza efektywność preparatów polifenoli pochodzących z fasoli kolorowych wskazuje na możliwość wpływu zdolności chelatowania jonów metali grup przejściowych przez te preparaty, na ich aktywność w zastosowanym w pracy układzie modelowym, ponieważ był on katalizowany przez jony miedzi(II), a podobnie jak w przypadku dezaktywacji rodników wodorotlenowych preparaty z okrywy nasion fasoli kolorowych wykazywały lepsze właściwości chelatujące.

Przeprowadzona analiza statystyczna wyników pozwoliła stwierdzić, że istnieje korelacja pomiędzy zdolnością preparatów do chelatowania jonów metali, a ich właściwościami antyrodnikowymi wobec rodników hydroksylowych. Należy tu jednak zauważyć, że na omawianą korelację mógł wpłynąć fakt, że w doświadczeniu badającym właściwości chelatujące użyto jonów żelaza, a nie jonów miedzi, która katalizowała wytwarzanie rodników wodorotlenowych.

Tabela 3

Zdolność preparatów polifenoli do unieczynniania rodników wodorotlenowych.

The effect of polyphenols on scavenging the hydroxyl radicals by the polyphenol preparations.

Mieszanka reakcyjna Reaction mixture	Fluorescencja w jedn. umownych Fluorescence expressed in conventional units			
	0 min	10 min	20 min	30 min
H ₂ O ₂ /Cu ⁺² /DTET	398,55 (±7,72)*	516,67 (±2,82)	901,87 (±1,31)	1003 (±0,00)
H ₂ O ₂ /Cu ⁺² /DTET + PFCz	36,49 (±5,15)	46,62 (±17,06)	55,74 (±18,23)	49,05 (±17,82)
H ₂ O ₂ /Cu ⁺² /DTET + PFR	280,05 (±6,02)	392,10 (±4,98)	505,52 (±4,74)	578,02 (±8,60)
H ₂ O ₂ /Cu ⁺² /DTET + PFBł	386,32 (±4,28)	478,62 (±6,12)	665,62 (±7,72)	750,50 (±0,83)

Wnioski

1. Wszystkie preparaty polifenoli otrzymane z okrywy nasion fasoli wykazywały właściwości przeciwutleniające w badanych układach modelowych.
2. Preparaty otrzymane z okrywy nasion fasoli czarnej i różowej wykazywały lepszą zdolność do wiązania rodników niż preparat z fasoli białej.
3. Wykazano większą aktywność przeciwutleniającą preparatów z fasoli kolorowej wobec rodników wodorotlenowych w reakcji katalizowanej jonami metali przejściowych, co może mieć związek z ich lepszymi właściwościami chelatującymi.
4. W składzie wszystkich badanych preparatów stwierdzono dominację tanin skondensowanych.

Literatura

- [1] Bacon J.R., Rhodes J.C.: Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using a peroxidase-labeled tannin. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 5083-5088.
- [2] Bressani R.: Grain quality of common beans. *Food Rev. Int.*, 1993, **9**, 237-297.
- [3] Chung H.Y., Yokozawa T., Soung D. Y., Kye I.S., No J.K., Baek B.S.: Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 4484-4486.
- [4] Deshpande S.S., Cheryan M.: Determination of phenolic compounds of dry beans using vanilin, redox and precipitation assays. *J. Food Sci.*, 1987, **2**, 332-334.
- [5] Gonet B.: Wolne rodniki i antyoksydanty w zdrowiu i chorobie. *Czynniki Ryzyka*, 1996, **11**, 5-13.
- [6] Hunt J.V., Simpson J.A., Dean R.T.: Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins. *Biochem. J.*, 1988, **250**, 87-93.
- [7] Kahkonen M., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3954-3962.
- [8] Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman P.B., Warber S., Bolling S., Chang S.C.: Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from *Crateagus leavigata* and *Crateagus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 3973-3976.
- [9] Lai L.S., Chou S.T., Chao W.W.: Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsoo leaf gum. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 963-968.
- [10] Miller N.J., Rice-Evans C.A.: Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 1996, **2**, 161-171.
- [11] Natella F., Nardini M., Di Felice M., Scaccini C.: Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants structure-activity relation. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **47**, 1453-1459.
- [12] Price M.L., van Scoyoc S., Butler L.G.: A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, **26**, 1214-1218.
- [13] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS^{•+} radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231-1237.
- [14] Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F.: A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **76**, 270-276.
- [15] Sawa T., Nakao M., Akaike T., Ono K.: Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 397-402.
- [16] Simonetti P., Pietta P., Testolin G.: Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 1150-1155.
- [17] Stasiak A., Wilska-Jeszka J.: Charakterystyka tanin występujących w nasionach roślin fasoli. *Mat. XXX Sesji Naukowej KTiChŻ PAN. Kraków 1999*, s. 5-9.
- [18] Swain T., Hillis W.: The phenolic constituents of *Prunus domestica*. *J. Sci. Food Agric.*, 1959, **1**, 63-68.
- [19] Takeoka G.R., Dao L. T., Full G. H., Wong R. Y., Harden L.A., Edwards R.H., Berrios J.: Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 3395-3400.
- [20] Tsuda T., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T.: Antyoksydacyjne pigmenty izolowane z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 248-251.
- [21] Wang H., Provan G.J., Helliwell K.: Tea flavonoids: Their functions, utilization and analysis. *T Food Sci. Techn.*, 2000, **11**, 152-160.

- [22] Wang S.Y., Lin H-S.: Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivars and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 140-146.
- [23] Wilska-Jeszka J., Posędek A., Anders B.: Ocena porównawcza metod oznaczania tanin skondensowanych. Materiały XVIII Sesji Naukowej KTiChŻ PAN, Gdańsk 1997, s. 299.
- [24] Wilska-Jeszka J., Stasiak A.: Polyphenol compounds in grain legumes. Bioactive substances in food of plant origin – Materials of the International Euro Food Tox IV Conference, 22-24 September 1994, Olsztyn, **1**, pp. 126-130.
- [25] Wołosiak R.: Aktywność przeciwutleniająca albumin z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*) i grochu (*Pisum sativum*). Rozprawa doktorska, SGGW. Warszawa 2002.
- [26] Yu L., Perret J., Harris M., Wilson M., Haley S.: Antioxidant properties of bran extract from wheat grown at different locations. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 1566-1570.

THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF POLYPHENOL PREPARATIONS OBTAINED FROM BLACK, PINK, AND WHITE BEAN SEED COATS (*PHASEOLUS*)

S u m m a r y

The objective of this work was to study antioxidative properties of the preparations obtained from the seed coats of black, pink and white beans. To make the preparations, polyphenols were extracted using a 0.5% HCl solution (HCL in methanol), condensed under the vacuum conditions, and, finally, they underwent a lyophilization procedure. In order to provide a chemical profile of the preparations obtained, the contents of condensed tannins and anthocyanins were determined. Furthermore, the chelating capacity of the polyphenols and their effect on Fe(II) ions were determined. The antioxidative properties were determined in the presence of hydroxyl and ABTS^{•+} radicals. It was stated that polyphenols under investigation developed an antioxidative activity in the presence of both the ABTS^{•+} radicals (from 18% to 28.5%) and the hydroxyl radicals (from 25% to 95%). The preparations extracted from the black and pink bean coats developed the strongest antioxidative activity, whereas the preparation extracted from the white bean coats had the weakest antioxidant effect. This fact could be attributed to the higher contents of condensed tannins in the preparations made of colour bean coats.

Key words: polyphenols, antioxidant properties, ABTS^{•+} radicals, hydroxyl radicals ☒

WIOLETTA TUR, EWA SZCZEPANIK, WOJCIECH KRZYŻANIAK,
WOJCIECH BIAŁAS, WŁODZIMIERZ GRAJEK

CHARAKTERYSTYKA MALTODEKSTRYN OTRZYMANYCH ZE SKROBI ZIEMNIACZANEJ PRZY UŻYCIU PREPARATÓW AMYLOLITYCZNYCH

Streszczenie

Hydrolizę skrobi ziemniaczanej przeprowadzono przy użyciu sześciu preparatów amyloolitycznych pochodzenia bakteryjnego typu Gamalpha (Gamma Chemie, Niemcy). Do hydrolizy stosowano skrobię skleikowaną w autoklawie oraz skrobię poddaną ekstruzji. W wyniku depolimeryzacji skrobi uzyskano różne maltodekstryny o DE 3-12. Produkty te zostały scharakteryzowane pod względem składu chemicznego oligosacharydów z uwzględnieniem cukrów o stopniu polimeryzacji od 2 do 8. Wykazano, że preparaty o tym samym równoważniku glukozowym znacznie różniły się składem oligosacharydów. Zawartość oligosacharydów o stopniu polimeryzacji 3–8 w hydrolizatach skrobi autoklawowanej wahała się od 8,2 do 48,5%, a skrobi ekstrudowanej 7,2 do 59,8%. Największą zawartość tego typu oligosacharydów uzyskano przy zastosowaniu preparatu Gamalpha 900P. We wszystkich otrzymanych maltodekstrynach największy udział procentowy spośród oligosacharydów miały: maltoheksaoza, maltoheptaosa i maltooktaosa. Uzyskane maltodekstryny zostały scharakteryzowane pod względem lepkości i ciśnienia osmotycznego ich 10% roztworów wodnych. W większości hydrolizatów obserwowano wzrost lepkości pozornej w miarę wzrostu równoważnika glukozowego w maltodekstrynach. Stwierdzono odwrotną zależność między szybkością ścinania a lepkością pozorną badanych maltodekstryn. Wyjątek stanowiły maltodekstryny otrzymane za pomocą preparatu Gamalpha 300L. Ciśnienie osmotyczne hydrolizatów maltodekstrynowych było proporcjonalne do równoważnika glukozowego.

Słowa kluczowe: maltodekstryny, skrobia, oligosacharydy, lepkość, ciśnienie osmotyczne.

Wprowadzenie

Maltodekstryny, jako produkty częściowej hydrolizy skrobi, zostały wprowadzone na rynek już pod koniec lat 50. XX w. Ich podstawowym wyróżnikiem jest tzw. równoważnik glukozowy (*ang.* dextrose equivalent; DE), który określa procentowy udział cukrów redukujących, wyrażonych jako glukoza, w przeliczeniu na suchą masę produktu. W zasadzie do maltodekstryn zalicza się hydrolizaty skrobiowe o DE poniżej 20.

Maltodekstryny są polisacharydami rozpuszczalnymi w wodzie, niewykazującymi smaku słodkiego, składającymi się głównie z D-glukozy, powiązanej wiązaniami $\alpha(1\rightarrow4)$, rzadziej $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozydowymi. Do ich produkcji wykorzystywana jest cała gama enzymów amylolytycznych. Wśród nich decydującą rolę odgrywają enzymy typu endo-glukanaz, przecinające łańcuchy polimerów glukozy wewnątrz długich łańcuchów. Zaliczają się do nich endo- α -1,4-glukanazy, głównie α -amylazy bakteryjne i pleśniowe, oraz endo- α -1,6-glukanazy, jak pululanaza i izoamylaza [4, 7]. Z uwagi na konieczność ograniczonego zakresu depolimeryzacji skrobi, przy produkcji maltodekstryn nie wykorzystuje się egzo-glukanaz, odcinających pojedyncze cukry lub krótkie oligosacharydy od nieredukujących końców polimerów skrobiowych.

Przy produkcji maltodekstryn istotą procesów enzymatycznych jest przeprowadzenie ograniczonej ilości cięć wewnątrz makrocząsteczki skrobi. Pamiętać jednak należy o tym, że preparaty alfa-amylazy wytwarzane przy użyciu bakterii *Bacillus* sp. zawierają zanieczyszczenia innymi enzymami, co ma wpływ na skład chemiczny hydrolizatów. Najczęściej występują w nich maltotrioza, maltotetraoza, maltopentaoza i maltoheksaoza [1].

Duża różnorodność endo-glukanaz, które pojawiły się na rynku w latach 70. i 80. XX w. oraz złożoność budowy atakowanego przez nie polimeru skrobiowego umożliwia uzyskanie wielu różnych maltodekstryn o tym samym równoważniku glukozy (DE), ale różniących się istotnie składem chemicznym cukrowców [6]. Ma to zasadniczy wpływ na kształtowanie się ich właściwości funkcjonalnych.

Na końcowy efekt działania enzymów ma wpływ wiele czynników, jak: czas, temperatura i pH reakcji, obecność jonów, stężenie enzymu i substratu, budowa skrobi, obecność rozpuszczalników organicznych, ciśnienie i inne. Istotną rolę odgrywa także sposób wstępnego przygotowania substratu. Kleikowanie skrobi polega na przejściu struktur krystalicznych gałeczek skrobiowych w stan nieuporządkowany. Proces ten jest zależny od temperatury i proporcji między skrobią a wodą [5]. Alternatywą wysokotemperaturowej inkubacji skrobi w roztworach wodnych jest ekstruzja [2, 3, 8].

Celem niniejszej pracy było określenie kinetyki hydrolizy skrobi autoklawowanej i ekstrudowanej katalizowanej przy użyciu preparatów amylolytycznych Gamalpha (Gamma Chemie, Niemcy) oraz charakterystyka uzyskanych maltodekstryn o równoważniku glukozy (DE) 3-12.

Materiał i metody badań

Skrobia

W badaniach stosowano skrobię ziemniaczaną Superior Standard [8], wyprodukowaną w Zakładach Przemysłu Ziemniaczanego w Luboniu. Badania przeprowadzono na dwóch rodzajach skrobi: skleikowanej przez autoklawowanie (autoklawowanej) oraz skrobi skleikowanej przez ekstruzję (ekstrudowanej).

Enzymy

Do hydrolizy skrobi wykorzystano bakteryjne preparaty amylolityczne firmy Gamma Chemie, Niemcy (aktualnie AB Enzymes, Niemcy), produkowane przez *Bacillus subtilis*, których charakterystykę przedstawiono w tab. 1. Dawki preparatów enzymatycznych dobrano doświadczalnie w taki sposób, aby DE hydrolizatów skrobiowych, otrzymanych w wyniku godzinnej hydrolizy, nie przekroczył wartości 20.

Tabela 1

Preparaty amylolityczne wykorzystywane do hydrolizy skrobi.
Amylolytic preparations used for the starch hydrolysis.

Enzym Enzyme	Optymalna temperatura Optimal temperature [°C]	Optymalne pH Optimal pH-value	Zastosowana dawka [ml/kg skrobi] Dosage applied [ml/kg starch]	
			Skrobia autoklawowana Autoclaved starch	Skrobia ekstrudowana Extruded starch
			Gamalpha PHL	80–90
Gamalpha TB150L	80–90	5,8–7,0	0,6	0,6
Gamalpha T400L	75–85	5,0–7,0	0,3	0,3
Gamalpha 900L	70–75	4,8–7,5	0,075	0,075
Gamalpha 300L	60–85	6,0	0,6	0,6
Gamalpha P120L	70–75	6,0	0,9	0,6

Kleikowanie skrobi w autoklawie

Roztwory skrobi natywnej o stężeniu 5% ogrzewano do temp. 70°C. Następnie, przy intensywnym mieszaniu dodawano kolejną porcję skrobi tak, aby końcowe stężenie skrobi wynosiło 10%. Przygotowaną zawiesinę przenoszono do zamkniętego naczynia z filtrem powietrza i autoklawowano przez 20 min w temp. 121°C. Uzyskane roztwory skleikowanej skrobi chłodzono do optymalnej temperatury działania poszczególnych enzymów i przeprowadzano proces hydrolizy.

Ekstruzja skrobi natywnej

Substrat skrobiowy nawilżano do 35% wilgotności wodą destylowaną o temp. 20°C, względnie wodą zawierającą dodatek enzymu. Całość mieszano w mieszarce laboratoryjnej w celu ujednoczenia wilgotności i dobrego rozprowadzenia enzymu. Tak przygotowane materiały poddawano procesowi ekstruzji w ekstruderze dwuślimakowym Krupp Werner & Pfleiderer, typ ZSK 25P8.2, zbudowanego z trzech sekcji grzejnych. W sekcji pierwszej temp. ekstruzji wynosiła 22°C, w sekcji drugiej i trzeciej 60°C a w głowicy 50°C. Szybkość mieszania skrobi była utrzymywana na poziomie 80 obr./min. Ekstrudat wychodzący z głowicy ekstrudera miał formę długich wałków o średnicy ok. 1 cm. W celu przyspieszenia procesu suszenia ekstrudatów

cięto je na kawałki o długości 1–1,5 cm. Suszenie przeprowadzano w suszarce w temp. 60°C, po czym wysuszone kawałki ekstrudatu mielono w młynku udarowym do postaci proszku.

Hydroliza skrobi

Hydrolizę 10% roztworu skrobi skleikowanej przez autoklawowanie lub ekstrudowanie prowadzono w ciągu 60 min, przy optymalnej temperaturze i pH działania danego enzymu. Dawki enzymu przedstawiono w tab. 1. Reakcję hydrolizy przeprowadzano w łaźni wodnej z wytrząsarką w zamkniętych naczyniach, przy ciągłym mieszaniu roztworu reakcyjnego. Reakcję zatrzymywano przez obniżenie pH roztworu reakcyjnego do 3,5 za pomocą kwasu cytrynowego i gotowaniu przez 5 min, a następnie schłodzenie do temp. 20°C. W trakcie hydrolizy, co 10 min pobierano próbki do analiz chemicznych i reologicznych. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

Oznaczanie równoważnika glukozowego (DE)

Równoważnik glukozowy DE określa zdolność redukcyjną hydrolizatu skrobiowego wyrażoną jako D-glukoza w przeliczeniu na suchą substancję. Oznaczanie wartości DE wykonano według PN-78/A-74701 [9]. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Oznaczanie cukrów metodą HPLC

Skład chemiczny hydrolizatów skrobi ustalano za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). Do oznaczenia zastosowano chromatograf ciekowy firmy Waters, wyposażony w detektor refraktometryczny typu 410 oraz pompę typu 501. Do rozdzielów używano kolumnę Ostion KS0403 (Lachema, Brno) o wymiarach 250 mm x 6 mm, wypełnioną żywicą usieciowaną sulfonowanym polistyrenem diwinylobenzenu w formie srebrowej. Do kolumny jednorazowo наносzono 20 µl próby, którą przed oznaczeniem rozcieńczano wodą destylowaną do 5° Bx i filtrowano przez sączki z porami wielkości 0,2 µm firmy Sartorius. Badane próby eluowano w temp. 85°C przy użyciu odgazowanej wody z prędkością 0,5 ml/min. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w postaci procentowego składu cukrowego uzyskanych maltodekstryn. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Badanie lepkości roztworów maltodekstryn

Lepkość badanych roztworów maltodekstryn o DE 3, 5, 8, 12 oznaczano w reometrze rotacyjnym Rheo Stress 1 firmy ThermoHaake (Niemcy). Stosowano rotor z podwójną szczeliną DG 43Ti, a objętość próbki wynosiła 11,5 ml. Aparat pracował w trybie CR – kontrolowanej prędkości ścinania, przy czym pomiary wykonywano w zakresie 0–1000 s⁻¹. Próbki pobrane w trakcie reakcji hydrolizy, przeznaczone do badań reologicznych, umieszczano w łaźni wodnej, w celu utrzymania stałej temp.

60°C. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w postaci krzywych lepkości, na podstawie których obliczano następnie wartość współczynnika konsystencji (K) oraz wskaźnika płynięcia (n). Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Oznaczenie ciśnienia osmotycznego

Ciśnienie osmotyczne hydrolizatów mierzono za pomocą osmometru Marcel OS 3000, pobierając jednorazowo 100 µl roztworu. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Oznaczanie suchej substancji

Oznaczenie suchej substancji skrobi dokonano metodą wagową, stosując temp. 105°C. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i ich omówienie

Kinetyka reakcji hydrolizy skrobi przy użyciu różnych preparatów enzymatycznych

W warunkach przeprowadzanych eksperymentów zakres DE w uzyskanych hydrolizatach zawierał się w zakresie 1,8–19,6 (tab. 2). Wyniki badań nad kinetyką reakcji enzymatycznych wskazują na duże różnice we właściwościach katalitycznych między poszczególnymi preparatami enzymatycznymi. Analizując dane zamieszczone w tab. 2. stwierdzono duże zróżnicowanie początkowej wartości równoważnika glukozowego (DE), wyznaczonego w ciągu 10 min reakcji enzymatycznych. Pewien wpływ na to miała zróżnicowana zawartość substancji redukujących w samych preparatach enzymatycznych. W celu właściwej oceny szybkości hydrolizy skrobi obliczono różnice wartości DE między 60 a 10 min reakcji.

Na tej podstawie można stwierdzić, że największy bezwzględny wzrost równoważnika glukozowego uzyskano przy stosowaniu preparatu Gamalpha 300L, który po 50 min reakcji w hydrolizatach skrobi autoklawowanej wynosił 15,4, a skrobi ekstrudowanej 14,0. Drugi w kolejności był preparat Gamalpha T400L, w przypadku którego wartość DE₆₀-DE₁₀ skrobi autoklawowanej wynosiła 13,2, a skrobi ekstrudowanej 14,9. Między preparatami Gamalpha PHL, Gamalpha TB150L i Gamalpha 900P nie było wyraźnych różnic. Najmniejszy przyrost wartości DE odnotowano w hydrolizatach skrobi autoklawowanej otrzymanych przy użyciu preparatu Gamalpha PHL i Gamalpha P120L. W przypadku tego ostatniego preparatu uzyskano wyraźnie zwiększoną hydrolizę skrobi autoklawowanej. Przedstawione zależności znajdują potwierdzenie także w wartościach współczynników kierunkowych prostych regresji opisujących zależność DE od czasu trwania reakcji hydrolizy (tab. 2). Porównując oba sposoby kleikowania skrobi należy stwierdzić, że w większości przypadków skrobia ekstrudowana była bardziej podatna na działanie zastosowanych amylaz niż skrobia autoklawowana, jednakże różnice te nie były tak istotne, jak różnice między działaniem poszczególnych enzymów.

Kinetyka reakcji hydrolizy skrobi autoklawowanej i ekstrudowanej przy użyciu różnych preparatów enzymatycznych.

The hydrolysis kinetics of starch autoclaved and extruded using different enzyme preparations.

Enzym Enzyme	Skrobia Starch	Czas hydrolizy [min] Hydrolysis time [min]						Różnica Difference: DE ₆₀ – DE ₁₀	Równanie regresji Regression equation
		10	20	30	40	50	60		
		Wartości DE / DE values							
Gamalpha PHL	Autoklawowana Autoclaved	5	7	8	9	10,8	12	7,0	Y=0,13x + 3,89
	Ekstrudowana Extruded	4	6,4	8,2	9,2	11	12,8	8,8	Y=0,17x + 2,72
Gamalpha TB150L	Autoklawowana Autoclaved	1,9	4,2	5,7	8,3	9	11,6	9,7	Y=0,19x + 0,23
	Ekstrudowana Extruded	1,8	3,6	5,0	7,2	8,6	9,6	7,8	Y=0,16x + 0,35
Gamalpha T400L	Autoklawowana Autoclaved	3,5	5,4	8,6	10,7	15	16,7	13,2	Y=0,28x + 0,29
	Ekstrudowana Extruded	2,8	6,1	8,6	12,6	13,6	17,7	14,9	Y=0,29x + 0,14
Gamalpha 900P	Autoklawowana Autoclaved	4,1	7,0	8,2	9,4	11,0	12,9	8,8	Y = 0,16x + 2,86
	Ekstrudowana Extruded	4	5,4	8,2	9,6	11	13,2	9,2	Y = 0,18x + 2,21
Gamalpha 300L	Autoklawowana Autoclaved	4,2	8,2	10,5	14,7	17,4	19,6	15,4	Y = 0,31x + 1,55
	Ekstrudowana Extruded	5	7,8	10	13	14	19	14,0	Y = 0,26x + 2,31
Gamalpha P120L	Autoklawowana Autoclaved	2,6	5,6	7,1	8,6	10,8	13,1	10,5	Y = 0,19x + 1,01
	Ekstrudowana Extruded	4,3	5,4	6,1	7,5	9,3	11,7	7,4	Y = 0,14x – 2,37

Y – ekwiwalent glukozy / glucose equivalent;

X – czas reakcji [min] / Time of reaction [min].

Na podstawie badań kinetycznych wyznaczono czas reakcji potrzebny do wytworzenia hydrolizatów o określonym równoważniku glukozy (tab. 3), co w dalszych etapach badań było wykorzystywane do produkcji określonych maltodekstryn używanych do badań nad właściwościami reologicznymi i ciśnieniem osmotycznym roztworów maltodekstryn. Analizując uzyskane dane należy odnotować, że szybkość uzyskania preparatów o DE 12 była bardzo zróżnicowana i wahała się od 33 min (Gamalpha 300L) do 72 min (Gamalpha TB150L).

Skład chemiczny maltodekstryn

Skład chemiczny poszczególnych próbek określano w oparciu o analizy wykonane w wysokosprawnym chromatografie cieczowym (HPLC) przy użyciu kolumny Ostion

KS0403 (Lachema, Brno). W tab. 4. przedstawiono skład węglowodanów zawartych w hydrolizatach skrobi autoklawowanej uzyskanych w

Tabela 3

Czas hydrolizy skrobi niezbędny do otrzymania maltodekstryn o DE 3, 5, 8 i 12.

Time of starch hydrolysis as required to obtain maltodextrins with DE 3, 5, 8, and 12.

Enzym Enzyme	Skrobia Starch	Wymagany czas hydrolizy [min] Required time of hydrolysis [min]			
		DE 3	DE 5	DE 8	DE 12
Gamalpha PHL	Autoklawowana Autoclaved	3	17	39	67
	Ekstrudowana Extruded	1,5	13	31	55
Gamalpha TB150L	Autoklawowana Autoclaved	14	25	41	62
	Ekstrudowana Extruded	16	28	47	72
Gamalpha T400L	Autoklawowana Autoclaved	10	17	27	42
	Ekstrudowana Extruded	10	16	27	41
Gamalpha 900P	Autoklawowana Autoclaved	1	12	30	55
	Ekstrudowana Extruded	4	15	32	54
Gamalpha 300L	Autoklawowana Autoclaved	5	11	20	33
	Ekstrudowana Extruded	3	10	21	37
Gamalpha P120L	Autoklawowana Autoclaved	10	20	35	55
	Ekstrudowana Extruded	5	18	39	67

wyniku hydrolizy enzymatycznej. Stwierdzono, że udział polimerów o stopniu spolimeryzowania (DP) 3–8 wynosił od 8,2% (Gamalpha 300L, DE 5) do 48,5% (Gamalpha 900P, DE 12) suchej substancji hydrolizatów. Zaobserwowano, że im mniejszy jest równoważnik glukozowy otrzymanych maltodekstryn, tym większy jest udział wysoko spolimeryzowanych oligosacharydów oraz cukrów wyższych (DP > 8).

Obecność glukozy stwierdzono w większości hydrolizatów o równoważniku glukozowym 12 oraz w hydrolizatach o DE 8 w przypadku użycia preparatów Gamalpha 120L i Gamalpha PHL. Jedynym preparatem, który w ogóle nie uwalniał glukozy był Gamalpha T400L. Obecność maltozy stwierdzono we wszystkich hydrolizatach o DE 8–12 i w kilku hydrolizatach o DE 5. Najbardziej maltotwórczymi preparatami były Gamalpha 900P i TB150L. W hydrolizatach skrobi autoklawowanej

o DE 3, uzyskanej przy zastosowaniu preparatów Gamalpha PHL, Gamalpha T400L, Gamalpha 900P, Gamalpha 300L i Gamalpha P120L nie wykryto maltotriozy i

Tabela 4

Skład chemiczny maltodekstryn uzyskanych w wyniku hydrolizy skrobi autoklawowanej.

The chemical composition of maltodextrins obtained as a result of the hydrolysis of autoclaved starch.

Enzym Enzyme	DE	Zawartość poszczególnych cukrów [%] Percentage contents of individual sugars [%]								
		Glukoza Glucose	Maltoza Maltose	Maltotrioza Maltotriose	Maltotetraoza Maltotetraose	Maltopentaoza Maltopentaose	Malto-heksaoza Maltohexaose	Maltoheptaoza Maltoheptaose	Maltooktaoza Maltooctaose	Cukry wyższe Higher sugars
Gamalpha PHL	3	0	0	0	0	0,98	2,94	2,96	2,22	90,90
	5	0	0	1,44	0,95	1,42	2,05	2,74	2,13	89,27
	8	0,48	1,36	3,04	1,71	2,32	3,39	4,29	3,02	80,39
	12	2,59	4,80	6,80	3,07	3,95	5,27	9,97	6,36	57,19
Gamalpha TB150L	3	0	0,64	1,79	0,97	1,48	2,23	2,99	2,20	87,70
	5	0	0,85	2,92	1,34	2,06	3,17	4,14	2,83	82,69
	8	0	1,30	3,10	2,17	3,60	5,06	7,35	5,25	72,17
	12	0,68	2,29	7,44	2,73	4,70	6,76	6,28	5,56	63,56
Gamalpha T400L	3	0	0	0	0	3,57	3,56	3,47	2,56	86,84
	5	0	0,54	1,88	0,78	1,02	3,36	4,46	3,08	84,88
	8	0	0,91	3,11	1,15	1,40	4,78	6,22	3,89	78,54
	12	0	1,49	4,85	1,72	2,11	6,92	7,46	5,71	69,74
Gamalpha 900P	3	0	0	0	0	0,77	3,11	0,97	5,26	89,89
	5	0	1,41	3,56	2,16	1,59	4,89	6,85	5,42	74,12
	8	0	2,51	4,86	3,94	3,11	5,71	7,93	3,51	68,43
	12	1,23	5,77	11,12	5,86	5,32	17,93	14,82	4,61	33,34
Gamalpha 300L	3	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	5	0	0	0	0	1,05	0,64	4,83	1,71	91,77
	8	0	0,49	1,26	0,95	0,80	2,14	3,74	2,34	88,28
	12	0,46	1,02	2,13	1,51	1,17	3,05	5,19	3,06	82,41
Gamalpha P120L	3	0	0	0	0	0	0	0	9,32	90,68
	5	0	0,76	2,07	1,52	1,17	3,14	3,46	3,17	84,71
	8	1,64	0,73	3,39	1,91	1,78	3,23	8,83	2,33	76,16
	12	0,51	1,67	7,16	2,57	1,92	4,78	12,06	3,58	65,75

maltotetraozy. W przypadku preparatu Gamalpha 300L maltotriozy i maltotetraozy nie wykryto także w hydrolizacie o DE 5. Uwagę zwraca natomiast duży udział

maltotriozy w hydrolizatach o DE 12, otrzymanych po działaniu preparatów Gamalpa 900P, Gamalpa PHL i Gamalpa TB150L.

We wszystkich maltodekstrynach uzyskanych ze skrobi autoklawowanej największy udział procentowy w oligosacharydach miały maltoheksaoza, maltoheptaoza i maltooktaoza. W większości spośród badanych hydrolizatów w największym stężeniu występowała maltoheptaoza. W miarę zwiększania wartości DE maltodekstryn wzrastało stężenie tych oligosacharydów i zwiększał się udział oligosacharydów o większym stopniu polimeryzacji.

Dane zamieszczone w tab. 5 wskazują, że skrobia ekstrudowana była bardziej podatna na hydrolizę enzymatyczną niż skrobia autoklawowana. Udział polimerów o stopniu spolimeryzowania (DP) 3–8 wynosił od 7,2 do 59,8% suchej substancji hydrolizatów, a więc był zdecydowanie większy niż w hydrolizatach skrobi autoklawowanej.

Tabela 5

Skład chemiczny maltodekstryn uzyskanych w wyniku hydrolizy skrobi ekstrudowanej.

The chemical composition of maltodextrins obtained as a result of the hydrolysis of extruded starch.

Enzym Enzyme	DE	Zawartość poszczególnych cukrów [%] Percentage contents of individual sugars [%]								
		Glukoza Glucose	Maltoza Maltose	Maltotrioza Maltotriose	Maltotetraoza Maltotetraose	Maltopentaoza Maltopentaose	Malto-heksaoz Maltohexaose	Malto-heptaoz Maltoheptaose	Maltooktaoza Maltooctaose	Cukry wyższe Higher sugars
Gamalpa PHL	3	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0
	5	0	0,58	1,29	0,80	1,45	1,99	2,69	2,02	89,18
	8	0	0,75	2,21	1,25	1,92	2,86	3,74	2,64	84,63
	12	0,57	1,68	4,01	2,11	2,99	4,32	5,31	3,38	75,62
Gamalpa TB150 L	3	0	0,52	1,75	0,82	1,41	2,21	3,01	2,16	88,12
	5	0,57	1,52	4,13	1,81	2,69	4,08	5,15	3,25	76,81
	8	0,60	2,36	6,15	3,13	3,45	7,41	8,08	6,46	62,36
	12	0,65	2,85	9,08	3,22	5,81	8,30	7,69	5,31	57,10
Gamalpa T400L	3	0	0,62	1,52	0,74	1,00	2,81	3,65	2,59	87,09
	5	0	0,96	3,13	1,15	1,15	4,86	6,19	3,65	78,57
	8	0	1,07	3,47	1,24	1,62	5,29	6,70	3,54	77,07
	12	0	1,68	4,98	1,72	2,22	7,07	6,73	6,15	69,45
Gamalpa 900P	3	0	0	0	0	1,33	0,83	3,14	6,02	88,68
	5	0,58	2,39	6,17	2,51	3,89	5,84	6,25	4,64	68,07
	8	0,73	3,39	8,06	4,66	3,51	11,25	14,98	4,50	48,92
	12	1,28	5,86	11,12	5,95	5,34	17,96	14,49	4,98	33,02

Gamalpa 300L	3	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	5	0	0	0	0	0	1,15	4,48	1,58	92,79
	8	0	0	1,18	0,85	0,71	2,06	3,65	2,24	89,31
	12	0	0,69	2,12	1,46	1,10	3,21	5,60	3,22	82,60
Gamalpa P120L	3	0	0	0	0	0	0	0	7,35	92,65
	5	0	0	0,98	0,71	2,43	2,52	3,31	2,04	88,01
	8	0	0,57	1,63	1,15	1,85	2,64	4,70	2,78	84,68
	12	0	1,25	2,90	2,58	1,99	3,67	4,24	3,54	79,83

Największą aktywność hydrolityczną wykazał preparat Gamalpa 900P, który efektywnie rozkładał skrobię ekstrudowaną do cukrów niskopolimeryzowanych i oligosacharydów. Było to szczególnie widoczne w hydrolizatach o DE 8-12, w których indywidualny udział maltoheksaozy i maltoheptaozy sięgał kilkunastu procent. Warto także odnotować, że hydrolizaty uzyskane przy użyciu preparatów Gamalpa T400L, Gamalpa 300L i Gamalpa P120L nie zawierały w ogóle glukozy. Dwa ostatnie charakteryzowały się także małą zawartością maltozy. Najbardziej maltotwórczym preparatem był Gamalpa TB150L i Gamalpa 900P. W hydrolizatach skrobi ekstrudowanej o DE 3, uzyskanej przy zastosowaniu preparatów Gamalpa PHL, Gamalpa 900P, Gamalpa 300L i Gamalpa P120L nie wykryto maltotriozy i maltotetraozy.

Na uwagę zasługuje fakt, że w maltodekstrynach uzyskanych ze skrobi ekstrudowanej największy udział procentowy w oligosacharydach miały maltoheksaoza i maltoheptaosa. Suma zawartości oligosacharydów o wysokim stopniu polimeryzacji była większa niż łączna zawartość cukrów niższych.

Właściwości reologiczne hydrolizatów skrobiowych

Wszystkie hydrolizaty skrobiowe uzyskane w wyniku działania preparatów enzymatycznych na skrobię autoklawowaną i ekstrudowaną poddano badaniom reologicznym w reometrze rotacyjnym Haake'a, wyznaczając krzywe płynięcia. Krzywe te poddano następnie analizie regresji z wykorzystaniem modelu cieczy pseudoplastycznych rozrzedzonych ścinaniem Ostwalda de Waele'a:

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad \text{w odniesieniu do naprężenia ścinającego,}$$

$$\eta = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{w odniesieniu do lepkości,}$$

gdzie:

τ – naprężenie ścinające [Pa],

K – współczynnik konsystencji [$\text{Pa}\cdot\text{s}^n$],

$\dot{\gamma}$ – prędkość ścinania [s^{-1}],

η – lepkość pozorna [$\text{Pa}\cdot\text{s}$],

n – indeks płynięcia.

Na podstawie regresji obliczono współczynniki konsystencji K, będące miarą lepkości pozornej roztworów maltodekstryn oraz indeksy płynięcia n, wskazujące jak dalece właściwości badanej cieczy odbiegają od właściwości cieczy newtonowskiej (im bardziej odległe od 1, tym większe odchylenie od właściwości cieczy newtonowskiej). Wyniki przedstawiono w tab. 6.

Na lepkość istotny wpływ miał skład chemiczny hydrolizatów, a szczególnie zawartości cukrów wyższych. W większości hydrolizatów obserwowano wzrost lepkości pozornej w miarę wzrostu wartości DE. Wiązało się to z rosnącym udziałem wyższych oligosacharydów w suchej masie maltodekstryn. Jedyny wyjątek stanowiła maltodekstryna otrzymana przy użyciu preparatu Gamalpha 300L. W tym przypadku, niezależnie od sposobu kleikowania skrobi, w miarę wzrostu wartości DE, lepkość pozorna badanych roztworów malała. Było to szczególnie widoczne w przypadku hydrolizatów otrzymanych ze skrobi ekstrudowanej. Hydrolizaty te wyróżniały się małym zakresem depolimeryzacji skrobi. W hydrolizatach skrobi ekstrudowanej o

Tabela 6

Wartości K i n roztworów maltodekstryn otrzymanych ze skrobi autoklawowanej i ekstrudowanej.
The values of K and n for the maltodextrin solutions obtained from the autoclaved and extruded starch.

Enzym Enzyme	DE	K	n	Enzym Enzyme	DE	K	n
Maltodekstryny ze skrobi autoklawowanej Maltodextrins from autoclaved starch				Maltodekstryny ze skrobi ekstrudowanej Maltodextrins from extruded starch			
Gamalpha PHL	3	0,06982	0,65750	Gamalpha PHL	3	0,04836	0,56296
Gamalpha PHL	5	0,08402	0,32930	Gamalpha PHL	5	0,06739	0,49660
Gamalpha PHL	8	0,08093	0,24750	Gamalpha PHL	8	0,07725	0,42146
Gamalpha PHL	12	0,07949	0,21376	Gamalpha PHL	12	0,08848	0,39640
Gamalpha TB150L	3	0,00237	0,84520	Gamalpha TB150L	3	0,00689	0,84150
Gamalpha TB150L	5	0,00411	0,80420	Gamalpha TB150L	5	0,01885	0,73555
Gamalpha TB150L	8	0,00664	0,75710	Gamalpha TB150L	8	0,01959	0,67065
Gamalpha TB150L	12	0,00630	0,75590	Gamalpha TB150L	12	0,02804	0,64105
Gamalpha 400L	3	0,07750	0,35820	Gamalpha 400L	3	0,06890	0,51260
Gamalpha 400L	5	0,08744	0,24070	Gamalpha 400L	5	0,08503	0,45903
Gamalpha 400L	8	0,07740	0,24960	Gamalpha 400L	8	0,13080	0,41770
Gamalpha 400L	12	0,08600	0,18870	Gamalpha 400L	12	0,12227	0,36820
Gamalpha 900P	3	0,00883	0,87335	Gamalpha 900P	3	0,00766	0,82790
Gamalpha 900P	5	0,00695	0,75140	Gamalpha 900P	5	0,08714	0,40945
Gamalpha 900P	8	0,00862	0,69050	Gamalpha 900P	8	0,03545	0,59000
Gamalpha 900P	12	0,01173	0,68130	Gamalpha 900P	12	0,12925	0,37385
Gamalpha 300L	3	0,00970	0,89993	Gamalpha 300L	3	0,16650	0,66370
Gamalpha 300L	5	0,00653	0,87250	Gamalpha 300L	5	0,06996	0,50210
Gamalpha 300L	8	0,00559	0,85790	Gamalpha 300L	8	0,07615	0,42877

Gamalpha 300L	12	0,00542	0,79810	Gamalpha 300L	12	0,08315	0,43900
Gamalpha P120L	3	0,00562	0,86810	Gamalpha P120L	3	0,00258	0,64800
Gamalpha P120L	5	0,00607	0,84550	Gamalpha P120L	5	0,00945	0,87820
Gamalpha P120L	8	0,00563	0,80140	Gamalpha P120L	8	0,01802	0,77110
Gamalpha P120L	12	0,00544	0,81380	Gamalpha P120L	12	0,02947	0,68320

DE = 3 otrzymanych za pomocą Gamalpha 300L i PHL w ogóle nie stwierdzono obecności mono- i oligosacharydów. W tab. 6. przedstawiono wyniki badań dotyczących właściwości reologicznych maltodekstryn uzyskanych ze skrobi skleikowanej w autoklawie. Największą lepkość wykazały hydrolizaty otrzymane w wyniku użycia preparatu Gamalpha 400L i Gamalpha PHL, zaś najmniejszą przy użyciu preparatu Gamalpha P120L i Gamalpha 300L (skrobia autoklawowana). Podobne relacje odnotowano w przypadku hydrolizatów uzyskanych ze skrobi ekstrudowanej. W tym przypadku wysoką lepkością odznaczały się dodatkowo hydrolizaty wyprodukowane przy użyciu Gamalpha 900P.

Analiza porównawcza wskazuje, że w większości przypadków lepkość hydrolizatów otrzymanych ze skrobi ekstrudowanej była nieco większa niż ze skrobi autoklawowanej. We wszystkich przypadkach obserwowano zmniejszanie się wartości indeksu płynięcia w miarę wzrostu wartości DE hydrolizatów, co wskazuje na występowanie odwrotnej zależności pomiędzy szybkością ścinania a lepkością pozorną badanych preparatów. Badane hydrolizaty stawały się zatem bardziej nienewtonowskie. Zastanawiający jest brak zbieżności między malejącą lepkością hydrolizatów wytworzonych przy użyciu preparatu Gamalpha 300L a kierunkiem zmian wartości indeksu płynięcia przy zwiększaniu się DE hydrolizatów. Trudno w tym przypadku znaleźć zadowalające wytłumaczenie.

Tabela 7

Wartości ciśnienia osmotycznego roztworów maltodekstryn otrzymanych ze skrobi autoklawowanej i ekstrudowanej.

The osmotic pressure of maltodextrin solutions obtained from the autoclaved and extruded starch.

Enzym Enzyme	DE	Ciśnienie osmotyczne	Enzym Enzyme	DE	Ciśnienie osmotyczne
-----------------	----	-------------------------	-----------------	----	-------------------------

		Osmotic pressure [mosmol/kg]			Osmotic pressure [mosmol/kg]
Skrobia autoklawowana / Autoclaved starch					
Gamalpha PHL	3	3	Gamalpha 900P	3	4
Gamalpha PHL	5	4	Gamalpha 900P	5	11
Gamalpha PHL	8	6	Gamalpha 900P	8	14
Gamalpha PHL	12	10	Gamalpha 900P	12	29
Gamalpha TB150L	3	9	Gamalpha 300L	3	2
Gamalpha TB150L	5	11	Gamalpha 300L	5	3
Gamalpha TB150L	8	11	Gamalpha 300L	8	3
Gamalpha TB150L	12	17	Gamalpha 300L	12	5
Gamalpha 400L	3	7	Gamalpha P120L	3	6
Gamalpha 400L	5	8	Gamalpha P120L	5	8
Gamalpha 400L	8	12	Gamalpha 4P120L	8	11
Gamalpha 400L	12	13	Gamalpha P120L	12	16
Skrobia ekstrudowana / Extruded starch					
Gamalpha PHL	3	3	Gamalpha 900P	3	6
Gamalpha PHL	5	3	Gamalpha 900P	5	11
Gamalpha PHL	8	5	Gamalpha 900P	8	21
Gamalpha PHL	12	6	Gamalpha 900P	12	26
Gamalpha TB150L	3	9	Gamalpha 300L	3	9
Gamalpha TB150L	5	11	Gamalpha 300L	5	9
Gamalpha TB150L	8	16	Gamalpha 300L	8	10
Gamalpha TB150L	12	16	Gamalpha 300L	12	12
Gamalpha 400L	3	8	Gamalpha P120L	3	5
Gamalpha 400L	5	15	Gamalpha P120L	5	7
Gamalpha 400L	8	16	Gamalpha P120L	8	10

Gamalpha 400L	12	17	Gamalpha P120L	12	20
------------------	----	----	-------------------	----	----

Ciśnienie osmotyczne hydrolizatów skrobiowych

Wartość ciśnienia osmotycznego określono przy użyciu osmometru. Wykazano, że jest ono proporcjonalne do równoważnika glukozowego. Jest to spowodowane zwiększającą się ilością cukrów redukujących, odzwierciedloną w wartości DE.

Największe ciśnienie osmotyczne stwierdzono w hydrolizatach otrzymanych w wyniku działania preparatu Gamalpha 900L (tab. 7). Wysokimi ciśnieniami osmotycznymi charakteryzowały się także hydrolizaty wyprodukowane przy udziale preparatu Gamalpha TB150L.

Wnioski

1. Wykazano, że kinetyka reakcji hydrolizy skrobi zależna jest od zastosowanego enzymu oraz sposobu przygotowania substratu.
2. Stwierdzono, że proces hydrolizy skrobi ekstrudowanej był szybszy niż skrobi autoklawowanej.
3. Maltodekstryny o tym samym równoważniku glukozowym mają odmienny skład węglowodanowy, co jest skutkiem zróżnicowanej aktywności stosowanych enzymów i odmiennego przygotowania substratu.
4. Wraz ze wzrostem równoważnika glukozowego i zawartości wyższych oligosacharydów lepkość pozorna hydrolizatów zwiększa się.
5. Hydrolizaty skrobi autoklawowanej mają mniejszą lepkość pozorną niż hydrolizaty skrobi ekstrudowanej.
6. Na podstawie krzywych płynięcia wykazano, że badane hydrolizaty zmieniały swoją reologię w kierunku cieczy o charakterze bardziej nienewtonowskim.
7. Ciśnienie osmotyczne roztworów badanych maltodekstryn zwiększa się wraz ze wzrostem współczynnika DE.

Praca była finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych jako projekt badawczy nr PBZ-KBN/021/P06/99/13.

Autorzy składają podziękowanie firmie Gammazym, Sieradz Polska, za przekazane preparaty enzymatyczne, które wykorzystano w tych badaniach oraz za pełną informację technologiczną.

Literatura

- [1] Duedahl-Olsen L., Pedersen L.H., Larsen K.L.: Suitability and limitation of methods for characterisation of activity of malto-oligosaccharide-forming amylases. *Carbohydr. Res.* 2000, **329**, 109-119.
- [2] Govindasamy S., Campanella O.H., Oates C.G.: Enzymatic hydrolysis of sago starch in a twin- screw extruder. *J. Food Eng.*, 1997, **32**, 403-426.
- [3] Grafelman D.D., Meagher M.M.: Liquefaction of starch by a single-screw extruder and post-extrusion static-mixer reactor. *J. Food Eng.* 1995, **24**, 529-542.

- [4] Maarel van M.J.E.C., Veen van der B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L.: Properties and application of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.* 2002, **94**, 137-155.
- [5] Maaruf A.G., Man Y.B.Ch., Asbi B.A., Junainah A.H., Kennedy J.F.: Effect of water content on the gelatinisation temperature of sago starch. *Carbohydr. Polym.* 2001, **46**, 331-337.
- [6] Marchal L.M., Beeftink H.H., Tramper J.: Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends Food Sci. Technol.* 1999, **10**, 345-355.
- [7] Nigam P., Singh D.: Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 1995, **17**, 770-778.
- [8] PN 93/A-74710. Przetwory ziemniaczane. Skrobia ziemniaczana.
- [9] PN-78/A-74701. Hydrolizaty skrobiowe. Metody badań.
- [10] Valle G.D., Boche Y., Vergnes B.: The extrusion behaviour of potato starch. *Carbohydrate Polym.* 1995, **28**, 255-264.

THE CHARACTERISTICS OF MALTODEXTRINS OBTAINED FROM POTATO STARCH USING AMYLOLYTIC PREPARATIONS GAMALPHA

S u m m a r y

The enzymatic hydrolysis of potato starch was performed using six amylolytic preparations of the bacterial origin. The type of the preparations was Gamalpha (Gamma Chemie, Germany). In the hydrolysis reaction, there were used two kinds of starches; the first one was gelatinized in an autoclave, and the second one was extruded. From the hydrolysis reaction, there were obtained various maltodextrins of a DE 3-12 value. These products were characterized with regard to the composition of oligosaccharides contained in them including sugars of a polymerization degree from 1 to 8. It was shown that hydrolysates with the similar DE value significantly differed in the chemical composition of oligosaccharides. A content of oligosaccharides, with a DP from 3 to 8, in the hydrolysates produced of the autoclaved starch ranged between 8,2% and 48,5%, and in the hydrolysates of the extruded starch varied from 7,2% to 59,8%. In all the maltodextrins obtained, the maltohexaose, maltoheptaose and maltooctaose constituted the highest percentage among all the oligosaccharides. For the maltodextrins produced, viscosity and osmotic pressure profiles of their 10% water solutions were developed. For the majority of the hydrolysates, as the dextrose equivalent rose in the maltodextrins, the apparent viscosity also rose. It was stated that with regard to the maltodextrin solutions investigated, their share rate was inversely proportional to their apparent except for the maltodextrins obtained using a Gamalpha 300L preparation. The osmotic pressure of the starch hydrolysates was proportional to their dextrose equivalent.

Key words: maltodextrin, starch, oligosaccharide, viscosity, osmotic pressure 

DOROTA PLASKOTA

WYZNACZENIE OBSZARU OPTYMALNYCH SZYBKOŚCI ŚCINANIA JOGURTÓW O RÓŻNYM CZASIE DOJRZEWANIA

Streszczenie

W artykule przedstawiono wyniki badań własności reologicznych jogurtów o różnym czasie dojrzwania. Badaniom poddano trzy rodzaje jogurtów naturalnych, o różnej zawartości tłuszczu (2,2–3,2%). Każdy rodzaj jogurtu poddawano eksperymentom czterokrotnie, w różnych terminach przydatności do spożycia. W celu określenia wartości lepkości oraz naprężenia stycznego poddawano próbkę ścinaniu przez 713 s przy kolejnych, stałych szybkościach ścinania 30, 50, 70, 100 i 150 s⁻¹. Interwał czasowy wynosił 23 s, co umożliwiło uzyskanie 31 punktów doświadczalnych w każdej serii pomiarowej. Dokonano pomiaru niektórych parametrów reologicznych i podjęto próbę opisanie ich za pomocą modelu matematycznego. Na podstawie analizy wyników badań wyznaczono obszar optymalnych szybkości ścinania jogurtów o różnym czasie dojrzwania. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów najlepsze przybliżenie danych doświadczalnych do krzywej postaci $\eta = f(t)$ otrzymano w przypadku 29 punktów doświadczalnych. Wskazuje na to najniższa wartość współczynnika wariancji CV oraz najwyższa współczynnika korelacji R w całym przedziale wykonanych eksperymentów. Ponadto stwierdzono, że istnieje związek pomiędzy wartością szybkości ścinania, a strukturą badanego medium.

Słowa kluczowe: jogurt, reologia, czas dojrzwania.

Wprowadzenie

W ostatnich latach zauważa się znaczny rozwój badań w zakresie bioreologii. Wiele właściwości emulsji spożywczych, takich jak: kremowość, smarowność czy płynność, jest bezpośrednio związanych z ich cechami reologicznymi. Cechy te mają także istotne znaczenie w projektowaniu procesów jednostkowych z udziałem emulsji, obejmujących m.in. przepływ przez rury, mieszanie czy pakowanie [9].

Jogurt jest emulsją typu o/w, w której fazę olejową stanowią kropelki tłuszczu, natomiast fazę wodną – roztwór białek, cukrów i soli mineralnych [11].

Jogurt, podobnie jak inne produkty mleczne zawierające kultury bakterii, ma strukturę żelu, który rozwija się podczas procesu fermentacji [2]. W wyniku tego procesu bakterie powodują zmniejszenie wartości pH mleka poprzez zamianę laktozy

na kwas mlekowy. Gdy pH osiąga wartość 5,0, micelle kazeiny zostają częściowo zdestabilizowane i zaczynają się ze sobą łączyć w formę agregatów i łańcuchów, tworząc trójwymiarową macierz białkową z unieruchomioną fazą ciekłą mleka. Proces ten wpływa w bardzo istotny sposób na strukturę i właściwości sensoryczne jogurtu.

Swoista struktura jogurtu sprawia, że występują powiązania lepkości z czasem i szybkością ścinania [1, 3, 7], dlatego też wielu badaczy [5, 6, 8] podjęło próbę sformułowania zależności pomiędzy tymi parametrami.

W literaturze przedmiotu opublikowano kilka modeli opisujących krzywe płynięcia, mogących znaleźć zastosowanie do opisu wielu produktów spożywczych, w tym również jogurtu [2]. Należą do nich między innymi:

- Model potęgowy Ostwalda - de Waele'a – najprostszy, dwuparametrowy model reologiczny, opisujący krzywe płynięcia badanego materiału.

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

gdzie:

τ – naprężenie styczne [Pa],
 k – współczynnik konsystencji [Pa·sⁿ],
 $\dot{\gamma}$ – szybkość ścinania [s⁻¹],
 n – wskaźnik płynięcia [-].

- Model Herschela - Bulkley'a – najprostszy model krzywych płynięcia nieliniowych płynów plastycznolepkich. Parametrami tego modelu są: τ_0 , k , n .

$$\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (2)$$

gdzie:

τ_0 – granica płynięcia [Pa].

- Model Crossa – pozwalający na określenie lepkości równowagowej, czyli lepkości przy szybkości ścinania dążącej do nieskończoności.

$$\eta = \eta_e + \frac{\eta_o - \eta_e}{[1 + (k \cdot \dot{\gamma}^n)]} \quad (3)$$

gdzie:

η – lepkość [Pa·s],
 η_e – lepkość równowagowa [Pa·s],
 η_o – lepkość przy szybkości ścinania dążącej do zera, [Pa·s].

- Model F. Butler i P. McNulty [4] – umożliwiający określenie lepkości równowagowej oraz uzależnienie parametrów reologicznych badanego materiału od czasu. Powyższe czynniki wpłynęły na wybór modelu F. Butler i P. McNulty do opisu danych doświadczalnych w prezentowanej pracy.

$$\frac{1}{\eta - \eta_e} = \frac{1}{\eta_0 - \eta_e} + A_1 \cdot t \quad (4)$$

gdzie:

A_1 – parametr $[(\text{Pa} \cdot \text{s}^{-2})^{-1}]$,

t – czas [s].

W celu określenia wartości lepkości równowagowej, czyli wartości lepkości przy szybkości ścinania dążącej do nieskończoności dokonano przekształceń.

Przyjmując, że

$$y = \frac{1}{\eta - \eta_e} \quad (5)$$

$$A_0 = \frac{1}{\eta_0 - \eta_e} \quad (6)$$

gdzie:

A_0 – parametr $[(\text{Pa} \cdot \text{s})^{-1}]$, podstawiono zależność (5) i (6) do (4) i otrzymano liniową postać modelu F. Butler i P. McNulty o następującej postaci:

$$y = A_0 + A_1 \cdot t \quad (7)$$

Powyższe podstawienie miało za zadanie linearyzować podstawową zależność $\eta^{-1} = f(t)$.

Celem niniejszej pracy było określenie zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami reologicznymi jogurtu, określenie ich zmienności w czasie oraz podjęcie próby wyznaczenia obszaru optymalnych szybkości ścinania jogurtów o różnym czasie dojrzewania.

Materiał i metody badań

Badaniom poddano trzy rodzaje jogurtów naturalnych, o różnej zawartości tłuszczu (2,2–3,2%), zakupionych w łódzkiej mleczarni. Każdy rodzaj jogurtu poddawano eksperymentom czterokrotnie. Pierwszy pomiar wykonano dwa dni przed terminem przydatności do spożycia, drugi w terminie, kolejny – cztery dni po terminie, a ostatni siedem dni po upływie daty ważności. Badania wykonywano za pomocą reometru rotacyjnego Rheotoc RC 20 firmy Haake. Jogurt przechowywano w temp. 4°C. Przed każdym pomiarem sprawdzano pH próbki, które wynosiło około 4,55. Wszystkie eksperymenty prowadzono w temp. 5°C w świeżych próbkach jogurtu (120 ml). W celu zminimalizowania zniszczenia struktury jogurtu, każdą z próbek przelewano ostrożnie do cylindra miarowego, pozostawiano tam przez 15 min, a następnie poddawano ścinaniu za pomocą cylindra wewnętrznego CC45. W celu określenia wartości lepkości oraz naprężenia stycznego, poddawano próbkę ścinaniu przez 713 s przy kolejnych, stałych szybkościach ścinania 30, 50, 70, 100 i 150 $[\text{s}^{-1}]$. Przedział czasowy wynosił 23 s, co umożliwiło uzyskanie 31 punktów doświadczalnych w każdej serii pomiarowej.

Wyniki badań i dyskusja

Do opracowania wyników badań wybrano model F. Butler i P. McNulty [4]. Model ten umożliwił przedstawienie zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami reologicznymi jogurtu, a także określenie ich zmienności w czasie. Szukano najlepszego równania regresji opisującego zależność przedstawioną funkcją (7). Podstawą oceny dopasowania było obliczenie współczynnika R oraz współczynnika wariancji CV, dla 31, 30 i 29 punktów doświadczalnych każdej serii pomiarowej. Podstawą odrzucenia punktów był rozkład normalny Gaussa w granicach $\pm 3 \cdot \delta$ (odchylenia standardowe), czyli w granicach przedziału ufności 99,73%. Zaproponowany model sprowadza się do rozwiązywania funkcji uwikłanych. Wyznaczone parametry reologiczne danego jogurtu nie są stałe, lecz zależą od zawartości tłuszczu, rodzaju jogurtu, czasu przechowywania, szybkości ścinania. W każdym przypadku można znaleźć zbiór współzależnych parametrów reologicznych (η_e , A0, A1), jednoznacznie opisujących stan jogurtu w danym momencie. Wartości parametrów reologicznych wyznaczano metodą prób i błędów, wykorzystując jako miarę najlepszego dopasowania najniższą wartość współczynnika wariancji CV oraz najwyższą wartość współczynnika korelacji R. W tab. 1. przedstawiono przykładowe wartości parametrów reologicznych jogurtu o zawartości tłuszczu 3,2% i o różnym czasie dojrzewania, obliczonych na podstawie równania (7). Najlepsze dopasowanie punktów doświadczalnych $[y = f(\eta^{-1}), t]$ do prostej (7) otrzymano w przypadku 29 punktów doświadczalnych. Przy każdej zmianie szybkości ścinania pierwszy punkt, a najczęściej dwa punkty doświadczalne nie układały się na prostej (rys. 1). Nie są to jednak przypadkowe błędy losowe. Zjawisko to należy tłumaczyć faktem, że każda skokowa zmiana szybkości ścinania wskutek bezwładności badanego materiału wymaga pewnego czasu na dojście do stanu równowagi dynamicznej. Potwierdza to również najniższa wartość współczynnika wariancji CV oraz najwyższa wartość współczynnika korelacji R w całym przedziale wykonanych eksperymentów.

Na podstawie wyników pomiarów lepkości (tab. 1, rys. 1 i 2) można stwierdzić, że optymalny przedział szybkości ścinania zawiera się w granicach ($20 \div 100 \text{ s}^{-1}$). Przy szybkości ścinania większej niż 100 s^{-1} można zauważyć, że wyniki pomiarów są do siebie bardzo zbliżone, a nawet w kolejnych punktach przyjmują takie same wartości, czego wynikiem jest zwiększona wartość współczynnika wariancji CV oraz współczynnika korelacji R. Potwierdzeniem powyższej tezy jest również rys. 3., na którym pokazano, w jak znacznym stopniu dane doświadczalne przy szybkości ścinania większej od 100 s^{-1} odbiegają od pozostałych punktów, układających się w przybliżeniu na prostej.

Tabela 1

Wartości parametrów reologicznych jogurtu naturalnego (o zaw. 3,2% tłuszczu).
Rheological parameters of a natural yogurt (showing a fat content of 3.22%).

Termin wykonywanych badań Day of testing	Wielkość mierzona Measured value	γ [s ⁻¹]	Liczba punktów doświadczalnych The number of experimental points		
			29	30	31
Dwa dni przed upływem terminu przydatności do spożycia. Two days before the expire date	η_e [Pa·s]	30	0,6809	0,6896	0,7017
		50	0,4450	0,4483	0,4562
		70	0,3238	0,3390	0,3435
		100	0,2472	0,2503	0,2559
		150	0,1769	0,1784	0,1820
W dniu terminu przydatności do spożycia. On the day of the expire date	η_e [Pa·s]	30	0,6818	0,6894	0,7009
		50	0,4316	0,4363	0,4477
		70	0,3250	0,3292	0,3383
		100	0,2498	0,2522	0,2574
		150	0,1861	0,1873	0,1901
Cztery dni po upływie terminu przydatności do spożycia. Four days before the expire date	η_e [Pa·s]	30	0,7095	0,7208	0,7379
		50	0,4409	0,4464	0,4611
		70	0,3156	0,3210	0,3360
		100	0,2552	0,2569	0,2625
		150	0,1793	0,1812	0,1852
Siedem dni po upływie terminu przydatności do spożycia. Seven days before the expire date	η_e [Pa·s]	30	0,7404	0,7461	0,7545
		50	0,4397	0,4432	0,4455
		70	0,3307	0,3348	0,3429
		100	0,2436	0,2473	0,2549
		150	0,1842	0,1870	0,1897
Dwa dni przed upływem terminu przydatności do spożycia. Two days before the expire date	CV [%]	30	1,099137	1,459320	2,210220
		50	0,458286	0,642896	1,424085
		70	0,526367	1,917949	2,393479
		100	0,849437	1,135395	2,081562
		150	1,099731	1,254019	2,025605
W dniu terminu przydatności do spożycia. On the day of the expire date	CV [%]	30	0,919055	1,250002	1,988846
		50	0,603418	0,766224	1,567322
		70	0,611567	0,769992	1,528895
		100	0,864940	1,036224	1,813398
		150	1,450282	1,625904	2,395830
Cztery dni po upływie terminu przydatności do spożycia. Four days before the expire date	CV [%]	30	0,786498	1,063085	1,686424
		50	0,364560	0,485942	1,136208
		70	0,432034	0,526979	1,148005
		100	0,498297	0,573009	1,234488
		150	0,700579	0,830200	1,397066

Tab. 1 c.d.

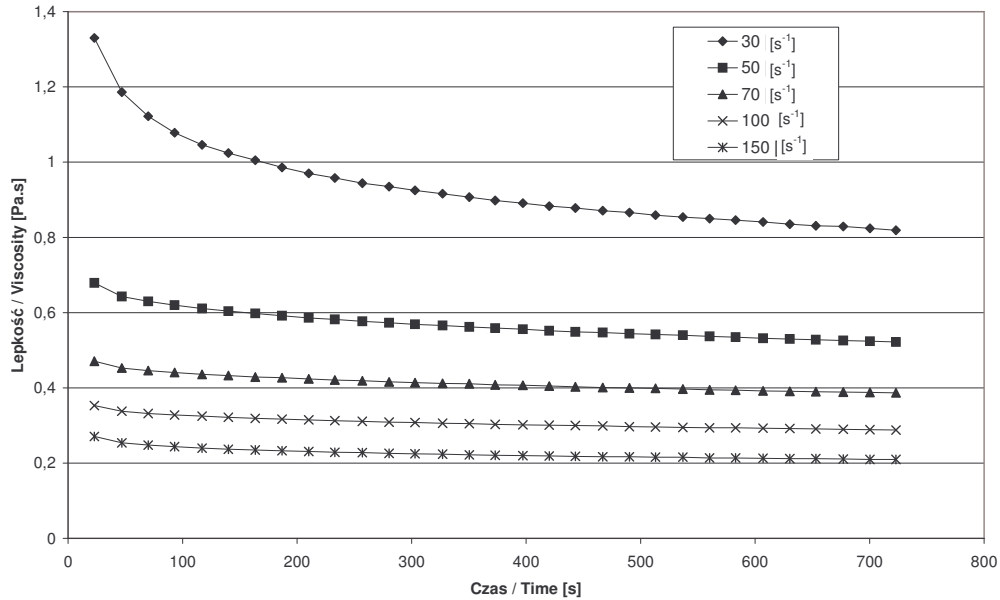
Termin wykonywanych badań Date of testing	Wielkość mierzona Measured value	γ [s ⁻¹]	Liczba punktów doświadczalnych The number of experimental points		
			29	30	31
Siedem dni po upływie terminu przydatności do spożycia Seven days before the expire date	CV [%]	30	1,472262	1,714325	2,260134
		50	0,327686	0,428663	0,486136
		70	0,523936	0,675520	1,249842
		100	0,601099	0,792512	1,611149
		150	0,882078	1,289935	1,836605
Dwa dni przed upływem terminu przydatności do spożycia Two days before the expire date	R	30	0,998807	0,998269	0,996862
		50	0,999694	0,999488	0,998062
		70	0,999338	0,994804	0,993701
		100	0,998625	0,998034	0,995327
		150	0,997885	0,997700	0,995584
W dniu terminu przydatności do spożycia On the day of the expire date	R	30	0,999124	0,998657	0,997315
		50	0,999275	0,999022	0,997010
		70	0,999025	0,998741	0,996543
		100	0,998423	0,998140	0,995922
		150	0,997024	0,996875	0,994947
Cztery dni po upływie terminu przydatności do spożycia Four days before the expire date	R	30	0,999220	0,998816	0,997641
		50	0,999688	0,999529	0,998086
		70	0,999292	0,999124	0,997163
		100	0,999469	0,999396	0,997921
		150	0,998938	0,998752	0,997336
Siedem dni po upływie terminu przydatności do spożycia Seven days before the expire date	R	30	0,998260	0,998009	0,997169
		50	0,999788	0,999687	0,999646
		70	0,999283	0,999016	0,997517
		100	0,999035	0,998647	0,996143
		150	0,998623	0,997723	0,996457
Dwa dni przed upływem terminu przydatności do spożycia Two days before the expire date	A0 [1/Pa·s]	30	1,67629	1,61540	1,51043
		50	4,24868	4,22690	4,14714
		70	7,11438	7,35855	7,28861
		100	10,02180	10,06571	10,00016
		150	12,92391	12,92128	12,80766
W dniu terminu przydatności do spożycia On the day of the expire date	A0 [1/Pa·s]	30	1,87328	1,81833	1,71631
		50	4,52770	4,55006	4,57042
		70	7,57346	7,70143	7,92278
		100	10,96238	11,04868	11,13688
		150	14,04325	13,91488	13,48847
Cztery dni po upływie terminu przydatności do spożycia Four days before the expire date	A0 [1/Pa·s]	30	1,46812	1,44563	1,40071
		50	3,54367	3,57417	3,64274
		70	5,59495	5,72060	6,07281
		100	9,09855	9,14908	9,27480
		150	11,58590	11,67301	11,79973

Tab. 1 c.d.

Siedem dni po upływie	A0 [1/Pa·s]	30	1,40986	1,34847	1,24931
-----------------------	--------------	----	---------	---------	---------

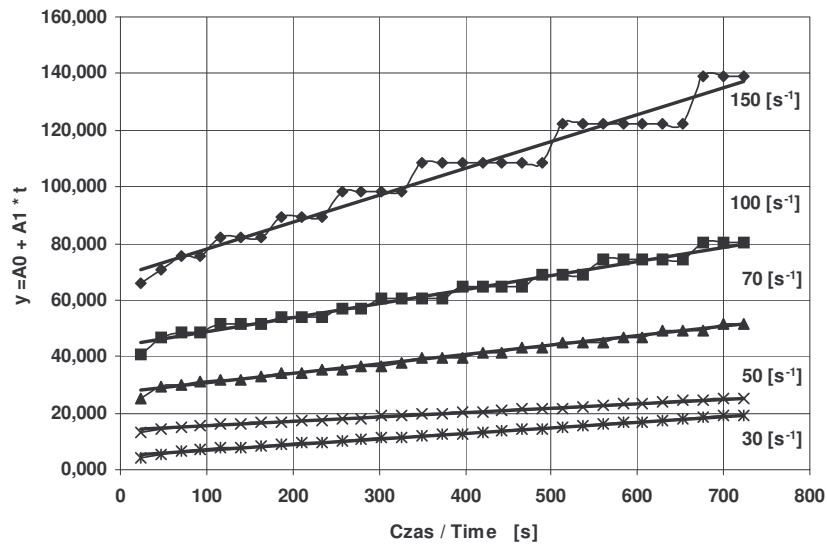
terminu przydatności do spożycia. Seven days before the expire date		50	3,86256	3,87561	3,88302
		70	6,84027	6,94104	7,11264
		100	9,33459	9,50832	9,79116
		150	13,49379	13,50142	13,35871
Dwa dni przed upływem terminu przydatności do spożycia. Two days before the expire date	A1 [1/Pa·s ²]	30	0,00700	0,00764	0,00866
		50	0,01131	0,01205	0,01410
		70	0,01201	0,01828	0,02117
		100	0,02058	0,02330	0,02969
		150	0,02871	0,03112	0,03812
W dniu terminu przydatności do spożycia. On the day of the expire date	A1 [1/Pa·s ²]	30	0,00735	0,00797	0,00906
		50	0,00894	0,00971	0,01201
		70	0,01190	0,01331	0,01731
		100	0,02058	0,02275	0,02871
		150	0,03844	0,04157	0,05026
Cztery dni po upływie terminu przydatności do spożycia. Four days before the expire date	A1[1/Pa·s ²]	30	0,00456	0,00495	0,00563
		50	0,00607	0,00652	0,00795
		70	0,00659	0,00725	0,00966
		100	0,01689	0,01789	0,02186
		150	0,02128	0,02311	0,02778
Siedem dni po upływie terminu przydatności do spożycia. Seven days before the expire date	A1[1/Pa·s ²]	30	0,00797	0,00845	0,00924
		50	0,00770	0,00812	0,00841
		70	0,01073	0,01184	0,01458
		100	0,01438	0,01624	0,02129
		150	0,02967	0,03471	0,04084

Proces ścinania jogurtu powoduje rozpad jego struktury. Przy szybkościach ścinania powyżej 100 s^{-1} dochodzi do ustalenia się stanu równowagi dynamicznej. Występują jedynie niewielkie zmiany struktury jogurtu, co manifestuje się niewielkimi zmianami lepkości. Można również zauważyć serie po 6÷7 identycznych wyników pomiarów lepkości (rys. 1 i 2). Dlatego też przy tak wysokich wartościach szybkości ścinania prowadzenie eksperymentów wydaje się bezcelowe. Dodatkowym uzasadnieniem takiego stwierdzenia jest wykres zależności $A_0 = f(\eta_e)$ (rys. 4, 5 i 6), z którego wynika, że bardzo wysokie szybkości ścinania (większe od 100 s^{-1}), powodują szybsze rozbitcie złożonych struktur białkowych, doprowadzając do stanu granicznego, co manifestuje się charakterem krzywej z wyodrębnieniem maksimum (rys. 6). Należy więc stwierdzić, że optymalne warunki prowadzenia eksperymentów otrzymuje się przy szybkości ścinania mniejszej od 100 s^{-1} .



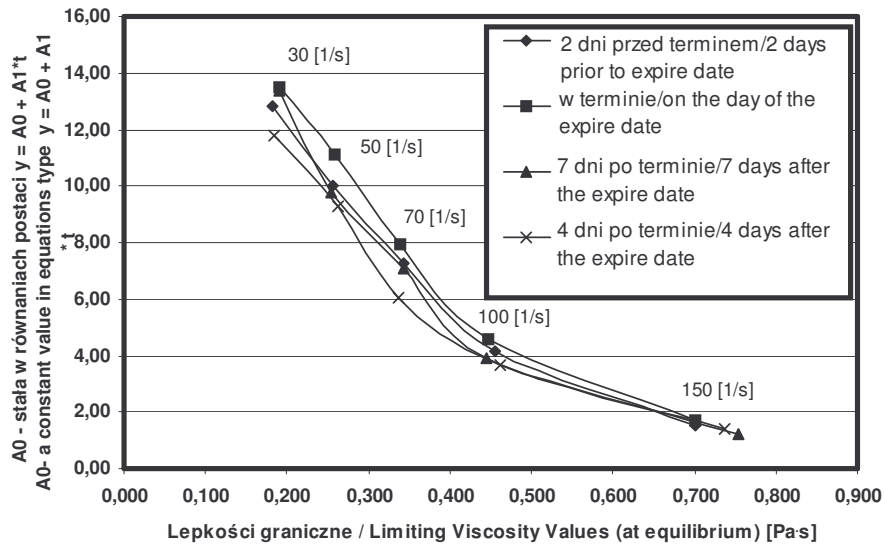
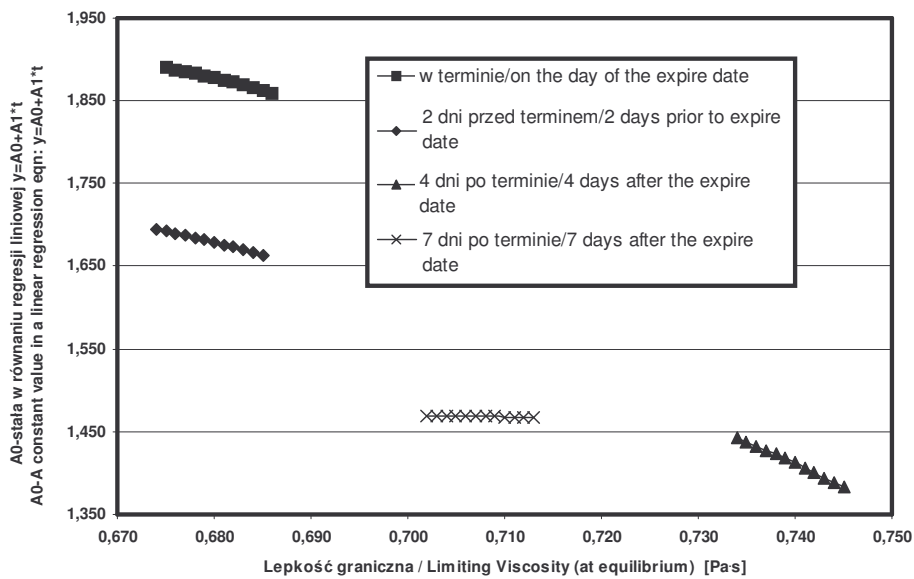
Rys. 1. Lepkość jogurtu (zaw. tłuszczu 3,2%) w funkcji czasu, w temp. 5°C przy stałych szybkościach ścinania.

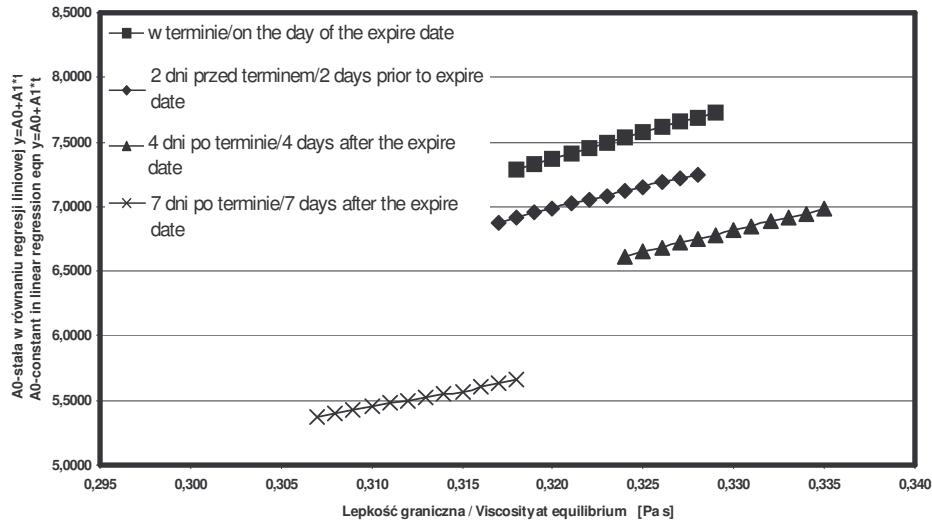
Fig. 1. The viscosity of yogurt (3.2% fat content) as a function of time at 5°C at constant shearing rates.



Rys. 2. Zależność $y = f(t)$ przy szybkości ścinania 30, 50, 70, 100, 150 [s⁻¹].

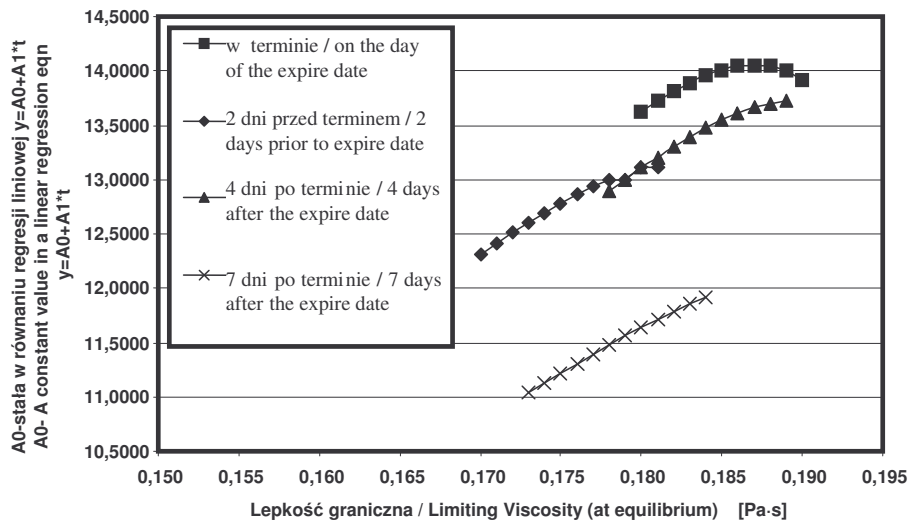
Fig. 2. The relation $y = f(t)$ at shearing rates of 30, 50, 70, 100, 150 [s⁻¹].

Rys. 3. Zależność $A0 = f(\eta_e)$ przy szybkości ścinania 30, 50, 70, 100, 150 $[s^{-1}]$.Fig. 3. The relation $A0 = f(\eta_e)$ at a shearing rate of 30, 50, 70, 100, 150 $[s^{-1}]$.Rys 4. Zależność $A0 = f(\eta_e)$ przy szybkości ścinania 30 $[s^{-1}]$.Fig. 4. The relation $A0 = f(\eta_e)$ at a shearing rate of 30 $[s^{-1}]$.



Rys 5. Zależność $A_0 = f(\eta_e)$ przy szybkości ścinania $70 \text{ [s}^{-1}\text{]}$.

Fig. 5. The relation $A_0 = f(\eta_e)$ at a shearing rate of $70 \text{ [s}^{-1}\text{]}$.



Rys. 6. Zależność $A_0 = f(\eta_e)$ przy szybkości ścinania $150 \text{ [s}^{-1}\text{]}$.

Fig. 6. The relation $A_0 = f(\eta_e)$ at a shearing rate of $150 \text{ [s}^{-1}\text{]}$.

Porównując własne wyniki badań z eksperymentami przeprowadzonymi przez O'Donnel i Butler [10] oraz Butler i McNulty [4] należy stwierdzić, że krzywe przedstawiające zależność lepkości od czasu przy stałych szybkościach ścinania mają podobny charakter, tzn. w warunkach stałej szybkości ścinania lepkości jogurtów

maleją w czasie, podobnie zresztą jak wartości lepkości równowagowych. Materiał biologiczny użyty w badaniach własnych był inny niż w przytoczonych publikacjach, stąd wartości uzyskanych wyników mogą różnić się od siebie w znaczny sposób.

Wnioski

1. Model Butler i McNulty polega na rozwiązywaniu funkcji uwikłanych i pozwala na liniowy opis procesów zachodzących w materiale biologicznym o charakterze emulsji.
2. Najlepsze przybliżenie danych doświadczalnych do krzywej postaci $\eta = f(t)$ otrzymano w przypadku 29 punktów doświadczalnych. Wskazuje na to najniższa wartość współczynnika wariancji CV oraz najwyższa współczynnika korelacji R w całym przedziale wykonanych badań.
3. Istnieje związek pomiędzy pomiarami lepkości a zawartością tłuszczu w badanym medium.
4. Wyznaczono obszar optymalnych szybkości ścinania jogurtów o różnym czasie dojrzewania. Proponuje się wykonywanie badań własności reologicznych jogurtów w następującym zakresie szybkości ścinania
 - od 30 do około 110 s⁻¹ materiał o niższej zawartości tłuszczu
 - od 20 do około 100 s⁻¹ materiał o wyższej zawartości tłuszczu.

Literatura

- [1] Basak S., Ramaswamy H.S.: Simultaneous evaluation of shear rate and time dependency of stirred yogurt rheology as influenced by added pectin and strawberry concentrate. *J. Food Eng.*, 1994, **21**, 385-393.
- [2] Benezech T., Maingonnat J.F.: Characterisation of the rheological properties of yogurt- A review. *J. Food Eng.*, 1994, **2/(4)**, 447-472.
- [3] Benezech T., Maingonnat J.F.: Flow properties of stirred yogurt: Modelling and influence of cooling conditions. In *Theoretical and Applied Rheology* (P. Moldenaers and R. Keunings, eds.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1992, pp. 693-695.
- [4] Butler F., McNulty P.: Time dependent rheological characterisation of buttermilk at 5 °C. *J. Food Eng.*, 1995, **25**, 569-580.
- [5] Cheng D.C H.: A differential form of constitutive relation for thixotropy, *Rheol. Acta*, 1973, **12**, 228.
- [6] Cheng D.C.H., Evans F.: Phenomenological characterisation of the rheological behaviour of inelastic reversible thixotropic and antithixotropic fluids. *Br. J. Appl. Phys.*, 1965, **16**, 1599.
- [7] De Kee D., Code R.K., Turcotte G.: Flow properties of time-dependent foodstuffs. *J. Rheol.*, 1983, **27(6)**, 581-604.
- [8] Hahn S.J., Ree T., Eyring H.: Flow mechanism of thixotropic substances. *Ind. Eng. Chem.*, 1959, **51**, 856.
- [9] McClements D.J.: *Food emulsions: principles, practices and techniques*. Boca Raton: CRC Press, 1999.
- [10] O'Donnell H.J., Butler F.: Time-dependent viscosity of stirred yogurt. Part I: couette flow. *J. Food Eng.*, 2002, **51**, 249-254.

- [11] Tan C.T.: Beverage emulsions. In: K. Larsson, S.E. Friberg: Food emulsions. Ed. Marcel Dekker, 2nd ed, New York 1990, pp. 445-478.

DETERMINING A RANGE OF OPTIMAL SHEARING RATES IN YOGURTS SHOWING DIFFERENT AGING TIMES

S u m m a r y

In the paper, there are discussed results obtained while investigating rheological properties of yogurts with different ageing times. Three types of natural yogurts showing various fat contents (2.2–3.3%) were four times tested. The tests were performed on different days during the expiry periods of yoghurts. Each test of a yogurt sample lasted 713 s, and during this time, the following constant shearing rates were applied, one after another: 30, 50, 70, 100 and 150 s⁻¹. The time interval was 23 s, and it was possible to score 31 testing points in each measuring series during this time. Some rheological parameters were measured, and an attempt was made to describe them using a mathematical model. Next, the results obtained were analysed, and, on this basis, a range of optimal shearing rates was determined for yogurts showing different ageing times. Based on the experiments accomplished, it was found that the experimental data were the nearest to the curve $\eta = f(t)$ in case of 29 experimental points. This fact is proved by the lowest value of the 'CV' variance coefficient and the highest value of the 'R' correlation coefficient within the whole range of the experiments carried out. In addition, it was stated the existence of a relationship between the value of a shearing rate and the structure of a medium under investigation.

Key words: yogurt, rheology, ageing time. ☒

MAGDALENA MIKA, AGNIESZKA WIKIERA, KRZYSZTOF ŻYŁA,
PRZEMYSŁAW PEREK

INTERAKCJE PEKTYNAZ I FOSFATAZ W PROCESIE ZMIAN BIODOSTĘPNOŚCI BIAŁKA Z PASZY DLA DROBIU

Streszczenie

Badano wpływ enzymów fosforolitycznych i pektynolitycznych na biodostępność białka oraz określono interakcje zachodzące pomiędzy działaniem tych enzymów. Analizy prowadzono z wykorzystaniem metody *in vitro*, symulującej warunki trawienia w przewodzie pokarmowym ptaków. Wyniki analizowano stosując dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA (dwuelementowe kombinacje aktywności enzymatycznych – preparaty: Finase P, Finase AP, Rapidase pomaliq 2F, Energex L). Wykazano, że zarówno dodatek pektynaz, jak i fosfataz do paszy ma istotny wpływ na stężenie białka oznaczanego w dializacie. Ponadto wykazano, że kooperacja z preparatami pektynolitycznymi jest efektywniejsza w przypadku fosfatazy kwaśnej niż fitazy. Stwierdzono także, że wysoka aktywność pektynoesterazy w preparatach pektynolitycznych jest czynnikiem ograniczającym biodostępność białka.

Słowa kluczowe: pektynazy, fosfatazy, biodostępność białka.

Wstęp

Preparaty enzymatyczne mają szerokie zastosowanie w przemyśle paszowym. Ich wykorzystanie zwiększa dostępność składników odżywczych z paszy pochodzenia roślinnego, zwłaszcza dla zwierząt monogastrycznych. Obecność składników antyżywniowych, takich jak fityniany czy niestrawne polisacharydy nieskrobiowe (NSP) może być niwelowana przez wzbogacanie diet dla drobiu w preparaty enzymatyczne. Zastosowanie preparatów fosforolitycznych, powodujących rozkład fitynianów, zwiększa nie tylko przyswajalność fosforu, ale poprawia także biodostępność metali (Ca, Mg, Zn, Fe) [8], białka [2, 17] i cukrowców [12] tworzących kompleksy z kwasem fitynowym. W ostatnich latach pojawiły się w literaturze doniesienia na temat zastosowania preparatów pektynolitycznych w żywieniu zwierząt monogastrycznych [14, 16]. Preparaty te, oprócz aktywności głównych enzymów rozkładających pektyny, wykazują istotne aktywności enzymów rozkładających inne

polisacharydy nieskrobiowe (β -glukany, hemicelulozy, ksylany). Wysoki stopień polimeryzacji NSP, często silnie rozgałęziona struktura oraz obecność grup zdysocjowanych sprawia, że związki te łatwo wiążą różne substancje, tworząc duże konglomeraty [1]. W środowisku przewodu pokarmowego w skład tych konglomeratów najczęściej wchodzi cząsteczki białka, skrobi, lipidów, wolne aminokwasy, witaminy i różne mikroelementy, a nawet enzymy trawienne. Już w roku 1983 Ikeda i Kuzano [6] donieśli o inhibującym wpływie pektyny, celulozy i ksylanu na aktywność enzymów katalizujących hydrolizę wiązań peptydowych, głównie pepsyny i tripsyny. Innym czynnikiem decydującym o antyżywnościowym działaniu NSP jest ich hydrofilowy charakter, co wpływa na wzrost lepkości treści jelitowej [3] i spowolnienie jej przepływu szczególnie u młodych zwierząt [7].

Celem badań było określenie wpływu preparatów pektynolitycznych i fosforolitycznych na biodostępność białka oraz określenie możliwych interakcji zachodzących pomiędzy działaniem tych preparatów.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiła mieszanka kukurydziano-sojowa dla drobiu. Jeden kilogram paszy charakteryzował się energią metaboliczną 12,47 MJ (2980 kcal) i zawierał składniki odżywcze w następujących ilościach: białko ogółem – 21,60%, wapń – 0,6%, fosfor całkowity – 0,40%, fosfor przyswajalny – 0,11%. Do głównych składników paszy należały: śruta kukurydziana (56,3%), poekstrakcyjna śruta sojowa (38,0%) i olej rzepakowy (3,6%).

Do badań zastosowano dwa handlowe preparaty pektynolityczne pochodzenia mikrobiologicznego: Energex L firmy Novo Nordisk i Rapidase pomaliq 2F firmy Gist-Brocades oraz dwa preparaty fosforolityczne pochodzenia mikrobiologicznego fitazę – Finase P i fosfatazę kwaśną – Finase AP firmy AB Enzymes OY. W każdym z preparatów oznaczano aktywności główne i towarzyszące.

Aktywność poligalakturonazy (EC 3.2.1.15) oznaczano w obecności 0,678% roztworu pektyny o pH 4,5, w temp 40°C, w ciągu 10 min. Za jednostkę aktywności poligalakturonazy (PGU) przyjęto ilość enzymu, która w warunkach oznaczenia uwalnia 1 μ mol kwasu D-galakturonowego w ciągu 1 min [11].

Aktywność pektynoesterazy (EC 3.1.1.11) oznaczano metodą miareczkowania potencjometrycznego uwalnianych w czasie reakcji grup karboksylowych. Jako substrat stosowano 0,5% roztwór pektyny o pH 4,5. Reakcja zachodziła w temp 40°C w ciągu 10 min. Jednostkę aktywności pektynoesterazy (PEU) zdefiniowano jako ilość enzymu równoważną 1 ml 1 M NaOH potrzebnego do utrzymania stałego pH mieszaniny reakcyjnej przez 1 min w warunkach reakcji [4].

Ogólną aktywność pektynolityczną oznaczano w temp. 20°C po uprzedniej hydrolizie 0,5% roztworu pektyny w temp. 40°C, przy pH równym 3,2. Jako jednostkę aktywności pektynolitycznej przyjęto stopnie PM (°PM) określające w ilu litrach 0,5% roztworu pektyny można osiągnąć spadek lepkości o 85%, w ciągu 5 godz, w temp. 20°C pod wpływem działania 1 kg preparatu pektynolitycznego [13].

Aktywność fitazy (EC 3.1.3.8) oznaczano w temp. 40°C, w ciągu 30 min, stosując jako substrat 5 mM roztwór fitynianu sodu o pH 5,0. Jednostkę aktywności fitazy (FTU) określano jako ilość enzymu uwalniającą 1 μmol fosforu w ciągu 1 min w warunkach reakcji [5].

Aktywność fosfatazy kwaśnej (EC 3.1.3.2) oznaczano w temp. 40°C, inkubując enzym z 5,5 mM roztworem soli sodowej p-nitrofenylofosforanu o pH 4,5 przez 15 min. Jednostkę aktywności fosfatazy kwaśnej (AcPU) definiowano jako ilość enzymu, która w warunkach reakcji uwalnia 1 μmol p-nitrofenolu w ciągu 1 min [18].

Aktywność proteazy kwaśnej (EC 3.4.23.6) oznaczano metodą Ansona wobec 2,5% roztworu hemoglobiny. Inkubację prowadzono przez 10 min, w temp. 40°C przy pH 2,8. Uwolnione aminokwasy i krótkołańcuchowe peptydy oznaczano z odczynnikami Folina-Ciocalteu'a. Jako jednostkę aktywności proteazy kwaśnej (AcPRU) przyjęto ilość enzymu, która hydrolizuje hemoglobinę w takim stopniu, że barwa z odczynnikami Folina-Ciocalteu'a odpowiada tej, jaką powoduje 1 μmol tyrozyny w warunkach oznaczenia [13].

Aktywność ksylanazy (EC 3.2.1.8) oznaczano w temp 40°C, w ciągu 10 min, stosując w charakterze substratu 3,33% roztwór ksylanu o pH 5,0. Jednostkę aktywności ksylanazy (XU) zdefiniowano jako ilość enzymu uwalniającą w warunkach reakcji 1 μmol ksylozy w ciągu 1 min [11].

Aktywność celulazy (EC 3.2.1.4) oznaczano wobec 0,833% roztworu CM-celulozy w temp. 40°C, przy pH równym 5,0 w ciągu 10 min. Jako jednostkę aktywności celulazy (CU) przyjęto ilość enzymu potrzebną do uwolnienia 1 μmola glukozy w ciągu 1 min w warunkach analizy [14].

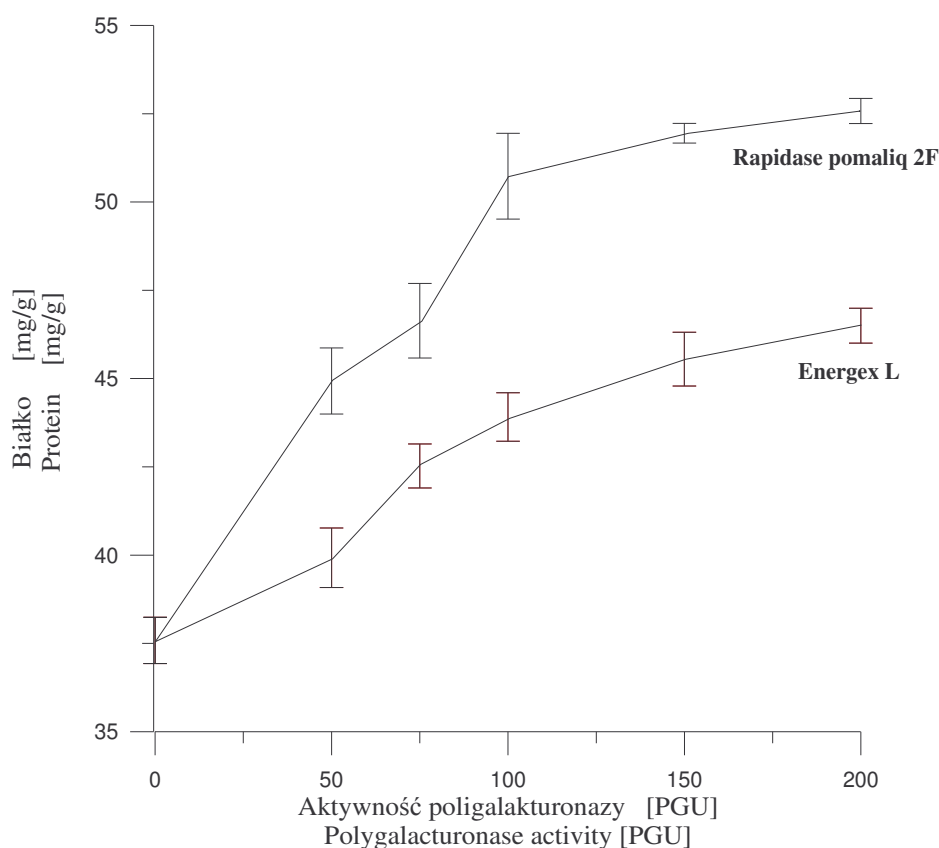
Aktywność β-glukanazy (EC 3.2.1.6) oznaczano w temp. 40°C przy pH 5,0, prowadząc dwudziestominutową inkubację enzymu z 1,66% roztworem lichenanu. Jednostkę aktywności β-glukanazy (GIU) zdefiniowano jako ilość enzymu konieczną do uwalniania 1 μmola glukozy w ciągu 1 min [11].

Biodostępność białka badano, stosując metodę *in vitro* symulującą układ trawienny ptaka opracowaną przez Żyłę i wsp. [17]. Preparaty fitazy i fosfatazy kwaśnej stosowano w dawkach wysycających w procesie defosforylacji paszy pszenno-sojowej, równych 750 FTU i 3156 AcPU na 1 kg paszy [16]. Preparaty pektynolityczne stosowano w dawce optymalnej 100 PGU na 1 kg paszy, którą wyznaczano w pierwszym etapie badań. Wszystkie analizy prowadzono w 6 powtórzeniach. Białko (produkty hydrolizy białka) w dializacie oznaczano metodą Lowry'ego [10].

Wyniki opracowano statystycznie, stosując dwuczynnikową analizę wariancji.

Wyniki i dyskusja

Optymalną dawkę wieloaktywnościowych preparatów pektynolitycznych standaryzowano w badaniach *in vitro* według aktywności poligalakturonazy. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 1. Jako optymalną dawkę uznano ilość preparatu wprowadzającą aktywność poligalakturonazy równą 100 PGU do 1 kg paszy. W tab. 1. przedstawiono poziomy aktywności głównych i aktywności towarzyszących, które były wprowadzane z preparatami pektynolitycznymi do 1 kilograma mieszanki paszowej.



Rys. 1. Zależność między aktywnością poligalakturonazy (PGU) w preparatach pektynolitycznych a ilością białka uwalnianego z paszy kukurydziano-sojowej.

Fig. 1. The relation between a polygalacturonase activity (PGU) in pectolytic preparations and amounts of protein released from a maize-soyabean-feed.

Tabela 1

Aktywności enzymatyczne towarzyszące 100 PGU w badanych preparatach pektynaz w przeliczeniu na 1 kg paszy kukurydziano-sojowej.

Enzymatic activities accompanying the standardized level of 100 PGU as found in the pectinase preparations per one kg of feed.

Nazwa preparatu Name of preparation	Dawka $\mu\text{l/kg}$ paszy Dosage $\mu\text{l/kg}$ of feed	Aktywności enzymatyczne Enzymatic activities								
		PGU	PEU	$^{\circ}\text{PM}$	FTU	AcPU	AcPRU	XU	GIU	CU
<i>Energex L</i>	4,3	100	2,4	11943,0	0,033	6,91	15,5	2	13,7	1,8
<i>Rapidase pomaliq 2F</i>	40	100	20,6	23180,8	0,029	0,07	4,4	75	154,6	16,9

W stosowanych dawkach preparat Energex L zawierał znaczący poziom jedynie ogólnej aktywności pektynolitycznej (11943 $^{\circ}\text{PM}$), pozostałe aktywności były śladowe. Pektynaza Rapidase pomaliq 2F charakteryzowała się relatywnie wysoką aktywnością enzymów rozkładających nieskrobiowe polisacharydy, a ogólna aktywność pektynolityczna tego preparatu była dwukrotnie wyższa niż w preparacie Energex L. Preparat Rapidase pomaliq 2F wykazywał także znaczący poziom pektynoesterazy, wynoszący 20,6 PEU na 1 kg paszy. Oba preparaty charakteryzowały śladowe aktywności: fitazy, fosfatazy kwaśnej i proteazy kwaśnej.

W tab. 2. przedstawiono aktywności enzymatyczne towarzyszące wysycającym dawkom handlowych preparatów fitazy (Finase P) i fosfatazy kwaśnej (Finase AP) wprowadzanym do 1 kg paszy. Stosowane preparaty fitazy i fosfatazy kwaśnej nie wykazały ogólnej aktywności pektynolitycznej ani pektynoesterazowej.

Tabela 2

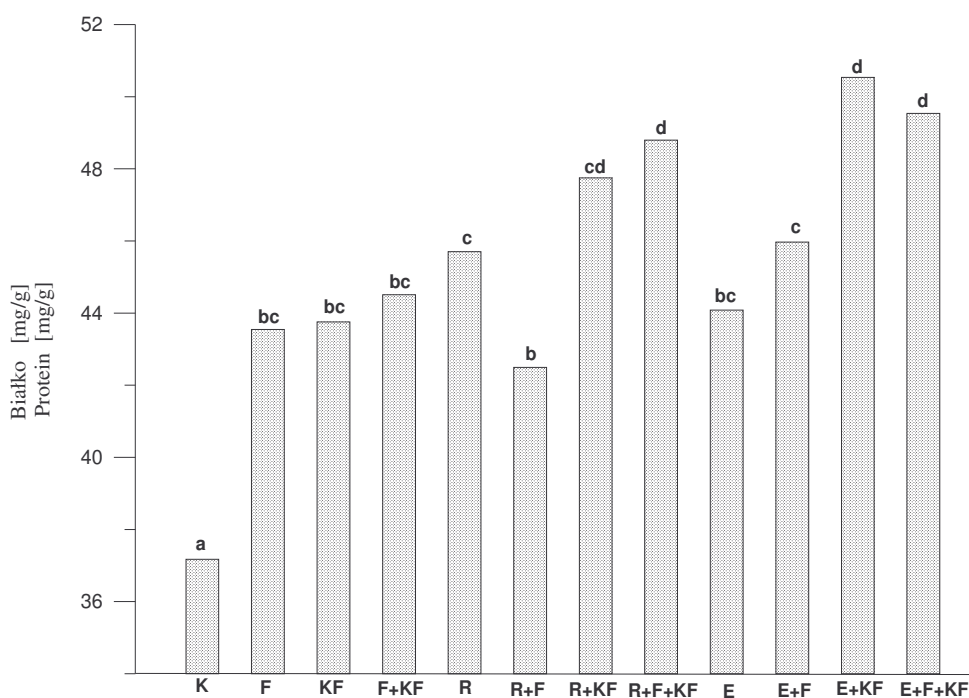
Aktywności enzymatyczne towarzyszące wysycającym dawkom fitazy i fosfatazy kwaśnej w przeliczeniu na 1 kg paszy kukurydziano-sojowej.

Enzymatic activities accompanying the saturated levels of phytase and acid phosphatase per kg of feed.

Nazwa preparatu Name of preparation	Dawka $[\mu\text{l/kg}$ paszy] Dosage $[\mu\text{l/kg}$ of feed]	Aktywności enzymatyczne Enzymatic activities								
		PGU	PEU	$^{\circ}\text{PM}$	FTU	AcPU	AcPRU	XU	GIU	CU
<i>Finase P</i>	0,3	80	0	0	750	305	24	53	32	54
<i>Finase AP</i>	0,48	106	0	0	178	3156	97	82	22	32

Wszystkie preparaty stosowane w doświadczeniach *in vitro* wpływały istotnie na poziom uwalnianego białka (rys. 2). Z preparatów pektynolitycznych nieznacznie lepsze rezultaty uzyskano w przypadku preparatu Rapidase pomaliq 2F, który spowodował wyższy o 23% przyrost ilości białka w dializacie niż preparat Energex L. Fakt ten można

wytlumaczyć wykazanymi uprzednio w preparacie Rapidase pomaliq 2F wyższymi, niż w preparacie Energex L, poziomami wszystkich aktywności enzymów rozkładających NSP. Wywołana przez glikozydazy depolimeryzacja paszowych pektyn, ksylianów i β -glukanów obniżała lepkość paszy trawionej metodą *in vitro*, ponadto podwyższała dostępność substratu (białka), uwalniając go z wielkich polisacharydowych konglomeratów, jak również eliminowała inhibujący wpływ nieskrobiowych polisacharydów, zwiększając tym samym ilość aktywnych cząsteczek enzymów trawiennych.



Rys. 2. Wpływ dodatku preparatów enzymatycznych na poziom białka uwalnianego z paszy do dializatu. [K – próba kontrolna, F – fitaza (Finase P), KF – fosfataza kwaśna (Finase AP), E – preparat Energex L, R – preparat Rapidase pomaliq 2F]. Różne litery superskryptu oznaczają różnice statystycznie istotne (test LSD).

Fig. 2. The influence of different enzyme preparations added to feed on the concentration of protein being released from feed to a dialysate. [K – control, F – phytase (Finase P), KF – acid phosphatase (Finase AP), E – Energex L pectinase preparation, R – Rapidase pomaliq 2F pectinase preparation]. Different letters in superscripts denote statistically essential difference (LSD test).

Zarówno fitaza, jak i fosfataza kwaśna, wpłynęły istotnie na przyrost ilości białka w dializacie (rys. 2), ale pomiędzy efektywnością działania tych preparatów nie obserwowano istotnych statystycznie różnic. Zastosowanie równocześnie

wysycających dawek obu fosfataz nie zwiększało w sposób istotny ilości białka uwalnianego z paszy. Pomiedzy działaniem preparatów fosforolitycznych zachodziła interakcja (tab. 3). Interesujący wydaje się fakt, że preparat Finase AP działający bez dodatku preparatu Finase P wpływał istotnie na wzrost poziomu białka uwalnianego do dializatu, mimo iż fosfataza kwasna samodzielnie nie jest w stanie hydrolizować kwasu fitynowego. Substratem do jej działania może być dopiero produkt powstały w reakcji (odszczerpienia pierwszej reszty fosforanowej od kwasu fitynowego) katalizowanej przez fitazę [15]. Wskazuje to, że poziom aktywności endogennej fitazy składników paszy i poziom aktywności fitazowej wprowadzanej z wysycającą dawką preparatu Finase AP były wystarczające do uwolnienia odpowiedniej ilości substratu.

Tabela 3

Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA.
Results of the two way ANOVA variance analysis.

Interakcje Interactions	F – wartość testu F – test value	P – prawdopodobieństwo P – probability
Finase P x Finase AP	10,65	0,003
Finase P x Energex L	12,06	0,002
Finase P x Rapidase pomaliq 2F	53,29	0,000
Finase AP x Energex L	0,01	0,924
Finase AP x Rapidase pomaliq 2F	8,46	0,007

W tab. 3. przedstawiono wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA (dwuelementowe kombinacje aktywności enzymatycznych – preparaty: Finase P, Finase AP, Rapidase pomaliq 2F, Energex L). Zbadano interakcje układów: Finase P x Energex L, Finase P x Rapidase pomaliq 2F, Finase AP x Energex L, Finase AP x Rapidase pomaliq 2F. Stwierdzono brak interakcji i zarazem istotny wzrost stężenia białka tylko przy kooperacji preparatów Finase AP i Energex L (rys. 2). W przypadku tych preparatów prawdopodobieństwo, że przyrosty ilości uwalnianego białka pochodzące od każdego z preparatów oddzielnie są addytywne wyniosło 92,4%. Dowodzi to, że substratem tych enzymów są różne kompleksy wiążące białka i żaden z produktów powstałych w reakcjach przez nie katalizowanych nie wpłynął inhibująco na aktywność drugiego preparatu, jak również nie spowodował dodatkowego kompleksowania białka. W przypadku preparatów Rapidase pomaliq 2F i Finase AP zaobserwowano istotną interakcję (tab. 3) i niewielki wzrost ilości uwalnianego białka (rys. 2). Spowodowane to było wysoką aktywnością pektynoesterazy, obecnej w preparacie Rapidase pomaliq 2F. Powstałe w wyniku akcji pektynoesterazy wolne grupy karboksylowe prawdopodobnie chelatowały białko uwalniane przez fosfatazę z kompleksów fitynowych, co ograniczyło dostęp peptydaz do substratu. Ponadto

negatywny wpływ mógł wynikać z wiązania przez wolne grupy karboksylowe jonów wapnia, które są aktywatorami wielu fosfomonoesteraz [9, 14].

Stwierdzono, że fitaza współdziałająca z preparatami pektynolitycznymi uwolniła do dializatu znacznie mniejsze ilości białka niż fosfataza kwaśna w połączeniu z tymi preparatami. Pomiędzy fitazą i preparatami pektynaz wystąpiły istotne interakcje (tab. 3). Współdziałanie preparatów Finase P i Energex L spowodowało 3,6 razy mniejszy przyrost (w stosunku do akcji samego preparatu Energex L) ilości białka w dializacie niż współdziałanie preparatów Finase AP i Energex L. Zastosowanie fitazy i preparatu Rapidase pomalij 2F spowodowało spadek uwalnianego białka o 7% względem wyników otrzymanych przy zastosowaniu tylko pektynazy. Analiza statystyczna wykazała istotną interakcję tych preparatów (tab. 3). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy ilością białka uwalnianego do dializatu przy wprowadzeniu do paszy pełnego zestawu preparatów (Finase P + Finase AP + preparat pektynolityczny) i zestawem Finase AP + preparat pektynolityczny, co potwierdza małą efektywność działania fitazy w procesie uwalniania białka.

Wnioski

1. Zastosowanie preparatów fosforolitycznych, jak i pektynolitycznych, ma istotny wpływ na ilość białka uwalnianego z paszy poddanej trawieniu *in vitro*.
2. Preparat fosfatazy kwaśnej (Finase AP) we współdziałaniu z preparatami pektynolitycznymi powoduje uwalnianie istotnie większych ilości białka niż preparat fitazy (Finase P) w połączeniu z tymi preparatami.
3. Wysoka aktywność pektynoesterazy w preparatach pektynolitycznych ogranicza uwalnianie białka do dializatu.
4. Działanie preparatu fosfatazy kwaśnej i preparatu pektynolitycznego o bardzo niskim poziomie pektynoesterazy (Energex L) nie wykazało interakcji (Finase P x Energex L $p = 0,924$), a przyrosty uwalnianego białka pod wpływem działania tych preparatów były addytywne.

Literatura

- [1] Bedford M.R., Morgan A.J.: The use of enzymes in poultry diets. *World Poultry Sci. J.*, 1996, **52**, 61-68.
- [2] Camovale E., Lugaro E., Lombardi-Boccia G.: Phytic acid in faba bean and pea. Effect on protein availability. *Cereal Chem.*, 1988, **65**, 114-117.
- [3] Choct M., Annison G.: Anti-nutritive effect of chitin pentosans in broiler chickens: roles of viscosity and gut microflora. *B. Poultry Sci.*, 1992, **33**, 821-834.
- [4] Hajnal H.A., Polaczek-Racz M.: Determination of pectin methyl esterases, polygalacturonase and pectic substances in some fruit and vegetables. *Acta Aliment.*, 1975, **4** (3), 271-289.
- [5] Heinonen J.K., Lahti R.J.: A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.*, 1981, **113**, 313-317.

- [6] Ikeda K., Kusano K.: In vitro inhibition of digestive enzymes by indigestible polysaccharides. *Cereal Chem.*, 1983, **60**, 260-263.
- [7] Jamroz D.: Antyżywniowe i toksyczne składniki pasz. W: *Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo*, t. I, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001, s. 122-134.
- [8] Kornegay E.T.: Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. *Enzymes Farm Animal Nutr.*, 2001, 237-271.
- [9] Krużel M., Morawiecka B.: Acid phosphatase of potato tubers. Purification, properties, sugar and amino acid composition. *Acta Biochim. Pol.*, 1982, **29 (3-4)**, 321-329.
- [10] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 256-275.
- [11] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 426-428.
- [12] Thompson L.U., Serraino M., Effect of phytic acid reduction on rapeseed protein digestibility and amino acid absorption. *J. Agr. Food Chem.*, 1986, **34**, 468-469.
- [13] Wikiera A.: Dostosowanie preparatu pektynolitycznego Pektopol PT 400 do potrzeb przemysłu paszowego. AR, praca doktorska. Kraków 2003.
- [14] Wood T.: Bhat K.M.: Methods for measuring cellulase activities. *Met. Enzym.*, 1988, **160**, 87-112.
- [15] Wyss M.: Biophysical characterization of fungal phytases (myoinositol heksakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microb.*, 1999, **65(2)**.
- [16] Żyła K., Koreleski J., Świątkiewicz S., Ledoux D.R., Piironen J.: Influence of supplemental enzymes on the performance and phosphorus excretion of broilers fed wheat-based diets to 6 weeks of age. *Animal Feed Sci. Technol.*, 2001, **89**, 113-118.
- [17] Żyła K., Ledoux D.R., Garcia A., Veum T.L.: An *in vitro* procedure for studying enzymic dephosphorylation of phytate in maize-soybean feeds for turkey poult. *Br. J. Nutr.*, 1995, **74**, 3-17.
- [18] Żyła K., Wikiera A., Koreleski J., Świątkiewicz S., Piironen J., Ledoux D.R.: Comparison of the efficacies of a novel *Aspergillus niger* mycelium with separate and combined effectiveness of phytase, acid phosphatase, and pectinase in dephosphorylation of wheat-based feeds fed to growing broilers. *Poultry Sci.*, 2000, **79**, 1434-1443.

INTERACTIONS BETWEEN PECTINASES AND PHOSPHATASES DURING A PROCESS OF ALTERING THE PROTEIN BIOAVAILABILITY IN FEED STUFF FOR POULTRY

S u m m a r y

The effects of pectinases and phosphatases on the bioavailability of protein and interactions between these enzymes were studied. Analysis were performed using an *in vitro* method simulating conditions of the bird's intestinal digestion tract. The results obtained were analysed using a two way ANOVA variance analysis (two factor combinations of enzymatic activities – the preparations: Finase P, Finase AP, Rapidase pomaliq 2F, and Energex L). The investigations evidenced that the addition of pectinases and phosphatases significantly influenced protein levels being determined in the dializate. Moreover, it was proved that the cooperation with the pectinase preparations was more effective for the acid phosphatase than for the phytase. It was also confirmed that the high pectin esterase activity in pectinase preparations was a factor limiting the protein bioavailability.

Key words: pectinases, phosphatases, protein bioavailability 

IRENA PERUCKA, MAŁGORZATA MATERSKA

WPLYW DOLISTNEGO STOSOWANIA JONÓW Ca^{2+} ORAZ PROCESU SUSZENIA NA ZAWARTOŚĆ α -TOKOFEROLU, β -KAROTENU I KSANTOFILI W OWOCACH PAPRYKI SŁODKIEJ

Streszczenie

Określono wpływ jonów wapniowych (stosowanych dolistnie) oraz procesu suszenia na zawartość witamin przeciwutleniających: tokoferoli (wit. E), β -karotenu (prowitaminy A) i ksantofili w owocach papryki słodkiej.

Badaniom poddano dwie odmiany papryki: King Arthur i Red Knight. W fazie 4–5 liści sadzonki opryskano roztworem CaCl_2 , po czym wysadzano je do gruntu. Próbę kontrolną stanowiły rośliny bez oprysku. Do analiz chemicznych pobierano owoce w pełni dojrzałe. Po usunięciu gniazd nasiennych z owocni przygotowywano ekstrakty. Frakcje tokoferoli, β -karotenu i ksantofili izolowano za pomocą metod chromatograficznych, a zawartość poszczególnych składników oznaczano spektrofotometrycznie.

Na podstawie wyników badań stwierdzono, że owoce roślin kontrolnych odmiany Red Knight charakteryzowały się ponad dwukrotnie wyższą zawartością α -tokoferolu i β -karotenu oraz o 60% wyższą zawartością ksantofili niż owoce odmiany King Arthur. Proces suszenia papryki spowodował 70–78% spadek zawartości α -tokoferolu oraz 12–46% zmniejszenie zawartości β -karotenu w owocach obu odmian. Natomiast zawartość ksantofili zwiększyła się o 22% zarówno w owocach odmiany King Arthur, jak i Red Knight.

Podczas suszenia papryki, pochodzącej z roślin poddanych opryskowi, nie odnotowano korzystnego wpływu jonów Ca^{2+} na trwałość zawartego w owocach α -tokoferolu. Pod względem zawartości β -karotenu, zmniejszenie strat tego składnika stwierdzono jedynie w owocach odmiany Red Knight – z 46 do 15%. Suszenie papryki odmiany King Arthur spowodowało zaś powiększenie straty β -karotenu z 12 do 14%. Jony Ca^{2+} wpłynęły korzystnie na zawartość ksantofili w świeżych owocach obu odmian, natomiast suszenie sprzyjało wzrostowi zawartości tych składników (o 30%) w papryce odmiany King Arthur.

Słowa kluczowe: papryka słodka, proces suszenia, α -tokoferol, β -karoten, ksantofile, Ca^{2+} .

Wprowadzenie

Owoce papryki należą do cennych warzyw pod względem odżywczym, zawierają bowiem witaminy o właściwościach przeciwutleniających: C, E oraz β -karoten, czyli

prowitaminę A. Zawartość tych związków zależy od odmiany i fazy dojrzałości papryki. Najwięcej witamin znajduje się w owocach w pełni dojrzałych – całkowicie wybarwionych [3, 4, 5, 6, 7, 9, 14]. O czerwonej barwie owoców papryki decyduje obecność specyficznych dla niej ksantofili – kapsantyny i kapsorubiny. Ich zawartość także w dużym stopniu zależy od odmiany [1, 3] i warunków pogodowych podczas wzrostu roślin [10].

Niekorzystne warunki pogodowe, występujące w wielu krajach o klimacie umiarkowanym, nie sprzyjają uzyskaniu pełnej dojrzałości owoców. Dlatego coraz częściej stosowane są substancje przyspieszające proces dojrzewania owoców. Jedną z nich jest etefon, który zastosowany 2 tygodnie przed zbiorem zwiększa ilość dojrzałych owoców. W badaniach własnych nad możliwością zastosowania etefonu w uprawie papryki ostrej we wczesnej fazie wzrostu roślin wykazano podobny efekt [12]. Przyspieszenie dojrzewania owoców papryki ostrej stwierdzono również po łącznym zastosowaniu etefonu z Ca^{2+} [13] oraz samych jonów wapniowych [15]. Badania wpływu Ca^{2+} na jakość owoców pod względem zawartości witamin wykazały zróżnicowaną reakcję roślin. W owocach odmian ostrych nie stwierdzono istotnego wpływu Ca^{2+} na poziom witamin, natomiast w owocach odmiany półostrej zanotowano wzrost poziomu β -karotenu o około 30% w porównaniu z próbami kontrolnymi [15]. Na temat funkcji jonów wapnia jako stabilizatora procesów biochemicznych, zachodzących podczas przechowywania owoców i warzyw, wykonano niewiele prac. Whitaker i wsp. [16], stosując jony wapnia do stabilizacji pektyn zawartych w jabłkach podczas ich przechowywania, odnotowali, że traktowanie jabłek roztworem CaCl_2 stabilizowało metabolizm tłuszczowy. Podano również, że w zielonych jabłkach traktowanych Ca^{2+} proces rozkładu karotenoidów oraz chlorofili był spowalniany i dzięki temu podczas przechowywania nie zmieniały swojej barwy [16].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu jonów wapniowych (stosowanych dolistnie przez oprysk roślin w fazie 4–5 liści) na zawartość przeciwutleniaczy: α -tokoferolu (witaminy E), β -karotenu (prowitaminy A) i ksantofili w świeżych oraz wysuszonych owocach wybranych odmian papryki słodkiej.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym były owoce papryki słodkiej dwóch odmian: King Arthur i Red Knight, pochodzące z prywatnego gospodarstwa ogrodniczego w Mosznej k. Nałęczowa. Przed wysadzeniem roślin do gruntu, w fazie 4–5 liści, zastosowano jednokrotny oprysk rozsady roztworem CaCl_2 (0,1 M). Próbę kontrolną stanowiły rośliny papryki bez oprysku. Do analiz pobierano owoce w pełni dojrzałe, po 1 kg z każdej odmiany, zarówno z roślin poddanych działaniu Ca^{2+} , jak i kontrolnych. Do analiz chemicznych pobierano tylko część konsumpcyjną owoców – owocnie. Jedną część każdej próby rozdrabniano i przygotowywano odważki do oznaczania tokofero-

li i β -karotenu. Drugą część suszono w temp. 25–30°C w komorze cieplnej z nawiewem, a następnie mielono. Analizy chemiczne wykonywano po 2 miesiącach przechowywania zarówno świeżych próbek w eterze naftowym w temp. 4–6°C, jak i wysuszonych próbek przechowywanych w temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$ w torbach papierowych bez dostępu światła. Termin analiz został wybrany na podstawie wyników badań Daooda i wsp. [3], którzy stwierdzili, że podczas przechowywania wysuszonych owoców papryki przez 2 miesiące, straty β -karotenu wynosiły ok. 30%, a poziom α -tokoferolu obniżył się o ok. 80%, natomiast dłuższe przechowywanie spowodowało gwałtowny spadek prowitamin A, o ponad 80% i całkowite utlenienie α -tokoferolu.

α -Tokoferol analizowano zmodyfikowaną metodą Muller-Muleta [11]. Do analiz pobierano próbki świeżych owoców wielkości 10 g, a wysuszonych 5 g. Frakcje zawierające α -tokoferol i karotenoidy ekstrahowano eterem naftowym zmieszany z acetonem w proporcji 1:1. Po oddzieleniu tkanki roślinnej ekstrakt przenoszono do rozdzielacza. Aceton usuwano wodą, a ekstrakt eterowy po osuszeniu bezwodnym Na_2SO_4 zatężano do sucha w wyparce próżniowej do niewielkiej objętości, a następnie przenoszono do kolbek o pojemności 10 cm^3 (ekstrakt ze świeżych owoców) lub 25 cm^3 (z wysuszonych). Z kolbki miarowej zawierającej ekstrakt pobierano 5 cm^3 próbki i odparowywano do sucha w wyparce próżniowej. Następnie dodawano etanol, roztwór tokoferolu zawierający 0,1 mg wzorca, całość przenoszono do kolbki miarowej, dodawano buforu octanowego (2 cm^3), 0,2% roztworu chlorku żelaza(III) (0,4 cm^3) i 0,5% α, α -dipirydylu (0,4 cm^3) i całość uzupełniano etanolem do 10 cm^3 . Pomiar absorbancji tego roztworu wykonywano po 20 min w spektrofotometrze Shimadzu UV-vis przy $\lambda = 525 \text{ nm}$. Zawartość α -tokoferolu oznaczano na podstawie krzywej wzorcowej. Roztwory wzorcowe przygotowano z roztworu podstawowego zawierającego 1 mg α -tokoferolu w 1 cm^3 etanolu. Do kolbek o pojemności 10 cm^3 pobierano 0; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 i 0,50 cm^3 roztworu wzorcowego, a następnie dodawano odczynniki w tych samych ilościach i kolejności, jak do analizowanych próbek. Wartości absorbancji otrzymanych roztworów wzorcowych mierzono również w tych samych warunkach, jak roztworów otrzymanych z ekstraktów z papryki.

Zawartość karotenoidów oznaczano metodą spektrofotometryczną po rozdzieleniu za pomocą chromatografii kolumnowej [2]. Otrzymane ekstrakty wprowadzano do kolumny wypełnionej $\text{Ca}(\text{OH})_2$. β -karoten wymywano mieszaniną eteru naftowego i acetonu 98:2 (v/v), a ksantofile roztworem w przedziale stężeń od 5 do 20% acetonu w eterze naftowym. Po całkowitym wymyciu karotenoidów z kolumny, otrzymane frakcje przenoszono do kolbek miarowych i dopełniano eterem naftowym do określonej objętości. Poziom β -karotenu (x) oznaczano mierząc wartość absorbancji w spektrofotometrze Shimadzu UV-160A przy $\lambda = 450 \text{ nm}$, a ksantofili przy 470 nm i przeliczając wartości z równania [2]:

$$x = \frac{427,4 \cdot A \cdot V}{m \cdot 1000 \cdot d}$$

gdzie:

A – absorbancja; V – objętość roztworu; m – masa próbki; d – szerokość kuwety; 427,4 – współczynnik roztworu wzorcowego ustalony doświadczalnie.

Wszystkie oznaczenia chemiczne przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Do oceny istotności różnic między wartościami średnimi zastosowano analizę wariancji. Istotność różnic oceniano testem Tuckey'a na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Zmiany zawartości α -tokoferolu oraz β -karotenu w słodkich odmianach papryki, pod wpływem dolistnego oprysku roślin roztworem CaCl_2 oraz procesu suszenia owoców papryki, przedstawiono w tab. 1. i 2.

Zawartość α -tokoferolu była zróżnicowana pod względem odmianowym. Owoce papryki odmiany King Arthur zawierały o ok. 50% mniej tokoferoli niż Red Knight (tab. 1). Zastosowanie oprysku roślin jonami wapniowymi miało korzystny wpływ na poziom α -tokoferolu w świeżych owocach papryki. Stwierdzono, że owoce odmiany Red Knight, roślin poddanych działaniu jonów wapniowych, zawierały o ok. 9% więcej tego składnika niż próby kontrolne. Otrzymane różnice były statystycznie istotne. Zawartość α -tokoferolu w owocach odmiany King Arthur roślin kontrolnych i na które działano Ca^{2+} była na podobnym poziomie. Nie stwierdzono jednak korzystnego wpływu Ca^{2+} na trwałość witaminy E podczas suszenia owoców obu odmian papryki. W czasie tego procesu nastąpił 74–85% spadek zawartości α -tokoferolu, zarówno w roślinach kontrolnych, jak i poddanych działaniu jonów wapniowych.

Znaczny spadek poziomu α -tokoferolu podczas suszenia i przechowywania owoców odnotowano również w innych badaniach [3]. Stwierdzono, że zawartość α -tokoferolu w suszonych owocach papryki zależy od stopnia odwodnienia próbki. Według Daooda i wsp. [3] synteza α -tokoferolu odbywa się również podczas naturalnego suszenia, osiągając maksimum, gdy sucha masa wynosi 53–68%. Podczas dalszego suszenia następuje spadek koncentracji α -tokoferolu jako wynik szybkiej oksydacji. Oznaczony w obecnych badaniach spadek poziomu tokoferoli można tłumaczyć ich oksydacją podczas suszenia (sucha masa badanych prób wynosiła od 77 do 78%) i przechowywania próbek, α -tokoferol działa bowiem jako pierwsza bariera oksydacyjna.

T a b e l a 1

Zawartość α -tokoferolu w świeżych i wysuszonych owocach papryki.
The content of α - tocopherol in fresh and dried pepper fruits.

Odmiana papryki Variety of pepper	Próba Sample	Zawartość suchej masy [%] Dry mass content [%]	Zawartość α -tokoferolu Owoce świeże [mg/100 g św.m.] α -Tokoferol content Fresh fruits [mg/100 g f.m]	Zawartość α -tokoferolu Owoce świeże [mg/100g s.m.] α -Tokoferol content Fresh fruit [mg/100 g d.m.]	Zawartość α -tokoferolu Owoce wysuszone [mg/100 g s.m.] α -Tokoferol content Dried fruits [mg/100 g d.m.]	Zmiany zawartości tokoferoli po procesie suszenia owoców pap- ryki [%] Changes in tocopherol contents after the pepper fruits were dried [%]
King Arthur	O ¹	7,71 ^b ± 0,08	1,05 ^a ± 0,14	13,62 ^a ± 1,04	2,96 ^b ± 0,45	- 78
	Ca ²	8,14 ^c ± 0,01	1,08 ^a ± 0,11	13,27 ^a ± 0,76	1,95 ^a ± 0,07	- 85
Red Knight	O	7,31 ^a ± 0,01	2,35 ^b ± 0,15	32,15 ^b ± 2,15	9,40 ^a ± 0,12	- 70
	Ca	7,50 ^a ± 0,04	2,62 ^b ± 0,41	34,92 ^c ± 1,05	9,07 ^c ± 0,58	- 74

Objaśnienia / Explanations:

1 – rośliny niepryskane roztworem CaCl₂ / plants without the CaCl₂ treatment;

2 – rośliny pryskane roztworem CaCl₂ / plants after the CaCl₂ treatment;

* Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie ($P \leq 0,05$);
Mean values in the same column, which are denoted by the same letter, do not differ statistically significant ($P \leq 0,05$).

Tabela 2

Zawartość β -karotenu w świeżych i wysuszonych owocach papryki.
The content of β -carotene in fresh and dried pepper fruits.

Odmiana papryki Variety of pepper	Próba Sample	Zawartość suchej masy [%] owoców wysuszonych Dry mass content [%] in dried fruits	Zawartość β -karotenu Owoce świeże [mg/100 g św. m.] β -carotene content Fresh fruits [mg/100g f.m.]	Zawartość β -karotenu Owoce świeże [mg/100g s.m.] β -carotene content Fresh fruit [mg/100g d.m.]	Zawartość β -karotenu Owoce wysuszone [mg/100 g s.m.] β -carotene content Dried fruits [mg/100g d.m.]	Zmiany zawartości β -karotenu po procesie suszenia owoców papryki [%] Changes in β -carotene contents after the fruits were dried[%]
King Arthur	O	77,14 ^a ±0,10	0,24 ^a ±0,015	3,16 ^a ±0,53	2,78 ^a ±0,54	- 12
	Ca	77,58 ^a ±0,18	0,28 ^a ±0,086	3,78 ^a ±0,52	3,26 ^b ±0,25	- 14
Red Knight	O	77,65 ^a ±0,43	0,60 ^b ±0,058	6,88 ^b ±1,16	3,74 ^b ±0,54	- 46
	Ca	77,93 ^{ab} ±0,19	0,47 ^b ±0,93	6,27 ^b ±0,56	5,30 ^c ±0,54	- 15

Objaśnienia jak w tab. 1./ Explanations as in Tab. 1

Tabela 3

Zawartość ksantofili w świeżych i wysuszonych owocach papryki.
The content of xanthophylls in fresh and dried pepper fruits.

Odmiana papryki Variety of pepper	Próba Sample	Owoce świeże [mg/100 g św. m.] Fresh fruits [mg/100g f.m.]	Owoce świeże [mg/100g s.m.] Fresh fruits [mg/100g d.m.]	Owoce wysuszone [mg/100 g s.m.] Dried fruits [mg/100g d.m.]	Zmiany zawartości ksantofili po procesie suszenia owoców papryki [%] Changes in the xanthophyll contents after the fruits were dried [%]
King Arthur	O	2,88 ^a ±0,08	37,13 ^a ±0,98	45,40 ^a ±1,63	+22
	Ca	3,48 ^a ±0,71	41,16 ^a ±4,58	53,42 ^a ±5,71	+30
Red Knight	O	4,45 ^b ±0,38	60,97 ^b ±5,07	74,70 ^b ±1,64	+22
	Ca	5,05 ^b ±0,82	67,33 ^b ±10,71	73,40 ^b ±4,20	+9

Objaśnienia jak w tab. 1./ Explanations as in Tab. 1.

Na podstawie wyników zawartości β -karotenu w świeżych i wysuszonych owocach papryki słodkiej (tab. 2) można stwierdzić, że odmiana King Arthur charakteryzowała się ponad dwukrotnie mniejszą zawartością β -karotenu niż odmiana Red Knight, analogicznie jak w przypadku α -tokoferolu.

Zaobserwowano także zróżnicowaną reakcję roślin obu odmian na działanie jonów Ca^{2+} . Po dolistnym stosowaniu CaCl_2 , w owocach odmiany King Arthur odnotowano 20% wzrost poziomu β -karotenu, a w owocach odmiany Red Knight mniej niż 10% zmniejszenie zawartości tego składnika w porównaniu z owocami roślin kontrolnych.

Pod względem strat zawartości β -karotenu, spowodowanych procesem suszenia owoców, odnotowano zróżnicowanie odmianowe papryki kontrolnej – od 12% w owocach odmiany King Arthur do 46% w Red Knight. Zastosowanie oprysku roślin jonami Ca^{2+} miało wpływ na zmniejszenie strat zawartości β -karotenu podczas suszenia owoców Red Knight – z 46 do 15%, a w przypadku King Arthur nastąpiło powiększenie straty tego składnika z 12 do 14%, w stosunku do świeżych owoców roślin kontrolnych (tab. 2).

Wyniki zmian zawartości ksantofili przedstawiono w tab. 3. Wykazano, że proces suszenia wywołał biostymulację syntezy karotenoidów w owocach obu odmian. W owocach odmiany King Arthur i Red Knight zawartość ksantofili zwiększyła się o 22%. Jony wapniowe zastosowane w niniejszych badaniach wywołały stymulację procesu karotenogenezy zachodzącego podczas suszenia owoców odmiany King Arthur, czego efektem był wzrost poziomu ksantofili o ok. 18% w stosunku do roślin kontrolnych. Jednak różnice były statystycznie nieistotne. We wcześniejszych badaniach, nad wpływem procesów suszenia i mielenia na stabilność karotenoidów, wykazano, że w każdym etapie występowały straty zawartości β -karotenu, β -kryptoksantyny i zeaksantyny, podczas gdy poziom anteraksantyny i czerwonych barwników (kapsantyny i kapsorubiny) zwiększał się [10].

Odnutowany w obecnych badaniach wzrost poziomu ksantofili w wysuszonych owocach w stosunku do świeżych, można tłumaczyć syntezą czerwonych barwników karotenoidowych, która odbywa się kosztem ich prekursorów. Proces ten był stymulowany przez jony wapniowe głównie w odmianie King Arthur. Jednak wyjaśnienie roli Ca^{2+} w procesie karotenogenezy wymaga dalszych badań.

Wnioski

1. Proces suszenia owoców spowodował zmniejszenie zawartości α -tokoferolu i β -karotenu w owocach badanych odmian papryki słodkiej oraz wzrost poziomu ksantofili.

2. Jony wapniowe wpłynęły korzystnie na jakość wysuszonych owoców papryki, odnotowano podczas suszenia niższe straty zawartości β -karotenu oraz wzrost poziomu ksantofili w owocach odmiany King Arthur.
3. Dolistne zastosowanie jonów wapniowych, w formie oprysku roślin papryki słodkiej, miało dodatni wpływ na poziom α -tokoferolu w świeżych owocach odmiany Red Knight oraz na zawartość β -karotenu i ksantofili w owocach odmiany King Arthur.

Literatura

- [1] Biacs P.A., Czinkotai B., Hoschke A.: Factors affecting stability of colored substances in paprika powders. J. Agric. Food Chem., 1992, **40**, (3), 363-367.
- [2] Bubicz M.: Occurrence of carotenoids in fruits of the genus Berberis. Bull. Acad. Polon. Sci. ser Sci. Biol., 1965, **13**, 251-255.
- [3] Daood H.G., Vinkler M., Márkus F., Hebshi E.A., Biacs P.A.: Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. Food Chem., 1996, **55**, (4), 365-372.
- [4] Deli J., Matus Z., Szaboles J.: Carotenoid composition in the fruits of black paprika (*Capsicum annum variety longum nigrum*) during ripening. J. Agric. Food Chem., 1992, **40**, 2072-2076.
- [5] Gómez-Landrón de Guevara R., Pardo – Gonzalez J.E.: Evolution of color during the ripening of selected varieties of paprika pepper (*Capsicum annum L.*). J. Agric. Food Chem., 1996, **44**, 2049-2052.
- [6] Horbowicz M.: Zmiany zawartości witaminy C i E w czasie przechowywania suszów i konserw papryki słodkiej. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 1993, **37** (3), 17-19.
- [7] Howard L.R., Talcott S.T., Brenes C.H., Villalon B.: Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum species*) as influenced by maturity. J. Agric. Food Chem., 2000, **48**, 1713-1720.
- [8] Kanner J., Harel S., Mandel H.: Stability of α -tocopherol in fresh and dehydrated pepper fruits (*Capsicum annum*). J. Agric. Food Chem., 1979, **27**, 1316-1318.
- [9] Markus F., Daood H.G., Kapitany J., Biacs P.A.: Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as function of ripening and some technological factors. J. Agric. Food Chem., 1999, **47**, 100-107.
- [10] Minquez-Mosquera M.J., Hornero-Méndez D.: Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (*Capsicum annum*) of the Bola and Agridulce varieties. J. Agric. Food Chem., 1994, **42**, 1555-1560.
- [11] Muller-Mulot M.: A new method for the quantitative determination of added α -tocopherol acetate in feed stuffs. Zeit. Analyt. Chem., 1968, **239**, 378-388.
- [12] Perucka I.: Ethephon – induced changes in accumulation of carotenoids in red pepper fruit (*Capsicum annum L.*). Pol. J. Food Nutr. Sci., 1996, **5/46** (4), 61-68.
- [13] Perucka I.: Joint effect of Ca^{2+} and ethephon on formation of capsaicinoids in fruits of hot pepper *Capsicum annum L.* Agri-Food Quality. Inter. Approach. RSC. Cambridge. UK 1996, pp. 95-99.
- [14] Perucka I.: Zmiany zawartości karotenoidów w owocach papryki odmiany Bronowicka Ostra zachodzące podczas dojrzewania i po zastosowaniu etefonu. Acta Sci. Pol. Technologia Alimentaria, 2004, **3** (1), 85-92.

- [15] Perucka I., Materska M.: Wpływ Ca^{2+} na zawartość witaminy C, prowitaminy A i ksantofili w owocach wybranych odmian papryki ostrej. *Annales UMCS, Sec. E*, 2004, **59**, **4**, 1933-1939.
- [16] Whitaker B.D., Klein J.D., Conway W.S., Sams C.E.: Influence of prestorage heat and calcium treatments on lipid metabolism in „Golden delicious” apples. *Phytochemistry*, 1997, **45**, 465-472.

THE Ca^{2+} TREATMENT AND DRYING PROCESS AND THEIR INFLUENCE ON THE CONTENTS OF α -TOCOPHEROL, β -CAROTENE, AND XANTHOPHYLL IN SWEET PEPPER FRUITS

S u m m a r y

In this study it was determined the impact of both the Ca^{2+} ions (applied on the leaves) and drying process on the content of antioxidant vitamins: tocopherols (vitamin E), β -carotene (pro-vitamin A), and xanthophylls in the fruits of sweet pepper. Two pepper varieties (cultivars) were investigated: King Arthur and Red Knight. During the seedling phase with 4–5 leaves, the leaves were sprayed with a CaCl_2 solution and planted in the soil. The control group were made of plants that were not treated using the CaCl_2 solution. Only the fully ripened fruits were used in the chemical analyses. Extracts were made of pure pericarps after the seed-bearing core was removed. The fractions of α -tocopherol, β -carotene, and xanthophylls were isolated by a chromatographic method, and, then, contents of each component were determined using spectrophotometric methods. On the basis of the investigation results obtained, it was stated that the fruits of the control Red Knight plants had a content of α -tocopherol and β -carotene that was more than twice as high as in the King Arthur variety, and the contents of xanthophylls in Red Knights were by 60% higher if compared with their content in the King Arthur pepper fruits. The drying process, when applied to the pepper, caused a dramatic decrease (70% to 78%) in the concentration of α -tocopherol, while the β -carotene content decreased at a lower rate (from 12% to 46%). On the other hand, the content of Xanthophylls in the two cultivars (King Arthur and Red Arthur) was higher by 22%. While drying the peppers from the treated plants, there was stated no favourable impact of the Ca^{2+} ions on the stability of the α -tocopherol contained in their fruits. With regard to β -carotene, its losses were stated only in the Red Knight fruits, and they decreased from 46% to 15%. When the King Arthur pepper fruits were dried, this process caused the increase in the loss of β -carotene from 12% to 14%. The Ca^{2+} ions favourably influenced the content of xanthophylls in fresh fruits of the two cultivars, and the drying process was conducive to the increase in the content of these components (by 30%) in the King Arthur pepper.

Key words: sweet peppers, drying process, α -tocopherol, β -carotene, xanthophylls, Ca^{2+} ☒

JOANNA TRAFIAŁEK, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, EMILIA FRONC

STOPIEŃ WDROŻENIA SYSTEMÓW ZAPEWNIENIA BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOŚCI W POLSKICH ZAKŁADACH

Streszczenie

W związku z przystąpieniem Polski do UE, w pracy określono wpływ harmonizacji polskiego prawa żywnościowego z unijnym na podjęcie przez zakłady produkcyjne decyzji o wprowadzaniu systemów zapewniających bezpieczeństwo zdrowotne produkcji żywności. Badano stopień wdrożenia systemu HACCP w polskich zakładach produkcyjnych różnych branż i różnej wielkości (małe, średnie, duże). Badania przeprowadzono metodą ankietową na losowo wybranej próbie 150 zakładów produkcyjnych

Obecnie, polskie zakłady produkcyjne nawet w 50% nie są przygotowane do produkcji żywności bezpiecznej o oczekiwanej jakości. Jednak sytuacja jest lepsza niż w roku 2000 i nadal się poprawia. Należy się spodziewać szybkiego wzrostu liczby zakładów, które wdrożą i będą stosować zasady systemu HACCP. Porównując dane z badań przeprowadzonych w latach 2000 i 2003 stwierdzono, że w ciągu trzech lat ponad dwukrotnie wzrosła liczba zakładów mających wdrożony system HACCP oraz takich, które rozpoczynają pracę nad jego wdrożeniem. Przyczyny poprawy to nie tylko wymóg prawny związany z przystąpieniem Polski do UE. To jest także deklarowana przez producentów chęć poprawy jakości i bezpieczeństwa oferowanych produktów, co ma ogromne znaczenie przy pozyskiwaniu nowych kontrahentów zarówno krajowych, jak i europejskich. Zniesienie barier celnych oraz dostęp do wymagającego rynku unijnego, to również istotna przyczyna wdrażania zasad systemu HACCP.

Słowa kluczowe: HACCP, bezpieczeństwo żywności.

Wprowadzenie

Po wejściu Polski do Unii Europejskiej polski rynek żywnościowy stał się integralną częścią rynku Wspólnoty, a polska żywność musi odpowiadać normom prawnym obowiązującym na jej terenie. Aby sprostać unijnym wymaganiom i dostosować polskie prawo żywnościowe do unijnego została uchwalona ustawa z dnia 11 maja 2001 r. *o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia*, z kolejnymi jej nowelizacjami m.in. z dnia 30 października 2003 *o zmianie ustawy o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia oraz niektórych innych ustaw*.

Mgr inż. J. Trafiałek, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, mgr inż. E. Fronc, Zakład Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

W ustawie z dnia 11 maja 2001 r. po raz pierwszy w Polsce zdefiniowano system HACCP, jako postępowanie mające na celu zapewnienie bezpieczeństwa żywności przez identyfikację i oszacowanie skali zagrożeń z punktu widzenia jakości zdrowotnej żywności oraz ryzyka wystąpienia zagrożeń podczas przebiegu wszystkich etapów procesu produkcji i obrotu żywnością [6].

Współczesne regulacje prawne określają wymagania dotyczące zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i jednocześnie zalecają wdrożenie konkretnych rozwiązań systemowych [4]. Są to Dobra Praktyka Produkcyjna (GMP), Dobra Praktyka Higieniczna (GHP) oraz Analiza Zagrożeń i Krytyczny Punkt Kontrolny (HACCP). Zgodnie z nowelizacją ustawy z dnia 30 października 2003 r. obowiązek wdrożenia i stosowania zasad systemu HACCP mają wszystkie zakłady produkujące lub wprowadzające do obrotu żywność, z wyjątkiem producentów na etapie produkcji pierwotnej [7].

Podstawowe pojęcia, zasady i etapy dotyczące systemu HACCP są zawarte w Codex Alimentarius [1]. Poza obligatoryjnym nakazem stosowania zasad systemu HACCP wdrażanie systemów zapewniających bezpieczeństwo produkcji żywności, w tym systemu HACCP, jest ważne ze względu na wzrost oczekiwań odbiorców co do bezpieczeństwa i identyfikacji żywności. Wielu ekspertów jest zdania, że system HACCP w połączeniu z realizacją zasad GMP/GHP jest najskuteczniejszym i najbardziej efektywnym narzędziem zapewnienia wysokiego standardu higieny produkcji i przetwarzania żywności. Bezpieczeństwo i jakość zdrowotna żywności stają się jednym z atrybutów wszystkich produktów spożywczych, a jednocześnie cennym towarem, za który trzeba płacić określoną cenę [2, 5].

W Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, w Zakładzie Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji zostały już po raz drugi przeprowadzone badania nad oceną wpływu zmian obecnego ustawodawstwa na podjęcie przez zakłady przemysłu spożywczego decyzji o wprowadzaniu systemów zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego w produkcji żywności, w tym systemu HACCP. Pierwsze badania przeprowadzono w roku 2000 [3], a obecne w 2003.

Celem niniejszej pracy była ocena stanu przygotowania polskich producentów żywności w aspekcie zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego produkcji żywności w okresie przygotowań Polski do wstąpienia do Unii Europejskiej.

Materiał i metody badań

Przedmiotem badań były zakłady przemysłu spożywczego na terenie Polski. Zakłady spełniały następujące wymagania:

1. Lokalizacja – cała Polska: miasto, wieś,

2. Wielkość zakładu: mały – do 50 pracowników, średni – 50 do 250 pracowników, duży – powyżej 250 pracowników,
3. Różne branże: piekarniczo-cukiernicza, cukrownicza, komponenty spożywcze, mleczarska, mięsna, chłodnicza, zbożowo-młynarska, rybna, ziemniaczana, olejarska, napojów i używek, drobiarska, przetwórstwo owocowo-warzywne.

Zakłady do badań zostały wybrane losowo, wykorzystując katalog „Agrobiznes” w Polsce. W pracy zastosowano badania ankietowe prowadzone w dwóch etapach.

I etap: ankieta telefoniczna przeprowadzona w 232 zakładach przemysłu spożywczego, podczas której uzyskiwano informacje o charakterze produkcji badanego zakładu oraz czy ma wdrożony system HACCP lub jest w trakcie jego wdrażania.

II etap: ankieta przesyłana pocztą, składająca się z 25 pytań, wysłana po uprzednim wyrażeniu zgody na jej wypełnienie przez zakłady mające wdrożony lub będące w trakcie wdrażania systemu HACCP. W ankiecie pisemnej wzięło udział 150 zakładów. Badania przeprowadzono w okresie listopad 2002 – marzec 2003 r.

Wyniki i ich omówienie

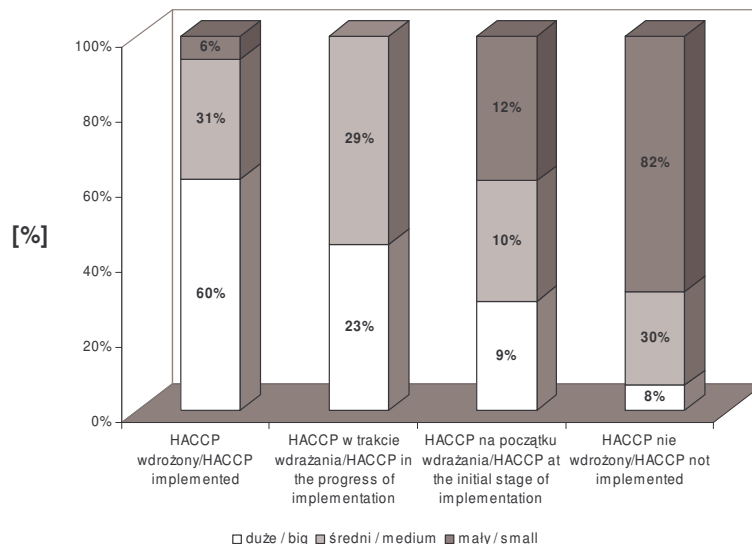
Zaprezentowane w tej pracy wyniki dotyczą okresu badań od listopada 2002 do marca 2003. Na decyzje podejmowane w tym okresie o wdrażaniu i stosowaniu zasad systemu HACCP nie miała jeszcze wpływu najnowsza ustawa z dnia 30 października 2003 r. *o zmianie ustawy o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia oraz niektórych innych ustaw* [7]. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynikało, że 44% zakładów miało już wdrożony system, 24% było w trakcie wdrażania, 10% badanych przedsiębiorstw było na początkowych etapach wprowadzania, natomiast 22% nie wdrażało jeszcze systemu (rys. 1).

Porównując dane z badań wykonanych w latach 2000 i 2003 stwierdzono, że w ciągu trzech lat ponad dwu i półkrotnie wzrosła liczba zakładów, które miały wdrożony system HACCP.

Najwięcej, bo 60% zakładów mających już wdrożony system HACCP było w grupie dużych przedsiębiorstw. System funkcjonował w 31% średnich firm i tylko w 6% małych. Zaawansowanych we wdrażaniu systemu było 29% średnich i 23% dużych przedsiębiorstw. Na początkowych etapach znajdowało się 12% małych, 10% średnich i 9% dużych. System HACCP nie został wdrożony w większości zakładów małych – 82%, w 30% średnich oraz w 8% dużych przedsiębiorstw (rys. 1).

Przy wdrażaniu systemu większość zakładów korzystała z pomocy z zewnątrz, co świadczy o braku wystarczająco kompetentnych osób w danym zakładzie oraz o braku dostatecznej wiedzy na ten temat. Ponad połowa badanych zakładów korzystała z pomocy instytucji bądź konsultanta przy wdrażaniu systemu HACCP. Była to najczęściej pomoc uczelni rolniczych (Olsztyn, Lublin, Kraków), Instytutu

Weterynaryjnego w Puławach, PCBC, Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego w Warszawie oraz różnych firm konsultingowych.

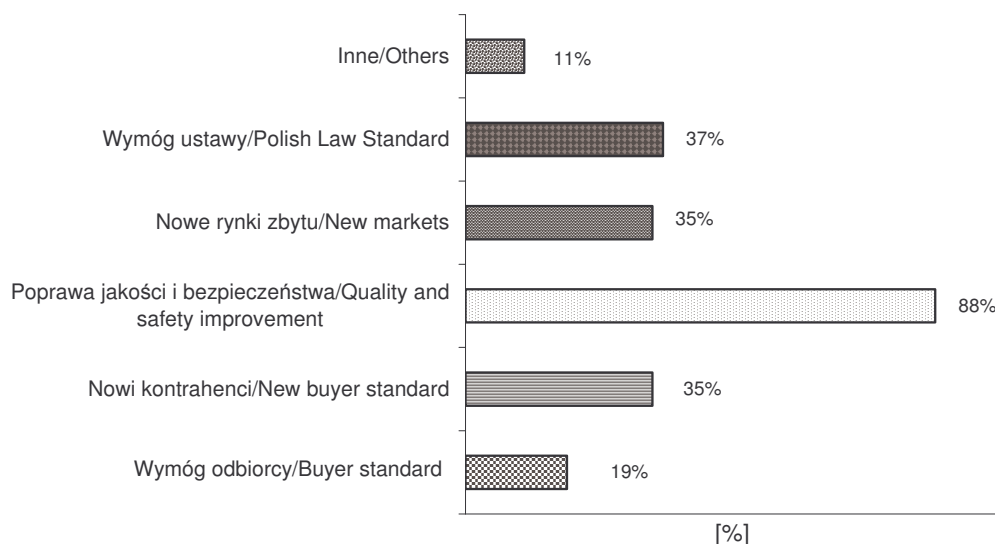


Rys. 1. Stopień wdrożenia systemu HACCP w zależności od wielkości zakładu.

Fig. 1. The progress in implementing the HACCP system depending on the plant size.

Wdrożenie systemu HACCP w zakładach produkcyjnych, przetwarzających i serwujących żywność powinno być poprzedzone wprowadzeniem zasad zarówno Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GHP), jak i Zasad Dobrej Praktyki Higienicznej (GHP), co pozwoliłoby na uporządkowanie wszystkich spraw związanych z higienizacją zakładu i przestrzeganiem podstawowych, uznanych zasad produkcji [2, 7]. Zbadano również, czy zakłady miały wdrożone zasady GMP/GHP. Stwierdzono, że 67% badanych zakładów wdrożyło zasady GMP/GHP, 13% wdrażało je równoległe z systemem HACCP, natomiast 20% nie miało jeszcze wprowadzonych zasad GMP/GHP.

Główną przyczyną wdrażania systemu HACCP była chęć poprawy jakości i bezpieczeństwa oferowanych produktów (88% odpowiedzi) (rys. 3). Spełnienie wymogów ustawy z dnia 11 maja 2001 r. i jej nowelizacji było powodem wdrożenia systemu w przypadku 37% badanych przedsiębiorstw, a w przypadku 35% przyczynę stanowiła chęć pozyskania nowych kontrahentów i nowych rynków zbytu; 19% zakładów zadeklarowało, że był to podstawowy wymóg stawiany przez głównego odbiorcę (rys. 2). Porównując wyniki badań z 2000 i 2003 r. należy zaznaczyć, że nadal główną przyczyną wdrażania systemu HACCP była chęć poprawy jakości i bezpieczeństwa oferowanych wyrobów.



Rys. 2. Główne przyczyny wdrożenia systemu HACCP.

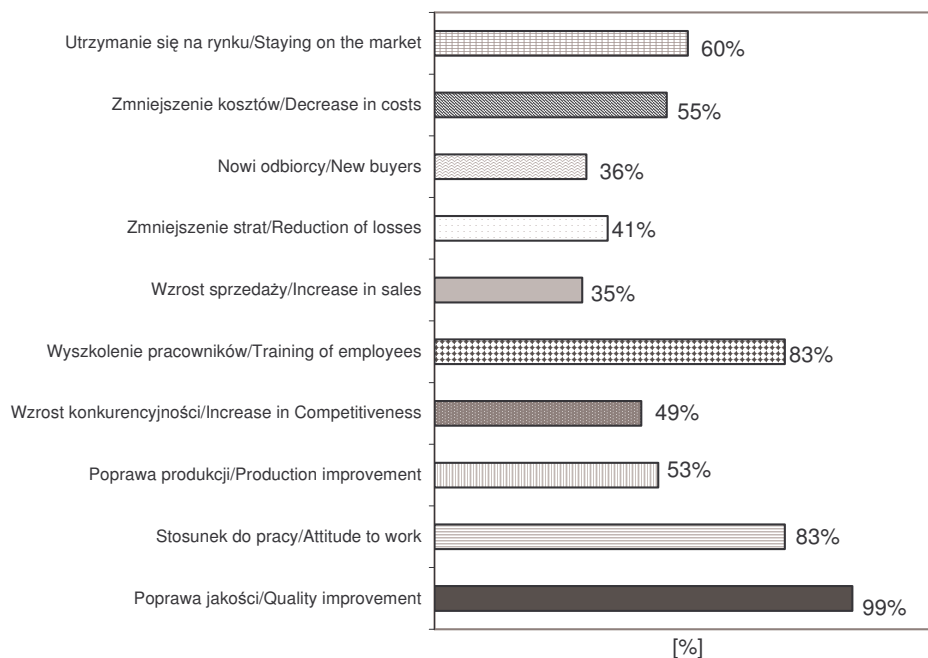
Fig. 2. Principal grounds for implementing the HACCP system.

Dane przedstawione na rys. 2. nie sumują się do 100%, gdyż respondent mógł udzielić więcej niż jednej odpowiedzi.

Główną korzyścią, jaką osiągnęły wszystkie zakłady bądź też zamierzały osiągnąć (rys. 3), była poprawa jakości, w tym bezpieczeństwa wytwarzanych produktów – 99%. W przypadku 83% respondentów ważna była zmiana stosunku pracowników do wykonywanej pracy, wzrost odpowiedzialności za wykonywane czynności oraz lepsze wykształcenie pracowników. Istotne okazało się także utrzymanie na rynku w związku z wejściem Polski do Unii Europejskiej i zmiana obowiązującego prawa (60% odpowiedzi). Korzyści z poprawy i unowocześnienia procesu produkcyjnego oraz zmniejszenie kosztów ponoszonych w wyniku wadliwości tego procesu były ważne dla 54% ankietowanych. W przypadku 49% był to wzrost konkurencyjności wyrobu na rynku krajowym i zagranicznym, a dla 41% zmniejszenie strat wynikających z niedostosowania wyrobu do wymagań klientów. Pojawienie się nowych odbiorców i zwiększenie sprzedaży oferowanych wyrobów było korzystne dla 36% zakładów. Wymieniane korzyści świadczą o tym, że producenci byli świadomi konieczności wdrażania systemu, oczekiwali pozytywnych jego skutków i doceniali je.

Najistotniejszą korzyścią ekonomiczną była możliwość konkurowania z produktami pochodzącymi z Unii Europejskiej, a także mniejsza liczba reklamacji i chęć konkurowania polskich zakładów z zakładami unijnymi. Świadczy to o uzyskiwaniu porównywalnej jakości polskich produktów z wyrobami unijnymi. Jeszcze trzy lata temu polscy producenci nie aspirowali do konkurowania na rynku

Wspólnoty i zadowalali się wyłącznie spadkiem reklamacji po wdrożeniu systemu HACCP. Podobnie jak poprzednio, większość zakładów uskarżała się na wzrost biurokracji po wprowadzeniu systemu oraz na problem ze zmianą mentalności pracowników w zrozumieniu istoty systemu zapewnienia jakości.



Rys. 3. Korzyści osiągnięte po wdrożeniu HACCP.

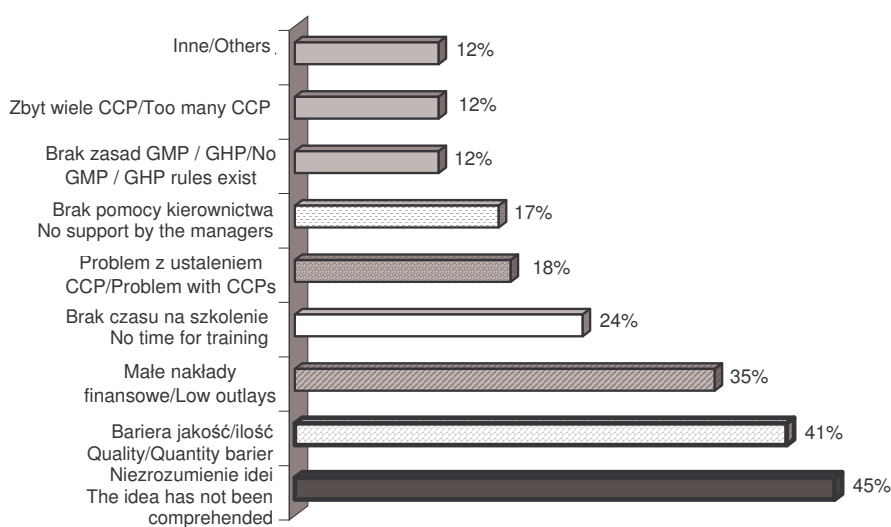
Fig. 3. Advantages gained upon the HACCP implementation.

Dane przedstawione na rys. 3 nie sumują się do 100%, gdyż respondent mógł udzielić więcej niż jednej odpowiedzi.

Oczekując, że system HACCP rzeczywiście przyczyni się do odnoszenia sukcesów, podczas jego wdrażania zaobserwowano wiele trudności. Podstawowym problemem 45% zakładów okazało się niezrozumienie idei i zagadnień systemu HACCP, a dla 41% zakładów były to trudności w przełamaniu bariery ilość/jakość, panującej wśród szeregowych pracowników. Dużą przeszkodą były zbyt małe nakłady finansowe przeznaczone na wdrożenie systemu (35% odpowiedzi), a równie istotny był brak czasu na organizowanie niezbędnych szkoleń dla pracowników i brak zaangażowania ze strony najwyższego kierownictwa oraz określenie faktycznych zagrożeń (rys. 4).

Identyfikacja zagrożeń sprawiała wiele trudności. Trudności pojawiające się przy identyfikacji zagrożeń nie zmieniły się w porównaniu z badaniami z 2000 r. Nadal

występował problem odróżnienia Krytycznych Punktów Kontrolnych (ang. Critical Control Point – CCP) oraz Punktów Kontrolnych (ang. Control Point – CP), co świadczy o niedostatecznej wiedzy na ten temat. Można nawet stwierdzić, że w niektórych zakładach błędnie zrozumiano definicję CCP. Nieodpowiednie ustalenie CCP mogło mieć związek z brakiem odpowiednich kwalifikacji u osób odpowiedzialnych za wdrażanie systemu HACCP. Natomiast konsultowanie problemów z osobami bardziej kompetentnymi wiązało się z dodatkowym kosztem dla zakładu.



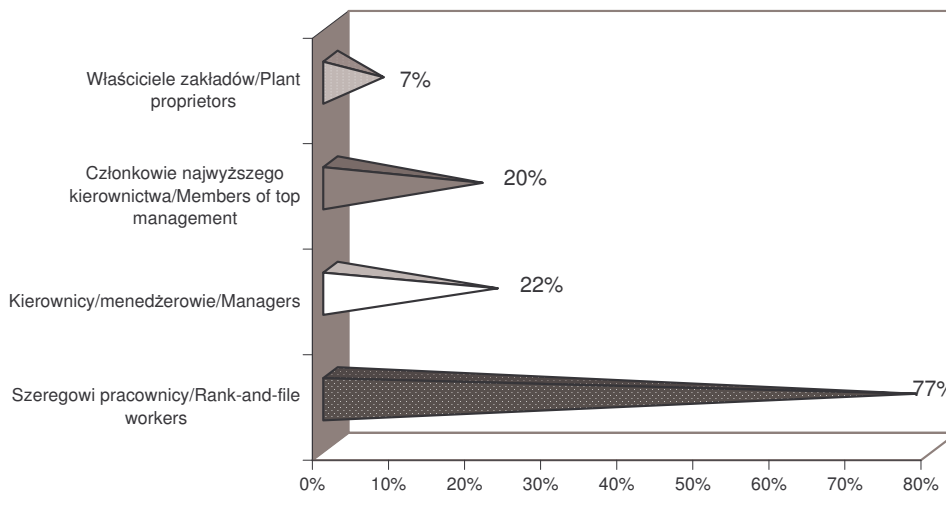
Rys. 4. Problemy zaistniałe przy wdrażaniu systemu HACCP.

Fig. 4. Problems appearing while implementing the HACCP system.

Dane przedstawione na rys. 4 nie sumują się do 100%, gdyż respondent mógł udzielić więcej niż jednej odpowiedzi.

Największe problemy ze zrozumieniem istoty systemu HACCP mieli pracownicy produkcyjni – w 77% zakładów. Dużo mniej trudności mieli kierownicy bądź menedżerowie bezpośrednio nadzorujący produkcję (22%) oraz członkowie najwyższego kierownictwa (20%). Zrozumienie zagadnień związanych z wdrożeniem systemu HACCP okazało się najmniej kłopotliwe dla właścicieli zakładów – 7%. (rys. 5).

Badania z 2000 r. wykazały, że trudności ze zrozumieniem zasad systemu mieli pracownicy produkcyjni, ale także w większym stopniu członkowie najwyższego kierownictwa, a mniej kierownicy i menedżerowie.



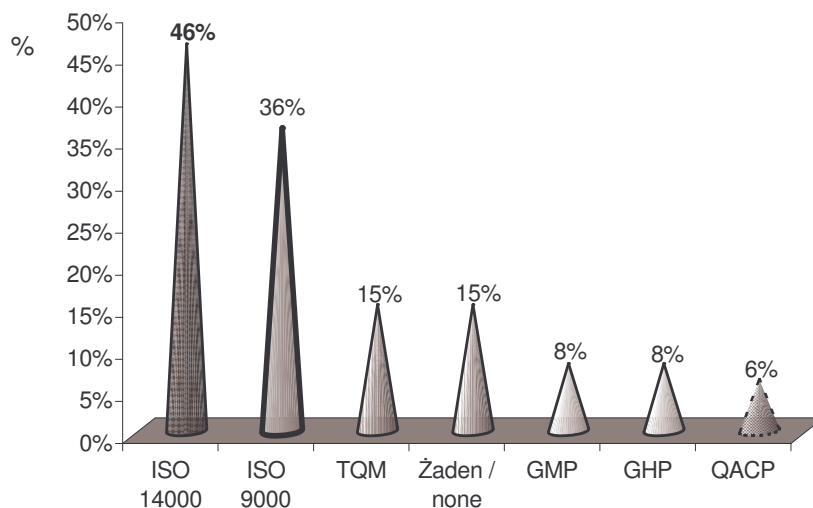
Rys. 5. Udział pracowników mających problemy ze zrozumieniem idei systemu HACCP [%].

Fig 5. Percentage of employees having problems with understanding the idea of the HACCP system.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, weryfikacja systemu odbywała się zgodnie z zasadami. Najczęściej była przeprowadzana po wprowadzeniu zmian (71% odpowiedzi), w razie zaistniałych problemów (61% odpowiedzi), po wdrożeniu systemu (29%), oraz w innych przypadkach (27%). Nie można porównać, czy w 2000 r. weryfikacja odbywała się w podobnych przypadkach, gdyż badania nie dotyczyły tego zagadnienia.

Przedsiębiorstwa w coraz większym stopniu podnosiły efektywność działania zakładu przez wdrażanie innych programów - systemów zapewnienia jakości lub zarządzania jakością. Najwięcej, bo aż 46% badanych zakładów zamierzało wprowadzić system zarządzania środowiskiem zgodny z normami ISO serii 14000, a 36% system zarządzania jakością zgodny z normami ISO serii 9000. Zasady GMP i GHP miały być wdrożone w 16% przedsiębiorstw (rys. 6).

Zaobserwowano, że najczęściej identyfikowane Krytyczne Punkty Kontrolne w 2000 r. nie stanowiły w roku 2003 pierwszoplanowych zagrożeń. Z badań wynika, że CCP wymienianym najczęściej w 2003 r. był proces pasteryzacji i sterylizacji – po 20% (w 2000 r.: pasteryzacja 32%, sterylizacja 8%). W 11% zakładów tym punktem było przyjęcie surowca (w 2000 r. – 34%) oraz pojawiające się w produktach substancje i ciała obce – 11% (było 24%). Dość często wymieniane CCP to obróbka termiczna – 7,5%, pakowanie – 6%, magazynowanie – 6%, a także detekcja – 5%. W niewielkim stopniu wskazywane CCP to chłodzenie, mrożenie, mycie i dezynfekcja, po 2% (było 5%) (tab. 1).



Rys. 6. Systemy, które będą wdrażane oprócz systemu HACCP.

Fig. 6. Other than HACCP systems planned to be implemented.

Tabela 1

Przykładowe Krytyczne Punkty Kontrolne wyznaczone w badanych zakładach.

Some examples of CCPs that are determined in the investigated plants.

Rodzaj CCP/ Kind of CCP	Rok 2000 [% zakładów] Year 2000 [% of plants]	Rok 2003 [% zakładów] Year 2003 [% of plants]
Przyjęcie surowca / Receiving raw materials	34	11
Pasteryzacja / Pasteurization	32	20
Magazynowanie gotowych produktów / Storing final products	26	6
Substancje obce / Foreign bodies	24	11
Chłodzenie / Cooling	18	3,5
Mrożenie / Freezing	18	2
Pakowanie gotowych produktów / Packing final products	18	6
Sterylizacja / Sterilization	8	20
Obróbka surowca / Processing raw materials	7	-
Dezynfekcja i mycie / Disinfection and washing	5	2
Woda / Water	3	-
Dozowanie substancji dodatkowych / Dosing additional substances	1	-
Obróbka termiczna / Thermal processing	-	7,5
Detekcja / Detection	-	5
Pozostałości środków myjących / Residues of washing agents	-	2
Inne: np. przyprawy, magnesy, transport / Other, e.g.: seasoning, magnets, transport, etc.	-	24

Wnioski

1. W ciągu trzech lat liczba zakładów mających wdrożony system HACCP zwiększyła się z 17% do 44%.
2. Stwierdzono, że w zakładach, w których był wdrożony system HACCP, działał on zgodnie z zasadami i był skuteczny.
3. W porównaniu z wynikami badań z 2000 r. stwierdzono istotne dążenie polskich producentów do zapewnienia jakości i bezpieczeństwa produkcji żywności. Wdrożenie systemu HACCP to dla producentów żywności dodatkowy atut utrzymania się na rynku i możliwość osiągnięcia korzyści ekonomicznych.
4. Główną korzyścią ekonomiczną, po wdrożeniu systemu HACCP, było zmniejszenie liczby reklamacji (podobnie, jak w badaniach z roku 2000) oraz dodatkowo możliwość konkurowania produktów krajowych z produktami pochodzącymi z UE.
5. Przedsiębiorstwa w coraz większym stopniu podnoszą efektywność działania przez wdrażanie innych programów/systemów, głównie zasad GMP/GHP, Systemu Zarządzania Jakością zgodnego z normami ISO serii 9000, a także Systemu Zarządzania Środowiskiem zgodnego z normami ISO serii 14000.

Literatura

- [1] Codex Alimentarius, Food Hygiene Basic Texts, FAO, WHO, Rzym 2001.
- [2] Kołożyn-Krajewska D. (red): Higiena produkcji żywności, Wyd. SGGW, Warszawa 2003.
- [3] Korzyńska A., Kołożyn-Krajewska D.: Zaawansowanie polskich producentów żywności we wdrażaniu systemu HACCP. Przem. Spoż., 2001, **5**, 12-14.
- [4] Sikora T.: Zapewnienie jakości na początku XXI wieku. W: Jakość żywności a rolnictwo ekologiczne. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2002.
- [5] Turlejska H., Pelzner U.: Wdrażanie systemu HACCP w małych i średnich przedsiębiorstwach sektora żywnościowego. Poradnik dla kierujących zakładem. FAPA, Warszawa 2003.
- [6] Ustawa o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia z dnia 11 maja 2001. Dz. U. 2001 Nr 63. poz. 634 i późn. zm.
- [7] Ustawa o zmianie ustawy o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia oraz niektórych innych ustaw z dnia 30 października 2003. Dz. U. 2003 Nr 208. poz. 2020.

THE PROGRESS MADE IN IMPLEMENTING FOOD SAFETY SYSTEMS IN POLISH PLANTS

S u m m a r y

When Poland acceded to the European Union, the Polish food legislation had to be matched up with the legal regulations of EU. In this paper, the authors attempt to determine the impact of harmonizing the food regulations on the decisions to be made by Polish food plants whether or not to implement systems that ensure health safety of food manufactured by them. The authors investigated and evaluated the

progress made in implementing the HACCP system in the Polish food manufacturing plants. The plants under investigation and evaluation were from various food branches and of different sizes (big, medium, and small ones). A random sample of 150 production plants was surveyed by polling.

Right now, the Polish food manufacturing plants are poorly prepared to manufacture health safe and quality food, and the preparation level is assessed as below 50%. However, the present situation is better than in the year 2000, and it continuously improves. A quick increase can be expected in the number of plants implementing and applying the principles of the HACCP system. The data obtained from the surveys in 2000 and 2003 show that, now, the number of food manufacturing plants with the HACCP system implemented plus plants starting to implement this system is twice as big as it was in 2000. This improvement results not only from the EU access. The food manufacturers declare their motivation and readiness to improve quality and health safety of the products they offer, and this fact is of the highest importance when winning new customers and business partners, both in Poland and in EU. Other vital reasons why the HACCP system is implemented are: lifting the customs barriers and a better and easier access to the highly demanding EU market.

Key words: HACCP system, food safety. ☒