

ŻYWNOŚĆ

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 1 (42)

Kraków 2005

Rok 12

SPIS TREŚCI

Od Redakcji.....	3
MARZENA NOWAK: Rola kalpain w procesie kruszenia mięsa	5
ANNA KACZMAREK, JAN ZABIELSKI, PIOTR ZIELONKA: Szacowanie wpływu warunków wędzenia surowych wyrobów mięsnych na możliwość wzrostu <i>Listeria monocytogenes</i> i <i>Escherichia coli</i> O157:H7	18
KRZYSZTOF PUDYSZAK, JANUSZ POMIANOWSKI, TERESA MAJEWSKA: Wartość rzeźna i jakość mięsa perlic ubijanych w różnym wieku	27
GRAŻYNA LEWANDOWICZ, KRYSZYNA PROCHASKA, WŁODZIMIERZ GRAJEK, WOJCIECH KRZYŻANIAK, ANGELIKA MAJCHRZAK, TADEUSZ CIAPA: Właściwości użytkowe maltodekstryn w układach emulsyjnych.....	35
WOJCIECH KRZYŻANIAK, TOMASZ JANKOWSKI, WŁODZIMIERZ GRAJEK: Optymalizacja parametrów hydrolizy enzymatycznej skrobi ziemniaczanej połączonej z procesem ekstruzji	48
GRAŻYNA GOŁUBOWSKA, GRAŻYNA LISIŃSKA: Zmiany tekstury i zawartości związków pektynowych w ziemniakach podczas produkcji frytek.....	63
GRAŻYNA CICHOSZ, JERZY SZPENDOWSKI, MAŁGORZATA KOSEK: Przydatność technologiczna zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych w zależności od warunków propagacji	71
KATARZYNA CZACZYK, ANNA OLEJNIK, PATRYK MIĘŻAŁ, WŁODZIMIERZ GRAJEK: Poszukiwanie prostych modeli do badania adhezji bakterii probiotycznych	84
ELŻBIETA DŁUŻEWSKA, KAMILA LICHOCKA: Wpływ wybranych aromatów i emulgatorów na stabilność emulsji napojowych.....	97
WIESŁAW WZOREK, SYLWIA BONIN, ARKADIUSZ BASIAK: Próba zastosowania chitozanu w formie rozpuszczonej do stabilizacji win.....	108
PIOTR ZAPOTOCZNY, MAGDALENA ZIELIŃSKA: Rozważania nad metodyką instrumentalnego pomiaru barwy marchwi.....	121
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie krajowym.....	133
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA, KATARZYNA MARCINIAK-DARMOCHWAŁ: Współczesny leksykon wiedzy o żywności	141
STANISŁAW POPEK: Nowe książki	143
Technolog Żywności.....	148

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 1 (42)

Kraków 2005

Vol. 12

CONTENTS

From the Editor.....	3
MARZENA NOWAK: The role of calpains in the meat tenderization process.....	5
ANNA KACZMAREK, JAN ZABIELSKI, PIOTR ZIELONKA: Predicting the effect of smoking conditions on the growth of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in raw meat products.....	18
KRZYSZTOF PUDYSZAK, JANUSZ POMIANOWSKI, TERESA MAJEWSKA: Slaughter value and meat quality of guinea fowls slaughtered at a different age	27
GRAŻYNA LEWANDOWICZ, KRYSZYNA PROCHASKA, WŁODZIMIERZ GRAJEK, WOJCIECH KRZYŻANIAK, ANGELIKA MAJCHRZAK, TADEUSZ CIAPA: functional properties of maltodextrines in emulsion systems	35
WOJCIECH KRZYŻANIAK, TOMASZ JANKOWSKI, WŁODZIMIERZ GRAJEK: Optimization of the enzymatic hydrolysis of potato starch combined with extrusion.....	48
GRAŻYNA GOŁUBOWSKA, GRAŻYNA LISIŃSKA: Changes in the content of pectic substances and in texture of potatoes during the production of french fries	63
GRAŻYNA CICHOSZ, JERZY SZPENDOWSKI, MAŁGORZATA KOSEK: The technological usefulness of mesophilic lactic streptococci starters depending on the propagation conditions	71
KATARZYNA CZACZYK, ANNA OLEJNIK, PATRYK MIĘŻAŁ, WŁODZIMIERZ GRAJEK: searching for simple models to study the adhesion of probiotic bacteria	84
ELŻBIETA DŁUŻEWSKA, KAMILA LICHOCKA: Effect of selected flavours and emulsifiers on stability of beverage emulsions	97
WIESŁAW WZOREK, SYLWIA BONIN, ARKADIUSZ BASIAK: An attempt to apply chitosan in a dissolved form to stabilize wines.....	108
PIOTR ZAPOTOCZNY, MAGDALENA ZIELIŃSKA: Discussion about a measurement of colour of carrot	121
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish legislation	133
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA, KATARZYNA MARCINIAK-DARMOCHWAŁ: Food science lexicon – contemporary terms	141
STANISŁAW POPEK: Book reviews.....	149
The Food Technologist.....	148

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 Barylko-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 Naczek (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 2005

Printed in Poland

Wydawanie publikacji dofinansowane przez Komitet Badań Naukowych

ISSN 1425-6959
ISBN 83-89541-37-8

ADRES REDAKCJI:

31-425 KRAKÓW, AL. 29 LISTOPADA 46

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 83-89541-37-8

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

MARZENA NOWAK

ROLA KALPAIN W PROCESIE KRUSZENIA MIĘSA

Streszczenie

Kruchość mięsa oraz czynniki na nią wpływające od dawna są przedmiotem badań. Istnieje kilka teorii wyjaśniających proces kruszenia mięsa. Za najbardziej prawdopodobną uznana została kalpainowa teoria tenderyzacji. Kalpainsy spełniają podstawowe kryteria stawiane czynnikom wpływającym na proces kruszenia mięsa. Enzymy te są obecne w komórce mięśniowej, a w doświadczeniach przeprowadzanych *in vitro* prowadzą do tych samych produktów degradacji białek, jakie wykrywane są w mięsie po okresie dojrzewania. Mają one dostęp do miofibryli w komórce. Aktywność kalpain oraz stosunek aktywności kalpainsy do aktywności kalpastatyny są skorelowane z twardością mięsa. Im wyższa jest aktywność kalpain i im wyższy stosunek kalpaina/kalpastatyna, tym bardziej kruche mięso otrzymuje się. Warunki w jakich enzymy te wykazują aktywność są zbliżone do warunków panujących w tkance mięśniowej po śmierci zwierzęcia. Na aktywność kalpain w mięsie działają zarówno czynniki przyżyciowe, w tym genetyczne, jak i pośmiertne.

Mimo, że mechanizm działania kalpain nie jest całkowicie wyjaśniony, na podstawie wyników licznych doświadczeń można stwierdzić, że kalpainsy pełnią ważną rolę w procesie tenderyzacji mięsa.

W artykule scharakteryzowano kalpainsy i opisano niektóre z czynników wpływających na ich aktywność.

Słowa kluczowe: kalpainsy, kruszenie mięsa (tenderyzacja).

Wprowadzenie

Większość konsumentów uważa kruchość za najważniejszą cechę jakościową mięsa. Jednak wyprodukowanie mięsa kruchego, o określonym standardzie, jest bardzo trudne ze względu na niewyjaśniony dotąd mechanizm jego kruszenia [30]. Konieczne jest więc zrozumienie tego mechanizmu, aby można było sterować procesem kruszenia [29].

Istnieje duże zróżnicowanie jakości mięsa zarówno pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt, jak i w obrębie tego samego gatunku. Jakość mięsa jest zależna także od warunków środowiska i od płci zwierzęcia [33].

W celu poprawy kruchości konieczne jest przechowywanie mięsa *post mortem* przez okres od kilkunastu godzin do kilku tygodni w temperaturze 3–5°C. Taki okres nazywany jest dojrzewaniem. Podczas dojrzewania zachodzi proces tenderyzacji, który zależy od warunków chłodzenia, rodzaju mięśnia oraz gatunku zwierzęcia. Prawdopodobnie różnice te są spowodowane działalnością kalpain w mięsie. Mogą być także wynikiem stopnia zeszywnienia mięśnia po śmierci zwierzęcia, które przebiega znacznie szybciej w mięsie drobiowym niż w wołowinie [43]. Czas dojrzewania wołowiny wynosi 2–4 tygodni, wieprzowiny 6–10 dni, a drobiu 0,5–1 dnia [46, 55].

Teorie dotyczące procesu kruszenia mięsa

Obecnie istnieją dwie główne teorie dotyczące procesu tenderyzacji mięsa. Jedną z nich jest „wapniowa teoria tenderyzacji” proponowana przez Takahashiego [55]. Według tej teorii jony wapnia bezpośrednio działające na włókna mięśniowe przyczyniają się do kruszenia mięsa podczas dojrzewania poubojowego. Osłabienie linii Z następuje w wyniku odłączania się fosfolipidów pod wpływem przyłączających się do nich jonów wapnia. Rozpuszczalność fosfolipidów zmienia się pod wpływem tych jonów. Według teorii Takahashiego [55] rozpad titiny zachodzi nawet wtedy, gdy w roztworze znajdują się jednocześnie jony wapnia i inhibitory proteaz. Niezbędna ilość wapnia w komórce, konieczna do spowodowania widocznych zmian w kruchości mięsa, wynosi 0,1 mM. Zmiany te nie są zależne od pH mięśnia, ani od temperatury [53]. Jednak wielu naukowców twierdzi, że za proces kruszenia mięsa odpowiedzialny jest, zależny od stężenia jonów wapnia, system kalpainowy [7, 29, 42]. Kalpains uznano za jeden z możliwych czynników przyczyniających się do kruszenia mięsa, ponieważ: są umieszczone w obrębie komórek tkanki mięśniowej, mają dostęp do substratu, mają zdolność hydrolizowania białek degradowanych podczas dojrzewania mięsa *post mortem*. Przeprowadzono wiele badań, które dowiodły, że kalpainowy system proteolityczny jest odpowiedzialny za proces tenderyzacji. Niektóre z dowodów to: przyspieszenie proteolizy *post mortem* po inkubacji kawałków mięśnia w roztworze jonów wapnia i zatrzymanie proteolizy po inkubacji z chelatorami jonów wapnia [28], blokowanie proteolizy i tenderyzacji mięsa po wstrzyknięciu chlorku cynku, potencjalnego inhibitora kalpain [58].

Do niedawna istniała teoria, że do tenderyzacji mogą przyczyniać się również katepsyny – proteolityczne enzymy lizosomalne. Powodem odrzucenia tej teorii jest fakt, że mają one możliwość rozkładu miozyny, aktyny i α -aktyniny [59], podczas gdy w czasie normalnego dojrzewania mięsa niewielka ilość tych białek jest degradowana [42]. Ponadto, są one umieszczone w lizosomach i nie ma dowodu na to, że po śmierci zwierzęcia następuje ich uwolnienie [30]. Innym systemem funkcjonującym w komórce jest multikatalityczny kompleks proteolityczny (MCP). Jednak kompleks ten działa na białka, które nie są rozkładane podczas procesu dojrzewania. Dlatego też enzymów tego kompleksu nie uznano za przyczyniających się do tenderyzacji mięsa [30].

Charakterystyka kalpain

Kalpainy (E C 3.4.22.17) są wewnątrzkomórkowymi, aktywowanymi przez jony wapnia neutralnymi proteinazami i zaklasyfikowane zostały do grupy cysteinowych endopeptydaz. Znajdują się one we wszystkich komórkach kręgowców; w mięśniach występują w cytoplazmie [8]. Głównymi komponentami systemu kalpainowego są: μ -kalpaina, m-kalpaina, μ /m kalpaina oraz ich specyficzny inhibitor kalpastatyna. Kalpastatyna hamuje tylko aktywność kalpain, nie działa na inne proteazy cysteinowe. Może ona występować w kilku różnych izoformach, które mają jedną, trzy lub cztery domeny i różne N-terminalne sekwencje [15]. Jest to białko o masie cząsteczkowej $60 \cdot 10^3$ - $70 \cdot 10^3$ Da. Ma ona cztery miejsca inhibitorowe o powtarzającej się strukturze 130-aminokwasowej. Wiąże się ona z kalpainą w obecności jonów wapnia. Kalpastatyna jest również substratem kalpainskiej. Powstające w wyniku hydrolizy peptydy mają nadal zdolność hamowania aktywności kalpainskiej [22]. Istnieje także tzw. kalpaina 3 (p94), która przez długi czas nie mogła być analizowana ze względu na szybką autolizę w warunkach *in vitro*, a także dlatego, że jest związana z titiną, która prawdopodobnie reguluje jej aktywność [48]. Opinie dotyczące roli kalpainskiej p94 w procesie tenderyzacji nie są jednoznaczne. Parr i wsp. [40] nie zauważyli wpływu kalpainskiej p94 na kruchość mięsa. Natomiast Illian i wsp. [21] stwierdzili wyraźny związek pomiędzy zawartością kalpainskiej 3 a względną szybkością tenderyzacji. Stwierdzili oni ważną rolę μ -kalpainskiej i kalpainskiej 3 w procesie tenderyzacji mięsa.

Odkryto także inne specyficzne kalpainskie tkankowe (nCl-2, n-Cl-3, n-Cl-4...) i nietypowe, jak: kalpainskie 5, 6, 10. Prawdopodobnie istnieje jeszcze wiele innych niewyzolowanych dotychczas kalpain [15, 35, 49, 51]. Nietypowe kalpainskie odkryto głównie w takich organizmach, jak: insekty, drożdże, grzyby. Ich nietypowość polega na tym, że mają one domenę o masie około $30 \cdot 10^3$ Da, podobną bardziej do dużej podjednostki kalpain ssaków niż do proteinaz, takich jak papaina czy katepsyny, a pozostałe domeny są prawdopodobnie odpowiedzialne za specyficzne funkcje, jakie mogą spełniać [49]. Najnowszym odkryciem jest kalpaina C, która została wyodrębniona podczas badań *Drosophila melanogaster* i która prawdopodobnie jest nieaktywna katalitycznie [50].

Najbardziej znanymi i najczęściej badanymi są μ - i m-kalpaina. Nazwy μ - i m-kalpainskie pochodzą od stężenia jonów wapnia wymaganego do ich aktywacji; μ -kalpaina wymaga 3–50 μ M, a m-kalpaina 0,4–0,8 mM wapnia do osiągnięcia połowy aktywności maksymalnej. Stężenie jonów wapnia w żywym mięśniach wynosi 0,2 μ M [32] i jest to poziom dużo niższy niż ten wymagany do aktywacji μ -kalpain. Jednak po uboju stężenie wolnego wapnia w komórce zwiększa się i wynosi 100 μ M [24]. W celu zapoczątkowania procesu autolizy *in vitro* (czyli do uaktywnienia) konieczne jest stężenie jonów wapnia wynoszące 100 μ M, ale poziom ten zmniejsza obecność fosfolipidów lub membran plazmowych [6]. Hopkins i Thompson [17] wykazali, że

stężenie jonów wapnia po uboju, w momencie osiągnięcia pH 5,5, w owczych mięśniach *m. longissimus lumborum* i *m. longissimus thoracis* wynosiło 110 μM , co jest wartością wystarczającą do aktywacji μ -kalpajny.

Obie kalpajny (μ - i m-kalpajna) zostały oczyszczone i wyodrębnione z wielu źródeł, chociaż żadna nie została wykryta. Są to heterodimery składające się z dużej podjednostki ($80 \cdot 10^3$ Da, jednostka regulacyjna) i małej podjednostki ($30 \cdot 10^3$ Da). Duża podjednostka μ -kalpajny jest w 50% homologiczna z dużą podjednostką m-kalpajny, natomiast małe podjednostki są identyczne u obu kalpajny [8, 27]. Podjednostka μ - i m-kalpajny o wielkości $80 \cdot 10^3$ Da może być podzielona na cztery domeny. Domena I jest krótkim fragmentem wprowadzającym i działa jako inhibitor aktywności proteolitycznej. Domena II reprezentuje odległą, podobną do papajny część typową dla proteinaz cysteinowych. Domena III nie jest homologiczna z żadnym innym białkiem. Analiza strukturalna wskazuje, że domena III fizycznie asocjuje się z domeną II. Domena IV wiąże jony wapnia i została wyodrębniona jako rozpoznająca substrat, ma ona charakterystyczny motyw strukturalny, powtórzony czterokrotnie a nazywany „EF-hands”. Pary motywów strukturalnych „EF-hands” tworzą globularne domeny, które mają wspólny hydrofobowy rdzeń, a które są połączone długim odcinkiem α -helikalnym. Mała podjednostka składa się z domen V i VI. Domena V zawiera dużą liczbę reszt glicynowych i reszt aminokwasów hydrofobowych. Domena VI jest homologiczna z domeną IV, ma cztery rejony wiążące jony Ca^{2+} . Obie podjednostki połączone są wiązaniem niekowalencyjnym [2, 3, 23].

Mechanizmy aktywacji kalpajny

Aktywacja przez jony wapnia, przyłączające się do końca każdej podjednostki, powoduje hydrolizę obu części (duża podjednostka zmniejsza swoją masę do $76 \cdot 10^3$ Da, natomiast mniejsza do $18 \cdot 10^3$ Da) i w rezultacie powstaje aktywny enzym [8]. Koohmarai [27] wykazał, że w wyniku autolizy małej podjednostki powstaje przeważnie jeden główny fragment $18 \cdot 10^3$ Da, chociaż możliwe, że powstaje seria produktów o masie cząsteczkowej od $30 \cdot 10^3$ do $18 \cdot 10^3$ Da, a takie fragmenty nie mogły być wychwycone przez żel SDS-PAGE użyty w doświadczeniu. Natomiast duża podjednostka rozpada się na kilka różnych fragmentów o masie cząsteczkowej od $61 \cdot 10^3$ do $21 \cdot 10^3$ Da. Polipeptyd o masie cząsteczkowej $40 \cdot 10^3$ Da reprezentuje już nieaktywną formę kalpajny.

Yoshizawa i wsp. [61] zaproponowali nieco inny mechanizm aktywacji. Pod wpływem jonów wapnia kalpajna rozpada się na dwie odrębne podjednostki. Jednostka $80 \cdot 10^3$ Da nie różni się właściwościami katalitycznymi od całej kalpajny, charakteryzuje się natomiast większą wrażliwością na jony wapnia. Odłączona podjednostka $80 \cdot 10^3$ Da wymaga stężenia wapnia takiego samego jak zautolizowana aktywna forma kalpajny.

Aktywność μ -kalpainsy zmniejsza się gwałtownie w ciągu pierwszych dni po uboju (po 72 godz. jej aktywność była mniejsza niż czułość zastosowanej metody analitycznej), podobnie dzieje się z aktywnością kalpastatyny, natomiast aktywność m-kalpainsy jest stabilna [27]. Spadek aktywności μ -kalpainsy koreluje z podwyższeniem stopnia kruchości [56]. Optymalne warunki aktywności kalpainsy ustalone *in vitro* to temp. 25°C i pH w zakresie od 7,2–8,2 [8]. Jednak podczas dojrzewania mięso przechowywane jest w temp. poniżej 15°C, a jego pH wynosi około 5,5. W badaniach przeprowadzonych przez Kanawę i wsp. [25] μ -kalpainsa wykazała maksimum swojej aktywności przy pH 7,58 i w temp. 25°C, była ciągle aktywna przy pH 5,5 w tej samej temperaturze, wykazując 17,7% swojej aktywności maksymalnej, ale w warunkach pH 5,78 i w temp. 5°C była całkowicie nieaktywna. Z badań Koohmariaie'go [27] wynika jednak, że stopień inaktywacji proteolitycznej μ -kalpainsy zwiększa się ze zmniejszającym się pH i ze wzrostem temperatury. Po 60 min, w temp. 25°C i przy pH 5,8 μ -kalpainsa zachowała jedynie 9,2% swojej aktywności początkowej, a po 120 min, w temp. 5°C zachowała 79,2% swojej początkowej aktywności. Badania Huff-Lonergan i wsp. [18] potwierdziły, że oczyszczone miofibryle są degradowane przez μ -kalpainsę w temp. 4°C przy pH równym 5,6 z dodatkiem 100 μ M chlorku wapnia. Wiele badań wskazuje na to, że żaden inny czynnik, jak tylko kalpainsy pełnią główną rolę w procesie kruszenia mięsa [1, 28, 31, 41].

Duża część kalpainsy jest związana z miofibrylami. Aktywność kalpainsy związaną z miofibrylami przypisuje się głównie μ -kalpainsie. Związany w ten sposób enzym ma lepszy dostęp do substratu i jest bardziej odporny na inhibicję przez kalpastatynę [1]. Jednak analiza mięśni pochodzących z owiec z fenotypem callipyge oraz ze zwierząt normalnych wykazała, że aktywność związanej z miofibrylami kalpainsy jest taka sama, podczas gdy twardość mięsa jest dwa razy większa u owiec callipyge. W związku z tym wydaje się niemożliwe, aby związana z miofibrylami kalpainsa miała duży udział w procesie tenderyzacji [5].

Funkcje kalpainsy

Funkcje kalpainsy nie zostały dotąd w pełni określone. Wiadomo, że są związane z podstawowymi frakcjami komórkowymi. Potwierdzono, że kalpainsa-10 powoduje zaburzenia w wydzielaniu i działaniu insuliny w żywym organizmie [51]. Istnieją dowody na to, że kalpainsy przyczyniają się do remodelowania cytoszkieletu aktyny, migracji komórki oraz transformacji onkologicznych [2]. Większość składników włókien mięśniowych, szczególnie białek cytoszkieletowych, uznano za potencjalny substrat biologiczny kalpainsy [46]. Teoretycznie aktywność μ -kalpainsy *in situ* powoduje proteolityczny rozpad, który z kolei osłabia strukturę włókien mięśniowych, dając w rezultacie kruche mięso po ugotowaniu. Aby rozpoczął się proces kruszenia musi nastąpić wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie, jony wapnia powodują wtedy aktywację kalpainsy, które następnie hydrolizują białka budujące strukturę włókna

mięśniowego. Nie ma bezpośredniego dowodu na to, że kalpainsy są aktywne w mięśni *post mortem*, nie ma nawet dowodu, że są aktywne w żywym mięśni. Aktywność kalpains stwierdza się jednak na podstawie dowodów pośrednich, czyli produktów autolizy kalpains obecnych w mięśni [8]. Badając produkty degradacji białek obecnych w mięśni podczas dojrzewania, a także produkty jakie powstają podczas inkubacji miofibryli z kalpainsami *in vitro* można określić wpływ kalpains na proces tenderyzacji.

Jedną ze zmian zachodzących podczas dojrzewania mięsa jest degradacja troponiny-T oraz pojawienie się fragmentów $27 \cdot 10^3$ lub $30 \cdot 10^3$ Da [13]. Podobne zmiany w troponinie T pojawiają się podczas inkubacji miofibryli z μ -kalpainsą w temp. 4°C przy pH 5,6 [18]. Hydroliza troponiny T przez μ -kalpainsę przebiega z uwolnieniem ośmiu peptydów o masie cząsteczkowej od 14 do $26 \cdot 10^3$ Da. Troponina T jest rozcinana w miejscu zawierającym jedną hydrofobową resztę aminokwasową [19].

Duże zmiany zachodzą również w titinie i nebulinie. Titina jest związana z linią „Z”, a jej degradacja powoduje rozluźnienie tej właśnie linii i utratę elastyczności mięśnia. Następuje dezintegracja pośrednich filamentów desminy. Charakterystyczne dla działania kalpains w tkance mięśniowej jest uwolnienie α -aktyniny z linii Z bez jej degradowania. Stwierdzono, że podczas dojrzewania α -konektyna jest rozszczepiana na β -konektynę i fragment o m. cz. $12 \cdot 10^5$ Da [14, 18, 55]. Steen i wsp. [52] nie stwierdzili jednak żadnej zależności pomiędzy koncentracją titiny a siłą cięcia mierzoną w różnych przedziałach czasowych *post mortem*. Nie wykazali też zależności pomiędzy koncentracją nebuliny a aktywnością m-kalpainsy, kalpastatyny czy stosunkiem m-kalpainsy do kalpastatyny. Nebulina natomiast zanika podczas dojrzewania mięsa *post mortem*. Filamenty nebuliny rozpadają się na pięć mniejszych fragmentów o łańcuchach $20 \cdot 10^4$, $18 \cdot 10^4$, $40 \cdot 10^3$, $33 \cdot 10^3$ i $23 \cdot 10^3$ Da. W środowisku i temp. 4°C i pH 5,6 μ -kalpainsa jest w stanie zdegradować nebulinę po 15 min inkubacji i degradacja ta zachodzi szybciej niż rozpad titiny. Desmina z kolei jest degradowana podczas dojrzewania *post mortem*, a głównym produktem tej degradacji jest produkt o m. cz. ok. $38 \cdot 10^3$ Da. Ten produkt pojawia się również podczas inkubacji miofibryli z μ -kalpainsą. Filamina rozpada się częściowo na produkt o m. cz. ok. $240 \cdot 10^3$ Da w próbkach mięsa dojrzewającego naturalnie oraz w próbkach oczyszczonych miofibryli z dodaną μ -kalpainsą [18, 55].

Czynniki wpływające na aktywność kalpains w mięsie

Tenderyzacja mięsa *post mortem* nie zależy od degradacji pojedynczych białek, ale jest związana z wieloma zmianami biochemicznymi i strukturalnymi zachodzącymi w białkach [18]. Aktywność kalpains może się różnić w zależności od gatunku zwierząt, mięśnia, może zależeć od wielu czynników działających na mięśnie jeszcze podczas życia zwierzęcia (poprzez modyfikowanie sposobu żywienia czy też poprzez rodzaj chowu) lub czynników mających wpływ na mięso w pierwszych godzinach po uboju lub podczas jego przetwarzania. Nie bez znaczenia są również czynniki genetyczne.

Istnieją dowody na to, że kalpains pełnią ważną rolę podczas wzrostu mięśnia po urodzeniu zwierzęcia, a także podczas niszczenia tkanki mięśniowej obserwowanego podczas zaniku mięśni [15].

Czynniki przyżyciowe

W hodowli zwierząt rzeźnych dąży się do zwiększenia mięsności oraz obniżenia stopnia otłuszczenia. Jednak bardzo często obserwuje się zwiększenie twardości mięsa ze zwierząt o podwyższonej mięsności. Przykładem może być rasa bydła podwójnie umięśniona Belgian Blue White. Zależność pomiędzy siłą cięcia a ilością fragmentu o wielkości $30 \cdot 10^3$ Da, charakterystycznego dla degradacji troponiny T, jest dużo słabsza niż u innych ras [52].

Znanym sposobem zwiększenia ilości tkanki mięsnej kosztem zmniejszenia zawartości tłuszczu, bez konieczności zwiększania dawki żywieniowej, jest podawanie zwierzętom clenbuterolu. Jest to sztuczny środek adrenergiczny podobny do adrenaliny. Podawanie go jest dobrym sposobem na uzyskanie większej ilości mięsa, jest ono jednak twarde. Podawanie clenbuterolu nie wpływa na aktywność μ -kalpains, ale podwyższa aktywność kalpastatyny, która blokuje tenderyzację mięsa [47]. Podobny efekt uzyskuje się podając adrenalinę, naturalnie występujący w organizmie czynnik adrenergiczny powodujący podwyższenie o 97% aktywności kalpastatyny. Jednak aktywności enzymów systemu kalpainowego w czasie składowania mięsa zmieniają się. Można więc powiedzieć, że zróżnicowany poziom adrenaliny w płazmie krwi powoduje silne zaburzenia w systemie kalpainowym [44]. Ertbjerg i wsp. [10], przeprowadzając badania świń, wykazali, że wstrzykiwanie adrenaliny domięśniowo w połączeniu z wysiłkiem fizycznym zwierząt powoduje podwyższenie pH mięsa i obniżenie stopnia jego twardości.

Hodowla świń, od których uzyskuje się chude mięso, doprowadziła do powstania mutacji genu RyR1. Obecność tego genu jest związana z podatnością zwierząt na stres i obniżoną jakością mięsa. W mięsie takich zwierząt obserwuje się niższy poziom aktywności m-kalpains w porównaniu ze zwierzętami nie dotkniętymi tą mutacją genu, co może decydować o podwyższonej twardości mięsa [45].

Ciekawym przypadkiem jest fenotyp owiec callipyge. Został on zidentyfikowany po raz pierwszy w roku 1983 w Dorset. Jeden z osobników męskich przekazywał specyficzny fenotyp niektórym potomkom. Charakteryzowały się one tym, że tylna część ciała (szczególnie mięśnie: *biceps femoris*, *semimembranosus*, *semitendinosus* i *longissimus*) była szczególnie umięśniona [11]. Mięśnie objęte fenotypem callipyge charakteryzują się dużo większym (o około 60% w momencie śmierci) poziomem kalpastatyny w porównaniu z mięśniami normalnych owiec [4, 12]. Fenotyp callipyge umożliwia produkowanie mięsa chudego, ale o mniejszej kruchości. Mrożenie powoduje zmniejszenie twardości mięsa, prawdopodobnie na skutek obniżenia aktywności kalpastatyny [9]. Mięśnie *biceps femoris* i *longissimus dorsi* z fenotypem

callipyge charakteryzują się większą twardością i masą, natomiast mięsień *infraspinatus* nie jest zaliczany do mięśni z tym fenotypem. Aktywność m-kalpainy jest wyższa w *m. biceps femoris* i *m. longissimus* owiec callipyge niż w tych samych mięśniach owiec normalnych. Natomiast m-kalpain w mięśni *infraspinatus* owiec normalnych i callipyge była tak samo aktywna [4]. Degradacja titiny, nebuliny, desminy i troponiny T przebiega znacznie wolniej podczas dojrzewania mięsa owiec callipyge [12]. Przypadek owiec callipyge świadczy o tym, że podwyższony przyrost masy mięśnia może powodować zmniejszenie stopnia degradacji białek związane ze spadkiem aktywności kalpain, który z kolei łączy się z podwyższonym poziomem kalpastatyny [15]. Istnieje wyraźna zależność pomiędzy jakością mięsa a typem mięśnia, z którego to mięso pochodzi. Różnorodność pomiędzy mięśniami jest często związana z właściwościami metabolicznymi mięśnia i jego zdolnością kurczenia się [26]. Szybciej dojrzewają mięśnie białe, szybko kurczące się, niż czerwone – wolno kurczliwe. Aktywność m-kalpainy i kalpastatyny okazały się silnie związane z typem mięśnia. Aktywność m-kalpainy jest tym niższa im większa jest szybkość skurczu mięśnia oraz tym niższa aktywność m-kalpainy im wyższa aktywność ATPazy. Podobne wyniki uzyskano w przypadku μ -kalpainy [39]. Porównując mięśnie indycze, wyższą aktywność m-kalpainy zanotowano w mięśniach udźca niż w mięśniach piersiowych [38].

Wprowadzanie witaminy E do mięśnia może zapobiegać utlenianiu kalpain i poprzez takie działanie spotęgować działanie dodanych jonów wapnia [16]. Wzbogacanie paszy witaminą D powoduje zwiększenie stężenia wapnia w *m. longissimus dorsi*, a tym samym zmniejszenie siły cięcia w przypadku mięsa wołowego. W 21. dniu po uboju siła cięcia mięśni zwierząt karmionych paszą wzbogaconą w witaminę D była mniejsza o 15%. Taka właściwość witaminy D może być wykorzystana jako czynnik powodujący zwiększenie kruchości mięsa [53].

Czynniki poubojowe

Zwiększenie stężenia wapnia w środowisku, w którym dojrzewa mięso, sprzyja zwiększeniu jego kruchości. Moczenie mięsa, pochodzącego z 8- do 11-letnich krów, w roztworze chlorku wapnia przez 24 godz. powoduje niskie wartości siły cięcia [60]. Także wstrzykiwanie chlorku wapnia razem z tokoferolem wywołuje intensywne kruszenie wołowiny.

Stymulacja elektryczna stosowana jest w celu uniknięcia tzw. skurczu chłodniczego, który jest częstym problemem pojawiającym się podczas szybkiego chłodzenia tusz po uboju [36]. Niskonapięciowa stymulacja elektryczna jest stosowana zazwyczaj od razu po oszołomieniu, natomiast wysokonapięciowa stosowana jest jakiś czas po oszołomieniu, na jednym z odcinków linii ubojowej. Za bardziej efektywną uznaje się stymulację wysokonapięciową [20].

Stymulacja elektryczna tusz wołowych w 3. min *post mortem*, niezależnie od jej rodzaju (niskie czy wysokie natężenie prądu), powoduje podwyższenie twardości mięsa. Obserwuje się przy tym gwałtowny spadek pH, co jest prawdopodobną przyczyną twardości mięsa w porównaniu z tuszami stymulowanymi w 40. min *post mortem* [20]. Badania te wskazują, że stymulacji elektrycznej nie powinno się przeprowadzać od razu po uboju. W innych badaniach także potwierdzono, że stymulacja pozwala uzyskać bardziej kruche mięso [34, 36, 37]. Zwiększony napływ jonów wapnia po stymulacji elektrycznej do cytoplazmy może powodować chwilowe uaktywnienie μ -kalpainy i dzięki temu proteoliza może zajść szybciej [57]. Morton i wsp. [37] zaobserwowali niewielki wzrost aktywności μ -kalpainy, a także kalpastatyny w wołowinie o pH 5,5 i w temp. 15°C, ale w 24. godz. aktywność μ -kalpainy, jak i kalpastatyny obniżyła się o 80%. Średnia twardość zmniejszyła się z 81 N w 12. godz. do 49 N w 336. godz. Ci sami naukowcy stwierdzili, że w stymulowanych elektrycznie tuszach owczych aktywność μ -kalpainy zmniejszała się na początku wolno (do 9. godz.), a pomiędzy 9. a 18. godz. spadała gwałtownie. Twardość mięsa owczego spadała ze 113 N w 6. godz. do 38 N w 96. godz. W innych badaniach [37] przeprowadzonych na tuszach wieprzowych wykazano, że elektryczna stymulacja wywołała efekt w połowie tak silny jak proces dojrzewania. W rezultacie uzyskano mięso bardziej kruche.

Podsumowanie

Dotychczas odkryto wiele rodzajów kalpain i prawdopodobnie będzie ich więcej. Kalpainy są obecne w różnych tkankach i spełniają różne role. Obecność kalpain w tkance mięśniowej jest stwierdzona, chociaż ich funkcje są nadal nie w pełni wyjaśnione. Kalpainy spełniają podstawowe kryteria stawiane czynnikom wpływającym na proces kruszenia mięsa. Enzymy te są obecne w komórce mięśniowej, a w doświadczeniach przeprowadzanych *in vitro* prowadzą do tych samych produktów degradacji białek, jakie wykrywane są w mięsie po okresie dojrzewania. Mają one dostęp do miofibryli w komórce [30]. Aktywność kalpain oraz stosunek aktywności kalpainy do aktywności kalpastatyny są skorelowane z twardością mięsa. Im wyższa jest aktywność kalpain oraz im wyższy stosunek kalpaina/kalpastatyna, tym bardziej kruche mięso otrzymuje się.

W większości badań aktywność kalpain była mierzona po wyizolowaniu ich z mięsa, używając jako substratu innych (niż miofibrylarne) białek. Nie mierzono więc rzeczywistej aktywności tych enzymów. Istnieją więc głównie pośrednie dowody na działanie kalpain podczas procesu kruszenia mięsa. W zależności od wielu czynników aktywność ta może być różna. Mimo, że mechanizm działania kalpain nie jest całkowicie wyjaśniony, na podstawie wyników licznych doświadczeń można stwierdzić, że kalpainy pełnią ważną rolę w procesie tenderyzacji mięsa. Dokładne poznanie mechanizmu kruszenia mięsa oraz działania kalpain umożliwiłoby świadome

sterowanie procesem tenderyzacji i uzyskiwanie mięsa kruchego o standardowej jakości.

Literatura

- [1] Boehm M.L., Kendall T.L., Thompson V.F., Goll D.E.: Changes in the calpains and calpastatin during *post mortem* storage of bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 1998, **76**, 2415-2434.
- [2] Carragher N.O., Frame M.C.: Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int. J. Bioch. Cell Biol.*, 2002, **34**, 1539-1543.
- [3] Dąbrowska R., Wrzosek A.: Molekularne podstawy kontroli skurczu mięśni przez jony wapnia. *Kosmos*, 1997, **46 (4)** 555-562.
- [4] Delgado E.F., Geesink G. H., Marchello J.A., Goll D.E., Koohmaraie M.: The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 398-412.
- [5] Delgado E.F., Geesink G.H., Marchello J.A., Goll D.E., Koohmaraie M.: Properties of miofibril-bound calpain activity in *longissimus muscle* of callipyge and normal sheep. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 2097-2107.
- [6] Dransfield E.: Modelling *post-mortem* tenderization-IV: Role of calpains and calpastatin in conditioning. *Meat Sci.*, 1993, **34**, 217-234.
- [7] Dransfield E.: Calpains from thaw rigor muscle. *Meat Sci.*, 1996, **43**, 311-320.
- [8] Dransfield E.: Meat tenderness-the μ -calpain hypothesis. 45th ICoMST, 1999, pp. 220-228.
- [9] Duckett S.K., Klein T.A., Leckie R.K., Thorngate J.H., Busboom J.R., Snowden G.D.: Effect of freezing on calpastatin activity and tenderness of callipyge lamb. *J. Anim. Sci.*, 1998, **76**, 1869-1874.
- [10] Ertbjerg P., Henckel P., Karlsson A., Larsen L. M., Møller A. J.: Combined effect of epinephrine and exercise on calpain/calpastatin and cathepsin B and L activity in porcine *longissimus muscle*. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 2428-2436.
- [11] Freking B.A., Keele J. W., Beattie C.W., Kappes S.M., Smith T.P.L., Sonstegard T.S., Nielsen M.K., Leymaster K.A.: Evaluation of the ovine callipyge locus: I. Relative chromosomal position and gene action. *J. Anim. Sci.*, 1998, **76**, 2062-2071.
- [12] Geesink G.H., Koohmaraie M.: *Postmortem* proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb *biceps femoris* during extended *postmortem* storage. *J. Anim. Sci.*, 1999 **77**, 1490-1501.
- [13] Geesink G.H., Taylor R.G., Bekhit A.E.D., Bickerstaffe R.: Evidence against the non-enzymatic calcium theory of tenderization. *Meat Sci.*, 2001, **59**, 417-422.
- [14] Goll D.E., Dayton W.R., Singh I., Robson R.M.: Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disc by using calpain. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, **13**, 8501-8510.
- [15] Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Ouali A.: The calpain system and skeletal muscle growth. *Can. J. Anim. Sci.*, 1998, **78**, 503-512.
- [16] Harris S.E., Huff-Lonergan E., Lonergan S.M., Jones W.R., Rankins D.: Antioxidant status affects color stability and tenderness of calcium chloride-injected beef. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 666-677.
- [17] Hopkins D.L., Thompson J.M.: Inhibition of protease activity 2. Degradation of myofibrillar proteins, myofibril examination of free calcium levels. *Meat Sci.*, 2001, **59**, 199-209.
- [18] Huff-Lonergan E., Mitsuhashi T., Beekman D. D., Parrish F. C., Jr., Olson D. G., Robson R. M.: Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in *post mortem* Bovine Muscle. *J. Anim. Sci.*, 1996, **74**, 993-1008.
- [19] Hughes M.C., Geary S., Dransfield E., McSweeney P.L.H., O'Neill E.E.: Characterization of peptides released from rabbit skeletal muscle tin-T by μ -calpain under conditions of low temperature and high ionic strength. *Meat Sci.*, 2001, **59**, 61-69.

- [20] Hwang I.H., Thompson J.M.: The effect of time and type of electrical stimulation on the calpain system and meat tenderness in beef *longissimus dorsi* muscle. *Meat Sci.*, 2001, **58**, 135-144.
- [21] Ilian M.A., Morton J.D., Kent M.P., Le Conteur C.E., Hickford J., Cowley R., Bickerstaffe R.: Intermuscular variation in tenderness: Association with the ubiquitous and muscle specific calpains. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 12-132.
- [22] Jakubiec-Puka A.: Rola proteolitycznego systemu kalpainowego w komórkach zwierzęcych. *Postępy Biochemii*, 1993, **39** (4) 251-258.
- [23] Jakubiec-Puka A.: Kalpains. *Kosmos*, 1997, **46** (4), 609-614.
- [24] Jeacocke R. E.: The concentrations of free magnesium and free calcium ions both increase in skeletal muscle fibres entering *rigor mortis*. *Meat Sci.*, 1993, **35**, 27-45.
- [25] Kanawa R., J. J., Takahashi K.: Inactivity of μ -calpain throughout *post mortem* aging of meat. *J. Food Sci.*, 2002, **67**, 2, 635-638.
- [26] Klont R.E., Brocks L., Eikelenboom G.: Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci.*, 1998, **49** (Suppl. 1), S219-S229.
- [27] Koochmaraie M.: Effect of pH, Temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain. *J. Anim. Sci.*, 1992, **70**, 3071-3080.
- [28] Koochmaraie M.: The role of Ca^{2+} dependent proteinases i *post mortem* proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 1992, **74**, 3, 239-245 (English abstract).
- [29] Koochmaraie M.: Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.*, 1994, **36**, 93-104.
- [30] Koochmaraie M.: Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci.*, 1996, **43**, S, S193-S201.
- [31] Kristensen L., Therkildsen M., Riis B., Sørensen M.T., Oksbjerg N., Purslow P.P., Ertbjerg P.: Dietary induced growth rate in pigs: Effects on *in vivo* and *post mortem* muscle proteolysis and meat quality. *J. Anim. Sci.*, 2002, **80**, 2862-2871.
- [32] Kurebayashi N., Harkins A.B., Baylor S. M.: Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 1993, **64**, 1934-1960.
- [33] Lawrie R.A.: *Meat Science*. Pergamon Press, Oxford 1985.
- [34] Lee S., Polidori P., Kaufman R.G., Kim B.C.: Low-voltage electrical stimulation effects on proteolysis and lamb tenderness. *J. Food Sci.*, 2000, **65** (5), 786-790.
- [35] Ma H., Fukiage Ch., Kim Y.H., Duncan M.K., Reed N. A., Shih M., Azuma M., Shearer T.R.: Characterization and expression of calpain 10. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276** (30), 28525-28531.
- [36] Maribo H., Ertbjerg P., Andersson M., Barton-Gade P., Møller A.J.: Electrical stimulation of pigs- effect on pH fall, meat quality and Cathepsin B+L activity. *Meat Sci.*, 1999, **52**, 172-187.
- [37] Morton J.D., Bickerstaffe R., Kent M.P., Dransfield E., Keeley G.M.: Calpain-calpastatin and toughness in *m. longissimus* from electrically stimulated lamb and beef carcasses. *Meat Sci.*, 1999, **52**, 71-79.
- [38] Northcutt J.K., Pringle T.D., Dickens J.A., Buhr R.J., Young L.L.: Effects of age and tissue type on the calpain proteolytic system in turkey skeletal muscle. *Poultry Sci.*, 1998, **77**, 367-372.
- [39] Ouali A.: Meat tenderization: Possible causes and mechanisms. A Review. *J. Muscle Foods*, 1990, **1** (2) 129-165.
- [40] Parr T., Sensky P.L., Scothern G.P., Bardsley R.G., Buttery P.J., Wood J.D. Warkup C.: Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine *longissimus muscle*. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 661-668.
- [41] Pringle T.D., Harrelson J.M., West R.L, Williams S.E., Johnson D.D.: Calcium-activated tenderization of strip loin, top sirloin, and top round steaks in diverse genotypes of cattle. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 3230-3237.
- [42] Purslow P.P., Ertbjerg P., Baron C.P., Christensen M., Lawson M. A.: Patterns of variation in enzyme activity and cytoskeletal proteolysis in muscle. 47th ICoMST, 2001, pp. 38-43.

- [43] Rosochacki S.J.: Proteoliza w mięśniach po uboju zwierząt. *Przeg. Hod.*, 1999, **9**, 26-29.
- [44] Sensky P.L., Parr T., Bardsley R.G., Buttery P.J.: The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine *longissimus muscle*. *J. Anim. Sci.*, 1996, **74**, 380-387.
- [45] Sensky P.L., Parr T., Lockley A.K., Bardsley R.G., Butery P.J., Wood J.D., Warkup C.: Altered calpain levels in *longissimus muscle* from normal pigs and heterozygotes with the ryanodine receptor mutation. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 2956-2964.
- [46] Sentandreu M.A., Coulis G., Ouali A.: Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.*, 2002, **13**, 398-419.
- [47] Simmons N.J., Young O.A., Dobbie P.M., Singh K., Thompson B.C., Speck P.A.: *Post-mortem* calpain-system kinetics in lamb: Effect of clenbuterol and preslaughter exercise. *Meat Sci.*, 1997, **47**, 1/2, 135-146.
- [48] Sorimachi H., Kinbara K., Kimura S., Takahashi M., Ishiura S., Sasagawa N., Sorimachi N., Shimada H., Tagawa K., Maruyama K., Suzuki K.: Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connection through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270** (52), 31158-31162.
- [49] Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K.: Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.*, 1997, **328**, 721-732.
- [50] Spadoni C., Forkas A., Sinka R., Tompa P., Friedrich P.: Molecular cloning and RNA expression of a novel *Drosophila* calpain, calpain C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **303**, 343-349.
- [51] Sreenan S.K., Zhou Y-P., Otani K., Hansen P.A., Currie K.P.M., Pan Ch-Y., Lee J-P., Ostrega D. M., Pugh W., Horikawa Y., Cox N. J., Harris C. L., Burant Ch. F., Fox A. P., Bell G. T., Polonsky K. S.: Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes*, 2001, **50**, 2013-2020.
- [52] Steen D., Claeys E., Uytterhaegen L., De Smet S., Demeyer D.: Early *post-mortem* conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-musled beef. *Meat Sci.*, 1997, **45**, 3, 307-319.
- [53] Swanek S.S., Morgan J.B., Owens F.N., Gill D. R., Strasia A., Dolezal H.G., Ray F.K.: Vitamin D₃ supplementation of beef seers increases *longissimus* tenderness. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 874-881.
- [54] Takahashi K.: Structural weakening of skeletal muscle tissue during *post-mortem* ageing of meat: Non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.*, 1996, **43**, S, S67-S80.
- [55] Takahashi K.: Mechanism of meat tenderization during *post-mortem* ageing: Calcium Theory. 45th ICoMST, 1999, pp. 230-235.
- [56] Thomson B.C., Dobbie P.M., Singh K., Speck P.A.: *Post-mortem* kinetics of meat tenderness and the components of calpain system in bull skeletal muscle. *Meat Sci.*, 1996, **44** (3) 151-157.
- [57] Veeramuthu G.I., Sams A.R.: *Post mortem* pH, myofibrillar fragmentation, and calpain activity in pectoralis from electrically stimulated and muscle tensioned broiler carcasses. *Poultry Sci.*, 1999, **78**, 272-276.
- [58] Watanabe A., Daly C.C., Devine C.E.: The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing. *Meat Sci.*, 1996, **42** (1) 67-78.
- [59] Whipple G., Koohmaraie M.: Degradation of myofibril proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. *J. Anim. Sci.*, 1991, **69**, 4449-4460.
- [60] Whipple G., Koohmaraie M.: Calcium chloride marination effects on beef steak tenderness and calpain proteolytic activity. *Meat Sci.*, 1993, **33**, 265-275.
- [61] Yoshizawa T., Sorimachi H., Tomioka S., Ishiura S., Suzuki K.: Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **208** (1) 376-383.

THE ROLE OF CALPAINS IN THE MEAT TENDERIZATION PROCESS

S u m m a r y

Meat tenderness and factors influencing it have been investigated for a long time. There are several theories explaining the process of meat tenderization. The calpain theory of tenderization has been accepted as the most feasible one. Calpains meet the basic criteria defined for factors that impact meat tenderization. These enzymes are present in a muscle cell, and in vitro experiments, when calpains are used, there are detected the same protein degradation products as in the meat after its raping. Calpains have access to myofibrils in cells. The activeness of calpains and the ratio between it and the calpastatin are correlated with the meat hardness. The higher the hardness of meat and the higher the ratio: calpain to calpastatin, the more tender meat can be obtained. Conditions under which these enzymes are active are close to conditions in the meat tissue after the death of animal. The calpain activity depends both on the survival, including genetic, and the post-mortem factors.

Although the mechanism of calpain activity has not been satisfactorily explained so far, but on the basis of results obtained, it can be concluded that they play an important role in the meat tenderization process.

In this paper, calpains are characterized and some factors influencing their activeness are described.

Key words: calpains, meat tenderization. ☒

ANNA KACZMAREK, JAN ZABIELSKI, PIOTR ZIELONKA

**SZACOWANIE WPLYWU WARUNKÓW WĘDZENIA SUROWYCH
WYROBÓW MIĘSNYCH NA MOŻLIWOŚĆ WZROSTU *LISTERIA
MONOCYTOGENES* I *ESCHERICHIA COLI* O157:H7**

Streszczenie

Celem pracy była prognoza wpływu warunków wędzenia trzech gatunków surowych wyrobów mięsnych na możliwość wzrostu bakterii *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* O157:H7.

Badania przeprowadzono w wybranym zakładzie mięsnym, w rzeczywistych warunkach produkcji handlowej. Obiekt badawczy stanowiły wyroby z 5 partii produkcyjnych schabu surowego, frankfurterek oraz kielbasy polskiej surowej. W produktach wędzonych oznaczano zawartość: soli, azotanów(III), pH oraz czas wędzenia w zakresie temp. 30–37°C. Prognozy wzrostu wybranych patogenów, z uwzględnieniem wyników przeprowadzonych oznaczeń, obliczono za pomocą programu Pathogen Modeling Program 6,0.

Wykazano bardzo dużą zmienność zawartości azotanów(III) ($V = 23,63\text{--}59,76\%$), soli ($V = 10,82\text{--}17,78\%$) oraz rzeczywistych okresów obróbki wędzarniczej ($V = 35,1\text{--}39,1\%$) poszczególnych partii produkcyjnych badanych wyrobów. W konsekwencji, obliczone prognozy okresów stabilności mikrobiologicznej *Escherichia coli* O157:H7 w poszczególnych partiach produkcyjnych schabu surowego charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem ($V = 9\text{--}95\%$). Zastosowane warunki wędzenia spowodowały, że w przypadku kielbasy polskiej oraz frankfurterek prawdopodobne było zakończenie okresu lag-fazy *Escherichia coli* O157:H7 jeszcze w czasie tego zabiegu.

Słowa kluczowe: mikrobiologia prognostyczna, wędzenie, surowe wyroby mięsne.

Wprowadzenie

Wyroby z mięsa peklowanego niepoddawane parzeniu, a jedynie ciepłemu wędzeniu, np. wędzonki lub niektóre kielbasy surowe, uważane są za szczególnie atrakcyjne sensorycznie. Należą też zwykle do droższych asortymentów handlowych i dlatego stanowią dość znaczną ilościowo grupę wyrobów produkowanych w zakładach mięsnych.

Względy ekonomiczne sprawiają, że w realnych warunkach produkcyjnych takie wyroby, jak: schab surowy wędzony, kielbasa polska surowa lub frankfurterki, po zakończeniu cyklu produkcyjnego nie są poddawane dalszym zabiegom utrwalającym, np. podsuszaniu lub dojrzewaniu. W ten sposób zmniejszają się technologiczne możliwości sterowania ich jakością mikrobiologiczną [7]. Dlatego, poza temperaturą przechowywania, głównymi czynnikami regulującymi skażenie mikrobiologiczne będą: kwasowość tych wyrobów, zawartość soli oraz azotanów(III).

Wędzone na surowo, solone i peklowane wyroby mięsne stanowią potencjalne źródło bakterii zarówno *Escherichia coli* [8], jak i *Listeria monocytogenes* [4]. Wykryto, że źródłem infekcji *Escherichia coli* może być nawet fermentowane salami [18]. Oznacza to, że ani peklowanie, ani wędzenie owiewowe nie gwarantują skutecznej eliminacji zagrożenia zdrowia, spowodowanego obecnością tych patogenów. Od dawna wiadomo, że płynne składniki dymu wędzarniczego działają bakterioobójczo lub bakteriostatycznie [6] na patogeny, w tym także na *L. monocytogenes* [1], ale w praktyce produkcyjnej wędzonek i kielbas surowych nie stosuje się płynnych preparatów dymu wędzarniczego.

Zalecany względami technologicznymi zakres temperatury owiewowego wędzenia wędzonek surowych oraz kielbas surowych wynosi od 18 do 25°C, a czas do kilkunastu godzin [13]. W praktyce jednak zabieg ten jest skracany do kilku godzin, przez podwyższenie temp. o około 10 do 12°C. Spowodowane jest to względami zarówno organizacyjnymi produkcji, jak i zmniejszaniem ubytków masy wpływających na wydajność gotowego wyrobu. W taki sposób, przez okres kilku godzin, zostają stworzone optymalne warunki temperaturowe wzrostu bakterii, w tym także *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli*. Dlatego informacje dotyczące czasu i temperatury zabiegu, pH, zawartości soli i azotanów(III) w zestawieniu z metodami mikrobiologii prognostycznej, umożliwią oszacowanie wpływu warunków wędzenia ciepłego na możliwość rozwoju tych patogenów.

Na potrzeby mikrobiologii prognostycznej opracowano wiele modeli i programów komputerowych opisujących wzrost mikroorganizmów w funkcji pH, zawartości soli i azotanów(III) oraz temperatury [5, 10, 16]. Dostępne dane literaturowe potwierdzają przydatność tych narzędzi w szacowaniu ryzyka powstawania zagrożenia mikrobiologicznego mięsa i wyrobów mięsnych [3, 20, 19, 11, 2, 9]. Wykorzystanie mikrobiologii prognostycznej zostało zaakceptowane np. w: dystrybucji mięsa, sprzedaży detalicznej, produkcji fermentowanych wyrobów mięsnych, czy rozbiorze tusz wołowych „na ciepło” w Australii przez tamtejsze władze sanitarne [17].

Potwierdza to celowość opisanych poniżej doświadczeń, w których podjęto próbę stwierdzenia, czy w rzeczywistych warunkach produkcji trzech rodzajów surowych wyrobów mięsnych możliwe jest wystąpienie w czasie obróbki wędzarniczej warunków sprzyjających rozwojowi *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli*.

Materiał i metody badań

Doświadczenia prowadzone były w rzeczywistych warunkach działania zakładu mięsnego na terenie Wielkopolski, w trakcie codziennej produkcji wyrobów mięsnych. Obiektami doświadczalnymi były wyroby z 5 partii produkcyjnych, z których pobrano po trzy próby schabu surowego wędzonego bez kości, kiełbasy polskiej surowej oraz frankfurterek. Schab (mięsień najdłuższy grzbietu) peklowano metodą nastrzykową. W przypadku kiełbasy polskiej surowej (25% wieprzowiny kl. I i 75% wieprzowiny kl. II) oraz frankfurterek (20% wieprzowiny kl. I i 80% wieprzowiny kl. II) stosowano peklowanie surowców poprzez wymieszanie z solą peklującą, bez dodatku wody.

Wędzenie owiewowe wyrobów prowadzono w komorach wędzarniczo-parzelniczych z żarową wytwornicą dymu oraz z możliwością regulacji temperatury zabiegu. Warunki prowadzenia zabiegu każdej partii produkcyjnej wyrobów charakteryzowano poprzez pomiar czasu oraz temperatury, mierzonej wewnątrz geometrycznego środka batonów.

Natychmiast po zakończeniu wędzenia wyrobów mierzono ich kwasowość, stosując pH-metr CP-551 z elektrodą OSH12-01 przystosowaną do bezpośrednich pomiarów pH w mięsie i serach.

Zawartość NaCl oznaczano metodą Mohra [14], a azotanów(III) poprzez reakcję z odczynnikiem Griessa [15].

Uzyskane wyniki parametrów fizykochemicznych poszczególnych partii wyrobów poddano analizie za pomocą programu Pathogen Modeling Program wersja 6 [12]. Szacowano czas trwania lag-fazy i czas wzrostu jednej generacji bakterii przy założonym poziomie skażenia początkowego 1 jtk/g. Jako okres stabilności mikrobiologicznej wyrobów przyjmowano sumę tych wartości, wyliczanych na podstawie prognoz wzrostu *L. monocytogenes* oraz *E. coli* O157:H7.

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. zestawiono parametry wędzenia oraz podstawowe wyróżniki fizykochemiczne pięciu partii produkcyjnych badanych wyrobów.

Najmniejszą powtarzalnością charakteryzował się proces peklowania wyrobów, co odzwierciedlają współczynniki zmienności średnich zawartości azotanów(III) i soli. W przypadku frankfurterek z surowców peklowanych "na sucho" współczynnik zmienności azotanów(III) wyniósł prawie 60%. Fakt występowania tak znaczącej zmienności zawartości azotanów(III) oraz soli pomiędzy partiami produkcyjnymi wskazuje na prawdopodobieństwo zróżnicowanego czasu stabilności mikrobiologicznej poszczególnych partii produkcyjnych tych samych sortymentów. Ponadto, w przypadku schabu surowego wędzonego, w czterech spośród pięciu partii produkcyjnych (80%) przekroczona była dopuszczalna zawartość azotanów(III) w produkcie finalnym. Zmienność wartości pH nie była duża, co potwierdza lepsze wyrównanie kwasowości badanych wyrobów.

Tabela 1

Parametry zabiegu wędzenia oraz podstawowe wyróżniki fizykochemiczne badanych wyrobów mięsnych.
Parameters of smoking process and basic physical & chemical characteristics of meat products studied.

Rodzaj wyrobu Product type	Partia produkcyjna Production batch	pH*	NaCl [%]*	Azotany(III)* [mg/kg] Nitrates(III)	Temperatura wędzenia [°C] Smoking temp.[°C]	Czas wędzenia [godz] Smoking time [h]
Schab surowy Raw pork loin	1	5,16	4,36	142,17	37	3,50
	2	5,75	3,59	74,14	36	5,20
	3	5,88	4,13	107,24	35	2,45
	4	5,95	3,47	137,62	37	2,35
	5	5,90	3,39	127,25	37	3,00
	\bar{x}	5,73	3,99	117,68	36,4	3,3
	SD	0,33	0,43	27,81	0,89	1,1
	V [%]	5,70	10,82	23,63	2,45	35,1
Frankfurterki Frankfurters	1	5,24	2,31	16,12	30	3
	2	5,43	2,28	26,17	33	5,2
	3	5,54	2,26	54,05	32	2,45
	4	5,79	2,61	48,70	32	2,35
	5	5,60	2,90	12,72	32	2,45
	\bar{x}	5,52	2,47	31,55	31,8	3,1
	SD	0,20	0,27	18,85	1,1	1,2
	V [%]	3,70	11,26	59,76	3,4	39,1
Kiełbasa polska surowa Polish raw sausage	1	5,37	3,09	70,90	30	3
	2	5,64	2,32	36,18	33	5,2
	3	5,97	2,62	85,28	32	2,45
	4	5,86	1,89	39,57	32	2,35
	5	5,98	2,41	52,57	32	2,45
	\bar{x}	5,76	2,46	56,9	31,8	3,1
	SD	0,25	0,43	20,91	1,1	1,2
	V [%]	4,50	17,78	36,76	3,4	39,0

V – współczynnik zmienności / variability coefficient; \bar{x} – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

* – wartości średnie z 3 oznaczeń / mean values of 3 measurements

O ile temperatura wędzenia charakteryzowała się bardzo małą zmiennością, to czas wędzenia poszczególnych partii wyrobów był zróżnicowany – współczynniki zmienności wahały się od 35,1 do 39,1%. Warto podkreślić, że temperatura wędzenia jest regulowana nastawami sterowników komór i dlatego współczynniki zmienności tego parametru są małe, natomiast o czasie zabiegu decyduje obsługa urządzeń i organizacja produkcji. W kategoriach sterowania procesami jest więc

prawdopodobne, że czas wędzenia oraz peklowanie surowców mogą być źródłem zmienności nadmiarowej.

Na podstawie danych obróbki wędzarniczej poszczególnych partii wyrobów obliczono prognozy wzrostu i okres stabilności mikrobiologicznej *L. monocytogenes* oraz *E. coli* O157:H7 i przedstawiono je w tab. 2.

Tabela 2

Szacowanie parametrów wzrostu *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* O157:H7 w surowych wyrobach mięsnych podczas zabiegu wędzenia.

Predicting the growth parameter levels of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat products being smoked.

Rodzaj wyrobu Product type	Seria Batch	Czas trwania lag-fazy [godz.] Lag phase duration [h]	Czas 1 generacji [godz.] Generation time [h]	Okres stabilności mikrobiologicznej (lag-faza+czas 1 generacji) [godz.] Microbial stability time (lag-phase + 1 generation) [h]	Czas wędzenia [godz.] Smoking time	
Schab surowy Raw pork loin	<i>Listeria monocytogenes</i>					
	1	47,3	3,2	50,5	3,50	
	2	7,5	0,8	8,3	5,20	
	3	8	0,9	8,9	2,45	
	4	6,3	0,8	7,1	2,35	
	5	11,6	1,1	12,7	3,00	
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7					
	1	25,3	1,4	26,7	3,00	
	2	7,6	0,8	8,4	5,20	
	3	9,5	0,8	10,3	2,45	
	4	7,6	0,7	8,1	2,35	
	5	12,3	0,9	13,2	2,45	
	Frankfurterki Frankfurters	<i>Listeria monocytogenes</i>				
		1	11,5	1,1	12,6	3,00
		2	7,4	0,8	8,2	5,20
3		7,9	0,9	8,8	2,45	
4		5,7	0,7	6,4	2,35	
5		6,6	0,7	7,3	2,45	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7						
1		5,5	1,1	6,6	3,00	
2		4,5	0,8	5,3	5,20	
3		4,8	0,8	5,6	2,45	
4		4,5	0,7	5,2	2,35	
5		5,2	0,9	6,1	2,45	

c.d. Tab. 2

polska surowa Polish RAW	<i>Listeria monocytogenes</i>				
	1	14,3	1,4	5,7	3,00
	2	5,9	0,7	6,6	5,20

3	5,4	0,7	6,1	2,45
4	4,2	0,6	4,8	2,35
5	4,5	0,6	5,1	2,45
<i>Escherichia coli</i> O157:H7				
1	8,2	1,1	9,3	3,00
2	4,1	0,7	4,8	5,20
3	4,4	0,7	5,1	2,45
4	3,2	0,6	3,8	2,35
5	3,8	0,6	4,4	2,45

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Druk wytłuszczony – okres stabilności mikrobiologicznej zbliżony do czasu obróbki wędzarniczej;

Bold – microbial stability time appearing close to the time period of smoking the products analysed.

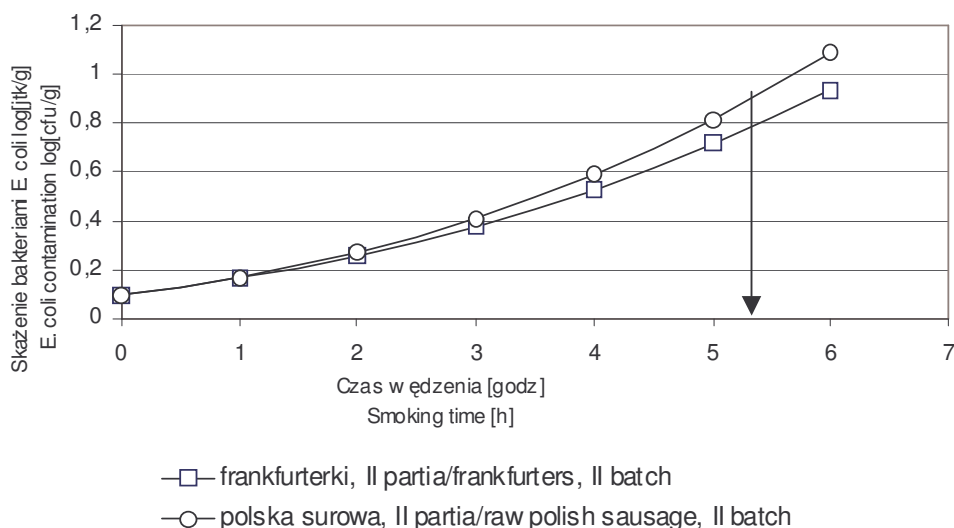
T a b e l a 3

Zmienność okresów stabilności mikrobiologicznej badanych wyrobów mięsnych.

Variability of microbial stability as stated for the meat products studied.

Rodzaj wyrobu Product type	Parametry rozkładu Distribution parameters	Gatunek bakterii Bacteria species	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
Schab surowy Raw pork loin	\bar{x} [godz.] / [h]	17,5	5,8
	SD [godz.] / [h]	16,6	0,5
	V [%]	94,9	9,0
Frankfurterki Frankfurters	\bar{x} [godz.] / [h]	13,3	5,7
	SD [godz.] / [h]	6,9	0,6
	V [%]	51,9	11,5
Kiełbasa polska surowa Raw Polish sausage	\bar{x} [godz.] / [h]	8,7	5,5
	SD [godz.] / [h]	2,1	1,9
	V [%]	24,6	35,7

Obliczone w prognozie okresy stabilności mikrobiologicznej badanych wyrobów charakteryzowały się bardzo dużą zmiennością w poszczególnych partiach produkcyjnych. W dwóch przypadkach, to jest w drugiej partii produkcyjnej frankfurterek oraz w drugiej partii kiełbasy polskiej surowej, wyliczone okresy stabilności mikrobiologicznej *Escherichia coli* O157:H7 były niemal takie same lub krótsze od czasów wędzenia. Prognozę krzywych wzrostu Gomperta *E. coli* O157:H7 tych przypadków przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Szacowanie krzywych wzrostu *Escherichia coli* O157:H7 w procesie wędzenia (strzałką zaznaczono koniec wędzenia tych partii wyrobów).

Fig. 1. Predicting the growth curves of *Escherichia coli* O157:H7 during the smoking (the arrow indicates that the smoking process of a particular production batch of products studies has ended).

Duża zmienność parametrów peklowania surowców w połączeniu ze zróżnicowanym czasem wędzenia sprawiają, że obliczone w prognozie okresy stabilności mikrobiologicznej wyrobów są również bardzo zróżnicowane (tab. 3).

Współczynniki zmienności okresów stabilności mikrobiologicznej badanych wyrobów wynoszą od 9 do 95% (schab surowy; *E. coli*). Wskazuje to, że jakość mikrobiologiczna poszczególnych partii produkcyjnych badanych wyrobów mogła być potencjalnie bardzo zróżnicowana.

Połączenie różnych czynników fizykochemicznych z powodzeniem może zabezpieczać produkty przed rozwojem mikroflory chorobotwórczej. Jednakże w rzeczywistych warunkach produkcyjnych surowych wyrobów mięsnych mogą zaistnieć takie wzajemne interakcje cech surowców, substancji peklujących, czasu i temperatury wędzenia, w wyniku których prawdopodobne jest zakończenie okresów lag-fazy niektórych bakterii chorobotwórczych. Dlatego szybkie i efektywne wychładzanie poprodukcyjne oraz utrzymanie ciągłości łańcucha chłodniczego będzie warunkować bezpieczeństwo mikrobiologiczne tych wyrobów.

Wnioski

1. W rzeczywistych warunkach produkcji wędzonych, surowych i peklowanych wyrobów mięsnych temp. wędzenia w zakresie 30–37°C może potencjalnie

- doprowadzić do stworzenia warunków umożliwiających zakończenie okresu lag-fazy niektórych bakterii chorobotwórczych.
2. Zakończenie czasu lag-fazy może wystąpić w jednej na pięć partii produkcyjnych dwóch gatunków wyrobów, czyli w 20% ich masy produkcyjnej. Sprzyjać temu będzie czas wędzenia dłuższy niż 4 godz. w zastosowanej temperaturze oraz zmienność zawartości soli i azotanów(III) w surowcach użytych do produkcji badanych wyrobów.
 3. Konieczna jest poprawa jakościowej i technologicznej efektywności peklowania w celu zapobieżenia możliwości realnego wystąpienia zagrożenia mikrobiologicznego.

Literatura

- [1] Faith N.G., Yousef A.E., Luchansky L.B.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoegenol, a phenolic component found in smoke. J. Food Safety, 1992, **12**, 303-314.
- [2] Fujikawa H., Kokubo Y.: Practical application of predictive microbiology software programs to HACCP plans. J. Food. Hyg. Soc. Japan., 2000, **42**, 252-256.
- [3] Giffel M.C., Zwietering M.H.: Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 1999, **46**, 135-149.
- [4] Guerra M.M., McLauchlin J., Bernardo F.A.: *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. Food Microbiol., 2001, **18**, 423-429.
- [5] Kołożyn-Krajewska D., Jałosińska-Pieńkowska M.: Założenia, zasady i przyszłość prognozowania mikrobiologicznego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 1999, **4 (21)**, 22-23.
- [6] Kurko W.I.: Chemiczne i fizykochemiczne podstawy procesu wędzenia. WPLiS. Warszawa 1963.
- [7] Leistner L.: Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int. J. Food Microbiol., 2000, **55**, 181-186.
- [8] Liddell K.G.: *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in central Scotland. Lancet, 1997, **349**, 502-503.
- [9] McClure P.J., Beaumont A.L., Shutherland J.P., Roberts T.A.: Predictive modeling of growth of *Listeria monocytogenes*. The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. Int. J. Food Microbiol., 1997, **34**, 221-232.
- [10] McDonald K., Sun D.: Predictive food microbiology for the meat industry: a review. Int. J. Food Microbiol., 1999, **52**, 1-27
- [11] Mellefont L.A., McMeekin T.A., Ross, T.: Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol., 2003, **82**, 45-58.
- [12] Pathogen Modeling Program manual, version 4.0, USDA Eastern Regional Center.
- [13] Pezacki W.: Przetwarzanie jadalnych surowców rzeźnych. PWN. Warszawa 1984.
- [14] PN-73/A-82112, Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości soli kuchennej.
- [15] PN-74/A-82114, Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości azotynów i azotanów.
- [16] Skinner G.E., Larkin J.W.: Mathematical modelling of microbial growth: a review. J. of Food Safety, 1994, **14**, 175-217.
- [17] Summer J., Krist K.: The use of predictive microbiology by the Australian meat industry. Int. J. Food Microbiol., 2002, **73**, 363-366.
- [18] Tilden J. Jr., Young W., McNamara A.M.: A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. Am. J. Publ. Hlth., 1996, **86**, 1142-1145.
- [19] Walls I., Scott V.N.: Validation of predictive mathematical models describing growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. J. Food Protection, 1996, **59**, 1331-1335.

- [20] Walls I., Scott V.N.: Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Protection, 1997, **60**, 1142-1145.

PREDICTING THE EFFECT OF SMOKING CONDITIONS ON THE GROWTH OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN RAW MEAT PRODUCTS

S u m m a r y

The objective of the study was to predict the effect of smoking conditions applied to smoke three types of raw meat products on the potential for *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 to grow in those products.

The study was performed in a selected meat processing plant, under real production conditions as existing during any regular, commercial production process carried out in this plant

The study target comprised five batches of the following products being produced: a raw pork loin, Frankfurter sausages, and a raw soft 'Polish' sausage. The following parameters of products being smoked were determined: contents of salts and nitrates(III), pH, and the smoking process temperatures within a range from 30°C to 37°C. The pathogen growth levels being predicted were calculated using a Pathogen Modelling Software, version 6.0; the calculations performed included the parameters as determined above.

With regard to individual production batches of products under analysis, there were stated very high variations among the following parameters characterizing the same product type in all 5 batches: contents of nitrates (III) ($V = 23.63\text{--}59.6\%$), contents of salts ($V = 10.82\text{--}17.78\%$), and real smoking times ($V = 35.1\text{--}39.1\%$). Consequently, there were high differences among predicted periods of microbial stability of *Escherichia coli* O157:H7 calculated for each individual production batch of raw pork loin ($V = 9\text{--}95\%$). The smoking conditions applied in this plant caused that, in the case of the Polish sausages and Frankfurter sausages, it was possible for the lag-phase of *Escherichia coli* O157:H7 to end prior to the completion of the entire smoking process.

Key words: predictive microbiology, smoking, raw meat products. ☒

KRZYSZTOF PUDYSZAK, JANUSZ POMIANOWSKI, TERESA MAJEWSKA

WARTOŚĆ RZEŻNA I JAKOŚĆ MIĘSA PERLIC UBIJANYCH W RÓŻNYM WIEKU

Streszczenie

W Polsce nie prowadzi się przemysłowej produkcji perlic rzeźnych, ale potrzeby rynku mięsnego mogą się zmienić w związku ze zmianą upodobań konsumentów oraz rozszerzeniem rynków zbytu. Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu wieku na wartość rzeźną i jakość mięsa perlic. Nie uwzględniono wpływu płci, gdyż u młodych perlic brak jest wyraźnego dymorfizmu płciowego.

Badania przeprowadzono na perlicach żywionych mieszankami pełnoporcjowymi bez antybiotykowego stymulatora wzrostu i odchowywanych do 18. tygodnia życia. Ubój ptaków wykonywano w 14., 16. i 18. tygodniu życia. W każdym z terminów ubijano po 10 ptaków, określając wydajność rzeźną, procentowy udział poszczególnych mięśni, pH oraz skład chemiczny mięśni piersiowych i nóg.

Średnia masa ciała perlic w kolejnych terminach uboju: 14., 16., 18. tygodniu życia wynosiła odpowiednio: 1181 g, 1314 g i 1373 g. Wydajność rzeźna perlic niezależnie od ich wieku była zbliżona i wahała się od 73,61 do 74,49%. Największy udział mięśni piersiowych, udowych i podudzi stwierdzono u perlic ubijanych w 14. tygodniu życia, stanowiły one odpowiednio: 17,66, 10,23 i 6,13%. Odczyn pH mięśni wraz z wiekiem ptaków obniżał się, a odczyn pH mięśni nóg był zawsze wyższy od odczynu mięśni piersiowych. Zawartość białka ogólnego w mięśniach piersiowych wynosiła od 23,72 do 26,37% a w mięśniach podudzi od 21,04 do 23,20%, a zawartość tłuszczu odpowiednio: od 0,84 do 1,12% i od 2,38 do 5,86%. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że odchów perlic przeznaczonych do uboju powinien być zakończony około 14 tygodnia życia.

Słowa kluczowe: wiek perlic, wartość rzeźna, pH, skład chemiczny, jakość mięsa.

Wstęp

Perlice domowe pochodzą od dzikiej formy *Numida meleagris* L., zamieszkującej stepowe tereny Afryki i Madagaskar. Ze względu na duże zdolności adaptacyjne, hodowla perlic rozpowszechniona jest w różnych regionach świata. W Europie, wśród producentów i konsumentów mięsa perliczego przodują Francja i Włochy. Mięso perlicze jest tam bardzo cenione ze względu na większą o 1,0–1,3% zawartość białka i

Dr inż. K. Pudyszak, prof. dr hab. T. Majewska, Katedra Drobiarstwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, dr inż. J. Pomianowski, Instytut Towaroznawstwa i

mniejszą o 0,4–2,5% zawartość tłuszczu niż mięso kurcząt i indyków rzeźnych [13]. We Francji w intensywnej produkcji uzyskuje się perlice, które w 76. dniu życia osiągają 1,8 kg [3].

W Polsce hodowla perlic była popularna w latach 70. i 80. XX w. W tym okresie, również w naszym kraju prowadzono badania tego gatunku ptaków [5, 9, 10]. W wyniku przeprowadzonych badań opracowano program żywienia perlic, w wyniku którego 12. tygodniowe ptaki uzyskują masę ciała ok. 1 kg. Obecnie nie ma zorganizowanej hodowli i reprodukcji tych ptaków. Nawet w chowie przydomowym ten gatunek ptaków utrzymywany jest sporadycznie. Hodowlę można jednak w każdej chwili odtworzyć z małych populacji utrzymywanych w różnych regionach Polski, dlatego też doskonalenie żywienia perlic jest w naszym kraju nadal przedmiotem prowadzonych badań [6, 7].

Zgodnie z europejskimi standardami handlowymi na mięso drobiowe, dotyczącymi kryteriów chowu drobiu, ubój perlic w przypadku chowu ściółkowego możliwy jest w 82. dniu życia. W tradycyjnym chowie z wybiegiem minimalny wiek uboju perlic wynosi 94 dni [1]. Przy wyborze terminu uboju ptaków powinno się uwzględniać także wartość rzeźną i jakość mięsa. Myasnikova [13] stwierdziła, że najkorzystniejszą wydajnością rzeźną oraz zawartością mięśni w tuszce charakteryzują się perlice o masie ciała 1200 g. Według Baeza i wsp. [2], na masę tuszki mają wpływ takie czynniki, jak genotyp, płeć i warunki odchowu. Wymienieni autorzy stwierdzili, że na procentowy udział mięśni piersiowych w tuszce istotny wpływ ma genotyp, a na zawartość tłuszczu zapasowego i skóry z tłuszczem podskórnym także płeć perlic.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu wieku na wartość rzeźną i jakość mięsa perlic.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiło 30 perlic chowanych na głębokiej ściółce. Pisklęta do badań pochodziły z własnych lęgów, po rodzicach zakupionych z drobnych gospodarstw. Przez cały okres odchowu ptaki żywiono do woli pełnoporcjowymi mieszankami bez antybiotykowego stymulatora wzrostu. Wartość pokarmową stosowanych mieszanek przedstawiono w tab. 1.

Ubój perlic wykonywano w 14., 16. i 18. tygodniu życia. W każdym okresie ubijano po 10 perlic. Wyboru ptaków do uboju dokonywano bez uwzględnienia płci, na podstawie masy ciała, stosując schemat losowania systematycznego, tak aby średnia masa ciała perlic wybranych do uboju była zbliżona do średniej masy ciała wszystkich ptaków w grupie. Wybrane w ten sposób perlice poddawano ubojowi, a następnie uproszczonej dysekcji, określając masę: tuszki patroszonej, mięśni piersiowych, ud i podudzi.

W ciągu 2 godz. od uboju określano odczyn mięśni przy użyciu cyfrowego testera kwasowości z elektrodą szklaną typu Eurosensor ESAgP-301, a następnie pobierano próbki mięśni piersiowych i udowych do oznaczania składu chemicznego. Zawartość suchej masy, białka surowego, tłuszczu surowego i popiołu oznaczano metodami konwencjonalnymi opisanymi przez Żagarską [17].

Tabela 1

Wartość pokarmowa mieszanek stosowanych w żywieniu perlic.
Nutritive value of the mixtures on which guinea fowls are fed.

Wyszczególnienie Specification	Okres [tygodnie] / Period [weeks]		
	0-4	5-8	9-18
Energia metaboliczna [kcal] Metabolizable energy	2759	3117	3140
Białko ogółem [%] Total protein	26,14	17,86	15,95
Włókno surowe [%] Crude fibre	3,53	3,14	3,11
Lizyna [%] Lisine	1,70	1,05	0,92
Metionina [%] Methionine	0,62	0,45	0,44
Metionina +cystyna [%] Methionine + cystine	1,02	0,77	0,73
Treonina [%] Threonine	0,99	0,67	0,59
Wapń [%] Calcium	1,25	0,91	0,89
Fosfor ogólny [%] Total phosphorus	0,96	0,71	0,67
Fosfor przyswajalny [%] Assimilatable phosphorus	0,68	0,49	0,46
Sód [%] Sodium	0,15	0,16	0,16
Chlor [%] Chlorine	0,17	0,18	0,20

Zebrany materiał liczbowy opracowano statystycznie jednoczynnikową analizą wariacji w układach ortogonalnych oraz testem Duncana przy użyciu programu statystycznego Stat-1 [12].

Wyniki i dyskusja

Średnia masa ciała perlic w kolejnych terminach ubojów (14., 16., 18., tydzień życia) była zróżnicowana i wynosiła 1181 g, 1314 g i 1373 g (tab. 2). Różnice między średnimi masami ciała były statystycznie wysoko istotne ($P < 0,01$). Wydajność rzeźna niezależnie od terminu uboju była zbliżona i statystycznie nieistotna (od 73,61 do

74,49%). W 14. tygodniu życia perlic udział zarówno mięśni piersiowych, jak i udowych oraz podudzi był statystycznie istotnie ($P < 0,05$; $P < 0,01$) wyższy niż u ubijanych w 16. i 18. tygodniu. Łączny udział mięśni (piersiowych, udowych i podudzi) w 14. tygodniu życia ptaków był większy niż w 16. i 18. tygodniu, odpowiednio o 1,7 i 4,1%. Według innych autorów na skład tkankowy tuszek perliczych ma wpływ masa ciała oraz pochodzenie i płeć perlic [2, 13].

Tabela 2

Wartość rzeźna tuszek perliczych.
Slaughter value of guinea fowl's carcass.

Wyszczególnienie Specification	Miary statystyczne Statistical measures	Wiek [tygodnie] / Age [weeks]		
		14	16	18
Masa ciała [g] Body weight	\bar{X}	1181 ^A	1314 ^B	1373 ^C
	v	4,60	7,38	5,06
Tuszka patroszona [%] Eviscerated carcass	\bar{X}	73,61	74,49	74,22
	v	1,98	1,23	3,44
Mięśnie piersiowe [%] Breast muscle	\bar{X}	17,81 ^A	17,66 ^a	16,48 ^{Bb}
	v	3,96	3,10	10,15
Mięśnie udowe [%] Thigh muscle	\bar{X}	11,32 ^A	10,23 ^B	9,04 ^C
	v	5,10	5,23	15,72
Mięśnie podudzi [%] Drumstick muscle	\bar{X}	6,60 ^A	6,13 ^A	5,89 ^B
	v	6,62	8,40	8,96
Mięśnie piersiowe i nóg [%] Breast and leg muscles	\bar{X}	35,72 ^{Aa}	34,02 ^{Ab}	31,66 ^B
	v	4,15	2,17	7,12

\bar{X} - wartość średnia / mean value; v – współczynnik zmienności / variation coefficient;

Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie: a, b – $P \leq 0,05$; A, B, C – $P \leq 0,01$.

Mean values designated by different letters are significantly differ: a, b – $P \leq 0,05$; A, B, C – $P \leq 0,01$.

Wartość pH mięśni piersiowych, udowych i podudzi w 14. tygodniu była statystycznie istotnie wyższa ($P < 0,01$) niż w 16. i 18. tygodniu (tab. 3). Wyjątek stanowiło pH mięśni udowych, które było jednakowe w 14. i 18. tygodniu. Baeza i wsp. [3] badając dynamikę zmian pH w mięśniach piersiowych perlic stwierdzili, że po 15 min od uboju wynosi ono 6,1–6,2 i zmniejsza się do 5,6–5,7 po 24 h. Odnotowane w badaniach własnych tendencję do zmniejszania się odczynu mięśni wraz z wiekiem ptaków potwierdzają badania prowadzone przez Szałkowską i Mellera [16] na kurczętach brojlerach. Także badania prowadzone na gęsiach przez Baturę i wsp. [4] potwierdzają wyższą wartość pH mięśni nóg niż mięśni piersiowych. Jak wskazują

badania Kiesslinga [8], niższa wartość pH mięśni piersiowych niż nóg, wynika z rodzaju i ilości włókien mięśniowych.

Tabela 3

Wpływ wieku perlic na pH mięśni zmierzone 2 godz. po uboju.

Effect of the guinea fowls' age on pH of muscles measured two hours after the slaughter performed.

Wyszczególnienie Specification	Miary statystyczne Statistical measures	Wiek [tygodnie] / Age [weeks]		
		14	16	18
Mięśnie piersiowe Breast muscles	\bar{X}	6,4 ^A	6,1 ^B	6,1 ^B
	v	4,70	3,24	2,14
Mięśnie udowe Thigh muscles	\bar{X}	6,5 ^A	6,3 ^B	6,5 ^A
	v	2,29	3,06	3,03
Mięśnie podudzi Drumstick muscles	\bar{X}	6,7 ^A	6,5 ^B	6,5 ^B
	v	3,31	2,78	2,40

Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie: A, B – $P \leq 0,01$

Mean values designated by different letters are significantly differ: A, B – $P \leq 0,01$.

Tabela 4

Skład chemiczny mięśni piersiowych perlic.

Chemical composition of guinea fowls' breast muscles.

Wyszczególnienie Specification	Miary statystyczne Statistical measures	Wiek [tygodnie] / Age [weeks]		
		14	16	18
Woda [%] Water	\bar{X}	72,02 ^b	71,10 ^B	73,67 ^{Aa}
	v	1,71	1,23	1,83
Białko [%] Protein	\bar{X}	25,53 ^B	26,37 ^B	23,72 ^A
	v	4,41	4,21	4,35
Tłuszcz [%] Fat	\bar{X}	1,02	0,84	1,12
	v	37,11	49,48	55,93
Popiół [%] Ash	\bar{X}	1,07	1,28	1,08
	v	43,94	16,63	37,53

Wartości oznaczone różnymi literami różnią się od siebie: a, b – $P \leq 0,05$; A, B – $P \leq 0,01$;

Mean values designated by different letters are significantly differ: a, b – $P \leq 0,05$; A, B – $P \leq 0,01$.

Tabela 5

Skład chemiczny mięśni udowych perlic.
Chemical composition of guinea fowls' thigh muscle.

Wyszczególnienie Specification	Miary statystyczne Statistical measures	Wiek [tygodnie] / Age [weeks]		
		14	16	18
Woda [%] Water	\bar{X}	73,14	71,93	72,36
	v	1,55	2,74	1,72
Białko [%] Protein	\bar{X}	23,20 ^A	21,26 ^B	21,04 ^B
	v	2,37	0,69	4,06
Tłuszcz [%] Fat	\bar{X}	2,38 ^B	5,86 ^A	5,35 ^A
	v	63,35	30,89	26,28
Popiół [%] Ash	\bar{X}	1,30	1,06	1,25
	v	19,59	12,95	17,77

Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie: A, B – $P \leq 0,01$
Mean values designated by different letters are significantly differ: A, B – $P \leq 0,01$

Skład chemiczny mięśni piersiowych przedstawiono w tab. 4. Wiek ubijanych perlic wpływał w sposób statystycznie istotny ($P < 0,05$; $P < 0,01$) na zawartości wody i białka w mięśniach. Mięśnie piersiowe perlic ubijanych w 14. i 16. tygodniu życia charakteryzowały się mniejszą zawartością wody (o 1,6–2,6%) i większą zawartością białka (o 1,8–2,6%) niż mięśnie perlic ubijanych w 18. tygodniu życia. W mięśniach udowych stwierdzono statystycznie istotne różnice ($P < 0,01$) pod względem zawartości białka i tłuszczu (tab. 5). Mięśnie udowe perlic ubijanych w 14. tygodniu życia zawierały więcej białka (o 1,9–2,2%) i mniej tłuszczu (o 3,0–3,5%) niż mięśnie perlic ubijanych w 16. i 18. tygodniu życia.

Spośród czterech podstawowych gatunków drobiu, największą wartością odżywczą i dietetyczną odznacza się mięso indycze [11]. W badaniach własnych, zawartość białka zarówno w mięśniach piersiowych jak i udowych perlic była wyższa, a tłuszczu w mięśniach udowych niższa od stwierdzonej w badaniach prowadzonych na indykach [14].

Wnioski

1. Najlepszymi wynikami wydajności rzeźnej i procentowym udziałem mięśni w tuszce charakteryzowały się perlice ubijane w 14. tygodniu życia. Również skład chemiczny mięśni tych ptaków okazał się najkorzystniejszy. Dlatego też odchow perlic przeznaczonych do uboju powinien trwać około 14 tygodni.
2. Mięśnie piersiowe perlic, w porównaniu z mięśniami udowymi, cechują się wyższym pH i większą zawartością białka, a mniejszą tłuszczu.

Literatura

- [1] Anders E.: Kryteria chowu drobiu w europejskich standardach handlowych na mięso drobiowe. *Polskie Drobiarstwo*, 2002, **1**, 16-18.
- [2] Baeza E., Juin H., Rebours G., Constantin P., Marche G., Leterrier C.: Effect of genotype, sex and rearing temperature on carcass and meat quality of guinea fowl. *Br. Poultry Sci.*, 2001, **42**, 470-476.
- [3] Baeza E., Lessire M., Juin H., Chartrin P., Berri C.: Objective criteria to differentiate carcass and meat quality of label and standard guinea fowls. *Proceedings of XVIth European Symposium on the Quality of Poultry Meat*, France, 2003, pp. 393-400.
- [4] Batura J., Karpińska M., Bojarska U.: Wartość odżywcza i technologiczna mięsa czterech rodów doświadczalnych gęsi. *Zesz. Nauk. Przeg. Hod.*, 1998, **36**, 357-366.
- [5] Faruga A., Puchajda H.: Wpływ niektórych zabiegów hodowlanych na wyniki tuczu młodych perlic. *Med. Wet.*, 1976, **7**, 426-428.
- [6] Frączak M., Rutkowski A., Józefiak D.: Porównanie kilku wariantów recepturowych mieszanek paszowych stosowanych w odchowie perlic rzeźnych. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 2002, **16 Supl.**, 205-210.
- [7] Frączak M., Rutkowski A., Józefiak D.: Choice feeding for laying guinea fowl in free range system. *Proceedings of 14th Eur. Symp. Poult. Nutr.*, Lillehammer, Norway, 2003, pp. 245-246.
- [8] Kiessling K., H.: Muscle structure and function in the goose, quail, pheasant, guinea hen and chicken. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1977, **57B**, 287-292.
- [9] Mazanowski A., Mazanowska K., Faruga A.: Ocena pełnoporcjowych mieszanek paszowych dla perlic brojlerów. *Zesz. Nauk. ART Olszt. Zootechnika*, 1982, **24**, 85-94.
- [10] Mazanowski A., Szukalski G., Faruga A.: Określenie przydatności mieszanek z ograniczonym udziałem białka w żywieniu młodych perlic. *Zesz. Nauk. ART Olszt. Zootechnika*, 1982, **24**, 119-132.
- [11] Michalik D.: Porównanie wykorzystania paszy przez różne gatunki młodych ptaków rzeźnych. *Acta Acad. Agricult. Tech. Ols. Zootechnica*, 1994, **39 Supl. C**.
- [12] Mikołajczak J.: STST 1. Wyd. ART Olsztyn 1992.
- [13] Myasnikova O.: Meat qualities of guinea fowl of Zagorskaya Belogradaya breed. *Proceedings of the XIII European Symposium on the Quality of Poultry Meat*, Poznań, 1997, pp. 247-249.
- [14] Puchajda H., Faruga A., Kłosowska D., Batura J., Meller Z.: Wartość odżywcza i technologiczna mięsa indyczek rzeźnych różnego pochodzenia. *Zesz. Nauk. Przeg. Hod.*, 1999, **45**, 463-470.
- [15] Sauvier B., Plouzeau M.: Technical and economical aspects of guinea fowl production in the world. *Proceedings World's Poultry Congress*, Amsterdam, 1992, pp. 319-324.
- [16] Szałkowska H., Meller Z.: Wady PSE i DFD w mięsie kurcząt brojlerów. *Zesz. Nauk. Przeg. Hod.*, 1998, **36**, 343-348.
- [17] Żagarska Z.: Ćwiczenia z analizy żywności. Wyd. UWM. Olsztyn 2003.

SLAUGHTER VALUE AND MEAT QUALITY OF GUINEA FOWLS SLAUGHTERED AT A DIFFERENT AGE

S u m m a r y

Slaughter guinea fowl are not produced in Poland on an industrial scale, but the demands of the meat market can change at any time to meet consumer demand or in reaction to expanding markets. The objective of the study was to determine the effect of age of the birds on slaughter yield and their meat quality. No effect of the bird's gender was included as young guinea fowls showed no distinct sexual dimorphism.

The study involved guinea fowl fed on full-portion mixtures containing no antibiotic growth stimulator; the birds were reared up to the 18th week of life. The bird slaughter was performed on week 14, 16, and 18 of life, and 10 birds were slaughtered in each of the three terms, and at the same time, the following factors were determined: slaughter yield, composition, pH, and chemical composition of breast and leg muscles.

Mean weights of the guinea fowl bodies were: 1181 g, 1314 g, and 1373 g, respectively in the subsequent slaughter terms 14, 16 and 18 weeks of life. The slaughter yields of the guinea fowls, regardless of their ages, were similar and ranged from 73.61 to 74.49%. The guinea fowls slaughtered on week 14 of life had the highest per cent contents of breast, thigh, and leg muscles; they were 17.66%, 10.23%, and 6.13%, respectively. The pH of muscles decreased with bird age and pH of leg muscles was always higher than pH of breast muscles. The content of total protein in breast muscles ranged from 23.72 to 26.37% and in the leg muscles: from 21.04 to 23.20%. The fat content ranged from 0.84 to 1.12% and from 2.38 to 5.86%, respectively. The results of this study indicate that the slaughter guinea fowl rearing period should be completed on, approximately, week 14 of life.

Key words: age of guinea fowls, slaughter value, pH, chemical composition, meat quality. ☒

**GRAŻYNA LEWANDOWICZ, KRYSZYNA PROCHASKA,
WŁODZIMIERZ GRAJEK, WOJCIECH KRZYŻANIAK,
ANGELIKA MAJCHRZAK, TADEUSZ CIAPA**

WŁAŚCIWOŚCI UŻYTKOWE MALTODEKSTRYN W UKŁADACH EMULSYJNYCH

Streszczenie

Celem pracy było określenie właściwości powierzchniowych maltodekstryn o różnym stopniu scukrzenia i zróżnicowanej technologii otrzymywania oraz weryfikacja ich funkcjonalności w układach emulsyjnych. Weryfikacji dokonano poprzez ocenę tekstury i właściwości reologicznych majonezów niskotłuszczowych, otrzymanych na bazie maltodekstryn. Stwierdzono, że maltodekstryny wykazują aktywność powierzchniową zarówno w układzie woda/powietrze, jak i woda/olej, przy czym obserwuje się zwiększenie aktywności powierzchniowej w miarę wzrostu stopnia hydrolizy. Na właściwości powierzchniowe maltodekstryn pozytywnie wpływa zastąpienie tradycyjnego procesu produkcyjnego hydrolizą prowadzoną w ekstruderze. Pomimo stwierdzonej aktywności powierzchniowej, maltodekstryny nie wykazują zdolności emulgującej, niezależnie od stopnia scukrzenia oraz metody otrzymywania. Natomiast w układach złożonych, jakimi są majonezy niskotłuszczowe, wykazują zróżnicowane oddziaływanie w stosunku do badanych białek. W konsekwencji majonezy wykonane na bazie różnych białek i różnych maltodekstryn wykazują znaczne zróżnicowanie parametrów uniwersalnego profilu tekstury oraz właściwości reologicznych, w zależności od surowców użytych do ich przyrządzenia. Pomimo obserwowanego zróżnicowania właściwości, badane majonezy pod względem reologicznym stanowią płyny rozrzedzane ścinaniem i ich lepkość może być opisana za pomocą empirycznego równania Ostwalda de Waele'a.

Słowa kluczowe: maltodekstryny, ekstruzja, właściwości powierzchniowe, emulsje, majonezy, tekstura, właściwości reologiczne.

Wprowadzenie

Maltodekstryny – produkty niepełnej hydrolizy skrobi znajdują szerokie zastosowanie w produkcji żywności. Są używane jako neutralne wypełniacze, nośniki, składniki stabilizujące i teksturotwórcze. Szczególne znaczenie mają maltodekstryny jako funkcjonalne składniki układów emulsyjnych, gdyż niejednokrotnie mogą być

Dr hab. inż. G. Lewandowicz, prof. dr hab. W. Grajek, mgr inż. W. Krzyżaniak, A. Majchrzak, T. Ciapa, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48; 60-627 Poznań, dr hab. inż. Krystyna Prochaska, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Poznańska, Pl. M. Skłodowskiej-Curie, Poznań

stosowane jako zamienniki tłuszczu [11]. Produkcja maltodekstryn może odbywać się z użyciem różnego typu enzymów, co implikuje zróżnicowanie strukturalne otrzymanych produktów, a co za tym idzie zróżnicowanie właściwości fizykochemicznych i użytkowych [5, 10]. Dodatkowym źródłem zróżnicowania właściwości maltodekstryn może być zastosowanie alternatywnych procesów technologicznych, takich jak np. ekstruzja [3, 5]. Przydatność różnorodnych produktów spożywczych w tworzeniu układów emulsyjnych była tradycyjnie oceniana na podstawie określenia zdolności emulgującej, trwałości emulsji, jak również poprzez ocenę cech sensorycznych i reologicznych [9, 11]. Badania aktywności powierzchniowej w układach płyn/płyn, powszechnie wykorzystywane przy opisie właściwości surfaktantów, nie były dotychczas stosowane do oceny produktów spożywczych.

Celem pracy było określenie właściwości powierzchniowych maltodekstryn o różnym stopniu scukrzenia i zróżnicowanej technologii otrzymywania oraz weryfikacja ich funkcjonalności w układach emulsyjnych.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły: skrobia ziemniaczana Superior Standard produkcji WPPZ w Luboniu, maltodekstryny produkcji SPPZ w Łobzie, gluten pszeniczny produkcji ZPZ w Niechlowie oraz skrobia modyfikowana (E 1422) „Adanet CS” produkcji Centralnego Laboratorium Przemysłu Ziemniaczanego w Luboniu. Do otrzymywania majonezów użyto oleju rzepakowego oraz niezbędnych handlowych produktów spożywczych.

Ekstruzyjną hydrolizę enzymatyczną prowadzono za pomocą handlowych preparatów enzymatycznych firmy Novo Nordisk (Dania) tj. termostabilnej α -amylazy bakteryjnej (produkowanej przez modyfikowane szczepy *Bacillus*) o nazwie handlowej Termamyl S oraz bakteryjnej α -amylazy (produkowanej przez wyselekcjonowane szczepy *Bacillus amyloliquefaciens*) o nazwie handlowej BAN 480 L. Skrobię ziemniaczaną nawilżano wodnym roztworem enzymów do wilgotności 35%. Proces prowadzono w mieszarce w temp. 25°C w czasie 0,5 h w celu ujednoczenia mieszaniny. Tak przygotowany materiał poddawano ekstruzji w czterosekcyjnym ekstruderze dwuślimakowym Krupp Werner & Pfleinderer, typ ZSK 25P8.2. Zastosowano różne warunki procesu w zależności od enzymu i tak: Termamyl S – 0,7 ml/kg s.s. skrobi, prędkość ślimaka 40 obr./min; BAN 480 L – 1,0 ml/kg s.s. skrobi, prędkość ślimaka 60 obr./min. Temperatura w poszczególnych sekcjach ekstrudera wynosiła: 20, 100, 120 i 140°C. W dalszej części tekstu użyto następujących określeń: maltodekstryna ekstruzyjna T (produkt otrzymany z zastosowaniem preparatu Termamyl S) oraz maltodekstryna ekstruzyjna B (produkt otrzymany z zastosowaniem preparatu BAN 480L)

Zawartość suchej substancji skrobi oraz maltodekstryn oznaczano zgodnie z PN-78/A-74701 [7].

Wartość równoważnika glukozowego DE określano zgodnie z PN-EN ISO 5377:2001 [8].

Napięcie powierzchniowe i międzyfazowe oznaczano metodą odrywania pierścienia du Noüy'a za pomocą tensiometru K12 firmy Krüss (Niemcy). Badania prowadzono w temp. 210°C. Jako modelową fazę olejową zastosowano toluen. Badane roztwory wodne zawierające od 10^{-3} do 1% analizowanych maltodekstryn uzyskiwano drogą kolejnych rozcieńczeń. Zdolność obniżania napięcia powierzchniowego, jak i międzyfazowego badanych pochodnych scharakteryzowano za pomocy wybranych parametrów adsorpcji zestawionych w tab. 1. i 2., wyznaczonych w oparciu o wartości współczynników izotermy Szyszkowskiego, zastosowanej do aproksymacji danych eksperymentalnych [1].

Zdolność emulgującą i trwałość termiczną emulsji oznaczano zmodyfikowaną metodą opracowaną przez Yasamatsu i wsp. [13]. W tym celu 7,0 g maltodekstryny rozpuszczano w 100 ml wody destylowanej, następnie stopniowo dodawano 100 ml oleju i miksowano układ przy użyciu miksera Ultrathurax IKA (Niemcy) z prędkością 6000 obr./min w ciągu 2 min. W przypadku badania glutenu 7,0 g próbki rozpuszczano w roztworze 10 ml octu spirytusowego o stężeniu 10% i 90 ml wody. Otrzymaną emulsję poddawano działaniu siły odśrodkowej w ultrawirówce przy prędkości obrotowej 3000 obr./min w ciągu 15 min. Aktywność emulgującą [%] wyliczano ze stosunku objętości fazy zemulgowanej do całkowitej objętości układu. W celu oznaczenia trwałości termicznej emulsji przygotowaną jak wyżej emulsję ogrzewano w łaźni wodnej, w temp. 80°C, przez 30 min. Następnie schładzano pod strumieniem zimnej wody w ciągu 15 min. Całość łagodnie mieszano za pomocą bagietki i poddawano działaniu siły odśrodkowej w ultrawirówce przy prędkości obrotowej 3000 obr./min w ciągu 15 min. Trwałość termiczną emulsji [%] wyliczano ze stosunku objętości fazy zemulgowanej do całkowitej objętości układu. Pomiary powtarzano trzykrotnie, następnie obliczano wartość średnią oraz przedział ufności przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$ [2].

Majonezy sporządzano w porcjach po 300 g wg następującej receptury: olej – 150,0 g; Adanet CS – 9,0 g; maltodekstryna – 9,0 g; cukier – 9,0 g; sól – 3,0 g; benzoesan sodu 0,6 g; ocet 10-procentowy – 12 g; musztarda – 6,0 g; żółtko jaja – 18 g lub zamiennie gluten 9,0 g. Całość uzupełniano wodą do 300 g. Z maltodekstryny, cukru, skrobi modyfikowanej, soli oraz benzoesanu sodu sporządzano suchą mieszankę, którą przy intensywnym mieszaniu wsypywano do wody. Po utworzeniu kleiku dodawano żółtko i musztardę, a następnie przy wolnym mieszaniu 2/3 oleju. Zwiększając obroty mieszadła dodawano na przemian ocet i resztę oleju. W przypadku majonezu na bazie glutenu najpierw gluten wsypywano do wody przy ciągłym mieszaniu, a następnie dodawano ocet i musztardę. Nie przerywając mieszania dodawano powoli mieszankę suchych składników. Po utworzeniu kleiku dodawano również powoli przy wolnym mieszaniu 2/3 oleju, a następnie zwiększano obroty mieszadła i dodawano resztę oleju.

Badanie tekstury majonezów prowadzono przy użyciu teksturometru TA.XT2 firmy Stable Micro Systems (Wielka Brytania) z zastosowaniem następujących parametrów pomiaru: głowica 5 kg; sensor walcowy o średnicy 20,0 mm, głębokość penetracji 4,0 mm; szybkość opadania sensora przed testem 1,0 mm/s, w trakcie testu 0,5 mm/s; po teście 1,0 mm/s; czas pomiędzy jednym a drugim cyklem pomiarowym 5 s; temp. 20°C. W badaniach stosowano trzykrotne powtórzenia pomiarów, następnie wyznaczano wartość średnią oraz przedział ufności przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$ [2].

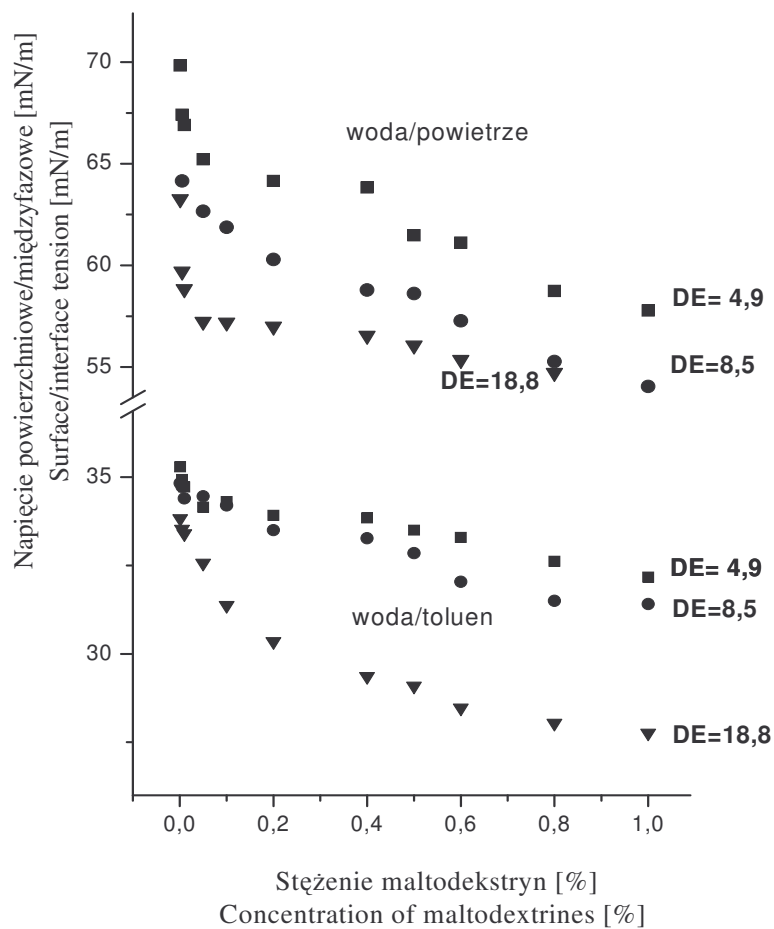
Badanie właściwości reologicznych majonezów prowadzono za pomocą reometru RheoStress 1 firmy Haake (Niemcy) w temp. 20°C, w układzie pomiarowym stożek – płytki C60/1⁰ Ti. Badania prowadzono w zakresie szybkości kątowej od 0,1 rad/s do 10 rad/s. Wyznaczano moduł sprężystości, moduł plastyczności, kąt przesunięcia fazowego oraz lepkość zespoloną. Do opisu zależności lepkości zespolonej od prędkości ścinania wykorzystano równanie Ostwalda de Waele'a. W celu wyznaczenia przedziału liniowej lepkośćsprężystości badanych majonezów określano zależność modułu sprężystości od zmieniającej się w zakresie od 0 do 5% amplitudy drgań o częstotliwości 1 Hz. Za wartość optymalną do badań przyjęto amplitudę 0,05%.

Wyniki i dyskusja

Maltodekstryny wykazywały aktywność powierzchniową w układzie woda/powietrze oraz woda/olej, przy czym zdolność obniżania napięcia powierzchniowego na granicy faz płyn/płyn zależała od stopnia ich hydrolizy i metody otrzymywania. W przypadku maltodekstryn handlowych (rys. 1) obserwowano zwiększenie aktywności powierzchniowej w miarę wzrostu stopnia ich hydrolizy, natomiast maltodekstryny ekstruzyjne (rys. 2) wykazywały silniejszą aktywność powierzchniową niż ich analogi handlowe o porównywalnym stopniu hydrolizy.

Swobodna energia adsorpcji w układzie woda/powietrze handlowych preparatów malała wraz ze wzrostem wartości DE (tab. 1). Natomiast w układzie woda/olej wzrostowi stopnia hydrolizy, tj. rosnącej wartości DE, towarzyszył wyraźny wzrost stężenia powierzchniowego w warstwie adsorpcyjnej.

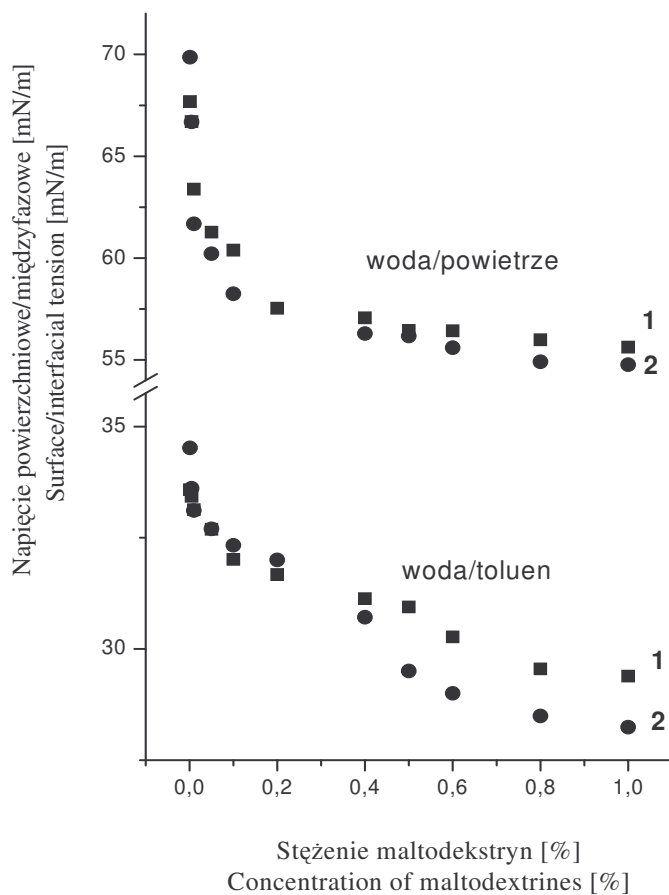
Pomimo wykazanej wyżej aktywności powierzchniowej maltodekstryn emulsje utworzone z ich roztworów i oleju ulegały natychmiastowemu rozwarstwieniu po zakończeniu mieszania układu. Wynika stąd, że niezależnie od stopnia scukrzenia oraz metody otrzymywania maltodekstryny nie mają zdolności emulgującej. Badane preparaty białkowe, czyli żółtko jaja i gluten pszeniczny wykazują wysoką aktywność emulgującą (tab. 2). Należy podkreślić, że emulsje utworzone z użyciem glutenu wykazują znacznie wyższą trwałość termiczną niż emulsje na bazie żółtka jaja kurzego.



Rys. 1. Aktywność powierzchniowa handlowych maltodekstryn w układzie woda/powietrze i woda/toluen.

Fig. 1. Surface activity of commercial maltodextrines in a water/air and a water/toluene system.

Majonezy wykonane na bazie różnych białek i różnych maltodekstryn wykazywały znaczne zróżnicowanie parametrów uniwersalnego profilu tekstury w zależności od surowców użytych do ich przyrządzenia (tab. 2). Majonezy zawierające gluten miały większą twardość od zawierających żółtko jaja. Rodzaj maltodekstryny w mniejszym stopniu wpływał na ten parametr majonezu.



Rys. 2. Aktywność powierzchniowa maltodekstryn ekstruzyjnych w układzie woda/powietrze i woda/toluen (1 – maltodekstryna T, 2 – maltodekstryna B).

Fig. 2. Surface activity of extrusion maltodextrines in the water/air and water/toluene systems (1–maltodextrine T, 2 – maltodextrine B).

Od powyższej reguły odbiegały majonezy sporządzone na bazie glutenu i maltodekstryny ekstruzyjnej B, których twardość była wyjątkowo mała. Przywieralność majonezów również wykazywała znacznie zróżnicowanie związane z rodzajem użytych surowców. Najwyższą przywieralnością charakteryzowały się majonezy wytworzone na bazie glutenu oraz maltodekstryn handlowych, natomiast zdecydowanie niskie wartości przywieralności wykazały majonezy, w przypadku których użyto maltodekstryny ekstruzyjnej B. Sprężystość była tym parametrem tekstury, który wykazywał zdecydowanie najmniejsze zróżnicowanie i w przypadku większości majonezów zawierał się w granicach 0,92–0,95. Wyjątek stanowił majonez wytworzony z udziałem żółtka jaja i maltodekstryny ekstruzyjnej B, którego elastyczność wynosiła 0,99. Również pozostałe parametry tego wyrobu tj. gumiaistość i

spoistość odbiegały od wartości, którymi charakteryzowały się pozostałe majonezy, przy czym należy zauważyć, że w przypadku gumiaści była to wartość najmniejsza, natomiast w przypadku spoistości największa.

Tabela 1

Parametry adsorpcji maltodekstryn handlowych oraz ekstruzyjnych.
Adsorption parameters of commercial and extrusion maltodextrines.

Maltodekstryna Maltodextrine	Parametry adsorpcji Adsorption parameters			
	Woda/powietrze Water/air		Woda/olej Water/toluene	
	$*\Gamma^{\infty} \cdot 10^6$ mol/m ²	$*-\Delta G_{ads}$ kJ/mol	$\Gamma^{\infty} \cdot 10^6$ mol/m ²	$-\Delta G_{ads}$ kJ/mol
Handlowa Commercial DE = 4,9	0,639	18,71	0,165	18,43
Handlowa Commercial DE = 8,5	0,751	20,95	0,237	16,38
Handlowa Commercial DE = 18,8	0,424	40,32	0,447	17,29
Ekstruzyjna T Extrusion T	0,781	21,3	0,250	23,25
Ekstruzyjna B Extrusion B	0,866	20,41	0,408	17,03

Objaśnienia: / Explanatory notes:

* wartości przeliczono na zawartość moli anhydroglukozy / the values were converted into a content of anhydroglucose moles

$-\Delta G_{ads}$ – swobodna energia adsorpcji / free energy of adsorption;

Γ^{∞} – nadmiar powierzchniowy na nasyconej granicy faz / surface excess at the saturated interface.

Porównując parametry tekstury majonezów (tab. 3) z właściwościami reologicznymi (rys. 3–5, tab. 4) dowiedziono, że nie jest możliwe znalezienie prostej korelacji pomiędzy tymi wielkościami. Analiza matematyczna przebiegu zmienności zależności lepkości zespolonej majonezów od szybkości ścinania wykazała, że charakteryzują się one we wszystkich przypadkach właściwościami płynów rozrzedzanych ścinaniem (rysunków nie przytoczono). Potwierdza to wysoka korelacja wzmiankowanych krzywych z empirycznym równaniem Ostwalda de Waele'a (tab. 4). Równanie Ostwalda de Waele'a było już wcześniej stosowane do opisu właściwości reologicznych napojów mlecznych oraz wodnych roztworów hydrokoloidów [6, 12]. Zmienność parametru K w równaniu Ostwalda de Waele'a oraz przebieg krzywych zależności modułów sprężystości i plastyczności od szybkości ścinania wskazuje natomiast na istotne różnice w oddziaływaniach pomiędzy badanymi

Tabela 2

Zdolność emulgująca oraz trwałość termiczna emulsji badanych białek.
Emulsifying activity and emulsion stability of investigated protein substances.

Substancja badana Substance investigated	Aktywność emulgująca [%] Emulsifying activity [%]	Trwałość termiczna emulsji [%] Thermal stability of emulsions [%]
Żółtko jaja Egg yolk	49,9 ± 0,3	25,0 ± 0,0
Gluten pszeniczny Wheat gluten	50,0 ± 0,0	49,9 ± 0,3

Tabela 3

Parametry tekstury badanych majonezów.
Texture parameters of mayonnaises.

Białko Protein	Maltodekstryna Maltodextrine	Twardość Hardness [N]	Przywieralność Adhesiveness [Ns]	Sprężystość Springiness	Gumiastość Gumminess [N]	Spoistość Cohesiveness
Żółtko jaja Egg yolk	handlowa commercial DE=9	0,21 ± 0,05	-1,6 ± 0,4	0,93 ± 0,0	0,15 ± 0,04	0,71 ± 0,04
Żółtko jaja Egg yolk	handlowa commercial DE=25	0,19 ± 0,02	-1,5 ± 0,1	0,93 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,74 ± 0,02
Żółtko jaja Egg yolk	ekstruzyjna T extrusion T	0,23 ± 0,08	-1,8 ± 0,7	0,94 ± 0,02	0,16 ± 0,05	0,71 ± 0,03
Żółtko jaja Egg yolk	ekstruzyjna B extrusion B	0,09 ± 0,00	-0,27 ± 0,07	0,99 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,81 ± 0,02
Gluten	handlowa commercial DE=9	0,31 ± 0,08	-2,3 ± 0,1	0,93 ± 0,01	0,21 ± 0,05	0,69 ± 0,02
Gluten	handlowa commercial DE=25	0,28 ± 0,05	-2,1 ± 0,1	0,92 ± 0,00	0,19 ± 0,02	0,69 ± 0,02
Gluten	ekstruzyjna T extrusion T	0,16 ± 0,02	-1,1 ± 0,2	0,95 ± 0,00	0,12 ± 0,03	0,77 ± 0,07
Gluten	ekstruzyjna B extrusion B	0,13 ± 0,00	-0,77 ± 0,05	0,95 ± 0,00	0,10 ± 0,02	0,75 ± 0,05

maltodekstrynami i białkami. W szczególności zwracają uwagę skrajnie różne wartości modułów sprężystości majonezów sporządzonych z udziałem maltodekstryny ekstruzyjnej B (rys. 3). Parametry te w przypadku majonezu zawierającego

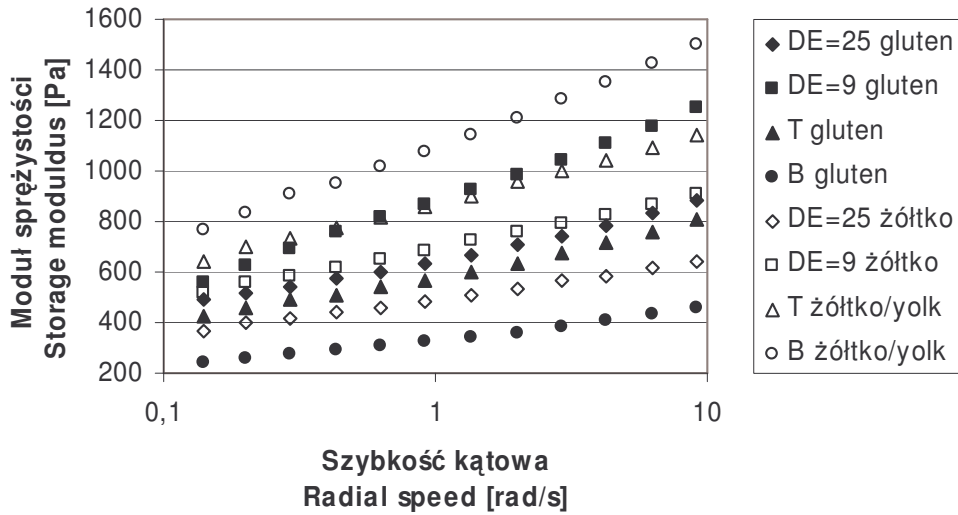
maltodekstrynę ekstruzyjną B i żółtko wykazywały najwyższe wartości, a w przypadku majonezu na bazie glutenu – najniższe. Maltodekstryny handlowe generalnie wykazywały wyższe wartości modułów zarówno sprężystości, jak i plastyczności w produktach o niższym DE = 9 niż wyższym DE = 25 stopniu scukrzenia. W przypadku maltodekstryny ekstruzyjnej T wartości modułów zarówno plastyczności, jak i sprężystości były wyższe w majonezach przyrządzonych na bazie żółtka.

Tabela 4

Parametry równania Ostwalda de Waele'a $\eta = K\omega^n$.

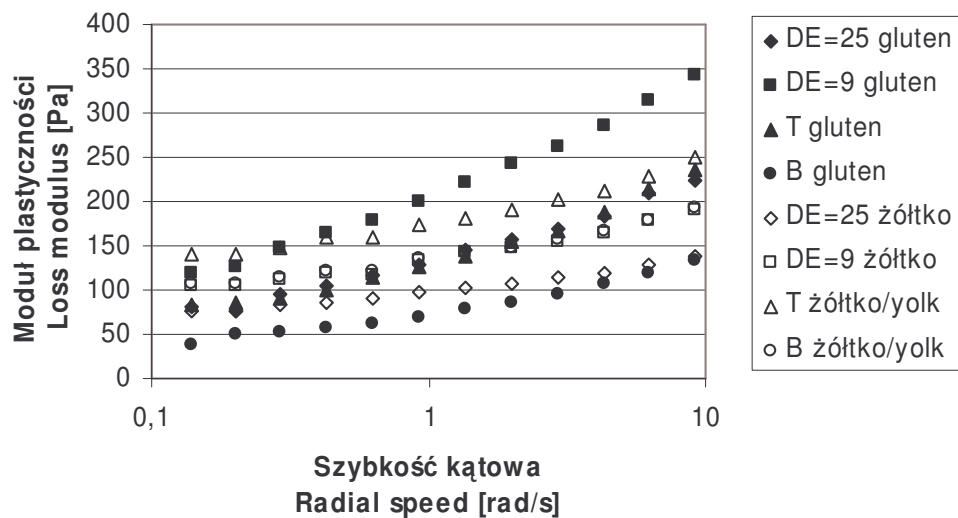
Ostwald de Waele $\eta = K\omega^n$ equation parameters.

Białko Protein	Maltodekstryna Maltodextrine	K	n	r
Żółtko jaja Egg yolk	handlowa commercial DE=9	700	0,12	1,000
Żółtko jaja Egg yolk	handlowa commercial DE=25	496	0,15	1,000
Żółtko jaja Egg yolk	ekstruzyjna T extrusion T	990	0,16	0,9998
Żółtko jaja Egg yolk	ekstruzyjna B extrusion B	1283	0,19	0,9998
Gluten	handlowa commercial DE=9	840	0,20	0,9999
Gluten	handlowa commercial DE=25	534	0,13	0,9999
Gluten	ekstruzyjna T extrusion T	620	0,14	0,9999
Gluten	ekstruzyjna B extrusion B	330	0,14	1,000



Rys. 3. Moduł sprężystości majonezów.

Fig. 3. Storage modulus of mayonnaises.

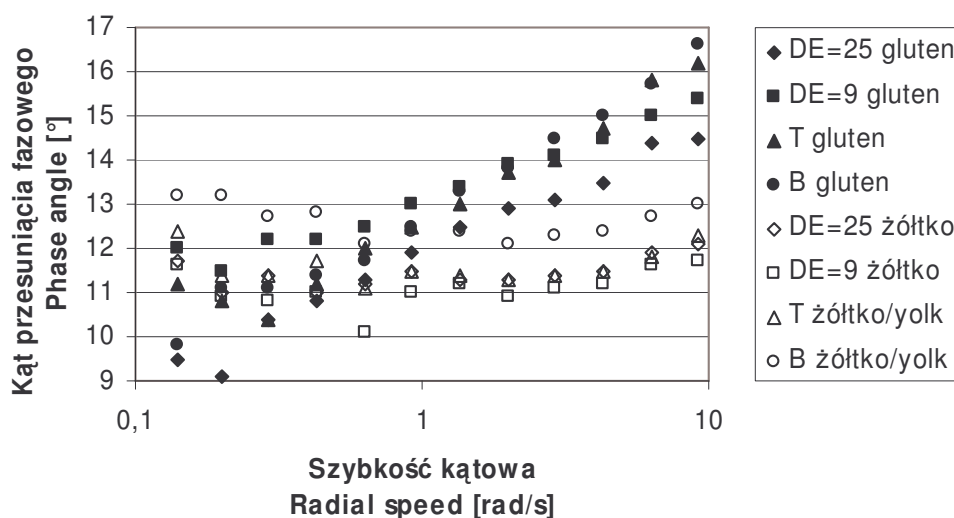


Rys. 4. Moduł plastyczności majonezów.

Fig. 4. Loss modulus of mayonnaises.

Hipotezę o różnym wzajemnym oddziaływaniu badanych maltodekstryn i białek potwierdza analiza zmienności kąta przesunięcia fazowego. Na rys. 5. widoczne są dwa pęki krzywych przynależnych do majonezów przyrządzonych na bazie żółtka (znaczniki puste) i glutenu (znaczniki wypełnione). Wartości kąta przesunięcia fazowego w przypadku majonezów na bazie żółtka są prawie stałe, oscylują w

granicach 10–13° i nie wykazują tendencji zarówno malejącej, jak i rosnącej. Świadczy to, że majonezy te są płynami lepkosprężystymi o zaznaczonej przewodze właściwości sprężystych. W przypadku majonezów na bazie glutenu ze wzrostem szybkości ścinania obserwowano wzrost kąta przesunięcia fazowego od 9° do 15°. Wskazuje to na fakt, że przy wyższych prędkościach ścinania majonezy te tracą właściwości sprężyste i upodabniają się do cieczy.



Rys. 5. Kąt przesunięcia fazowego majonezów.

Fig. 5. Phase angle of mayonnaises.

Wnioski

1. Maltodekstryny wykazują aktywność powierzchniową zarówno w układzie woda/powietrze, jak i woda/olej.
2. Maltodekstryny handlowe wykazują zwiększenie aktywności powierzchniowej w miarę wzrostu stopnia ich hydrolizy, natomiast maltodekstryny ekstruzyjne wykazują silniejszą aktywność powierzchniową niż ich analogi handlowe o porównywalnym stopniu hydrolizy.
3. Maltodekstryny nie wykazują zdolności emulgującej niezależnie od stopnia scurzenia oraz metody ich otrzymania.
4. Majonezy wykonane na bazie różnych białek i różnych maltodekstryn wykazują znaczne zróżnicowanie parametrów uniwersalnego profilu tekstury w zależności od surowców użytych do ich przyrządzenia.
5. Badane majonezy pod względem reologicznym są płynami rozrzedzanymi ścinaniem i ich lepkość może być opisana za pomocą empirycznego równania Ostwalda de Waele'a.
6. Maltodesktryny, w układzie emulsyjnym majonezu niskotłuszczowego, wykazują zróżnicowane właściwości funkcjonalne w zależności od użytego białka.

Pracę zrealizowano w ramach grantu zamawianego KBN nr PBZ/KBN/021/P06/99/13 oraz prac własnych PP nr BW 3z/118/2004

Literatura

- [1] Chattoraj D.K, Birdi K.S.: Adsorption and the Gibbs Surface Excess. Plenum Press. New York 1984.
- [2] Czermiński J.B., Iwasiewicz A., Paszek Z., Sikorski A.: Metody statystyczne dla chemików. PWN. Warszawa 1986.
- [3] Govindasamy S., Campanella O.H., Oates C. G.: Enzymatic hydrolysis and saccharification optimisation of sago starch in a twin-screw extruder. *J. Food Eng.*, 1997, **32**, 427-446
- [4] Krzyżaniak W., Białas W., Olesienkiewicz A., Jankowski T., Grajek W.: Characteristics of oligosaccharides produced by enzymatic hydrolysis of potato starch using mixture of pullulanases and alpha-amylases. *Elect. J. Pol. Agric. Univ., Food Sci. Techn.*, 2003, www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue2/
- [5] Krzyżaniak W., Olesienkiewicz A., Białas W., Słomińska L., Jankowski T., Grajek W.: Charakterystyka chemiczna maltodekstryn o małym równoważniku glukozowym otrzymanych przez hydrolizę skrobi ziemniaczanej za pomocą alfa-amylaz. *Acta Sci. Pol., Technologia Alimentaria*, 2003, **2**, 5-15.
- [6] Oerther S., Payan E., Lapicque F., Presle N., Hubert P., Muller S., Netter P., Lapicque, F.: Hyaluronate-alginate combination for the preparation of new biomaterials: investigation of the behaviour in aqueous solutions. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/General Subject.*, 1999, **1426**, 185-194.
- [7] PN-78/A-74701. Hydrolizaty skrobiowe. Metody badań.
- [8] PN-EN ISO 5377:2001. Produkty hydrolizy skrobi. Oznaczanie siły redukującej i równoważnika glukozowego. Metoda stałego miana Lane'a i Eynone.
- [9] Robins M.M., Watson A.D., Wilde P.J.: Emulsions – creaming and rheology. *Curr. Opin. in Colloid & Interface Science*, 2002, **7**, 419-425.
- [10] Słomińska L.: Enzymatyczne metody transformacji skrobi. *Przem. Spoż.*, 1995, **12**, 472-475, 480.
- [11] Słomińska L.: Węglowodanowe zamienniki tłuszczu. *Przem. Spoż.*, 1999, **12**, 12-15.
- [12] Yanes M., Durán L., Costell E. Effect of hydrocolloid type and concentration on flow behaviour and sensory properties of milk beverages model systems. *Food Hydrocolloid* 2002, **16**, 605-611.
- [13] Yasamatsu K., Sawada K., Moritaka S., Misaka M., Toda J., Wada T., Ishii K.: Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agr. Biol. Chem.*, 1972, **36**, 719-727.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF MALTODEXTRINES IN EMULSION SYSTEMS

S u m m a r y

The objective of this work was to determine surface properties of maltodextrines having a various saccharification degree and obtained using different technological processes. Furthermore, this work

aimed at verifying the functionality of maltodextrines in emulsion systems by determining the rheological properties and the texture of low fat mayonnaises prepared from these maltodextrines.

It was found that both in water/air and water/oil systems, maltodextrines demonstrate surface activity which is observed to increase with the rise of the hydrolysis degree. Replacing the traditional process of production by a hydrolysis carried out in extruder has a positive effect on surface properties of maltodextrines. Despite the a surface activity stated, maltodextrines do not show any emulsifying abilities, regardless of the saccharification degree and production method. However, they exhibit a varied effect on the examined proteins in such complex systems as low fat mayonnaises. As a consequence, mayonnaises made on the basis of different proteins and maltodextrines show a considerable diversity of their universal texture profile parameters and rheological properties, depending on the components used to prepare them. In spite of the observed diversity of properties, examined mayonnaises constitute pseudoplastic fluids in respect of rheological properties, and their viscosity could be described by means of the Ostwald de Waele's empirical equation.

Key words: maltodextrines, extrusion, surface properties, emulsion, mayonnaises, texture, rheological properties 

WOJCIECH KRZYŻANIAK, TOMASZ JANKOWSKI, WŁODZIMIERZ GRAJEK

**OPTYMALIZACJA PARAMETRÓW HYDROLIZY
ENZYMATYCZNEJ SKROBI ZIEMNIACZANEJ POŁĄCZONEJ
Z PROCESEM EKSTRUZJI**

Streszczenie

Celem pracy była optymalizacja parametrów hydrolizy enzymatycznej skrobi ziemniaczanej połączonej z procesem ekstruzji.

Do hydrolizy użyto następujących preparatów enzymatycznych: α -amylazy bakteryjnej Termamyl S, Ban 480L oraz α -amylazy grzybowej Fungamyl 800L. Początkowo wykonano doświadczenia mające na celu dobranie parametrów pracy ekstrudera zapewniających dostateczne skleikowanie skrobi. Regulowano temperaturę w poszczególnych sekcjach ekstrudera oraz obroty elementów roboczych. Stwierdzono, że dopiero temperatura powyżej 100°C zapewniała dostateczne skleikowanie skrobi. Sprawdzone, czy w zastosowanych warunkach ekstruzji enzymy zachowują swoją hydrolityczną aktywność. Stwierdzono wzrost wielkości współczynnika DE wraz ze wzrostem dawki enzymu dodawanego do skrobi. Do dalszych ekstruzji wybrano enzymy o największej termoodporności czyli Termamyl S oraz Ban 480 L. Określono wpływ szybkości obrotów ślimaków, w zakresie 40–60 obr./min, oraz wilgotności początkowej skrobi, od 32 do 40%, na równoważnik glukozowy (DE) i ciśnienie osmotyczne badanych preparatów. Określono także skład chemiczny tych preparatów. Badania wykazały, że zastosowane warunki ekstruzji były wystarczające do częściowej hydrolizy skrobi ziemniaczanej i do uzyskania produktów o niskim stopniu scukrzenia.

Słowa kluczowe: ekstruzja, skrobia ziemniaczana, hydroliza enzymatyczna, α -amylaza.

Wstęp

Ekstruzja jest rodzajem ciśnieniowego ekspandowania produktu. Polega na gwałtownym powiększeniu objętości cząstki na skutek jej szybkiego podgrzania do temperatury niezbędnej do zamiany wody w parę [8].

Prowadzi to do zwiększenia ciśnienia wewnątrz cząstki, a następnie do jej rozerwania i rozděcia na skutek braku możliwości swobodnego odparowania. Jest to również proces termoplastycznego wyłaczania surowca poddanego wcześniej obróbce mechanicznej [17].

Główną część roboczą ekstrudera stanowi komora ciśnieniowo-termiczna z ruchomym wałem, zwanym potocznie ślimakiem. Ze względu na ich liczbę ekstrudery dzieli się na jedno lub dwuślimakowe. W nowoczesnych maszynach proces ekstruzji oraz jego parametry są sterowane komputerowo [5, 21].

W czasie ekstruzji nawilżonej skrobi dochodzi do jej skleikowania i częściowej hydrolizy [12, 26]. Zaletą tego procesu jest krótkie działanie temperatury i możliwość dokładnego regulowania jego parametrów [18]. Ekstruzja wpływa na wzrost rozpuszczalności skrobi w temperaturze otoczenia pod warunkiem poddania jej działaniu sił ścinających w temp. powyżej 110°C. Wraz ze wzrostem temp. ekstruzji w zakresie od 90 do 210°C maleje także gęstość produktu i zwiększa się zdolność wiązania wody przez zmodyfikowaną skrobię [18]. W wyniku ochłodzenia płynna skrobia traci ciepło wraz z uchodzącą parą wodną. Materiał staje się twardszy, mniej plastyczny i traci swoją elastyczność na skutek tworzenia się żelu skrobiowego. Powstaje niejednorodna, porowata struktura o wytrzymałości zależnej od szybkości ochładzania produktu [12]. Właściwości ekstrudatu zależą również od składu chemicznego surowca skrobiowego, głównie proporcji między amylozą i amylopektyną oraz od zawartości lipidów [1, 16, 23].

Enzymy amylolityczne działają wyłącznie na skrobię skleikowaną [24]. W zawiesinach wodnych skrobi hydroliza enzymatyczna zachodzi już w temp. ok. 60–80°C, jednak przebiega ona z niewielką szybkością ze względu na niepełne upłynnienie skrobi, które wymaga ogrzania do temp. powyżej 100°C, najlepiej 140°C [22]. Badania nad enzymami amylolitycznymi, mającymi zastosowanie w przemysłowym przetwórstwie skrobi, są obecnie nastawione zarówno na poszukiwanie naturalnych źródeł termoodpornych enzymów, jak i na modyfikacje już znanych amylaz poprzez ukierunkowane mutacje lub też chemiczne modyfikacje tych białek [3, 20]. W literaturze wykazano możliwość obróbki hydrotermicznej skrobi z jednoczesnym działaniem enzymów, co umożliwiło otrzymanie produktów o ograniczonym zakresie hydrolizy, charakteryzujących się niskim równoważnikiem glukozowym DE [4, 7, 10, 15, 25]. Osiągane to jest dzięki krótkiemu działaniu obu czynników. Parametrami ekstrudera umożliwiającymi regulację stopnia hydrolizy skrobi są: obroty elementu roboczego regulujące czas hydrolizy oraz temperatura w poszczególnych sekcjach [5, 9]. Dodatkowo, duży wpływ na proces ma zawartość wody w surowcu przeznaczonym do ekstruzji oraz termoodporność i ilość użytego enzymu [11]. Wykorzystanie ekstruzji jako metody przygotowania skrobi do hydrolizy może umożliwić uzyskanie maltodekstryn odznaczających się nowymi właściwościami reologicznymi i teksturotwórczymi [23].

Celem pracy była optymalizacja parametrów hydrolizy enzymatycznej skrobi ziemniaczanej podczas procesu ekstruzji.

Materiał i metody badań

Skrobia ziemniaczana

Substratem użytym do ekstruzji była skrobia ziemniaczana Superior wyprodukowana w Zakładach Przemysłu Ziemniaczanego w Luboniu o zawartości suchej masy 89,8%.

Enzymy

Do badań zastosowano następujące preparaty enzymatyczne produkowane przez Novozymes, Dania:

- Termamyl Supra – mieszanina wyjątkowo stabilnych bakteryjnych α -amylaz (4-glukanohydrolaza- α -1,4-glukanu) produkowanych przez genetycznie zmodyfikowane szczepy z rodzaju *Bacillus*. Aktywność tego preparatu enzymatycznego wynosi 120 KNU/g, a optymalna temp. działania 105°C;
- Ban 480 – α -amylaza bakteryjna (α -1,4-D glukohydrolaza glukanu) produkowana przez *Bacillus amyloliquefaciens*. Aktywność tego preparatu enzymatycznego wynosi 480 KNU/g, a optymalna temp. działania 85°C;
- Fungamyl 800L α -amylaza grzybowa (α -1,4-D glukohydrolaza glukanu) produkowana przez *Aspergillus oryzae*. Aktywność tego preparatu enzymatycznego wynosi 800 FNU/g, a temp. działania 65°C.

Ekstruzja

Ekstruzję skrobi połączoną z jednoczesną hydrolizą enzymatyczną prowadzono w ekstruderze dwuślimakowym ZSK 25 WLE firmy Krupp Werner & Pfleiderer GmbH. Po uwzględnieniu suchej masy, materiał nawilżano wodą destylowaną do odpowiedniej wilgotności i mieszano w mieszarce laboratoryjnej w celu ujednoczenia materiału. Do wody wprowadzano odmierzoną dawkę preparatu enzymatycznego. Nawilżoną skrobię z preparatem enzymatycznym ekstrudowano w warunkach przedstawionych w tab. 1. Produkt powstały w procesie ekstruzji suszono w temp. 60°C przez 24 godz., w suszarce z obiegiem powietrza, a następnie mielono do postaci proszku.

Oznaczanie DE

Równoważnik glukozowy DE oznaczano metodą jodometryczną według PN-78/A-74701.

Oznaczanie cukrów metodą HPLC

Zawartość cukrów w hydrolizatach oznaczano za pomocą chromatografii cieczowej (HPLC). Wykonano analizę ilościową obecności cukrów wyższych i cukrów zawierających od jednego do ośmiu monomerów. Parametry oznaczenia: kolumna

Aminex HPX-42A o wymiarach 300 × 7,8 mm oraz detektor refraktometryczny IR. Prędkość elucji: 0,6 ml wody/min w temp. 70°C. Na kolumnę jednorazowo наносono 20 µl odpowiednio rozcieńczonej próby, uprzednio przefiltrowanej przez sączi z porami wielkości 0,45 µm (Millex HA) w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń.

Tabela 1

Warianty procesu ekstruzji.
Variants of the extrusion process.

Warianty procesu Variants of the process	Temperatura Temperature [°C]				Szybkość ślimaków [obr./min] Screw speed [rpm]
	Sekcja 1 Section 1	Sekcja 2 Section 2	Sekcja 3 Section 3	Głowica Die	
Wariant I Variant I	24	110	110	120	85
Wariant II Variant II	24	70	70	50	80

Oznaczanie rozpuszczalności ogólnej

Do kolby stożkowej o poj. 250 ml wsypywano 10 g szklanych perełek, dodawano 100 ml wody destylowanej o temp. 40°C oraz 6,4 g produktu. Tak przygotowaną próbę intensywnie mieszano przez 30 min w łaźni wodnej o temp. 60°C. Następnie 50 ml próby wirowano przez 10 min przy obrotach 210 × g. Po odwirowaniu pobierano 5 ml supernatantu i przenoszono do wyważonego naczynka wagowego ze spiralnie zwiniętym paskiem bibuły. Tak przygotowaną próbę suszono do stałej masy w temp. 100°C. Rozpuszczalność ogólną obliczono z równania:

$$R = \frac{(m_3 - m_1)(a + \rho V) \cdot 100}{(m_2 - m_1)(100 - w) \cdot a} \cdot 100 \text{ [%]}$$

gdzie: m_1 – masa naczynka z bibułą [g],

m_2 – masa naczynka z bibułą i roztworem [g],

m_3 – masa naczynka z bibułą i roztworem po wysuszeniu [g],

a – naważka proszku [g],

V – objętość wody, w której rozpuszczono proszek [cm³],

w – wilgotność badanego proszku [%],

ρ – gęstość wody [g/cm³].

Ciśnienie osmotyczne

Oznaczania ciśnienia osmotycznego dokonywano za pomocą osmometru Marcel OS 3000, według zaleceń producenta. Pomiar polega na przechłodzeniu 100 µl próby do temp. -10°C, wzbudzeniu jej krystalizacji oraz rejestracji i analizie przebiegu

temperatury w czasie krystalizacji. Osmolalność roztworu wyrażona w mOsm/kg H₂O jest miarą ciśnienia osmotycznego.

Różnicowa kalorymetria skaningowa

Badania charakterystyki kleikowania skrobi w ekstrudowanych preparatach wykonano przy użyciu kalorymetru skaningowego Perkin-Elmer DSC 7 (Perkin-Elmer Co., Connecticut, USA). Próbki sproszkowanego ekstrudatu o masie ok. 5 mg umieszczano w aluminiowych naczynkach kalorymetrycznych o pojemności 20 µl, dokładnie ważono, dodawano dwukrotnie większą masę wody od masy preparatu, zamykano hermetycznie i pozostawiano na 1 godz. w celu nawilżenia. Następnie próbki ogrzewano w kalorymetrze w zakresie temp. 20–100°C z szybkością wzrostu temperatury 10 K/min. Jako wzorzec odniesienia stosowano puste, identyczne naczynko kalorymetryczne. Z termogramów kleikowania skrobi wyznaczano temperaturę pikową T_p oraz entalpię przemiany ΔH (J/g) odniesioną do suchej masy próbki. Dodatkowo, w celu porównawczej oceny stopnia skleikowania skrobi w ekstrudatach wykonano analizę kleikowania natywnej skrobi ziemniaczanej.

Analiza statystyczna

Wykonano dwuczynnikową analizę wariancji na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, aby wykazać istotność wpływu wilgotności skrobi i obrotów ślimaków ekstrudera na DE oraz ciśnienie osmotyczne ekstrudatów. Posłużono się w tym celu programem Statistica 6.0. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Skrobia ziemniaczana jest najczęściej hydrolizowana w reaktorach do maltodekstryn za pomocą dwustopniowej hydrolizy enzymatycznej, trwającej około 73 godz., z koniecznością dwukrotnej regulacji temp. z około 95–140°C do 60–95°C oraz zmiany pH z 6,5 do 4 [2]. Drugą powszechnie stosowaną metodą hydrolizy skrobi ziemniaczanej jest hydroliza kwasowa trwająca około 60 min, wymagająca dwukrotnej regulacji temperatury procesu [2]. Alternatywą przedstawionych metod może być ekstruzja skrobi połączona z hydrolizą enzymatyczną.

Pierwszy etap doświadczeń miał na celu dobór warunków procesu, które należy zastosować w procesie hydrolizy enzymatycznej prowadzonej w ekstruderze. Ze względu na krótki czas przebywania surowca skrobiowego w ekstruderze, wynoszący od 30 do 60 s i konieczność przeprowadzenia w tym czasie skleikowania skrobi oraz jej hydrolizy, użyte enzymy powinny charakteryzować się odpowiednią odpornością termiczną i wysoką aktywnością w temperaturze procesu. Enzymy inaktywowano termicznie przez podwyższenie temperatury w głowicy ekstrudera.

Warunki termiczne procesu dobrano tak, aby nie powodowały utraty aktywności enzymu w sekcjach roboczych ekstrudera. Zastosowano dwa warianty procesu ekstruzji (tab.1). Pierwszy w wyższej temperaturze dla enzymów Termamyl S i Ban

480 L oraz drugi dla enzymu Fungamyl 800L, o mniejszej termoodporności. We wszystkich doświadczeniach wilgotność skrobi wynosiła 35%.

Na podstawie badań DSC (tab. 2) preparatów skrobi ekstrudowanej bez enzymów stwierdzono, że jedynie ekstruzja w wyższej temperaturze umożliwiła pełne skleikowanie skrobi. Świadczy o tym brak przemiany kleikowania na termogramach DSC.

Tabela 2

Temperatura pików przemiany DSC, entalpia, oraz stopień skleikowania skrobi natywnej i skrobi ekstrudowanej.

DSC peak transition temperature, enthalpy, and degree of gelatinisation of the native starch and extruded starch.

Próba Sample	Temperatura pików przemiany Peak transition temperature [°C]	Entalpia kleikowania Gelatinisation enthalpy ΔH [J/g s/s]	Skleikowanie skrobi Starch gelatinisation [%]
Skrobia natywna Native starch	67,0	12,0	0
Ekstrudowana w. I Extruded v. I	brak przemiany no transition	0	100
Ekstrudowana w. II Extruded v. II	67,0	9,3	22,3

W procesie ekstruzji w niższej temperaturze wykazano, że skleikowało zaledwie około 22% skrobi pomimo dłuższego czasu ekstruzji (tab. 2). Powyższe obserwacje potwierdzają decydującą rolę wody w przebiegu zjawisk kleikowania skrobi. Temperaturowy zakres procesu kleikowania, a także charakter procesu jest inny, gdy skrobia jest nawilżona powyżej 70% i inny, gdy jej wilgotność jest mniejsza niż 35–40% [13]. W tym drugim zakresie wilgotności, odpowiadającym procesom ekstruzji, skrobia ulega przemianie interpretowanej jako topnienie krystalitów na zasadzie podobieństwa do stapiania syntetycznych krystalicznych polimerów, gdzie ilość rozpuszczalnika decyduje o ich temperaturze topnienia [6].

W kolejnych badaniach sprawdzono, czy w wytypowanych warunkach ekstruzji (tab. 1) enzymy wykazują hydrolityczną aktywność. Zarówno w przypadku enzymów Termamyl S i Ban 480 L, zastosowanych w ekstruzji w wyższej temperaturze, jak i pozostałego enzymu użytego w niższej temperaturze, stwierdzono wzrost wartości liczbowej współczynnika DE wraz ze wzrostem dawki enzymu dodawanego do skrobi (tab. 3). Taka tendencja w przypadku skrobi nie w pełni skleikowanej przy zastosowanych parametrach ekstruzji może świadczyć, że doszło do częściowej

Tabela 3

Wskaźnik DE oraz rozpuszczalność preparatów skrobi otrzymanych w procesie ekstruzji z udziałem enzymów Termamyl S, Ban 480L oraz Fungamyl 800L.

Dextrose equivalent values and solubility of starch preparations extruded using enzymes Termamyl S, Ban 480L and Fungamyl 800L.

Enzym Enzyme	Dawka Dose [KNU]	DE	Rozpuszczalność Solubility [%]
Termamyl S	36	3	90,1
	72	5	90,3
	144	6	93,7
	288	9,7	94,5
	720	13	95
Ban 480 L	280,8	5	65,2
	561,6	7,8	73,8
	1123,2	9,9	80,6
Fungamyl 800 L	1840	8,9	43,5
	4600	9,7	48,6
	7360	12,4	52,6

hydrolizy. Jednakże otrzymane preparaty mogły cechować się słabą rozpuszczalnością.

Rozpuszczalność preparatów rosła wraz ze wzrostem ilości enzymu dodanego do skrobi i wynosiła w przypadku Termamylu S od 90,1 do 95%. Rozpuszczalność ekstrudatów wyprodukowanych z enzymem Ban 480 L wynosiła od 65,2 do 80,6% zaś z enzymem Fungamyl 800 L była najmniejsza (tab. 3). Otrzymane wyniki potwierdzają obserwacje poczynione w przypadku skrobi sago, gdzie w wyniku ekstruzji oraz zwiększającej się dawki enzymu rozpuszczalność wzrosła z 11% (skrobia natywne) do ponad 63% w przypadku ekstrudatów [7].

Oznaczono ciśnienie osmotyczne ekstrudatów w celu wstępnego stwierdzenia ewentualnych różnic w składzie cukrowym preparatów. Wraz ze wzrostem dawki enzymu stwierdzono wzrost wartości ciśnienia osmotycznego preparatu ekstrudowanego z enzymem Termamyl S. W zależności od dawki enzymu wartości te były następujące: 36 KNU – 1 mOsm/kg H₂O, 72 KNU – 2 mOsm/kg H₂O, 144 KNU – 7 mOsm/kg H₂O. Wzrost wielkości tego parametru może wskazywać na inny skład chemiczny produktów ekstruzji.

Po analizie wstępnych wyników, biorąc pod uwagę rozpuszczalność preparatów i aktywność hydrolityczną enzymów w procesie ekstruzji, do dalszych badań wybrano enzymy: Termamyl S oraz Ban 480 L. We wcześniejszych badaniach wykazano dużą stabilność enzymów należących do grupy Termamyl podczas ekstruzji w temp. powyżej 100°C [19]. Obydwa enzymy, cechujące się najwyższą termoodpornością, można było z powodzeniem stosować w wyższej temperaturze procesu ekstruzji, umożliwiającą skleikowanie skrobi. Govinddasamy i wsp. [7], w badaniach nad ekstruzją skrobi sago z termostabilnymi amylazami, wykazali, że w zależności od parametrów ekstruzji możliwe jest uzyskanie produktów o DE 0-10, podczas gdy w tych samych warunkach ekstruzji bez enzymu wartość liczbowa wskaźnika DE nie przekraczała 1,5.

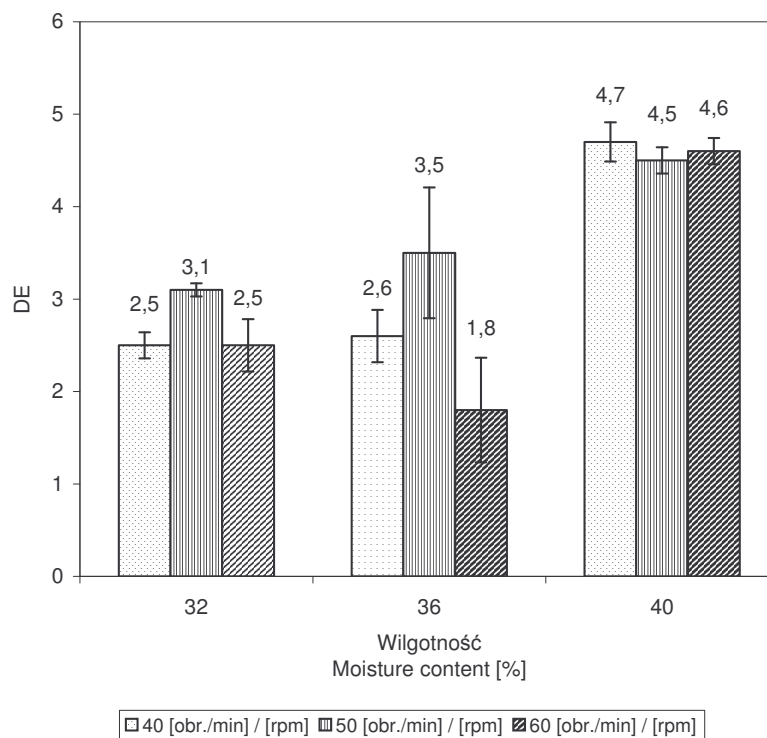
Wykorzystując właściwości hydrolityczne enzymów Termamyl S i Ban 480L w wysokiej temperaturze procesu, podjęto się zbadania wpływu wilgotności początkowej skrobi ziemniaczanej oraz czasu ekstruzji na DE oraz ciśnienie osmotyczne, zachowując jednakową temperaturę procesu i jednakową dawkę enzymów we wszystkich wariantach ekstruzji.

Temperaturę w poszczególnych sekcjach ekstrudera ustalono na następujących poziomach: sekcja 1 – 20°C, sekcja 2 – 110°C, sekcja 3 – 110°C, głowica 140°C. Temperatura głowicy była dobrana tak, aby następowało zatrzymanie reakcji hydrolizy poprzez denaturację enzymu.

Obroty ślimaków ekstrudera w kolejnych doświadczeniach wynosiły 40, 50 i 60 obr./min, a wilgotność skrobi 32, 36 i 40%. W przypadku enzymu Termamyl S ilość dodanego preparatu odpowiadała 104,4 KNU, a enzymu Ban 480 L, ze względu na mniejszą termostabilność, 561,6 KNU.

Zmiany wielkości współczynnika DE w różnych wariantach procesu ekstruzji przedstawiono na rys. 1. i rys. 2. a ciśnienia osmotycznego na rys. 3. i rys. 4. Zróżnicowanie czasu hydrolizy przez zmianę obrotów elementu roboczego ekstrudera miało wpływ na wielkość wskaźnika DE uzyskanych preparatów. Znajduje to potwierdzenie w publikowanych badaniach, w których stwierdzono, że wskaźnik DE skrobi ekstrudowanej łącznie z enzymem zmniejszał się, gdy rosła szybkość obrotów ślimaków ekstrudera [7, 15].

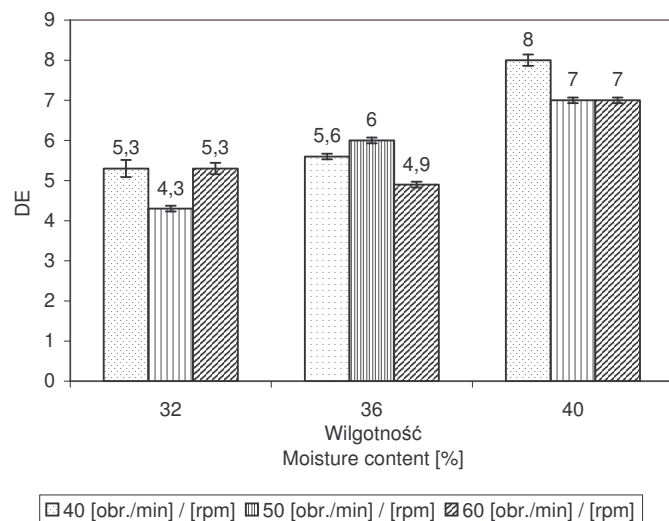
Znaczący wpływ na wielkość wskaźnika DE ekstrudatów miała wilgotność skrobi w czasie ekstruzji. Zarówno przy ekstruzji z enzymem Termamyl S jak i Ban 480 L stwierdzono najwyższe wartości DE uzyskanych preparatów przy wilgotności skrobi 40%. Jednocześnie, przy tych samych parametrach procesu, wskaźnik DE preparatu uzyskanego z enzymem Ban 480 L był wyższy od analogicznego uzyskanego z enzymem Termamyl S. Wskazuje to na zachowaną aktywność hydrolityczną tego enzymu w temperaturze ekstruzji. Uzyskane wyniki potwierdzają dane literaturowe wskazujące, że optymalnymi warunkami ekstruzji umożliwiającymi skuteczne zajście procesu hydrolizy enzymatycznej skrobi są: wysoka wilgotność początkowa surowca, mała prędkość ślimaków oraz duża dawka enzymu [4, 10].



Rys. 1. Wpływ wilgotności skrobi i szybkości obrotów ślimaków ekstrudera na wartość współczynnika DE preparatów ekstrudowanych z enzymem Termamyl S.

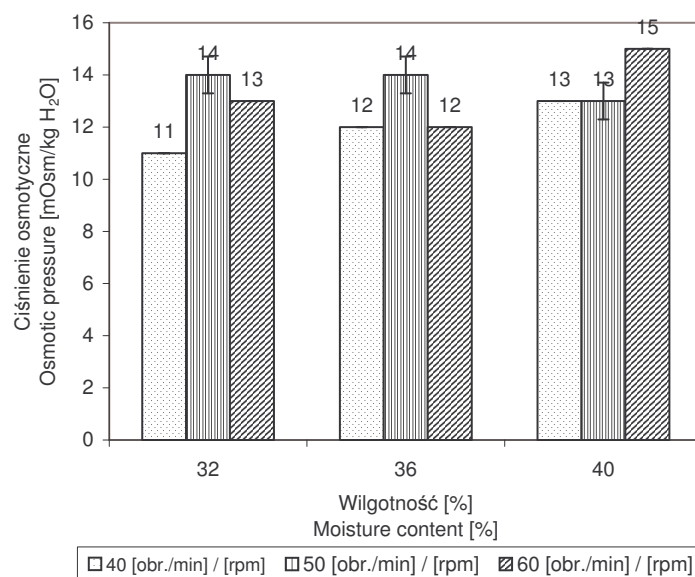
Fig. 1. The effect of moisture content in starch and of screw speed of the extruder on the dextrose equivalent of preparations obtained using an enzyme Termamyl S.

W celu stwierdzenia, który z parametrów ekstruzji: obroty ślimaków czy wilgotność skrobi miał większy wpływ na badane właściwości ekstrudatów wykonano dwuczynnikową analizę wariancji na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. W przypadku produktu wytworzonego z udziałem enzymu Termamyl S stwierdzono istotny wpływ wilgotności skrobi na DE. Z kolei zarówno obroty, wilgotność skrobi, jak i kombinacja tych czynników istotnie wpływały na wielkość ciśnienia osmotycznego. W przypadku produktu z Ban 480 L zarówno wielkość równoważnika DE, jak i ciśnienie osmotyczne zależały bardziej od wilgotności początkowej skrobi niż od szybkości obrotów ślimaków ekstrudera.



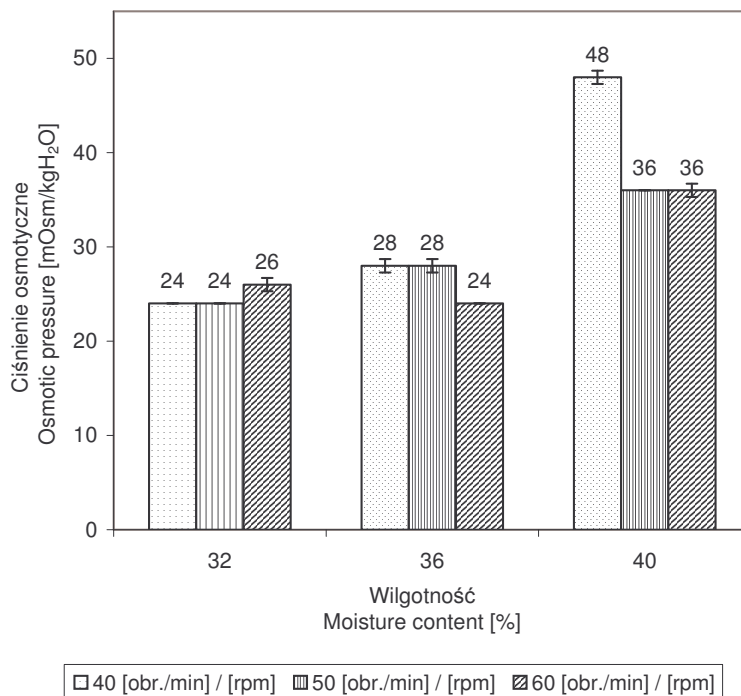
Rys. 2. Wpływ wilgotności skrobi i szybkości obrotów ślimaków ekstrudera na wielkość współczynnika DE preparatów ekstrudowanych z enzymem Ban 480 L.

Fig. 2. The effect of moisture content in starch and of screw speed of the extruder on the dextrose equivalent of preparations obtained with an enzyme Ban 480 L.



Rys. 3. Wpływ wilgotności skrobi i szybkości obrotów ślimaków ekstrudera na wartość ciśnienia osmotycznego preparatów ekstrudowanych z enzymem Termamyl S.

Fig. 3. The effect of moisture content in starch and of screw speed of the extruder on the osmotic pressure of preparates obtained with enzyme Termamyl S.



Rys. 4. Wpływ wilgotności skrobi i szybkości obrotów ślimaków ekstrudera na wartość ciśnienia osmotycznego preparatów ekstrudowanych z enzymem Ban 480 L.

Fig. 4. The effect of moisture content in starch and of screw speed of the extruder on the osmotic pressure of preparations obtained with an enzyme Ban 480 L.

W związku z różnicami w ciśnieniu osmotycznym pomiędzy wodnymi roztworami ekstrudatów wytworzonych z enzymem Termamyl S i Ban 480L wykonano analizę chromatograficzną mającą na celu ustalenie składu cukrowego produktów (tab. 4).

W przypadku ekstrudatów wytworzonych z enzymem Termamyl S stwierdzono, że największą grupę stanowiły cukry wyższe o DP > 8, a wśród cukrów niższych oligosacharydy o DP 5–8. Podobnie w przypadku ekstrudatów uzyskanych z enzymem Ban 480 L największą grupę stanowiły cukry wyższe, a następnie oligosacharydy o DP 5–7. Zawartość glukozy była niewielka i wynosiła od 0,09 do 0,86%, w zależności od warunków ekstruzji. Zawartość cukrów wyższych, średnio 92%, świadczy o większym stopniu hydrolizy skrobi niż w przypadku ekstrudatów z enzymem Termamyl S, w których zawartość oligosacharydów o DP > 8 wynosiła średnio 96%. Podobny skład cukrów obserwowano w przypadku ekstruzji z enzymami innych rodzajów skrobi [7, 15]. Można zatem stwierdzić, że zastosowane warunki ekstruzji były wystarczające do częściowej hydrolizy skrobi ziemniaczanej do produktów o niskim stopniu scurzenia. Inny skład oligosacharydów obserwowano w preparacie skrobi sago hydrolizowanej enzymem Termamyl 120L. W tym przypadku stwierdzono najwięcej cukrów o DP2, DP3, i DP6, zaś zawartość cukrów wyższych

wynosiła około 20% przy DE 8. Wraz ze wzrostem wilgotności początkowej skrobi sago rosła także zawartość oligosacharydów o DP 2-6 [7]. Takiej jednoznacznej zależności nie zaobserwowano w przypadku skrobi ziemniaczanej ekstrudowanej z enzymem Termamyl S i Ban 480 L w bieżącej pracy. Jednakże stwierdzono, podobnie jak w przypadku ekstruzji skrobi sago z enzymem Termamyl 120 L [7], wzrost stopnia upłynnienia skrobi ziemniaczanej wraz ze wzrostem wilgotności początkowej substratu z 32 do 40%.

Tabela 4

Zawartość cukrów w preparatach ekstrudowanych z enzymami Termamyl S i Ban 480 L.
The content of Oligosaccharide in extruded preparations obtained using enzymes Termamyl S and Ban 480 L.

Enzym Enzyme	Wilgotność Moisture content [%]	Obroty ślimaka [obr./min] Screw speed [rpm]	Zawartość cukrów Oligosaccharide content [%]								
			DP1	DP2	D23	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8	DPn
Termamyl S	32	40	0	0,18	0,31	0,22	0,35	0,58	0,72	0,71	96,94
		50	0	0,11	0,26	0,19	0,32	0,55	0,7	0,7	97,17
		60	0	0,17	0,34	0,26	0,38	0,62	0,77	0,76	96,7
Termamyl S	36	40	0	0,17	0,33	0,25	0,43	0,66	0,8	0,78	96,58
		50	0	0,16	0,3	0,23	0,38	0,58	0,71	0,7	96,95
		60	0	0,14	0,28	0,21	0,39	0,58	0,71	0,69	97,01
Termamyl S	40	40	0	0,17	0,3	0,25	0,44	0,57	0,67	0,66	96,93
		50	0	0,01	0,28	0,24	0,4	0,5	0,57	0	97,98
		60	0	0,17	0,31	0,26	0,43	0,6	0,71	0,7	96,82
Ban 480 L	32	40	0,09	0,3	0,56	0,43	0,54	1,14	1,37	0	95,57
		50	0,86	0,42	0,71	0,53	0,55	1,39	1,87	0	93,68
		60	0,08	0,4	0,65	0,5	0,51	1,24	1,68	0	94,95
Ban 480 L	36	40	0,12	0,57	1,06	0,71	0,89	1,81	1,97	0	92,86
		50	0,12	0,48	0,96	0,66	0,84	1,79	1,94	0	93,21
		60	0,13	0,45	0,83	0,58	0,83	1,54	1,52	0	94,12
Ban 480 L	40	40	0,24	1,3	2,57	1,46	2,04	3,67	2,8	0	85,92
		50	0,2	0,97	1,82	1,05	1,53	2,81	2,17	0	89,46
		60	0,17	0,84	1,58	1,00	1,37	2,84	2,55	0	89,65

Wnioski

1. Prowadzenie procesu ekstruzji w temp. powyżej 100°C przy wilgotności skrobi 35% umożliwia pełne skleikowanie skrobi ziemniaczanej.
2. W temperaturze zastosowanej w procesie ekstruzji enzymy Termamyl S, Ban 480 L oraz Fungamyl 800L zachowują aktywność hydrolityczną, jednak

- produkty wytworzone z enzymem Fungamyl 800L cechują się bardzo niską rozpuszczalnością.
3. DE produktów wytworzonych z udziałem enzymu Termamyl S istotnie zależy od wilgotności skrobi ziemniaczanej. Ciśnienie osmotyczne roztworów tych produktów zależy zarówno od obrotów ślimaków ekstrudera, wilgotności początkowej skrobi, jak i kombinacji tych czynników.
 4. W produktach wytworzonych za pomocą enzymu Ban 480 L wielkość wyróżnika DE oraz ciśnienia osmotycznego zależą bardziej od wilgotności początkowej skrobi niż od szybkości obrotów ślimaków ekstrudera.
 5. W produktach wytworzonych z enzymem Termamyl S oraz Ban 480 L największą grupę cukrów stanowią cukry o DP > 8.
 6. Zastosowane warunki ekstruzji są wystarczające do częściowej hydrolizy skrobi ziemniaczanej do produktów o niskim stopniu scukrzenia.

Praca finansowana ze środków KBN jako projekt badawczy zamawiany PBZ-KBN/021/P06/99/13.

Literatura

- [1] Bhattacharaya M., Hanna M.A.: Effects of lipids on the properties of extruded products. *J. Food. Sci.*, 1988, **53**, 1230-1231.
- [2] Bryjak J.: Enzymatyczna hydroliza skrobi do syropów maltodekstrynowych skrobiowych. Część II. Procesy. *Biotechnologia*, 1999, **1(44)**, 201-225.
- [3] Chen H., Bakir U., Reilly P.J., Ford C.: Increased thermostability of Asn 182 Ala mutant *Aspergillus awamori* glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, **43**, 101-105.
- [4] Chouvel H., Chay P.B., Cheftel J.C.: Enzymatic hydrolysis of starch and cereal flours at intermediate moisture contents in a continuous extrusion-reactor. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1983, **16**, 346-353.
- [5] Della Valle G., Boche Y., Colonna P., Vergnes B.: The extrusion behaviour of potato starch. *Carbohydr. Polym.*, 1995, **28**, 255-264.
- [6] Donovan J.W.: Phase transition in the starch-water system. *Biopolymers*, 1979, **18**, 263-275.
- [7] Govinddasamy S., Campanella H., Oates C.: Enzymatic hydrolysis of Sago starch in twin-screw extruder. *J. Food Engin.*, 1997, **32**, 403-426.
- [8] Grochowicz J., Zawiślak K.: Wpływ różnych czynników i jakości surowca na przebieg procesu ekspandowania i fizyczne cechy ekspandatu. *Pasze Przem.*, 1997, **4**, 21-30.
- [9] Guha M., Zakiuddin A., Bhattacharya S.: Twin-screw extrusion of rice flour without a die: effect of barrel temperature and screw speed on extrusion and extrudate characteristics. *J. Food Engin.*, 1997, **32**, 251-267.
- [10] Hakulin S., Linko Y. Y., Linko P., Seiler K., Seibel W.: Enzymatic conversion of starch in twin-screw extruder. *Starch*, 1983, **35**, 411-414.
- [11] Hülya A.: High moisture food extrusion. *Inter. J. Food Sci. Technol.*, 1999, **34**, 195-207.
- [12] Jamroz J.: Zmiany struktury skrobi ziemniaczanej i mąki pszennej podczas ekstruzji. Rozprawa habilitacyjna. Wyd. AR w Lublinie 1993.
- [13] Jankowski T, Rha C.K.: Differential scanning calorimetry of wheat grain cooking process. *Starch*, 1986, **38**, 35-48.
- [14] Kudła E., Tomasik P.: The modification of starch by high pressure. Part I. *Starch*, 1992, **44**, 167-173.

- [15] Linko Y.Y, Vourien H., Olku J., Linko P.: The effect of HTST- extrusion on retention of cereal alpha-amylase activity and on enzymatic hydrolysis of barley starch. In: Food Process Engineering, Vol 2, Eds P. Linko., J. Lankari. Elsevier Appl. Sci. London, 1980, pp. 210-223.
- [16] Lovedeep K, Narpinder S, Navadeep S.S.: Some properties of potatoes and their starches. II Morphological, thermal and rheological properties of starches. Food Chem., 2002, **79**, 183-192.
- [17] Mościcki L.: Współczesne ekstrudery i ekspandery. Przegl. Zboż. Młyn., 1994, **6**, 9-11.
- [18] Obuchowski W., Michniewicz J.: Ekstruzja - możliwości oddziaływania na cechy produktu. Przegl. Zboż. Młyn., 1993, **11**, 5-11.
- [19] Roussel L., Vieille A., Billet I., Cheftel J.: Sequential heat gelatinisation and enzymatic hydrolysis of corn starch in an extrusion reactor: optimisation for a maximum dextrose. Lebensm. Wiss. u. Technol., 1991, **24**, 449-457.
- [20] Rudiger A., Jorgensen P.L., Antranikian G.: Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 1995, **61**, 567-575.
- [21] Senanayake S., Clarke B.: A simplified twin screw co-rotating food extruder: design, fabrication and testing. J. Food Engin., 1999, **40**, 129-137.
- [22] Słomińska L.: Scukrzanie skrobi wybranymi preparatami enzymatycznymi. Roczniki AR, Rozprawy Naukowe, Zeszyt 239, Poznań 1993.
- [23] Śmietana Z., Szpendowski J., Soral-Śmietana M., Świgoń J.: Skrobia ziemniaczana ekstruzyjnie modyfikowana. Przem. Spoż., 1993, **3**, 13-14.
- [24] Trzmiel T.: Właściwości enzymów i ich zastosowanie. Przem. Spoż., 1995, **9**, 338-341.
- [25] Vasanthan T., Yeung J., Hoover R.: Dextrinization of starch in barley flours with thermostable alpha-amylase by extrusion cooking. Starch, 2001, **53**, 616-622.
- [26] Willett J.L., Shogren R.L.: Processing and properties of extruded starch/polymer foams. Polymer, 2002, **43**, 5935-5947.

OPTIMIZATION OF THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF POTATO STARCH COMBINED WITH EXTRUSION

S u m m a r y

The objective of this paper was to optimize the process of simultaneous gelatinisation and liquefaction of potato starch with α -amylases in a co-rotating twin-screw extruder. Bacterial α -amylases, such as Termamyl S and Ban 480L, and fungal α -amylase Fungamyl 800L, were used. The first step was to determine the process parameters owing to which the gelatinisation of starch was possible. The temperature of the barrel sections and the screw speed of the extruder varied, and they were controlled, while the moisture content of starch was constant, and equal to 35% (w/w). It was stated that only a temperature higher than 100°C could produce a satisfactory gelatinisation of starch. It was also verified whether or not enzymes maintained their hydrolytic activity under the extrusion conditions. It was stated an increase in the dextrose equivalent (DE) ensuing parallel to the increasing doses of enzymes added to starch. For continuing extrusions, two enzymes: Termamyl S and Ban 480 L were selected since they showed the highest thermal resistance. The impact of the extruder's screw speed (40–60 rpm) and of the initial moisture content in starch (32–40%) on DE and on the osmotic pressure of products under investigations was investigated. Additionally, chemical composition of these preparations was determined. The research performed showed that the conditions applied to carry out extrusion processes were sufficient for a partial hydrolysis of potato starch to occur products and to obtain products with a low DE value.

Key words: extrusion, potato starch, enzymatic hydrolysis, α -amylase. ☒

GRAŻYNA GOŁUBOWSKA, GRAŻYNA LISIŃSKA

**ZMIANY TEKSTURY I ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW
PEKTYNOWYCH W ZIEMNIAKACH
PODCZAS PRODUKCJI FRYTEK**

Streszczenie

Celem pracy było określenie zmian zawartości związków pektynowych w ziemniakach w poszczególnych etapach produkcji frytek oraz określenie teksturotwórczej roli tych związków. Do badań laboratoryjnych pobrano próby: bulw, krajanki i frytek z dziewięciu miejsc linii produkcyjnej. W próbach bulw, krajanki i frytek oznaczono zawartość substancji pektynowych oraz określono teksturę przy użyciu aparatu Instron.

Ziemniaki po procesie blanszowania zawierały o 30% mniej pektyn rozpuszczalnych i o 50% więcej protopektyn w porównaniu z surowcem. Zawartość protopektyn we frytkach była trzykrotnie większa niż w przerabianych ziemniakach. Tekstura ziemniaków w większości etapów przerobowych uzależniona była od zawartości pektyn. Tekstura frytek podsmażanych i frytek gotowych była dodatnio i statystycznie istotnie skorelowana z zawartością protopektyn ($r = 0,71$) i pektyn ogółem ($r = 0,63$).

Słowa kluczowe: związki pektynowe, konsystencja, bulwa ziemniaka, krajanka, proces technologiczny.

Wstęp

Tekstura smażonych produktów ziemniaczanych jest jednym z ważniejszych wyróżników ich jakości. Właściwości teksturalne tych produktów mogą być modyfikowane podczas procesu technologicznego, ale przede wszystkim zależą od składu chemicznego surowca. Do produkcji frytek producenci używają ziemniaków wytypowanych odmian, o odpowiedniej znormalizowanej zawartości suchej masy, skrobi i cukrów redukujących [12]. W literaturze naukowej zwraca się uwagę także na inne związki zawarte w ziemniakach, które mogą mieć wpływ na cechy sensoryczne frytek. Przykładowo, jako związki teksturotwórcze podaje się, obok skrobi, polisacharydy nieskrobiowe, a zwłaszcza związki pektynowe: pektyny ogółem, protopektyny i pektyny rozpuszczalne [4, 15]. Występują one w przestrzeniach międzykomórkowych jako lepiszcze niezdrewniałych ścian komórek roślinnych,

tworząc tzw. „blaszkę środkową”. W ścianie komórkowej tkanki roślinnej frakcja ta odgrywa rolę usztywniającą i wzmacniającą [13]. Aguilera-Carbo i wsp. [1] oraz Andersson i wsp. [3] podają, że teksturotwórcze właściwości pektyn wynikają ze zdolności do formowania „mostków wapniowych” pomiędzy grupami karboksylowymi pektyn a jonami Ca^+ i Mg^+ . Jony wapnia przy połączeniu sąsiadujących cząsteczek pektyn nadają tkance bardziej stabilną i jędrną strukturę, zapobiegając rozpuszczaniu się pektyn zawartych w ścianach komórkowych oraz w blaszce środkowej. Szczególnie przyczyniają się do tego pektyny o niższym stopniu estryfikacji oraz większa zawartość jonów dwuwartościowych. Wśród grupy związków pektynowych na uwagę zasługuje frakcja protopektyn, która spełnia funkcję cementującą i usztywniającą w blaszce środkowej, a także wykazuje szczególną zdolność wiązania jonów wapnia [3]. Mączysta lub mazista konsystencja ugotowanych ziemniaków jest często wiązana z pęcznieniem i kleikowaniem skrobi, jak również z trwałością związków pektynowych w ścianach komórkowych i w blaszce środkowej. Substancje pektynowe i skrobia zawarte w komórkach oddziałują na teksturę w przeciwstawnym sposób. Skrobia pęczniąc, powoduje powiększanie się komórek, w wyniku czego następuje ich rozdzielenie się, natomiast związki pektynowe poprzez siły kohezji zapobiegają temu zjawisku [3].

W literaturze naukowej mało jest danych dotyczących zmian zawartości i składu związków pektynowych w ziemniakach, półproduktach i produktach gotowych podczas całego procesu technologicznego produkcji wyrobów smażonych czy suszonych. Zmiany te mogą mieć podstawowe znaczenie w kształtowaniu konsystencji końcowego produktu [2, 11, 16, 17].

Celem pracy było określenie zmian zawartości związków pektynowych w ziemniakach w poszczególnych etapach produkcji frytek oraz określenie teksturotwórczej roli tych związków.

Materiał i metody badań

Do badań laboratoryjnych pobrano próby bulw, krajanki i frytek (po około 2 kg każda) z dziewięciu miejsc linii produkcyjnej frytek. Pierwszą próbę stanowiły ziemniaki przed obraniem, drugą – ziemniaki po obraniu parowym (ciśnienie 1,6 MPa czas 0,5 min), trzecią – ziemniaki po podgrzaniu (20 min w temp. 35°C), czwartą – ziemniaki po pokrojeniu (w hydrokrajalnicy na krajankę o przekroju 0,7 x 0,7 cm), piątą – krajanka po I stopniu blanszowania (5,0 min w temp. 72°C), szóstą – krajanka po II stopniu blanszowania (5,5 min w temp. 80°C), siódmą – krajanka po podsuszeniu (6,0 min w temp. 37°C), ósmą – frytki po I stopniu smażenia (45 s w temp. 180°C) i próbę dziewiątą – frytki po II stopniu smażenia (3 min w temp. 180°C).

Bezpośrednio po pobraniu prób z linii produkcyjnej oznaczano teksturę ziemniaków przy użyciu aparatu Instron 5544, współpracującego z komputerem, wyposażonego w prostokątną przystawkę przycinającą. Prędkość przesuwu głowicy z

przystawką wynosiła $250 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Na podstawie pomiarów wyznaczano maksymalną siłę (F_{max}) potrzebną do przecięcia krajanki ziemniaczanej.

Zawartość pektyn ogółem, protopektyn i pektyn rozpuszczalnych oznaczano metodą kolorymetryczną z karbazolem, metodą opracowaną przez McComba i McCready [13] oraz Jaswala [7], a zmodyfikowaną w Katedrze Technologii Rolnej i Przechowywania Akademii Rolniczej we Wrocławiu [9], po uprzednim utrwaleniu ziemniaków przez liofilizację. Zawartość związków pektynowych wyrażano w g kwasu galakturonowego/100 g suchej masy.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 6, stosując jednoczynnikową analizę wariancji. Grupy homogeniczne wyznaczano za pomocą testu Duncana, na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. W celu określenia zależności pomiędzy konsystencją a zawartością pektyn ogółem, protopektyn i pektyn rozpuszczalnych w ziemniakach wyliczono współczynniki korelacji, na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, uwzględniając poszczególne etapy przerobu ich na frytki

Wyniki i dyskusja

Według danych literaturowych [10, 15], zawartość związków pektynowych w ziemniakach stanowi średnio około 2,0% ich suchej masy. Protopektyny są liczniejszą frakcją od pektyn rozpuszczalnych i stanowią około 69–77% związków pektynowych [11] zawartych w bulwach. Andersson i wsp. [3] podają, że pektyny stanowią 47-66% masy ściany komórkowej ziemniaka. W przeprowadzonym doświadczeniu (tab. 1) zawartość pektyn ogółem w ziemniakach wynosiła 2,59 g kwasu galakturonowego/100 g suchej masy, z czego protopektyny stanowiły 1,58 g, a pektyny rozpuszczalne 1,01 g. Tajner-Czopek [16] podaje średnie zawartości protopektyn i pektyn rozpuszczalnych w ziemniakach badanych odmian wynoszące odpowiednio 1,50 g i 0,55 g kwasu galakturonowego/100 g suchej masy.

Jednym z pierwszych procesów technologicznych w przetwórstwie ziemniaków na cele spożywcze jest obieranie. Kita [10] oraz Garrote i wsp. [6] podają, że podczas procesu obierania bulw poszczególne związki polisacharydów nieskrobiowych NSP i lignina ulegają zmianom ilościowym. Kita [10] stwierdziła, że po obraniu bulw metodą karborundową zawartość sumy NSP i ligniny zmniejszyła się o około 30%, z czego straty związków pektynowych wynosiły 24%. W przeprowadzonych badaniach ziemniaki były poddane obieraniu parowemu, po którym zawartość pektyn rozpuszczalnych w bulwach obranych zmniejszyła się o około 15%, a równocześnie zawartość protopektyn zwiększyła się o około 17% (tab 1). Camire i wsp. [5], porównując zawartość niektórych składników w bulwach ziemniaka w zależności od sposobu obierania, stwierdzili, że większą zawartością węglowodanów i nierozpuszczalnych substancji błonnikowych charakteryzowały się ziemniaki po obraniu parowym.

Tabela 1

Zawartość związków pektynowych w ziemniakach w trakcie procesu produkcji frytek.

Content of pectins substances in potato tubers while French fries are processed.

Próby Samples	Pektyny ogółem Total pectins	Protopektyny Protopectins	Pektyny rozpuszczalne Water-soluble pectins
	[g kwasu galakturonowego/100g s.m.] [g galacturonic acid/100g d.m.]		
Ziemniaki nieobrane Not peeled potatoes	2,59a	1,58a	1,01b
Ziemniaki po obraniu Peeled potatoes	2,72ab	1,86b	0,86ab
Ziemniaki po podgrzaniu Preheated potatoes	2,99ab	1,96b	1,03b
Ziemniaki po pokrojeniu Cut potatoes	2,85ab	2,09b	0,76ab
Krajanka po I stopniu blanszowania Strips after the 1 st stage of blanching	3,14bc	2,24c	0,90ab
Krajanka po II stopniu blanszowania Strips after the 2 nd stage of blanching	3,11bc	2,45c	0,68a
Krajanka po podsuszeniu Dried strips	3,35c	2,48c	0,87ab
Frytki po I stopniu smażenia French fries after the 1 st stage of frying	4,64d	3,64d	1,00b
Frytki po II stopniu smażenia French fries after the 2 nd stage of frying	5,04d	4,17e	0,87ab

a, b, c, d – różnice między wartościami średnimi statystycznie istotne;

a, b, c, d – differences between the mean values are statistically significant.

Kolejne procesy stosowane w produkcji frytek – podgrzewanie bulw oraz „hydrokrojenie” ziemniaków w słupki nie spowodowały istotnych zmian zawartości związków pektynowych w ziemniakach (tab. 1). Po procesie blanszowania istotnie wzrosła natomiast zawartość pektyn ogółem (3,14 g/100 g s.s.) w krajance ziemniaczanej w stosunku do zawartości w surowcu, w tym głównie protopektyn (2,45 g/100 g s.s.). Powodem tego wzrostu było wymycie z krajanki związków rozpuszczalnych, co spowodowało podwyższenie zawartości związków nierozpuszczalnych w suchej masie ziemniaka. Największą zawartość protopektyn, podczas produkcji frytek, oznaczono we frytkach po I i II stopniu smażenia 2,60 i 4,17 g/100 g s.s. Zawartość pektyn ogółem po procesach smażenia wynosiła 4,64 i 5,04 g/100 g s.s. W procesie smażenia następowało dalsze wymycie substancji rozpuszczalnych zawartych w krajance. Zawartość pektyn rozpuszczalnych w ziemniakach w trakcie całego procesu produkcji frytek kształtowała się na podobnym poziomie, jak w surowcu i wynosiła od 0,7 do 1g kwasu galakturonowego/100 g s.s. Jedynie po II stopniu blanszowania zawartość pektyn

w krajance uległa zmniejszeniu o około 20% w stosunku do surowca. Według Thed i Phillinsa [18], powodem wzrostu zawartości protopektyn w ziemniakach podczas procesów termicznych może być przemiana rozpuszczalnych związków pektynowych w związki nierozpuszczalne.

Tabela 2

Współczynniki korelacji [r] pomiędzy konsystencją ziemniaków a zawartością pektyn w trakcie procesu produkcji frytek.

Coefficients of a correlation between the texture of potatoes and the content of pectins while processing French fries.

Próby Samples	Pektyny ogółem Total pectins	Protopektyny Protopectins	Pektyny rozpuszczalne Water-soluble pectins
	Współczynnik korelacji [r] Correlation coefficient [r]		
Ziemniaki po obraniu Peeled potatoes	0,77*	-	-
Ziemniaki po podgrzaniu Preheated potatoes	0,68*	-	0,65*
Ziemniaki po pokrojeniu Cut potatoes	0,61*	-	-
Krajanka po I stopniu blanszowania Strips after the 1 st stage of blanching	-	-	0,67*
Krajanka po II stopniu blanszowania Strips after the 2 nd stage of blanching	-	-	-
Krajanka po podsuszeniu Dried strips	-	-	-
Frytki po I stopniu smażenia French fries after the 1 st stage of frying	0,86*	0,75*	0,88*
Frytki po II stopniu smażenia French fries after the 2 nd stage of frying	0,63*	0,71*	-

* nie stwierdzono korelacji / no correlation was found;

* korelacja statystycznie istotna / a statistically significant correlation.

Na rys. 1. przedstawiono wyniki zmian konsystencji ziemniaków [N] w trakcie procesu produkcji frytek. Ziemniaki surowe, tzn. bulwy po obraniu, po podgrzaniu oraz po pokrojeniu, charakteryzowały się znacznie twardszą konsystencją (średnio 33 N) w porównaniu z krajanką po I i II blanszowaniu i podsuszaniu (średnio 24 N). Wartość siły F_{max} , podczas określania tekstury frytek po I i II stopniu smażenia, zmniejszyła się i wynosiła odpowiednio 10,2 i 12,8 N.

Według Anderssona i wsp. [3], procesy termiczne (blanszowanie, smażenie) obok innych funkcji mają za zadanie kształtować teksturę produktu, przy czym jako najważniejsze teksturotwórcze składniki ziemniaka wymieniają oni: zawartość skrobi, związków pektynowych, substancji mineralnych i aktywność enzymów pektynolitycznych. Teksturotwórcze znaczenie pektyn podkreślają także inni autorzy na przykład przy określeniu konsystencji marchwi [8] czy ziemniaków gotowanych [4, 7].

W tab. 2. przedstawiono współczynniki korelacji pomiędzy teksturą (N) a zawartością pektyn rozpuszczalnych, protopektyn i pektyn ogółem. Tekstura ziemniaków w większości etapów przerobowych uzależniona była od zawartości pektyn. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy teksturą a zawartością analizowanych frakcji w krajance po II stopniu blanszowania i po podsuszeniu. Tekstura bulw po podgrzaniu, krajanki po I stopniu blanszowania i po I stopniu smażenia zależała od zawartości pektyn rozpuszczalnych. Tekstura frytek podsmażanych i frytek gotowych była w wysokim stopniu skorelowana z zawartością protopektyn ($r = 0,71$) i pektyn ogółem ($r = 0,63$).

Wnioski

1. Zawartość protopektyn w suchej masie ziemniaków po procesie obierania zwiększyła się o 20%, po procesie blanszowania o 50% i po procesie smażenia o 150% w stosunku do zawartości w surowcu, jako rezultat wymycia części substancji rozpuszczalnych ziemniaka.
2. Zawartość pektyn rozpuszczalnych w suchej masie ziemniaków po procesie obierania zmniejszyła się o 15% i po blanszowaniu o 30% w stosunku do zawartości w surowcu.
3. Tekstura ziemniaków w większości etapów przerobowych uzależniona była od zawartości pektyn.
4. Tekstura frytek podsmażanych i frytek gotowych była dodatkowo skorelowana z zawartością pektyn ogółem i protopektyn.

Literatura

- [1] Aguilera-Carbó A., Montañez J.C., Anzaldúa-Morales A., de la Luz Reyes M., Contreras-Esquivel J., Aguilar C.N.: Improvement of color and limpness of fried potatoes by in situ pectinesterase activation. *Eur. Food Res. Technol.*, 1999, **210**, 49-52.
- [2] Alvarez M.D., Canet W.: Optimization of stepwise blanching of frozen-thawed potato tissues (cv. Monalisa). *Eur. Food Res. Technol.*, 1999, **210**, 102-108.
- [3] Andersson A., Gekas V., Lind I., Oliveira F., Oste R.: Effect of preheating on potato texture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1994, **34**, 229- 251.
- [4] Burton W.G.: *The potato*. (3 ed). Longman Scientific and Technical, J. Wiley and Sons Inc. New York 1989.

- [5] Camire M.E., Violette D., Dougherty M.P., McLaughlin M.A.: Potato peel dietary fiber composition: effects of peeling and extrusion cooking processes. *J. Agricult. Food Chem.*, 1997, **45**, 1404-1408.
- [6] Garrote R.L., Silva R.E., Bertone R.A.: Effect of thermal treatment on steam peeled potatoes. *J. Food Eng.*, 2000, **45**, 67-76.
- [7] Jaswal A.S.: Pectic substances and the texture of French fried potato. *Amer. Potato J.*, 1969, **46**, 168-173.
- [8] Kato N., Terakoto A., Fuchigami M.: Pectic substance degradation and texture of carrots as affected by pressurization. *J. Food Sci.*, 1997, **2**, 359-363.
- [9] Kita A., Tajner-Czopek A., Lisińska G.: Oznaczenie pektyn i protopektyn w bulwach ziemniaka. *Mat. XXVIII Sesji Nauk. KTiCHŻ PAN „Postępy w Technologii i Chemii Żywności”*. Gdańsk 1997, s. 282-283.
- [10] Kita A.: The influence of potato chemical composition on crisp texture. *Food Chem.*, 2002, **76**, 173-179.
- [11] Lisińska G., Leszczyński W.: *Potato Science and Technology*. Elsevier Applied Science. London 1989.
- [12] Lisińska G.: Czynniki surowcowe i technologiczne kształtujące jakość przetworów ziemniaczanych. *Mat. Konferencji „Ziemniak spożywczy i przemysłowy oraz jego przetwarzanie” AR Wrocław, Polanica Zdrój*, 2000, s. 51-57.
- [13] McComb E.A., McCreedy R.M.: Colorimetric determination of pectic substance. *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 1630-1632.
- [14] Sikorski Z.: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. WNT. Warszawa 1994.
- [15] Tajner-Czopek A., Kita A., Rytel E., Gołubowska G.: Zawartość polisacharydów nieskrobiowych i ligniny w bulwach ziemniaka o różnej długości okresu wegetacyjnego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 2003, **489**, 291-299.
- [16] Tajner-Czopek A.: The changes of pectin substances concentration in potatoes and French fries and the effect of those substances on the texture of the final product. *Nahrung/Food*, 2003, **47**, 4, 228-231.
- [17] Talburt W.F., Smith O.: *Potato Processing*. (4 ed). AVI Van Nostrand Reinhold Com. New York 1987.
- [18] Thed S.T., Phillips R.D.: Changes of dietary fiber and starch composition of processed potato products during domestic cooking. *Food Chem.*, 1995, **52**, 301-307.

CHANGES IN THE CONTENT OF PECTIC SUBSTANCES AND IN TEXTURE OF POTATOES DURING THE PRODUCTION OF FRENCH FRIES

S u m m a r y

The objective of the study was to determine changes in pectic substances contained in potato tubers, at several stages of the production of French fries, as well as texture-forming effects of these compounds. The samples studied in the laboratory were: potato tubers, strips, and French fries. French fries were obtained from nine posts within one production line. An Instron apparatus was applied to determine contents of pectic substances in the samples of potato tubers, strips, and French fries, as well as their textures.

After blanching, the content of water-soluble pectins in potatoes was by 30% lower, whereas the content of protopectins – by 50% higher than in the raw material. The content of protopectins in French fries was three times as high as in potatoes processed. At the most stages of the potato processing, their texture

depended on the content of pectins. The texture of semi-fried and ready-made French fries was positively and statistically significantly correlated with the content of protopectin ($r = 0.71$) and total proteins ($r = 0.63$).

Key words: pectic substances, texture, potato tubers, strips, French fries. ☒

GRAŻYNA CICHOSZ, JERZY SZPENDOWSKI, MAŁGORZATA KOSEK

PRZYDATNOŚĆ TECHNOLOGICZNA ZAKWASÓW MEZOFILNYCH PACIORKOWCÓW MLEKOWYCH W ZALEŻNOŚCI OD WARUNKÓW PROPAGACJI

Streszczenie

Oceniono przydatność technologiczną zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych namnażanych w mleku odtłuszczonym oraz w dwóch różnych podłożach wzrostowych w temp. 24 i 30°C. Badano wpływ rodzaju podłoża oraz temperatury inkubacji na liczebność bakterii fermentacji mlekowej z uwzględnieniem udziału szczepów fermentujących cytryniany.

Przydatność technologiczną zakwasów oceniano dwuetapowo. Porównano zawartość diacetylu i CO₂ w mleku ukwaszonym do pH 5,2, przy zastosowaniu badanych zakwasów. Zakwasy namnażane w temp. 24°C zastosowano w technologii sera gouda. Sery po 4 i 6 tygodniach dojrzewania poddano ocenie sensorycznej.

Zastosowanie podłoży wzrostowych umożliwiło – zwłaszcza przy inkubacji w temp. 24°C – otrzymanie zakwasów o większej liczebności bakterii fermentacji mlekowej oraz większym odsetku szczepów fermentujących cytryniany, a w konsekwencji większej aktywności aromato- i gazotwórczej. Sery wyprodukowane z zastosowaniem zakwasów z badanych podłoży charakteryzowały się korzystniejszym smakiem i zapachem (wyraźnie orzechowy) oraz zdecydowanie lepszym oczkowaniem niż sery wyprodukowane z zakwasem namnażanym w mleku odtłuszczonym.

Słowa kluczowe: zakwasy mezofilne, szczepy fermentujące cytryniany, diacetyl, CO₂, jakość sensoryczna, ser gouda.

Wstęp

W kształtowaniu cech sensorycznych produktów mleczarskich, takich jak: sery podpuszczkowe i twarogowe, masło, śmietana oraz napoje fermentowane szczególną rolę odgrywają kultury *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* i *Leuconostoc* sp., fermentujące oprócz laktozy również cytryniany z wytworzeniem diacetylu, acetoniny, aldehydu octowego i CO₂ [7, 15]. Podczas propagacji w mleku szczepy fermentu-

jące cytryniany charakteryzują się zróżnicowanymi szybkościami wzrostu i zmienną aktywnością biochemiczną.

Szczepy *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* metabolizują cytryniany do szczawianu i octanu. Powstały szczawian pod wpływem dehydrogenazy szczawianowej ulega przemianie w pirogronian, który po dekarboksylacji tworzy tzw. aktywny aldehyd tj. kompleks aldehyd octowy – TPP. Aktywny aldehyd po reakcji z acetylo-CoA przekształcany jest do diacetylu. Enzymy rozszczepiające cytryniany mogą działać dopiero po obniżeniu pH do wartości 5,5, stąd maksymalna synteza diacetylu i acetoiny ma miejsce podczas fazy logarytmicznego wzrostu bakterii. Dzięki represji syntezy reduktazy diacetylu i acetoiny cytrynianem, wymienione związki karbonylowe kumulowane są w środowisku, osiągając maksymalny poziom bezpośrednio przed wykorzystaniem cytrynianów, po czym następuje szybka redukcja diacetylu, a u większości szczepów także acetoiny [6, 20].

W odróżnieniu od kultur *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* szczepy *Leuconostoc* sp. metabolizują cytryniany z opóźnieniem. W hodowlach prowadzonych w środowisku o wartości pH ok. 7,0 nie kumulują diacetylu i acetoiny, produkują natomiast octan. Po zakwaszeniu środowiska do pH poniżej 5,5 większość szczepów z rodzaju *Leuconostoc* sp. syntetyzuje zarówno diacetyl, jak też acetoinę, przy czym stężenie acetoiny w hodowlach bakterii mlekowych wykorzystujących cytryniany jest zawsze wyższe od poziomu diacetylu. Prawdopodobnie wynika to z uwarunkowań energetycznych tj. ograniczonej zdolności bakterii do syntezy acetylo-CoA, związku uczestniczącego wyłącznie w tworzeniu diacetylu [19, 21].

Maksymalne stężenie diacetylu i acetoiny w hodowlach kultur *Leuconostoc* sp. obserwuje się przy pH 4,3. Jednakże acetoina oraz 2,3-butandiol syntetyzowany zarówno przez szczepy *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*, jak i *Leuconostoc* sp. – nie stanowią komponentów aromatu produktów mleczarskich. Intensywność aromatu, tj. stężenie przede wszystkim diacetylu zależy w pewnym stopniu od dostępu tlenu [3].

W formowaniu cech sensorycznych istotna jest również proporcja diacetylu i aldehydu octowego – optimum występuje przy 4-krotnie wyższym stężeniu diacetylu niż aldehydu octowego. Dzięki redukcji aldehydu octowego do etanolu bakterie z rodzaju *Leuconostoc* skutecznie zapobiegają kumulowaniu aldehydu w produktach mleczarskich [17, 23]. Wzrost zawartości diacetylu w zakwasach można osiągnąć poprzez podwyższenie zawartości s.m. do ok. 12–15% [11]. Zwiększona zawartość s.m. jest równoznaczna z większą koncentracją cytrynianów, stymulujących wzrost i aktywność biochemiczną szczepów syntetyzujących związki aromatu.

Hugenholtz i wsp. [8] dowiedli, że szczepy *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* mogą rosnąć w podłożu z cytrynianem jako jedynym źródłem energii. Maksymalną szybkość wzrostu obserwowano przy pH 6,2 do 5,5 i koncentracji cytrynianów ok. 20 mM – co odpowiada optimum działania permeazy cytrynianowej. Mechanizm genero-

wania energii z cytrynianów przez *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* jest elektrochemiczny, jednak ATP formowany jest powoli i w minimalnych ilościach w odróżnieniu od energii generowanej z laktozy [19].

W badaniach Libudzisz i wsp. [16] udowodniono, że szybkość wzrostu kultur *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* w podłożu APLC i EPLC wynosiła od 0,39 do 0,60·h⁻¹ w hodowlach bez neutralizacji. Większość badanych szczepów wyraźnie reagowała większą dynamiką wzrostu w hodowlach neutralizowanych (0,74 do 0,92·h⁻¹), co świadczy o dużej wrażliwości na końcowy produkt metabolizmu, jakim jest kwas mlekowy.

Porównując szybkość wzrostu w podłożach APLC i EPLC [12] z rezultatami badań Hugenoltza i wsp.[8], w których jedynym źródłem węgla był cytrynian, można stwierdzić, że kultury *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* charakteryzują się wysokim powinowactwem do laktozy. Dowodem tego jest kilkakrotnie wyższa dynamika wzrostu w podłożach zawierających laktozę, w porównaniu z szybkością wzrostu w obecności wyłącznie cytrynianów.

Przedstawione powyżej różnice w składzie produktów fermentacji laktozy i cytrynianów są bardzo często powodem braku stabilności cech biochemicznych zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych. Natomiast zróżnicowane szybkości wzrostu homo- i heterofermentatywnych paciorkowców mlekowych są przyczyną braku stabilności międzyszczepowej zakwasów mleczarskich [2, 7, 16].

Brak stabilności cech biochemicznych mezofilnych paciorkowców mlekowych uwarunkowany jest genetycznie, bowiem poza DNA chromosomalnym, kodującym prawie 90% informacji genetycznej, geny bardzo często zlokalizowane są w DNA plazmidowym [14]. Istotne z technologicznego punktu widzenia cechy genetyczne mezofilnych paciorkowców mlekowych są kodowane w DNA plazmidowym, nie chromosomalnym, stąd często spotykany w praktyce brak stabilności zdolności fermentacji laktozy i galaktozy, aktywności aromatotwórczej i peptydolitycznej, fagoporności oraz zdolności syntezy i oporności na bakteriocyny [14]. Mutacje prowadzące do powstania Lac⁻ i Prt⁻ szczepów mogą mieć miejsce podczas pasażowania kultur w mleku, zwłaszcza przy nieprzestrzeganiu reżimów temperatury. Również w długotrwałych hodowlach ciągłych i półciągłych komórki bakterii są nieuchronnie przedmiotem mutacji [12].

W związku z powyższym za celowe uznano podjęcie badań nad zastosowaniem do propagacji zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych podłoży zawierających niezbędne składniki pokarmowe: jako źródło węgla zarówno laktozę, jak i cytryniany stymulujące wzrost szczepów *L. Lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* i *Leuconostoc* sp., a także sole buforujące, neutralizujące kwas mlekowy [22].

Celem podjętych badań było:

- określenie wpływu dwóch podłoży (różnych producentów) oraz temperatury inku-

- bacji na liczbę bakterii mlekowych oraz odsetek szczepów fermentujących cytryniany,
- porównanie aktywności gazotwórczej (ilości CO₂) otrzymanych zakwasów,
 - porównanie stabilności biochemicznej zakwasów namnażanych w podłożach oraz mleku odtłuszczonym bezpośrednio po inkubacji oraz po 24 h przechowywania w temp. 4°C,
 - ocena przydatności technologicznej zakwasów poprzez porównanie liczby bakterii mlekowych z uwzględnieniem szczepów fermentujących cytryniany, ilości diacetylu i CO₂ w mleku kotłowym ukwaszonym do pH 5,2,
 - porównanie jakości sensorycznej sera gouda wyprodukowanego z zakwasami namnażanymi w podłożach i mleku regenerowanym.

Material i metody badań

W doświadczeniu zastosowano skoncentrowaną, głęboko mrożoną szczepionkę mezofilnych paciorkowców mlekowych (86805) typu BD. Badaną szczepionkę namnażano w dwóch podłożach o różnej zawartości soli buforujących (produkcji Marschall oraz Systems Bio-industrie) oraz w regenerowanym mleku odtłuszczonym. Podłoża regenerowano do zawartości 6% s.m., pasteryzowano w temp. 95°C przez 30 min. Również odtłuszczone mleko regenerowane do zawartości 10% s. m., pasteryzowano jw.

Mleko regenerowane oraz podłoża zaszczipiano inokulum w ilości 0,01%, a następnie inkubowano w temp. 24 i 30°C do osiągnięcia odpowiedniej kwasowości, tj. pH 5,2 – w podłożu A, pH 4,8 – w podłożu B oraz pH 4,6 – w mleku.

Otrzymane zakwasy poddano ocenie pod względem: liczby bakterii mlekowych oraz udziału szczepów fermentujących cytryniany [9]; aktywności aromatotwórczej – oznaczanie zawartości diacetylu metodą Piena [4]; stabilności biochemicznej poprzez porównanie aktywności zakwasów bezpośrednio po inkubacji oraz po 24 h przechowywania w temp. 4°C [2]; przydatności technologicznej w wyrobie serów typu holenderskiego.

W oznaczeniach mikrobiologicznych stosowano podłoże Nickelsa-Leesmenta [9]. Analizy wykonywano w trzech powtórzeniach z 3 rozcieńczeń.

W ocenie stabilności biochemicznej zakwasów zastosowano zmodyfikowaną metodę Ellikera [2]. Do dwóch części mleka pasteryzowanego o temp. 30°C dodawano jedną część badanego zakwasu. Bezpośrednio po zaszczipieniu oraz po 2 h inkubacji w temp. 30°C oznaczano kwasowość. Przyrosty kwasowości przeliczano na 100 cm³ i wyrażano w °SH.

Oceniając przydatność technologiczną zakwasów prowadzono ukwaszanie (w temp. 30°C) mleka pasteryzowanego do uzyskania pH 5,2 (podobnie jak w przypadku

serów typu holenderskiego). Stosowano 1% dodatek zakwasu do mleka.

W ukwaszonym mleku oznaczano: liczbę bakterii mlekowych; liczbę szczepów fermentujących cytryniany (metody jw.); zawartość diacetylu (metodą jw.); zawartość CO₂ z wykorzystaniem rurek dyfuzyjnych (prod. Dragerwerk Aktiengesellschaft).

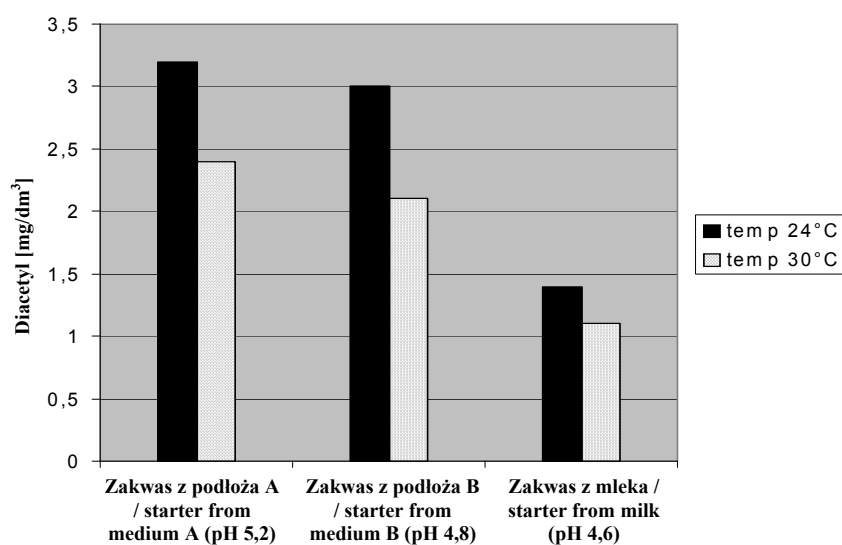
Zakwasy namnażane w temp. 24°C zastosowano w technologii sera gouda. Sery produkowano w warunkach przemysłowych zgodnie z instrukcją technologiczną, stosując 1% dodatek zakwasu. Po 4 i 6 tygodniach dojrzewania sery poddawano ocenie sensorycznej z uwzględnieniem następujących wyróżników jakości: wygląd zewnętrzny, barwa, konsystencja, oczkowanie, smak i zapach. Ocena sensoryczną serów, metodą opisową wg IDF Standard 99C [10], przeprowadził 6-osobowy zespół.

Wyniki i dyskusja

Liczba bakterii fermentacji mlekowej (BFM) w badanych zakwasach zależna była od warunków namnażania. Największą liczbę BFM stwierdzono w zakwasach z podłożu namnażanych w temp. 30°C (tab. 1). Podczas inkubacji w temp. 24°C uzyskiwano zakwasy o mniejszej liczbie BFM, ale większym odsetku szczepów fermentujących cytryniany (39,6% w podłożu A oraz 34,1% w podłożu B), prawdopodobnie dzięki wydłużeniu – średnio o 2–2,5 h – czasu trwania fermentacji. Zdecydowanie najmniejszą liczbę bakterii mlekowych, a jednocześnie najmniejszy odsetek szczepów fermentujących cytryniany stwierdzono w zakwasach namnażanych w mleku. Czynnikiem ograniczającym wzrost BFM był deficyt odpowiednich substratów, a także kwas mlekowy. Podczas wzrostu w mleku, w momencie osiągnięcia pH 4,6 fermentacja mlekowa została zahamowana.

Poprzez związanie wytwarzanego kwasu mlekowego przez sole buforujące możliwe jest utrzymanie pH na odpowiednio wysokim poziomie tj. pH 5,2 w podłożu A oraz pH 4,8 w podłożu B, a tym samym wzrost BFM do liczniejszej populacji. Konsekwencją składu chemicznego podłożu, tj. dodatku cytrynianów i odpowiednich stymulatorów wzrostu była także zdecydowanie większa liczba szczepów fermentujących cytryniany. Odzwierciedleniem zmiennych proporcji między szczepami fermentującymi cytryniany a pozostałymi szczepami była zróżnicowana zawartość diacetylu w badanych zakwasach. Zaobserwowano wyraźną zależność zawartości diacetylu od liczby szczepów fermentujących cytryniany (rys. 1). Największą zawartością diacetylu charakteryzowały się zakwasy namnażane w podłożu A. Najmniejszą z kolei zawartość diacetylu (mniejszą niż 50% średniej ze wszystkich zakwasów z podłożu) stwierdzono w zakwasach namnażanych w mleku. Jednocześnie w zakwasach inkubowanych w temp. 24°C stwierdzono większą ilość diacetylu. Podczas inkubacji w optymalnej temperaturze wzrostu bakterii, tj. 30°C, ma miejsce redukcja diacetylu (optimum temperatury działania reduktazy acetoiny) [13, 16].

Równie istotne, jak w zakwasach, są proporcje między szczepami fermentującymi i niefermentującymi cytryniany w mleku kotłowym z ich dodatkiem. W mleku z dodatkiem zakwasów namnażanych w podłożach stwierdzono większą liczbę bakterii mlekowych ogółem niż w mleku z dodatkiem zakwasów namnażanych w mleku. Zależność ta dotyczyła zarówno zakwasów namnażanych w temp. 24, jak i 30°C (tab. 1). Dodatek zakwasu namnażanego w mleku w temp. 24°C zapewniał w mleku kotłowym liczbę BFM równą $8,2 \cdot 10^8$ jtk/cm³. Stosowanie pozostałych zakwasów zapewniało w mleku kotłowym liczbę bakterii mlekowych rzędu 10^9 jtk/cm³.



Rys. 1. Zawartość diacetylu w zakwasach otrzymanych w podłożach A i B oraz w mleku.

Fig. 1. Content of diacetyl in starters propagated in medium A, B and in milk.

Największy odsetek szczepów fermentujących cytryniany (26,8%) stwierdzono w mleku z dodatkiem zakwasu namnażanego w podłożu B w temp. 24°C. W mleku z dodatkiem zakwasów namnażanych w podłożu A odsetek szczepów fermentujących cytryniany był mniejszy i wynosił odpowiednio: 25 i 22%. Zdecydowanie najmniejszy odsetek szczepów fermentujących cytryniany stwierdzono w mleku z dodatkiem zakwasów, do propagacji których zastosowano mleko regenerowane. Konsekwencją inkubacji mleka po zaszczepleniu zakwasem w temp. 30°C oraz krótszego czasu ukwaszania (tylko do pH 5,2) była mniejsza liczba BFM oraz mniejszy odsetek szczepów fermentujących cytryniany w mleku kotłowym w porównaniu z odpowiednimi zakwasami (tab. 1).

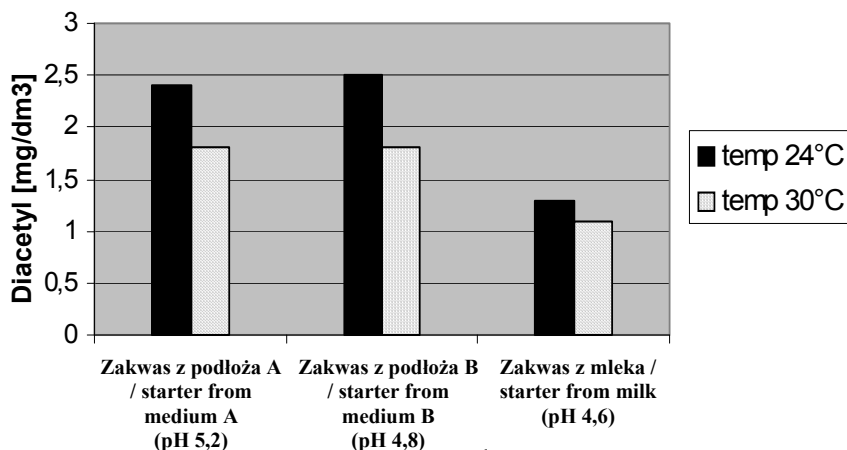
Podobnie, jak w badanych zakwasach (rys. 1), również w mleku kotłowym zaobserwowano wyraźną zależność zawartości diacetylu od liczby szczepów fermentują-

cych cytryniany. Największą zawartość diacetylu w mleku kotłowym zapewniały zakwasy namnażne w podłożu B, nieznacznie mniejszą – w podłożu A, najmniejszą zaś zakwasy namnażane w mleku w temp. 30°C. Stosowanie zakwasów namnażanych w podłożach A i B zapewnia w mleku kotłowym średnio o 60% większą zawartość diacetylu niż stosowanie zakwasów namnażanych w mleku (rys. 2).

T a b e l a 1

Wpływ warunków propagacji na liczbę bakterii fermentacji mlekowej oraz udział szczepów fermentujących cytryniany.
 Effect of the propagation conditions on the number of lactic acid bacteria and the percentage of citrate-fermenting strains.

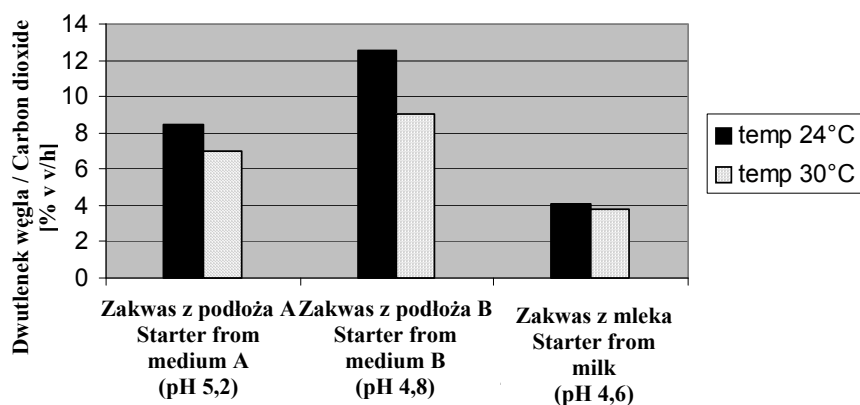
Podłoże – kwasowość zakwasu Medium – acidity of the starters [pH]	Temp. inkubacji Temp. of the incubation [°C]	Liczba bakterii w zakwasach [jtk/cm ³] Number of bacteria in the starter [cfu/cm ³]		Udział bakterii fermentujących cytryniany Per cent rate of the bacteria that ferment citrates [%]	Liczba bakterii w mleku [jtk/cm ³] Number of bacteria in the milk [cfu/cm ³]		Udział bakterii fermentujących cytryniany Share of the bacteria that ferment citrates [%]
		Ogółem Total	Fermentujących cytryniany Fermenting citrates		Ogółem Total	Fermentujących cytryniany Fermenting citrates	
A - 5,2	24	4,4x10 ⁹	1,5 x10 ⁹	34,1	1,4x10 ⁹	3,5 x10 ⁸	25,0
	30	5,6x10 ⁹	1,6 x10 ⁹	28,6	2,0 x10 ⁹	4,4 x10 ⁸	22,0
B - 4,8	24	5,8x10 ⁹	2,3 x10 ⁹	39,6	2,8 x10 ⁹	7,5 x10 ⁸	26,8
	30	6,9x10 ⁹	2,2 x10 ⁹	31,9	3,1 x10 ⁹	7,3 x10 ⁸	23,5
Mleko - 4,6	24	1,4x10 ⁹	2,9 x10 ⁸	20,7	8,2 x10 ⁸	7,7 x10 ⁷	9,4
	30	2,4x10 ⁹	4,1 x10 ⁸	17,1	1,2 x10 ⁹	9,7 x10 ⁷	8,1



Rys. 2. Zawartość diacetylu w mleku ukwaszonym do pH 5,2 – zakwasami pochodzącymi z podłoża A i B oraz z mleka.

Fig. 2. Content of diacetyl in the milk acidified to pH 5,2 using starters from the medium A and B, and from the milk.

W mleku kotłowym ukwaszonym do pH 5,2 przy zastosowaniu ocenianych wcześniej zakwasów oznaczano również zawartość CO_2 . Zaobserwowano analogiczne, jak w przypadku diacetylu, zależności, tj. największą ilość CO_2 w mleku z zakwasami z podłoża B (niezależnie od temperatury propagacji zakwasu) i najmniejszą ilość CO_2 w mleku z zakwasami namnażanymi w mleku regenerowanym. (rys. 3).



Rys. 3. Zawartość CO_2 w mleku ukwaszonym do pH 5,2 zakwasami z podłoża A, B i z mleka.

Fig. 3. Content of carbon dioxide in the milk acidified to pH 5,2 using starters from the medium A and B, and from the milk.

Relatywnie wysoka zdolność syntezy diacetylu oraz wysoka aktywność gazotwórcza zakwasów namnażanych w podłożach koreluje z liczbą szczepów fermentujących cytryniany. Wskazuje także na prawdopodobnie wyższy odsetek szczepów *Leuconostoc* sp. w zakwasach z podłoży. W odróżnieniu od szczepów *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* kultury *Leuconostoc* sp. wytwarzają CO₂ w wyniku fermentacji zarówno cytrynianów, jak i laktozy [6, 18, 23].

Tabela 2

Wpływ warunków propagacji na stabilność biochemiczną zakwasów.
Effect of the propagation conditions on biochemical stability of starters.

Podłoże – kwasowość zakwasu Medium – acidity of the starter [pH]	Temperatura inkubacji Temperature of the incubation [°C]	Przyrosty kwasowości mleka z zakwasem Acidity Increments of the milk containing a starter [°SH]	
		Zakwas świeży Fresh starter	Zakwas przechowywany (24 h, temp. 4°C) Stored starter (24 h, temp. 4°C)
A – 5,2	24	10,5	10,5
	30	10,0	10,0
B – 4,8	24	11,0	11,0
	30	10,5	10,5
Mleko – 4,6	24	10,0	7,0
	30	9,5	6,5

Istotną, pod względem technologicznym, cechą zakwasów mezofilnych paciorkowców mlekowych jest stabilność podczas (koniecznego niekiedy) przechowywania zakwasów. Badane zakwasy bezpośrednio po inkubacji charakteryzowały się bardzo wysoką aktywnością (10°SH), wyjątkiem był zakwas namnażany w mleku w temp. 30°C (9,0°SH), (tab. 2). Przyrost kwasowości mleka z zakwasem o 10°SH (zmodyfikowana próba Ellikera) wskazuje na bardzo dobrą jakość zakwasu [2]. Również po 24 h inkubacji aktywność zakwasów namnażanych w podłożach była bardzo wysoka i pozostawała na niezmiennym poziomie. Natomiast zakwas namnażany w mleku, mimo natychmiastowego schłodzenia do temp. 4°C (po osiągnięciu pH 4,6), charakteryzowały się znacznie niższą (o ponad 30%) aktywnością kwaszącą po 24 h przechowywania (tab. 2).

Sery wyprodukowane z zastosowaniem zakwasów z podłoży A i B każdorazowo charakteryzowały się korzystniejszym smakiem i zapachem (wyraźnie orzechowym) oraz zdecydowanie lepszym oczkowaniem niż sery wyprodukowane z zakwasem namnażanym w odtłuszczonym mleku regenerowanym. Poza tym, nie stwierdzono różnicowania w zakresie wyglądu, barwy ani konsystencji serów wyprodukowanych z zastosowaniem badanych zakwasów (tab. 3). Degradacja parakazeiny do niskocząsteczkowych peptydów i wolnych aminokwasów w większym stopniu zależna jest od

Tabela 3

Jakość sensoryczna serów gouda w zależności od warunków propagacji zakwasu.
Sensory quality of Gouda chesses depending on the starter propagation conditions.

Zakwas Starter	Czas dojrzewania [tyg] Time of ripening [weeks]	Wygląd zewnętrzny Finish and appearance	Barwa Colour	Struktura / Texture		Smakowitość / Flavour	
				Oczkowanie Eyes	Konsystencja Consistency	Zapach / Aro- ma	Smak / Taste
Podłoże A Medium A	4	kształt prostokątnych blo- ków, gładkie powierzchnie, bez defektów; shaped as rectangular blocks, smooth surface, no defects	naturalna, jednolita; uniform, natural	drobne, nieliczne, równomierne fine, not numerous, equally spread	lekko krucha slightly fragile	czysty, łagodny pure, mild	lekko kwaśny slightly acid
	6			typowe, kształtne $\phi=3$ mm; typical, regular $\phi=3$ mm	elastyczna, spręży- sta, prawidłowa elastic, tender, regular	typowy orze- chowy / typical nutty	czysty słodki pure sweet;
Podłoże B Medium B	4	kształt prostokątnych blo- ków, gładkie powierzchnie, bez defektów; shaped as rectangular blocks, smooth surface, no defects	naturalna, jednolita; uniform, natural	drobne, dosyć liczne, nieregul- larne/ fine, quite numerous, irregular	lekko krucha/ slightly fragile	czysty, łagod- ny/ pure mild	lekko kwaśny slightly acid
	6			typowe, kształtne $\phi = 3$ mm typical, regular $\phi = 3$ mm	elastyczna, spręży- sta, prawidłowa elastic, tender, regular	typowy orze- chowy / typical nutty	czysty słodki; pure sweet
Mleko Milk	4	kształt prostokątnych blo- ków, gładkie powierzchnie, bez defektów; shaped as rectangular blocks, smooth surface, no defects	naturalna, jednolita; uniform, natural	nieliczne, drobne, nieregularne not numerous, fine, irregular	lekko krucha slightly fragile	lekko kwaśny, nieczysty slightly acid, impure	kwaśny, nie- czysty / acid, impure
	6			nieliczne, drobne, nieregularne not numerous, small, irregular	elastyczna, spręży- sta, prawidłowa; elastic, tender, regular	łagodny, lekko przejrzały; mild, slightly overripened	lekko pikant- ny, nieczysty; slightly piqu- ant, impure

liczby nie pochodzących z zakwasu pałeczek mlekowych niż od liczby kultur zakwasu [5]. Jednakże oczkowanie oraz zapach serów typu holenderskiego determinowane są liczbą oraz aktywnością dodawanych z zakwasem szczepów fermentujących cytryniany. Można zatem stwierdzić, że orzechowy zapach oraz liczniejsze, bardziej kształtne oczka w badanych serach wyprodukowanych z zakwasami z podłoży były konsekwencją większego odsetka szczepów fermentujących cytryniany, a tym samym większej aktywności aromato- i gazotwórczej tych zakwasów.

Wnioski

1. Wszystkie badane czynniki (podłoże wzrostowe, temperatura inkubacji, końcowe pH) determinowały aktywność biochemiczną zakwasów.
2. Zastosowanie podłoży umożliwia otrzymywanie zakwasów o większej liczbie bakterii fermentacji mlekowej oraz większym odsetku szczepów fermentujących cytryniany w porównaniu z zakwasami namnażanymi w mleku.
3. Inkubacja zakwasów w temp 24°C zapewnia większy odsetek szczepów fermentujących cytryniany niż inkubacja w temp. 30°C.
4. Zakwasy namnażane w podłożach (w odróżnieniu od zakwasów namnażanych w mleku) charakteryzowały się wysoką i stabilną aktywnością kwaszącą podczas przechowywania.
5. Konsekwencją większej liczby szczepów fermentujących cytryniany była większa zawartość diacetylu w zakwasach z podłoży oraz większa zawartość zarówno diacetylu jak też CO₂ w mleku kotłowym po ukwaszeniu do pH 5,2,
6. Sery gouda wyprodukowane z zakwasami z podłoży charakteryzowały się znacznie lepszą jakością sensoryczną (zdecydowanie lepsze oczkowanie, wyraźny orzechowy zapach) niż sery, w których technologii zastosowano zakwas namnażany w mleku regenerowanym.

Literatura

- [1] Bacterial Nomenclature Up-To-Date. Information Centre for European Culture Collections (ICECC) 1993, Braunschweig.
- [2] Bielecka M., Derejska-Benedict K.: Wzrost i aktywność kultur zakwasów podczas prowadzenia na mleku świeżym. Mat. II Sesji Nauk. Postęp w technologii, technice i organizacji przemysłu mleczarskiego. Olsztyn 1984, s. 228-229.
- [3] Boumerdassi H., Monnet C., Desmazeaud M., Corrieu G.: Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen. J. Dairy Sci., 1997, **80**, 634-639.
- [4] Case R.A., Bradley R.L., Williams R.R.: Chemical and physical methods. In Standards Methods for the Examination of Dairy Products, ed.G.H. Richardson, American Public Health Association, Washington 1985, pp. 327-394.

- [5] Cichosz G., Zalecka A., Lenkiewicz M.: The influence of streptococci and lactobacilli on proteolysis in gouda cheese. *Milchwiss*, 2003, **58** (5/6), 297-300.
- [6] Cogan T., M., Jordan K., N.: Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2704-2709.
- [7] Hugenholtz J.: Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, **12**, 165-178.
- [8] Hugenholtz J., Perdon L., Abee T.: Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59** (12), 4216-4222.
- [9] IDF Standard 149: 1991. Lactic acid starters. Standard of identity.
- [10] IDF Standard 99C: 1997. Sensory evaluation of dairy products by scoring. Preference.
- [11] Kiszka J., Panfil-Kuncewicz H.: Charakterystyka zakwasów mleczarskich na mleku o podwyższonej zawartości suchej masy. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olst., Technologia Alimentorum.*, 1989, **23**, 15-24.
- [12] Kornacki K.: Nowe generacje kultur starterowych w rozwoju technologii żywności. *Biuletyn Informacyjny Biolacta-Textel*, 1997, **4**, 16-18.
- [13] Levata-Jovanovic M., Sandine W., E.: Citrate utilization and diacetyl production by various strain of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 1996, **79**, 1928-1935.
- [14] Libudzisz Z.: Genetyczne determinanty metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej. *Biotechnologia*, 1992, **2**, 66-79.
- [15] Libudzisz Z.: Tworzenie związków aromatu przez bakterie fermentacji mlekowej. W: *Bakterie fermentacji mlekowej*. Wyd. Politechniki Łódzkiej, 1998, s. 110-121.
- [16] Libudzisz Z., Galewska E.: Citrate metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* strains. *Die Nahrung*, 1991, **35** (6), 611-618.
- [17] Liu S.O., Asmundson R.V., Holland R., Crow V.I.: Acetaldehyde metabolism by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* under stress conditions. *Int. Dairy J.*, 1997, 175-183.
- [18] Martley F.G., Crow V.L.: Open texture in cheese: the contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *J. Dairy Res.*, 1996, **63**, 489-507.
- [19] Marty-Teyssat C., Posthuma C., Lolkema J.S., Schmitt P., Divies C., Konings W.N.: Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 2178-2185.
- [20] Monnet C., Schmitt P., Divies C.: Diacetyl production in milk by an a-acetolactic accumulating strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2916-2921.
- [21] Oberman H.: Klasyfikacja bakterii mlekowych. W: *Bakterie fermentacji mlekowej*. Wyd. Politechniki Łódzkiej, 1998, s. 7-25.
- [22] Rybka J., Fetliński A.: Podłoża do przygotowania zakwasów roboczych. *Przegl. Mlecz.*, 1995, **5**, 134-136.
- [23] Vedomuthu E.R.: The dairy *Leuconostoc* : use in dairy products. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2725-2730.

THE TECHNOLOGICAL USEFULNESS OF MESOPHILIC LACTIC STREPTOCOCCI STARTERS DEPENDING ON THE PROPAGATION CONDITIONS

S u m m a r y

The technological usefulness of mesophilic lactic streptococci starters propagated in skimmed milk and in two different growth media at 24 and 30°C was evaluated. The effect of medium type and incuba-

tion temperatures on the number of lactic acid bacteria were studied including the percentage rate of the citrate-fermenting bacteria.

The evaluation of the starters' technological usefulness comprised two phases. There were compared contents of diacetyl and of CO₂ in milk that was acidified to pH 5.2 using experimental starters. Starters that propagated at 24°C were used to produce Gouda cheese. After a 4 and 6 week ripening period, sensory properties of the cheese were evaluated.

Owing to the growth media used, it was possible, especially when the incubation took place at 24°C, to obtain starters with higher numbers of lactic acid bacteria, and a higher percentage of citrate-fermenting bacteria; consequently, the aroma- and gas-forming activity of the starters was higher, too. Cheeses produced with starters, which propagated on the experimental media, had a more advantageous flavour and smell (a clearly nutty smell) and a significantly better eye structure than cheeses produced with a starter propagated on skimmed milk.

Key words: mesophilic starters, citrate-fermenting strains, diacetyl, CO₂, sensory quality, Gouda cheese. ☒

KATARZYNA CZACZYK, ANNA OLEJNIK, PATRYK MIĘŻAŁ, WŁODZIMIERZ GRAJEK

POSZUKIWANIE PROSTYCH MODELI DO BADANIA ADHEZJI BAKTERII PROBIOTYCZNYCH

Streszczenie

Przeprowadzono studia porównawcze nad możliwością zastąpienia w badaniach adhezji bakterii mlekowych modelu kultury komórek nabłonka jelitowego innymi uproszczonymi modelami. Badano przyczepność bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* Shirota ATCC 39539, *Lactobacillus acidophilus* LC1 oraz *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 do membran wykonanych z alginianu, karagenu, żelatyny, kolagenu, szkła, polistyrenu i karboksymetylocelulozy.

Zaobserwowano największy stopień przyczepności bakterii probiotycznych do membran wykonanych z karboksymetylocelulozy i kolagenu. W większości wariantów doświadczeń liczba przyczepionych komórek bakteryjnych wzrastała wraz ze wzrostem czasu ich kontaktu z powierzchnią stałą. Wykazano także różnice w przyczepności komórek do hydrożeli o różnych stężeniach. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że stopień adhezji bakterii probiotycznych do różnych powierzchni organicznych i nieorganicznych jest cechą zależną od szczepu mikroorganizmu. Żaden z prostych modeli adhezyjnych, zastosowanych w tej pracy, nie charakteryzował się adhezyjnością porównywalną z komórkami nabłonka jelitowego Caco-2 i HT-29, stosowanego obecnie jako główny model *in vitro* do badań adhezji bakterii probiotycznych.

Słowa kluczowe: adhezja, *Lactobacillus*, alginian, karagen, kolagen, karboksymetyloceluloza.

Wstęp

Zdolności adhezyjne bakterii probiotycznych są uważane za jedną z najbardziej pożądanych cech tych drobnoustrojów, gdyż warunkują one długotrwałe ich przebywanie w przewodzie pokarmowym człowieka i tym samym przedłużony wpływ na jego zdrowie. Dzieje się tak nawet wówczas, gdy adhezja bakterii ma charakter przejściowy i nie kończy się trwałą kolonizacją jelit [19, 21]. Z tego powodu badania nad zdolnościami adhezyjnymi bakterii, obok badań nad ich przeżywalnością

w środowisku o niskim pH oraz w obecności żółci i enzymów trawiennych, stanowią podstawowy etap w pracach naukowych z tej dziedziny [1, 4, 5, 22].

Najczęściej stosowanym modelem do badań adhezji bakterii są jednowarstwowe kultury nabłonka jelitowego *in vitro*, szczególnie linii komórkowych Caco-2 i HT-29. Kultury nabłonkowe, mimo że są biologicznie najbardziej zbliżone do nabłonka jelitowego *in vivo*, trudno uznać za łatwy model badawczy. Ich hodowla wymaga specjalistycznej aparatury, jest długotrwała i bardzo kosztowna [4, 22]. Stąd od dawna poszukiwane są modele, które cechuje prostota i niskie koszty badań, a przy tym możliwie wiernie imitujące adhezję w przewodzie pokarmowym. Zagadnieniom związanym z adhezją mikroorganizmów do różnorodnych powierzchni poświęcono bogate piśmiennictwo naukowe [2, 6, 14, 18]. W tym kontekście można wymienić badania nad adhezją drobnoustrojów do powierzchni zębów, skóry, implantów, osadu czynnego, gleby, urządzeń inżynierskich, opakowań, produktów spożywczych i wielu innych. Część zjawisk związanych z adhezją mikroorganizmów do ciał stałych należy uznać za zjawisko niekorzystne (korozja mikrobiologiczna, skażenie powierzchni kontaktujących się z żywnością, zakażenia szpitalne), natomiast część można uznać za zjawisko pożądane (kolonizacja jelit, fermentacja żywności i pasz, udział mikroorganizmów w tworzeniu próchnicy w glebie) [6, 9, 12].

Adhezją w sensie biologicznym nazywa się trwałe i nieodwracalne połączenie się komórki drobnoustroju z powierzchnią ciała stałego. Pierwszą teorią zastosowaną do wytłumaczenia interakcji występujących w procesie adhezji bakterii była teoria DLVO, której nazwa pochodzi od pierwszych liter nazwisk jej autorów (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) [10]. Teoria ta była pierwotnie sformułowana do wyjaśnienia adhezji koloidów i dopiero później adaptowana do opisu adhezji mikroorganizmów. Teoria ta wskazuje na kluczową rolę dwóch rodzajów oddziaływań: przyciągających sił van der Waalsa oraz odpychających sił elektrostatycznych związanych z podwójną warstwą elektronową wokół komórki. Siły te działają na dystansie od 1 do 50 nm i decydują o zbliżeniu komórek do powierzchni ciał stałych na tyle blisko, aby powstały wiązania chemiczne trwale łączące oba obiekty. Całkowita wolna energia interakcji między komórką a powierzchnią ciała stałego jest wypadkową obu sił i decyduje ona o możliwości zbliżenia komórki bakteryjnej do ciała stałego. Największe przyciąganie występuje w obszarze tzw. pierwszego minimum energetycznego, które występuje na bardzo małej odległości od ciała stałego, rzędu 1 nm. Minimum to jest oddzielone od drugiego minimum energetycznego obszarem dodatniej energii, która odpowiada za odpychanie komórki od obiektu. Pokonanie tego niekorzystnego obszaru zależy w dużym stopniu od kształtu komórek. Im mają one mniejszy promień w miejscu styku obu powierzchni, tym łatwiej pokonać komórce bakteryjnej siły odpychania i przejść z drugiego do pierwszego obszaru minimum energetycznego. Oznacza to faworyzowanie w procesach adhezji komórek o kształtach wydłużonych oraz mających wydłużone struktury powierzchniowe, takie jak fimbrie i rzęski [11, 13]. Wobec powyższego można uznać, że komórki pałeczek bakterii kwasu mlekowego mają kształt ułatwiający

zbliżenie do powierzchni ciała stałego. Podobne znaczenie mają nierówności na powierzchni ciała stałego – ciała szorstkie, o nieregularnej powierzchni są szybciej zasiedlane przez bakterie niż ciała o powierzchni gładkiej [6, 9].

Teoria DLVO nie uwzględnia interakcji występujących na średnich odległościach. Są to głównie siły związane z ruchami Browna oraz interakcje hydrofobowe. Te ostatnie mają szczególnie duże znaczenie w środowisku wodnym. Van Oss [24] zaproponował uogólnioną teorię rozszerzającą teorię DLVO o brakujące oddziaływania na średnich odległościach (teoria ta jest znana pod nazwą XDLVO [3]).

Obok wymienionych interakcji istotną rolę w adhezji komórek do powierzchni ciała stałego odgrywają wydzieliny komórkowe o charakterze polimerów. Składają się one z polisacharydów, glikoprotein, liposacharydów i kwasów uronowych [8, 15]. Tworzą swoistą otoczkę polimerową, która bardzo często utrudnia fizyczne zbliżenie komórki do ciała stałego [3, 23]. Właściwości takie mają niektóre gatunki drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus*. Znane są jednak liczne przypadki, w których glikokaliks otaczający komórkę (np. *Pseudomonas fluorescens*) wręcz ułatwia jej „zakotwiczenie” na powierzchni ciała stałego.

W połączeniu komórki bakteryjnej z powierzchnią danego ciała biorą udział swoiste substancje chemiczne, zwane adhezynami. W warunkach naturalnych panujących w przewodzie pokarmowym adhezyny bakteryjne łączą się swoiście z receptorami znajdującymi się na powierzchni enterocytów jelitowych oraz w śluzie jelitowym [22]. Receptory te zawierają zwykle w swej strukturze węglowodany. Adhezyny mają charakter białkowy i najobficiej występują na powierzchni organelli ruchowych (fimbrie) oraz w warstwach powierzchniowych ścian komórkowych [7, 12, 17]. Istotną rolę w adhezji odgrywają także składniki ścian komórkowych, takie jak peptydoglikan lub mureina. Warstwa mureiny może być otoczona ściśle ułożonymi cząsteczkami białka, a w jej wielowarstwową strukturę wplecione są wielocukry mające ładunek elektryczny i kwasy tejchojowe. W ścianie wielu bakterii gramodatnich są też cząsteczki kwasów lipotejchojowych zakotwiczone częścią lipidową w błonie cytoplazmatycznej, leżącą pod mureiną. Uważa się, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mogą przylegać do powierzchni ciał stałych za pośrednictwem struktur powierzchniowych zawierających kwasy tejchojowe i lipotejchojowe związane z peptydoglikanem ściany komórkowej [13, 20, 22].

Proces adhezji mikroorganizmów do powierzchni stałych przebiega w sposób wielostopniowy. Pierwszy etap, poprzedzający właściwą adhezję drobnoustrojów, stanowi przyłączanie się substancji organicznych i nieorganicznych do miejsc obdarzonych ładunkiem elektrycznym. Są to różne grupy polarne lub jony metali występujących na powierzchni ciała stałego. Gromadzenie się substancji organicznych tworzy swoisty gradient pokarmowy skoncentrowany przy powierzchni ciała stałego, co stwarza dogodne warunki do rozwoju bakterii i w konsekwencji sprzyja adhezji bakterii i tworzeniu biofilmu [23, 24].

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie prostego modelu do badań nad adhezją bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym człowieka. W tym celu przeprowadzono badania nad adhezją komórek trzech znanych szczepów bakterii probiotycznych do powierzchni różnych ciał stałych i porównano ją z adhezją tych samych mikroorganizmów do monowarstwy komórek nabłonka jelitowego *in vitro*.

Materiał i metody badań

Mikroorganizmy

W badaniach zastosowano trzy szczepy bakterii probiotycznych: *Lactobacillus casei* Shirota ATCC 39539, *Lactobacillus acidophilus* LC1 i *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. Bakterie hodowano w warunkach względnie beztlenowych na pożywce MRS w temp. 30°C przez 20 h. Do badań nad adhezją wykorzystano komórki z logarymicznej fazy wzrostu po ich odwirowaniu (5000 g, 10 min).

Komórki nabłonkowe i metoda ich hodowli

Komórki nabłonka jelitowego linii Caco-2 (ATTC HTB 37) hodowano w pożywce DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; Sigma), wzbogaconej w 20% płodową surowicę bydlęcą (FBS, Gibco BRL), inaktywowaną termicznie (56°C, 30 min.), 1% zestaw aminokwasów endogennych 100X (NEAA, Sigma) i 50 mg l⁻¹ gentamycyny (Gibco BRL). Komórki nabłonka jelitowego linii HT-29 (ATTC HTB 38) hodowano w pożywce bezsurowiczej, wzbogaconej w 10% dodatek płodowej surowicy bydlęcej. W trakcie hodowli pożywkę wymieniano na świeżą co drugi dzień. Hodowlę komórek Caco-2 prowadzono przez 21 dni, a HT-29 przez 10 dni w 6-dołkowych płytkach polistyrenowych (Nunc), w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i 95% powietrza. Eksperymenty prowadzono w trzech powtórzeniach.

Przygotowanie powierzchni stałych

1. Płytki polistyrenowe, firmy Becton Dickinson and Company (Multiwell™), pakowane sterylne, stosowano bezpośrednio, bez dodatkowej obróbki wstępnej.
2. Mikroskopowe szkiełka nakrywkowe, wykonane ze szkła borosilikatowego, odtłuszczano przez gotowanie z dodatkiem mydła szarego przez 1 h, przepłukiwano kilkakrotnie wodą destylowaną, moczo w roztworze 0,1 N NaOH przez 24 h, ponownie przepłukiwano wodą destylowaną, po czym moczo w 0,02% fosforanie trójsodowym przez 24 h, przepłukiwano wodą [16] i umieszczano w dołkach płytki polistyrenowej.
3. Karagen (Sigma) przygotowywano w formie 1, 2 i 3% roztworów, którymi zalano dołki płytki polistyrenowej, uzyskując jednolitą powierzchnię żelu karagenowego do badań nad adhezją.
4. Alginian (Sigma) przygotowano przez wprowadzenie 0,5 i 1% roztworów alginianu sodowego do dołków płytki polistyrenowej i zestalenie ich do postaci

- żelu poprzez zalanie 4% roztworem chlorku wapnia. Nadmiar roztworu wapnia usuwano, a powierzchnie przemywano jałową wodą destylowaną.
5. Kolagen (Millicell-PCF, Millipore), naniesiony na membranę poliwęglanową, umieszczano w dołkach płytki polistyrenowej.
 6. Karboksymetylocelulozę (Millicell-CM, Millipore) stosowano w formie krążków umieszczonych w dołkach płytki polistyrenowej.
 7. Żelatyna (Sigma) była przygotowana w formie 5 i 10% roztworów, które w temp. 37 i 20°C zachowały formę lepkiej cieczy bez widocznego żelowania.

Test na adhezję bakterii do ciał stałych

Ciała stałe i hydrożele umieszczano w 6-dołkowych płytkach polistyrenowych i zalewano zawiesiną komórek bakteryjnych o gęstości $1 \cdot 10^6$ jtk/ml, pozostawiając je w temp. 37°C przez 1, 2 i 8 h. W celu ograniczenia zakażeń zewnętrznych płytki pokrywano parafilmem. Po czasie inkubacji dołki przemywano dwukrotnie 2 ml buforu PBS i dokonywano liczenia przyczepionych komórek. W tym celu powierzchnię wraz z drobnoustrojami wybarwiano oranżem akrydyny (0,01%) przez 2 min i przemywano wodą destylowaną. Bakterie przyczepione do badanej powierzchni liczone z 10 pól widzenia za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (CARL-ZEISS, Axiovert 200, Niemcy).

Test na adhezję bakterii do komórek nabłonka jelitowego in vitro

Komórki bakteryjne hodowane w pożywce MRS wirowano (5000 g, 10 min), dwukrotnie przemywano buforem PBS (pH = 7,2) i rozcieńczano do gęstości populacji $1 \cdot 10^6$ jtk/cm³ w pożywce DMEM bez dodatku antybiotyku. Do każdego dołka w płytce, do kultur tkankowych dodawano 1 ml zawiesiny bakteryjnej. 21-dniowa kultura Caco-2 i 10-dniowa kultura HT-29, wyhodowane w dołkach 6-dołkowej płytki, były dwukrotnie przemywane buforem PBS. Do każdego z dołków w płytce dodawano 1 ml inoculum bakteryjnego i płytkę inkubowano w warunkach beztlenowych w temp. 37°C przez 1h. Następnie usuwano pożywkę DMEM i monowarstwę enterocytów przemywano trzykrotnie buforem PBS w celu usunięcia niezwiązanych bakterii. Po ostatnim przemyciu komórki Caco-2 zostały delikatnie odklejone przez trypsynizację i odwirowane oraz poddane działaniu 1% Triton X-100 przez 5 min w celu przeprowadzenia lizy komórek enterocytów. Bakterie przyczepione do enterocytów były oznaczane metodą płytkową po odpowiednim dziesiętnym rozcieńczeniu. Hodowlę bakterii prowadzono w warunkach względnie beztlenowych, na podłożu MRS, w temp. 30°C.

Wyniki i dyskusja

W przedstawionej pracy zbadano adhezję bakterii probiotycznych do powierzchni ciał stałych, takich jak: hydrożele typu alginian, karagen, żelatyna, kolagen oraz szkło,

polistyren i karboksymetyloceluloza. Stopień adhezji bakterii kwasu mlekowego oceniano na podstawie liczebności komórek bakteryjnych przyczepionych do 1 cm² powierzchni po 1, 2 i 8 h inkubacji. Określono także stopień adhezji badanych szczepów bakterii do monowarstwy komórek nabłonka jelitowego *in vitro*.

Adhezja bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do powierzchni polistyrenu i szkła

W pierwszym etapie badań określono możliwości adhezji dwudziestogodzinnej hodowli komórek *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* oraz *Lactobacillus rhamnosus* do powierzchni polistyrenu i szkła. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1.

Wyniki doświadczeń wskazują jednoznacznie, że badane szczepy bakterii mlekowych nie wykazały adhezji do powierzchni polistyrenu. Również adhezja do szkła borosilikatowego została oceniona jako bardzo mała. Komórki *L. casei* w ogóle nie przyłączyły się do powierzchni szkła, a pozostałe dwa szczepy wykazały adhezję rzędu 13–26 komórek/cm².

Tabela 1

Adhezja bakterii do powierzchni polistyrenu i szkła.
Bacterial adhesion to polystyrene and glass surfaces.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni (po 1h ekspozycji) Number of bacteria adhering to a given surface (after 1h of exposure) [jtk/cm ²] / [cfu/cm ²]	
	Polistyren Polystyrene	Szkło Glass
<i>L. casei</i> Shirota	0	0
<i>L. acidophilus</i> LC1	0	26 (± 7)
<i>L. rhamnosus</i> GG	0	13 (± 3)

(±) – odchylenie standardowe / standard deviation

Podobne badania prowadzili Boonaert i wsp. [5], którzy testowali zdolności adhezyjne bakterii *Lactococcus lactis* do powierzchni polistyrenu i szkła. Autorzy ci wykazali, że adhezja tych bakterii kształtowała się na poziomie 10⁶ jtk/cm², a decydujący wpływ na zjawisko miała faza wzrostu mikroorganizmów (większa w fazie stacjonarnej w porównaniu do logarytmicznej fazy wzrostu). W naszych badaniach w ogóle nie stwierdzono przyczepności badanych szczepów *Lactobacillus* do tego materiału. W przypadku adhezji bakterii *L. lactis* do szkła nie obserwowano już zależności związanej z wiekiem populacji bakteryjnej. Autorzy ci wskazali także na niekorzystny wpływ przemywania komórek buforem PBS, wynikający z ekstrakcji białek i kwasów nukleinowych. W rezultacie dochodziło do lizy części komórek bakteryjnych. Zagadnienie to wymaga jednak wyjaśnienia, gdyż PBS jest powszechnie stosowany do przemywania komórek bakteryjnych, szczególnie przy wykorzystaniu nabłonkowych kultur komórkowych. W pracy tej zwrócono także uwagę na istotną

rolę w adhezji metabolitów wydzielanych przez komórki, czego nie uwzględnia model DLVO [3]. Należy podkreślić także, że adhezja *L. lactis* do szkła była mniejsza niż do polistyrenu. Flint i wsp. [9] określili wydajność adhezji bakterii *Streptococcus thermophilus* do szkła na poziomie 10^7 jtk/cm² i była ona większa niż do różnych rodzajów stali kwasoodpornych. Studia nad adhezją ośmiu szczepów bakterii należących do rodzajów *Escherichia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* i *Bacillus* do szkła borosilikonowego wykazały, że wydajność adhezji wynosiła 10^5 – 10^7 jtk/cm² [14].

Adhezja bakterii z rodzaju Lactobacillus do powierzchni membrany karboksymetylocelulozowej, kolagenu i żelatyny

W kolejnym etapie doświadczeń określono adhezję badanych mikroorganizmów do powierzchni membrany wykonanej z karboksymetylocelulozy lub z kolagenu. Kontakt bakterii z obu powierzchniami trwał 1 h. Wyniki tych badań przedstawiono w tab. 2.

Uzyskane dane wskazują, że wszystkie trzy badane szczepy probiotyczne wykazały zdolność do przyczepienia się zarówno do karboksymetylocelulozy, jak i do kolagenu. Porównując obie powierzchnie należy stwierdzić, że adhezja do karboksymetylocelulozy była zdecydowanie większa niż do kolagenu. Obserwacja ta dotyczyła szczególnie *L. rhamnosus* GG, gdyż przyczepność tych bakterii do karboksymetylocelulozy była 25-krotnie większa od przyczepności do kolagenu. W przypadku *L. casei* Shiota różnica była 10-krotna. Najmniejszą przyczepność do kolagenu wykazał szczep *L. acidophilus*. Większa przyczepność bakterii do powierzchni karboksymetylocelulozy może być tłumaczona większą porowatością jego powierzchni. Ciekawe badania nad adhezją bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* prowadzili Aleljun i wsp. [1]. Przetestowali oni przyczepność ponad stu szczepów bakteryjnych do kolagenu typu I i wykazali, że zdolność tę wykazało ok. 75% badanych szczepów, w tym również szczepy należące do gatunków *L. casei*, *L. acidophilus* i *L. rhamnosus*. Autorzy ci wskazali także na zależność między właściwościami adhezyjnymi a wiekiem kultury u niektórych szczepów. Maksimum przyczepności obserwowali we wczesnej fazie stacjonarnej. Nieznaczny wpływ na adhezję bakterii miała także pożywka hodowlana i jej pH. Autorzy ci zwracają uwagę na powszechną zdolność pałeczek mlekowych do adhezji do kolagenu, co jest cechą inwazyjnych szczepów bakterii chorobotwórczych. Zwracają oni przy tym uwagę na fakt, że badane przez nich szczepy nie przyczepiały się do fibronektyny.

Tabela 2

Adhezja bakterii do powierzchni karboksymetylocelulozy i kolagenu.
Bacterial adhesion to carboxymethylcellulose and collagen surfaces.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni (po 1h ekspozycji) Number of bacteria adhering to a given surface (after 1h of exposure) [jtk/cm ²] / [cfu/cm ²]
------------------	--

	Karboksymetyloceluloza Carboxymethylcellulose	Kolagen Collagen
<i>L. casei</i> Shirota	12568 (± 1756)	1211 (± 98)
<i>L. acidophilus</i> LC1	4764 (± 1430)	737 (± 56)
<i>L. rhamnosus</i> GG	36953 (± 4680)	1474 (± 102)

(±) – odchylenie standardowe / standard deviation

Próba przeprowadzenia doświadczeń nad adhezją bakterii do żelatyny nie powiodła się z uwagi na trudności w uzyskaniu struktury żelowej w temperaturze 20°C i 37°C.

Adhezja bakterii z rodzaju Lactobacillus do powierzchni żelu karagenowego

Dogodną powierzchnią do adhezji bakterii mogą być, obok kolagenu, także inne hydrożele. W związku z tym w pracy przebadano zdolność bakterii mlekowych do zasiedlania karagenu. W badaniach tych uwzględniono różny czas ekspozycji oraz różną gęstość hydrożelu. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tab. 3.

Przyczepność badanych szczepów bakterii do karagenu należy ocenić jako małą, rzędu 2-4 cykli logarytmicznych w przeliczeniu na 1 cm². Odnosi się to szczególnie do adhezji szczepów *L. acidophilus* LC1 i *L. rhamnosus* GG do 1% żelu karagenowego. Wyniki badań wskazują jednak, że dużą rolę w adhezji odgrywa czas kontaktu bakterii z zasiedlaną powierzchnią oraz gęstość stosowanego żelu. Przy zastosowaniu 1% karagenu w pierwszych dwóch godzinach ekspozycji liczba przyczepionych bakterii była podobna, jednak po 8 h obserwowano znaczący wzrost adhezji.

Wraz ze wzrostem gęstości żelu wyraźny był wzrost liczby przyczepionych bakterii. Podobną zależność odnotowano w stosunku do czasu ekspozycji, gdyż wydłużenie kontaktu bakterii z powierzchnią karagenu zwiększyło liczbę związanych z nią komórek. Do wyników tych należy jednak podejść z pewną ostrożnością, bowiem zwiększenie liczebności bakterii na powierzchni karagenu po 8 h inkubacji może być wynikiem rozmnażania się bakterii, które przyczepiły się do tej powierzchni w początkowym okresie. Sugeruje to brak różnic w adhezji do 1% żelu między 1. i 2. h ekspozycji, jednakże wyniki uzyskane przy zasiedlaniu 3% żelu wydają się tej hipotezie zaprzeczać, gdyż różnice w liczbie związanych komórek między 1. a 8. h ekspozycji są bardzo małe.

T a b e l a 3

Wpływ gęstości żelu i czasu ekspozycji na adhezję bakterii do powierzchni karagenu.
The effect of gel concentration and exposure time on the bacterial adhesion to a carrageenan surface.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni Number of bacteria adhering to a given surface [jtk/cm ²] / [cfu/cm ²]
------------------	--

	1 h	2 h	8 h
	1% karagen 1% carrageenan		
<i>L. casei</i> Shirota	145 (± 12)	146 (± 15)	711 (± 68)
<i>L. acidophilus</i> LC1	33 (± 5)	39 (± 7)	375 (± 31)
<i>L. rhamnosus</i> GG	26 (± 4)	26 (± 3)	230 (± 19)
	2% karagen 2% carrageenan		
<i>L. casei</i> Shirota	439 (± 40)	684 (± 59)	1684 (± 113)
<i>L. acidophilus</i> LC1	592 (± 43)	948 (± 102)	1263 (± 120)
<i>L. rhamnosus</i> GG	355 (± 32)	1250 (± 94)	1559 (± 126)
	3% karagen 3% carrageenan		
<i>L. casei</i> Shirota	1440 (± 105)	1487 (± 100)	1531 (± 150)
<i>L. acidophilus</i> LC1	853 (± 62)	1238 (± 109)	2171 (± 113)
<i>L. rhamnosus</i> GG	753 (± 33)	1341 (± 110)	2421 (± 201)

(±) – odchylenie standardowe / standard deviation

Adhezja bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do powierzchni żelu alginianowego

Drugim badanym hydrożelem roślinnym był alginian. Doświadczenia objęły dwie zmienne: stężenie alginianu oraz czas ekspozycji. W przypadku alginianu zależności nie były tak jednokierunkowe, jak to miało miejsce w przypadku karagenu, niemniej odnotowano wiele podobieństw. W zdecydowanej większości przypadków zwiększenie stężenia alginianu z 0,5% do 1% spowodowało zwiększenie liczby bakterii, które uległy adhezji (tab. 4).

Wpływ czasu ekspozycji na adhezję bakterii był już bardziej złożony. Na ogół obserwowano zwiększenie adhezji w drugiej godzinie ekspozycji, natomiast po 8 h liczba przyłączonych komórek wyraźnie się zmniejszała i to wielokrotnie. Trudno wskazać przyczynę tego zjawiska, albowiem w literaturze nie ma informacji o szkodliwym działaniu alginianu na komórki bakteryjne, a polimer ten jest powszechnie używany jako nośnik do immobilizacji mikroorganizmów. Można jedynie przypuszczać, że pewną rolę w osłabieniu adhezji mogła odgrywać translokacja jonów dwuwartościowych, wapnia i magnezu, z powierzchni kontaktu w głąb hydrożelu. Jony te są odpowiedzialne za stabilizację struktury żelowej alginianu.

T a b e l a 4

Wpływ gęstości żelu i czasu ekspozycji na adhezję bakterii do powierzchni alginianu.
The effect of gel concentration and time exposition on the bacterial adhesion to an alginate surface.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni Number of bacteria adhering to a given surface [jtk/cm ²] / [cfu/cm ²]
------------------	--

	1 h	2 h	8 h
	0,5 % alginian / 0,5% alginate		
<i>L. casei</i> Shirota	172 (± 10)	407 (± 38)	58 (± 7)
<i>L. acidophilus</i> LC1	692 (± 41)	809 (± 74)	53 (± 5)
<i>L. rhamnosus</i> GG	245 (± 21)	602 (± 53)	87 (± 4)
	1% alginian / 1% alginate		
<i>L. casei</i> Shirota	222 (± 21)	505 (± 51)	305 (± 30)
<i>L. acidophilus</i> LC1	689 (± 39)	739 (± 62)	192 (± 18)
<i>L. rhamnosus</i> GG	499 (± 27)	405 (± 38)	226 (± 20)

(±) – odchylenie standardowe / standard deviation

Adhezja bakterii do monowarstwy komórek nabłonka jelitowego *in vitro*

Pomimo odmiennej charakterystyki morfologicznej i funkcjonalnej obu linii komórkowych, przeprowadzone doświadczenia wykazały, że przyczepność bakterii do badanych tkanek jest zbliżona (tab. 5). Największe zróżnicowanie wykazał szczep *L.*

T a b e l a 5

Adhezja bakterii do komórek nabłonka jelitowego.

Bacterial adhesion to intestinal epithelial cells.

Szczep Strain	Liczba bakterii przyczepionych do powierzchni nabłonka (po 1h ekspozycji) Number of bacteria adhering to intestinal epithelial cells (after 1h) [jtk/cm ²] / [cfu/cm ²]	
	Caco-2	HT-29
<i>L. casei</i> Shirota	4328 (± 1500)	3490 (± 750)
<i>L. acidophilus</i> LC1	10427 (± 1600)	10680 (± 2510)
<i>L. rhamnosus</i> GG	74211 (± 7800)	6980 (± 2931)

rhamnosus GG, którego adhezja do linii Caco-2 była 10-krotnie większa niż w stosunku do linii HT-29. Wynika z tego, że ten sam mikroorganizm może wykazywać zupełnie odmienne zdolności do przyczepiania się do poszczególnych linii komórek nabłonkowych. Najmniejszymi właściwościami adhezyjnymi odznaczał się *L. casei* Shirota. W porównaniu do pozostałych rodzajów powierzchni, bakterie probiotyczne silniej adherowały do komórek nabłonkowych, a liczba komórek przyczepionych do 1 cm² powierzchni tkanki sięgała 3–4 cykli logarytmicznych bakterii.

Wnioski

1. Wykazano brak adhezji badanych szczepów bakterii probiotycznych do polistyrenu, a ich przyczepność do szkła była dużo mniejsza niż innych gatunków mikroorganizmów.

2. Na przyczepność bakterii probiotycznych wpływ wywierał czas ekspozycji oraz stężenie stosowanych hydrożeli.
3. Porównanie efektywności przyłączania komórek bakteryjnych do różnych powierzchni stałych i odniesienie rezultatów tych badań do danych uzyskanych w badaniach nad adhezją komórek bakteryjnych do nabłonka jelitowego *in vitro* jest trudne, bowiem występuje zróżnicowanie w adhezji bakterii już na poziomie linii komórek nabłonka jelitowego. Trudno w tym przypadku określić, która z tych linii jest bardziej reprezentatywna dla warunków *in vivo*.
4. Najbardziej zbliżone wyniki do adhezji na Caco-2 i HT-29 stwierdzono w przypadku adhezji na membranie karboksymetylocelulozowej, chociaż nie może być ona uznana jako model zbliżony do modelu nabłonka jelitowego

Praca naukowa finansowana ze środków Ministra Nauki w latach 1999–2004 jako projekt badawczy zamawiany PBZ-KBN/020/P06/1999/01.

Literatura

- [1] Aleljung P., Paulsson M., Emödy L., Andersson M., Naidu A.S., Wadström T.: Collagen binding by lactobacilli. *Curr. Microbiol.*, 1991, **23**, 33-38.
- [2] An Y.H., Friedman R.J.: Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J. Microbiol. Meth.*, 1997, **30**, 141-152.
- [3] Azeredo J., Visser J., Oliviera R.: Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO. *Coll. Surf.*, 1999, **14**, 141-148.
- [4] Blum S., Reniero R., Schirin E.J., Crittenden R., Mattila-Sandholm T., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A., Saarela M., Collins K.: Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 405-410.
- [5] Boonaert Ch.J.P., Dufrene Y.F., Derclaye S.R., Rouxhet P.G.: Adhesion of *Lactococcus lactis* to model substrata: direct study of the interface. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 2001, **22**, 171-182.
- [6] Bower C.K., McGuire J., Daeschel M.A.: The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trend Food Sci. Technol.*, 1996, **7**, 152-157.
- [7] Fleischer M., Przondo-Mordarska A.: Adhezyjne pałeczek z rodzaju *Acinetobacter*. *Med. Doświad. Mikrobiol.*, 1998, **50**, 229-237.
- [8] Fleming H.C., Wingender J.: Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.*, 2001, **43**, 1-8.
- [9] Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J.: Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J. Food Eng.*, 2000, **43**, 235-242.
- [10] Hermansson M.: The DLVO theory in microbial adhesion. *Coll. Surf.*, 1999, **14**, 105-119.
- [11] Jasiński A., Kilarski W.: Ultrastruktura komórki. *WSiP*. Warszawa 1987.
- [12] Krajewska-Pietrasik D., Różalska B., Różalski A.: Adhezja bakteryjna w świetle najnowszych danych. *Post. Mikrob.*, 1993, **32**, 271-287.
- [13] Kunicki-Goldfinger W.J.: *Życie bakterii*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1998.
- [14] Li B., Logan B.E.: Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Coll. Surf.*, 2004, **36**, 81-90.
- [15] Liu Y.-Q., Liu Y., Tay J.-H.: The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **65**, 143-148.
- [16] Lyndersén B.K., D'eila N.A.: *Bioprocess Engineering Systems, Equipment and Facilities*. Ed. Jon Wiley & Sons, New York 1994.

- [17] Otto K., Elwing H., Hermansson M.: The role of type 1 fimbriae in adhesion of *Escherichia coli* to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Coll. Surf.*, 1999, **15**, 99-111.
- [18] Rijnaarts H.H.M., Norde W., Bourer E.J.: Bacterial adhesion under static and dynamic condition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 3255-3265.
- [19] Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., Lee Y.K.: Probiotics: how should they be defined?. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 107-110.
- [20] Salyers A. A., Whitt D.: *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 2003.
- [21] Shortt C.: The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 411-417.
- [22] Strus M., Kukła G., Rurańska-Smutnicka D., Przondo-Morderska A., Heczko P.: Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Adherencja do linii komórkowej. *Med. Dośw. Mikrob.*, 2001, **53**, 253-258.
- [23] Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A.: Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, **223**, 287-292.
- [24] Van Oss C.J.: *Interfacial forces in aqueous media*. Ed. Marcel Dekker, New York 1994.

SEARCHING FOR SIMPLE MODELS TO STUDY THE ADHESION OF PROBIOTIC BACTERIA

S u m m a r y

Comparative studies were performed on the possibility of replacing intestinal epithelial cells by some other simplified models for the purpose of examining the adhesion of probiotic bacteria. The adhesion of *Lactobacillus casei* Shirota ATCC 39539, *Lactobacillus acidophilus* LC1, and *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 to surfaces of alginate, carrageenan, gelatin, collagen, glass, polystyrene, carboxymethylcellulose, and to intestinal epithelial cells (Caco-2 and HT-29 lines) were tested.

Among the examined solid surfaces, the highest degree of adhesion was observed in the case of carboxymethylcellulose and collagen. In the majority of experimental variants, the number of bacterial cells adhering to surfaces increased parallel to the time of their contacting a solid surface. Additionally, there were stated differences in the cell adhesion to hydrogels showing varying concentration rates. On the basis of the experiments performed, it is possible to state that the adhesion degree of probiotic bacteria to various inorganic and organic surfaces is a parameter that depends on the strain of a microorganism. Among all the simplified models applied in the studies in question, no one was marked by an adhesion rate comparable to the adhesion of intestinal epithelial cells Caco-2 and HT-29, which are, nowadays, used as a major model *in vitro* while investigating the adhesion of probiotic bacteria.

Key words: adhesion, *Lactobacillus*, alginate, carrageenan, collagen, carboxymethylcellulose. ☒

ELŻBIETA DŁUŻEWSKA, KAMIŁA LICHOCKA

WPLYW WYBRANYCH AROMATÓW I EMULGATORÓW NA STABILNOŚĆ EMULSJI NAPOJOWYCH

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu rodzaju aromatu, czynnika obciążającego oraz emulgatora na stabilność emulsji napojowych.

Stabilność określano na podstawie pomiaru wielkości cząstek fazy olejowej metodą turbidymetryczną, mikrometryczną i dyfrakcji laserowej. Mierzono również potencjał zeta emulsji.

Stabilność emulsji zawierających naturalny olejek eteryczny była większa w porównaniu z próbkami emulsji zawierającymi bezterpenowy olejek lub roztwór aromatu w glikolu propylenowym. Emulsje te charakteryzowały się również wyższym stopniem zmętnienia, co pozwala na otrzymanie z nich napojów o zmętnieniu typowym dla naturalnych soków owocowych. Dodatek czynnika obciążającego był konieczny do uzyskania stabilnych emulsji aromatów. Preparat estryfikowanej kalafonii i preparat gumy damara w jednakowym stopniu spowodowały wzrost gęstości fazy olejowej i tym samym wzrost stabilności emulsji. Stabilność emulsji aromatów z dodatkiem mieszaniny skrobi modyfikowanej i gumy arabskiej była mniejsza niż stabilność emulsji z dodatkiem pojedynczych preparatów.

Słowa kluczowe: emulsja napojowa, stabilność, aromat, czynnik obciążający, emulgator

Wprowadzenie

Emulsje aromatów stosowane w przemysłowej produkcji napojów bezalkoholowych należą do emulsji typu olej w wodzie. Produkowane są w formie skoncentrowanej, a następnie rozcieńczane są w roztworze cukru w celu otrzymania napoju. Emulsje w formie skoncentrowanej oraz napoje z nich otrzymane powinny charakteryzować się wysokim stopniem stabilności [16].

Stabilność emulsji aromatów (napojowych) jest problemem technologicznym występującym w przemyśle napojów bezalkoholowych.

Typowa emulsja, z której otrzymywane są napoje bezalkoholowe zawiera aromat, czynnik obciążający w fazie olejowej oraz emulgator, kwas spożywczy, konserwant i barwnik w fazie wodnej [1, 4]. Substancje aromatyczne naturalne i identyczne z naturalnymi są podstawowymi i niezbędnymi składnikami napojów bezalkoholowych.

Większość dodawanych aromatów to olejki eteryczne, głównie cytrusowe [7]. Olejki cytrusowe mogą być pozbawione terpenów poprzez ekstrakcję roztworami wodno-alkoholowymi lub na drodze destylacji próżniowej [3, 12].

Rolę emulgatorów i stabilizatorów emulsji napojowych mogą pełnić hydrokoloidy. Najczęściej stosowanym w przemyśle napojów bezalkoholowych hydrokoloidem jest guma arabska, otrzymywana z drzew *Acacia senegal* i *Acacia seyal* [2, 5, 14].

Niestabilność emulsji jest wynikiem procesów fizycznych polegających na zwiększaniu się wielkości cząstek, co związane jest z flokulacją, dojrzewaniem Oswalda lub koalescencją oraz migracji cząstek prowadzącej do śmietankowania lub sedimentacji [8]. Obniżenie stabilności emulsji z termodynamicznego punktu widzenia oznacza wzrost wielkości cząstek fazy rozproszonej. Zatem wielkość cząstek fazy rozproszonej i częstość występowania cząstek o danej wielkości można traktować jako miarę stabilności emulsji [13]. Ograniczenie tempa procesów destabilizujących emulsje aromatów można osiągnąć poprzez właściwy dobór emulgatora, uzyskanie odpowiedniego stopnia dyspersji, zminimalizowanie różnic w gęstości faz poprzez dodatek czynnika obciążającego do fazy olejowej oraz zwiększenie lepkości fazy ciągłej, czego konsekwencją jest zmniejszenie ruchliwości cząstek fazy zdyspergowanej [1, 9].

Celem pracy było określenie wpływu rodzaju aromatu, czynnika obciążającego oraz emulgatora na stabilność emulsji napojowych.

Materiał i metody badań

W badaniach zastosowano: preparat Valgum (mieszanina różnych odmian gumy arabskiej), Valspray A (suszona rozpyłowo i oczyszczona kordofanem guma arabska), Valdamar (oczyszczona i odwoniona guma damara), Valrosin D (estryfikowana kalafonia) firmy Valmar, modyfikowaną skrobię (Purity Gum 2000) firmy National Starch and Chemical, olejek cytrynowy zwykły, olejek cytrynowy bezterpenowy, aromat cytrynowy w formie roztworu w glikolu propylenowym firmy Pollena Aroma S.A., benzoosan sodu i kwas cytrynowy firmy Orffa Food Eastern Europe.

Emulsje otrzymywano zgodnie z recepturą: 10% aromatu, 8% czynnika obciążającego, 8 lub 12% emulgatora, 0,1% benzoosan sodu, 0,3% kwasu cytrynowego oraz woda destylowana do 100%. Emulgatory dyspergowano przez 30 min przy użyciu mieszadła laboratoryjnego typu RW 20 DZW firmy Janke&Kunkle, w wodzie o temp. 20°C (skrobia modyfikowana) lub 40°C (guma arabska), w której rozpuszczono benzoosan sodu, następnie dodawano kwas cytrynowy. Fazę wodną zawierającą gumę arabską pozostawiano na 24 godz. w celu uwodnienia emulgatora. Preemulsje sporządzano mieszając fazę wodną i olejową (aromat i czynnik obciążający) przez 10 min mieszadłem laboratoryjnym przy prędkości 1700 obr./min. Emulsje otrzymywano stosując homogenizację dwustopniową przy użyciu homogenizatora typu APV-1000, firmy APV, przy ciśnieniu 450/150 barów.

Oceniając stabilność emulsji metodą mikrometryczną wyznaczano średnią wielkość cząstek fazy rozproszonej emulsji (L), stosując mikroskop optyczny Studar Lab połączony z kamerą video Oscar-35 firmy Mintron. Kroplę emulsji umieszczano na szkiełku podstawowym i obserwowano przy powiększeniu 1000 x. Obraz emulsji uzyskiwano przy użyciu programów komputerowych Muliscan v 6.08 firmy Scanning Systems i Mocha v 1.2.10 firmy Jadel Scientific.

Ocena stabilności emulsji metodą turbidymetryczną [11] polegała na pomiarze absorbancji rozcieńczonych próbek emulsji w stosunku 1:1000. Wykonywano pomiary absorbancji przy długościach fali 400, 660 i 800 nm, używając spektrofotometru Helios β (Unicam). Jako stopień zmętnienia oznaczano absorbancję przy dł. fali 660 nm, zaś ze stosunku absorbancji przy długościach fali 800 i 400 nm wyznaczano indeks wielkości cząstek (R).

Analizę wielkości cząstek fazy rozproszonej wykonywano metodą dyfrakcji laserowej przy użyciu aparatu Zeta Sizer 4 firmy Malvern.

Potencjał elektrokinetyczny określany jako potencjał zeta (ζ) oznaczano przy użyciu aparatu Zeta Sizer 4 firmy Malvern, w oparciu o elektroforezę. Elektroforetyczne oznaczanie potencjału ζ prowadzono w środowisku wodnym o pH w zakresie od 3,5 do 4,5.

Test przechowalniczy prowadzono w temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$ przy dostępie światła dziennego. Rozwarstwienie emulsji, przechowywanej przez 12 tygodni w szklanych słojach, uznawano za objaw niestabilności emulsji.

Analizę statystyczną wyników, stosując jednoczynnikową analizę wariancji, prowadzono wykorzystując program Statgraphics Plus, firmy Graphics Corporation.

Wyniki i dyskusja

Duża różnica gęstości olejków eterycznych, stanowiących fazę olejową emulsji aromatów i roztworu cukru (ok. $1,040 \text{ g/cm}^3$), w którym rozcieńczana jest emulsja w celu otrzymania napoju, może prowadzić do zjawiska śmietankowania, czyli pojawienia się w napojach tzw. „obrączki”, świadczącej o niestabilności emulsji, zarówno w formie skoncentrowanej, jak i rozcieńczonej [15]. Gęstość fazy olejowej emulsji aromatów bez dodatku czynnika obciążającego wynosiła od $0,850$ do $0,890 \text{ g/cm}^3$. Bezterpenowy olejek eteryczny charakteryzował się większą gęstością w porównaniu z naturalnym olejkiem eterycznym oraz roztworem glikolowym aromatu (tab. 1). Dodatek czynnika obciążającego spowodował wzrost gęstości wszystkich analizowanych aromatów. Porównując efektywność działania zastosowanych substancji stwierdzono, że próbki z dodatkiem estryfikowanej kalafonii charakteryzowały się nieznacznie większą gęstością w porównaniu z analogicznymi próbkami, do których dodano gumę damara (tab. 1). Jednak różnice w gęstościach omawianych próbek były na tyle małe, że nie powinny powodować różnic w stabilności emulsji.

Wpływ rodzaju czynnika obciążającego na gęstość i wielkość cząstek fazy olejowej emulsji napojowych.
Effect of weighing agent on density and particle size of oil phase beverage emulsions.

Czynnik obciążający Weighing agent	Rodzaj aromatu Kind of flavour	Gęstość fazy olejowej Density of oil phase [g·cm ⁻³]	Średnia wielkość cząstek fazy rozproszonej (L) [µm] Mean particle size of dispersed phase (L)	
			bezpośrednio po otrzymaniu immediately after obtaining	po 12 tygodniach after 12 weeks
Brak Lack	olejek naturalny essential oil	0,847 ^a	0,78 ^d	1,00 ^c
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,887 ^b	0,54 ^b	1,12 ^c
	aromat glikolowy glycol aroma	0,848 ^a	0,60 ^c	1,00 ^c
Estryfikowana kalafonia Rosin esters	olejek naturalny essential oil	0,952 ^e	0,50 ^b	0,78 ^b
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,984 ^f	0,52 ^b	0,80 ^b
	aromat glikolowy glycol aroma	0,946 ^d	0,62 ^c	0,79 ^b
Guma damara Damar gum	olejek naturalny essential oil	0,928 ^c	0,51 ^b	0,74 ^b
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,952 ^e	0,32 ^a	0,81 ^b
	aromat glikolowy glycol aroma	0,936 ^c	0,38 ^a	0,56 ^a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie między sobą ($\alpha = 0,05$) / Mean values in the same column denoted by the different indices differ significantly from each other ($\alpha = 0.05$)

Stabilność emulsji jest tym większa im mniejsze są kuleczki olejowe. Emulsje zawierające odpowiedni emulgator i czynnik obciążający nie powinny ulec rozwarstwieniu, jeśli średnica kuleczek olejowych wynosi poniżej 1 µm [1].

Na podstawie wyników pomiaru wielkości cząstek fazy rozproszonej metodą mikrometryczną (tab. 1) stwierdzono, że w emulsjach bez dodatku czynnika obciążającego średnia wielkość kuleczek olejowych, bezpośrednio po otrzymaniu emulsji, wynosiła od 0,54 do 0,78 µm. Najmniejsze kuleczki olejowe zaobserwowano w próbkach z bezterpenowym olejkim eterycznym. W próbkach, w których zastosowano czynnik obciążający, cząstki fazy rozproszonej były mniejsze niż w

emulsjach bez dodatku tego czynnika. Nadal najmniejszymi wielkościami cząstek fazy rozproszonej charakteryzowały się próbki z bezterpenowym olejkim eterycznym. Po 12 tygodniach przechowywania średnia wielkość kuleczek olejowych w emulsjach zawierających czynnik obciążający wynosiła poniżej 0,80 μm . Tak więc warunek stabilności emulsji zaproponowany przez Buffo i Reinecciusa [1] został w tych emulsjach spełniony. Emulsje otrzymane bez dodatku czynnika obciążającego po 12 tygodniach przechowywania charakteryzowały się średnią wielkością cząstek fazy olejowej większą niż 1,00 μm i uległy rozwarstwieniu (tab. 2). Porównując efektywność działania estryfikowanej kalafonii i gumy damara, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wartościach średnich wielkości cząstek fazy rozproszonej po 12 tygodniach przechowywania. Można zatem stwierdzić, że oba preparaty w podobnym stopniu ograniczały wzrost wielkości cząstek fazy rozproszonej, a tym samym stabilizowały emulsję.

Tabela 2

Wpływ rodzaju czynnika obciążającego na stabilność emulsji napojowych.
Effect of weighing agent on stability of beverage emulsions.

Czynnik obciążający Weighing agent	Rodzaj aromatu Kind of flavour	Indeks wielkości cząstek fazy rozproszonej (R) Size index of dispersed phase (R)		Stopień zmętnienia emulsji Opacity of emulsion		Rozwarstwienie emulsji (po 12 tyg.) Breakdown of emulsion (after 12 weeks)
		0	12	0	12	
Brak Lack	olejek naturalny essential oil	0,504 ^b	0,778 ^b	0,365 ^a	0,353 ^a	Tak/Yes
Estryfikowana kalafonia Rosin esters		0,338 ^a	0,363 ^a	0,728 ^b	0,682 ^b	Nie/No
Guma damara Damar gum		0,345 ^a	0,394 ^a	0,894 ^c	0,603 ^b	Nie/No

Objaśnienia: / Explanatory notes:

0 – bezpośrednio po otrzymaniu / immediately after obtaining; 12 – po 12 tygodniach przechowywania / after 12 weeks of storage.

Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie między sobą ($\alpha = 0,05$) / Mean values in the same column denoted by the different indices differ significantly from each other ($\alpha = 0,05$).

Indeks wielkości cząstek fazy rozproszonej może być również wskaźnikiem stabilności emulsji. Wzrost wartości indeksu świadczy o tworzeniu się większych agregatów kuleczek olejowych [11]. Wyniki pomiaru indeksu wielkości cząstek fazy rozproszonej (tab. 2) w pełni potwierdziły stwierdzenia sformułowane na podstawie pomiarów mikrometrycznych. Próbkę z dodatkiem czynnika obciążającego charakteryzowały się mniejszymi wartościami indeksu, w porównaniu z próbkami bez

czynnika obciążającego, zarówno bezpośrednio po otrzymaniu, jak i po 12 tygodniach przechowywania.

Ważnym wyróżnikiem sensorycznym napojów jest ich zmętnienie, im jest ono większe tym napoje w większym stopniu przypominają naturalne soki owocowe. Jednocześnie stopień zmętnienia emulsji napojowej może być miarą wielkości cząstek fazy olejowej i tym samym stabilności emulsji. Zmiany stopnia zmętnienia emulsji mogą być sygnałem zmniejszania się ilości kuleczek olejowych w emulsji poprzez łączenie się mniejszych kuleczek w większe i tym samym wskazywać na spadek stabilności emulsji [11].

Największym zmętnieniem, bezpośrednio po otrzymaniu, charakteryzowała się próbka zawierająca gumę damara – 0,89, nieco mniejszym zmętnieniem charakteryzowała się emulsja z estryfikowaną kalafonią – 0,73, natomiast próbki bez dodatku czynnika obciążającego wykazywały znacznie mniejsze zmętnienie (tab. 2). Po 12 tygodniach przechowywania nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wartościach stopnia zmętnienia emulsji z dodatkiem gumy damara i estryfikowanej kalafonii. Jednak nadal próbki zawierające czynnik obciążający miały znacznie większe zmętnienie w porównaniu z próbkami bez tego czynnika. Tak więc preparaty gumy damara i estryfikowanej kalafonii nie tylko zwiększały gęstość fazy olejowej, ale również pełniły funkcję czynnika zmętniającego.

Wielkość dodatku emulgatora ustalono na podstawie wcześniejszych badań [6]. Zastosowanie w charakterze emulgatora i zarazem stabilizatora emulsji mieszaniny gum arabskich w ilości 8% oraz skrobi modyfikowanej w ilości 12% pozwoliło na otrzymanie emulsji stabilnych co najmniej przez 12 tygodni (tab. 4). Natomiast w przypadku zastosowania mieszaniny skrobi modyfikowanej i gumy arabskiej (preparat Valgum) otrzymano emulsję mniej stabilną, która rozwarstwiła się przed upływem 3 miesięcy. Analiza rozkładu wielkości cząstek fazy olejowej, bezpośrednio po otrzymaniu emulsji, nie wykazała istotnych różnic w wartościach średnich wielkości cząstek (tab. 3). Uzyskane wyniki mogą sugerować, że analizowane emulsje powinny charakteryzować się podobną stabilnością. Potwierdzeniem takiego stwierdzenia były wyniki pomiaru wielkości cząstek fazy rozproszonej metodą dyfrakcji laserowej, przeprowadzonego po 5 miesiącach przechowywania emulsji napojowych. Średnie wielkości cząstek były nawet nieznacznie mniejsze w przypadku emulsji niestabilnej w porównaniu z próbkami emulsji stabilnych (tab. 3).

T a b e l a 3

Wpływ rodzaju aromatu i emulgatora na potencjał zeta i wielkość cząstek fazy rozproszonej emulsji.
Effect of flavour and emulsifier types on zeta potentials and particle size of dispersed phase.

Emulgator Emulsifier	Rodzaj aromatu Kind of flavour	Średnia wielkość cząstek Mean particle size [μm]		Potencjał ζ Potential ζ [mV]
		(L) 0	5	
Mieszanka gum arabskich Mixture of arabic gums [8%]	naturalny olejek eteryczny essential oil	0,51 ^c	1,72	- 41,2
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,32 ^a	3,58	- 39,8
	aromat glikolowy glycol aroma	0,38 ^b	1,62	- 39,2
Skrobia modyfikowana Modified starch [12%]	naturalny olejek eteryczny essential oil	0,41 ^b	0,99	- 16,1
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,42 ^b	1,06	- 14,0
	aromat glikolowy glycol aroma	0,44 ^b	1,48	- 18,9
Skrobia modyfikowana i guma arabska Modified starch and arabic gum [12%]	naturalny olejek eteryczny essential oil	0,58 ^c	0,89	- 29,5
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,78 ^e	1,08	- 26,6
	aromat glikolowy glycol aroma	0,62 ^d	1,21	- 30,8

Objaśnienia: / Explanatory notes:

0 – bezpośrednio po otrzymaniu / immediately after obtaining; 5 – po 5 miesiącach / after 5 months;

Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie między sobą ($\alpha = 0,05$)

Mean values in the same column denoted by the different indices differ significantly from each other ($\alpha = 0.05$)

W celu wyjaśnienia przyczyny niestabilności emulsji emulgowanej mieszaniną skrobi modyfikowanej i gumy arabskiej zmierzono potencjał elektrokinetyczny analizowanych próbek emulsji. Wartość potencjału zeta próbek stabilizowanych mieszaniną gum arabskich wynosiła od -39,8 mV do -41,2 mV (tab. 3). Według danych literaturowych, jeżeli potencjał zeta emulsji stabilizowanych gumą arabską jest mniejszy od -30 mV lub większy od 30 mV, można spodziewać się, że taka emulsja będzie stabilna [1]. W przypadku emulsji stabilizowanych skrobią modyfikowaną potencjał w granicach od -14,0 do -18,9 mV, umożliwił otrzymanie stabilnej emulsji. Można to wyjaśnić tym, że w przypadku skrobi dominującym mechanizmem stabilizacji emulsji są oddziaływania przestrzenne, stąd siły elektrostatyczne nie odgrywają istotnej roli w stabilizacji emulsji [4]. W przypadku gumy arabskiej stabilizacja przestrzenna i elektrostatyczna przebiegają równolegle, lecz obecność w niej grup funkcyjnych mających ładunek ujemny wskazuje na bardziej istotną rolę oddziaływań elektrostatycznych w stabilizacji emulsji gumą arabską [5, 10].

Stopień zmętnienia oraz wyniki testu przechowalniczego emulsji napojowych.
The opacity of beverage emulsions and results of a storage test

Emulgator Emulsifier	Rodzaj aromatu Kind of flavour	Stopień zmętnienia Opacity		Rozwarstwienie emulsji po 12 tyg. Breakdown of emulsion after 12 weeks
		0	12	
Mieszanka gum arabskich Mixture of arabic gums [8%]	naturalny olejek eteryczny essential oil	0,89 ^f	0,60 ^d	-
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,69 ^d	0,57 ^c	-
	aromat glikolowy glycol aroma	0,77 ^e	0,58 ^c	-
Skrobia modyfikowana Modified starch [12%]	naturalny olejek eteryczny essential oil	0,65 ^c	0,58 ^c	-
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,30 ^a	0,30 ^a	-
	aromat glikolowy glycol aroma	0,61 ^c	0,45 ^b	-
Skrobia modyfikowana i guma arabska Modified starch and arabic gum [12%]	naturalny olejek eteryczny essential oil	0,63 ^c	0,53 ^c	+
	olejek bezterpenowy essential oil without terpenes	0,32 ^a	0,31 ^a	+
	aromat glikolowy glycol aroma	0,43 ^b	0,45 ^b	+

Objaśnienia: / Explanatory notes:

0 – bezpośrednio po otrzymaniu / immediately after obtaining; 12 – po 12 tygodniach przechowywania / after 12 weeks of storage;

Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie między sobą ($\alpha = 0,05$) / Mean values in the same column denoted by the different indices differ significantly from each other ($\alpha = 0.05$).

Prawdopodobnie niestabilność próbek emulsji otrzymanych z dodatkiem mieszanki skrobi i gumy arabskiej była spowodowana zbyt małą wartością bezwzględnej potencjału zeta (od -26,6 do -30,8 mV) w porównaniu z wymaganą wartością potencjału emulsji z dodatkiem gumy arabskiej.

Analizę wpływu rodzaju aromatu na stabilność emulsji przeprowadzono na podstawie pomiarów wielkości cząstek fazy olejowej oraz potencjału zeta. Bezpośrednio po otrzymaniu najmniejsze kuleczki olejowe stwierdzono w emulsji z dodatkiem bezterpenowego olejku eterycznego i stabilizowanej gumą arabską (tab. 3). Niemniej w trakcie przechowywania w próbkach emulsji z dodatkiem olejku bezterpenowego zaobserwowano największy przyrost wielkości cząstek fazy olejowej. Po 5 miesiącach przechowywania emulsje z dodatkiem naturalnego olejku eterycznego charakteryzowały się mniejszymi cząstkami fazy rozproszonej w porównaniu

z próbkami z dodatkiem olejku bezterpenowego. Natomiast w emulsjach z dodatkiem roztworu aromatu w glikolu propylenowym średnia wielkość cząstek była podobna lub nieco większa (w zależności od zastosowanego emulgatora) niż w emulsjach z dodatkiem naturalnego olejku eterycznego. Dodatek bezterpenowego olejku eterycznego, pomimo że uzyskano emulsję charakteryzującą się najmniejszymi cząstkami fazy rozproszonej bezpośrednio po otrzymaniu, nie spowodował poprawy stabilności emulsji w porównaniu z próbkami, do których dodano naturalny olejek lub roztwór aromatu w glikolu propylenowym.

Najmniejszy, a zarazem najbardziej korzystny z punktu widzenia stabilności emulsji potencjał zeta stwierdzono w przypadku zastosowania naturalnego olejku eterycznego (tab. 3). Wyniki przedstawione w tab. 3. pozwalają przypuszczać, że bardziej stabilne emulsje można otrzymać stosując naturalny olejek eteryczny niż olejek bezterpenowy, niemniej stabilność emulsji w dużo większym stopniu uzależniona była od rodzaju zastosowanego emulgatora.

Biorąc pod uwagę wpływ rodzaju aromatu na stopień zmętnienia emulsji (tab. 4), stwierdzono, że emulsje z dodatkiem bezterpenowego olejku zarówno bezpośrednio po otrzymaniu, jak i po 12 tygodniach przechowywania, niezależnie od rodzaju zastosowanego emulgatora, charakteryzowały się najmniejszym stopniem zmętnienia. W przypadku próbek z dodatkiem olejku naturalnego i próbek z dodatkiem aromatu glikolowego bezpośrednio po otrzymaniu emulsji nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach stopnia zmętnienia, lecz w czasie przechowywania próbki z dodatkiem aromatu glikolowego stawały się bardziej klarowne.

Wnioski

1. Stabilność emulsji aromatów zawierających naturalny olejek eteryczny była wyższa w porównaniu z próbkami emulsji zawierającymi bezterpenowy olejek lub roztwór aromatu w glikolu propylenowym. Emulsje te charakteryzowały się również wyższym stopniem zmętnienia, co pozwala na otrzymanie z nich napojów o zmętnieniu typowym dla naturalnych soków owocowych.
2. Dodatek czynnika obciążającego był konieczny do uzyskania stabilnych emulsji aromatów. Preparat estryfikowanej kalafonii i preparat gumy damara w jednakowym stopniu spowodowały wzrost gęstości fazy olejowej i tym samym wzrost stabilności emulsji.
3. Stabilność emulsji aromatów z dodatkiem mieszaniny skrobi modyfikowanej i gumy arabskiej była mniejsza niż stabilność emulsji z dodatkiem samej gumy arabskiej lub skrobi modyfikowanej.

Pracę zrealizowano w ramach grantu KBN nr 0747/P06/2003/25.

Literatura

- [1] Buffo R., Reineccius G.: Beverage emulsions and the utilization of gum acacia as emulsifier/stabilizer. *Perfumer & Flavorist*, 2000, July/August (**25**), 24-44.
- [2] Buffo R. A., Reineccius G. A., Oehlert G. W.: Influence of time-temperature treatments on the emulsifying properties of gum acacia in beverage emulsions. *J. Food Eng.*, 2002, **51**, 341-345.
- [3] Brud W.: Formy handlowe aromatów spożywczych – część II. *Przem. Piek. Cuk.*, 1995, **1 (43)**, 14-16.
- [4] Chanamai R., McClements D.J.: Depletion flocculation of beverage emulsions by gum arabic and modified starch. *J. Food Sci.*, 2001, **3/66**, 457-463.
- [5] Dickinson E.: Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 2003, **17**, 25-39.
- [6] Dłużewska E., Panasiewicz M., Leszczyński K.: Wpływ wybranych emulgatorów polisacharydowych na stabilność emulsji aromatów. *Mat. III Krajowego Sympozjum nt. Naturalne i syntetyczne produkty zapachowe. Politechnika Łódzka, Łódź*, 2003, s. 24.
- [7] Hopkins G.: Flavourings and emulsions. In: *Formulation and production of carbonated soft drinks* - red. A. J. Mitchell. Chapman & Hall, 1990, pp. 81-89.
- [8] Huang X., Kakuda Y., Cui W.: Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 2001, **15**, 533-542.
- [9] Horne D. S., Hermar Y.: Light scattering and rheological studies of emulsion system. In: *Emulsifiers. Functionality and applications* - red. K. Berger, R.J. Hamiltona. SCI, London, 1998, pp. 14-18.
- [10] Jayme M.L., Dunstan D.E., Gee M.L.: Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 1999, **13**, 459-465.
- [11] Kaufman V.R., Garti N.: Effect of cloudy agents on the stability and opacity of cloudy emulsions for soft drinks. *J. Food Techn.*, 1984, **19**, 255-261.
- [12] Krug H.: Flavourings for beverages. In: *Flavourings – production, composition, applications, regulations* - red. E. Ziegler, H. Ziegler. Wiley-Vch, 1998, pp. 418-432.
- [13] McClements D.J.: *Emulsion stability. Food Emulsions: Principles. Practice and Techniques*. CRC Press LLC, 1999.
- [14] Sanchez Ch., Renard D., Robert P., Schmitt Ch., Lefebver J.: Structure and rheological properties of acacia gum dispersios. *Food Hydrocolloids*, 2002, **16**, 257-267.
- [15] Stauffer C.E.: *Emulgatory*. WNT. Warszawa 2001.
- [16] Tan C-T., Wu Holmes J.: Stability of beverage flavor emulsions. *Perfumer & Flavorist*, 1988, **13**, 23-41.

EFFECT OF SELECTED FLAVOURS AND EMULSIFIERS ON STABILITY OF BEVERAGE EMULSIONS

S u m m a r y

The objective of this study was to evaluate the effect of flavour, weighing agent and emulsifier on stability of beverage emulsions.

The stability was determined basing on the measured particle size of dispersed phase by a turbidity method, a micrometric method, and a laser light scattering. Additionally, the potential zeta of emulsions was measured.

The stability of emulsions containing natural essential oil was higher if compared with emulsions containing essential oil without terpenes or with a glycol solution of aroma. The emulsions were marked by a higher opacity degree, and owing to this fact, it was possible to obtain beverages with clarity similar to natural juices. It was also necessary to add a weighing agent in order to get stable flavour emulsions. The rosin esters and the damar gum caused, to the same extent, an increase in the density of oil phase, and, consequently, in the stability of emulsions. The stability of beverage emulsions with a mixture of modified starch and arabic gum added was smaller than the stability of emulsions to which only one of the two preparations was added.

Key words: beverage emulsions, stability, flavour, weighing agent, emulsifier ☒

WIESŁAW WZOREK, SYLWIA BONIN, ARKADIUSZ BASIAK

PRÓBA ZASTOSOWANIA CHITOZANU W FORMIE ROZPUSZCZONEJ DO STABILIZACJI WIN

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania chitozanu w formie rozpuszczonej do stabilizacji win oraz określenie wpływu zastosowanych metod na skład tych napojów. W doświadczeniu użyto win pochodzących z jednego z polskich zakładów winiarskich: białe (jabłkowe) i czerwone (aroniowe). Do klarowania stosowano chitozan niskolepki i chitozan w postaci preparatu Profloc (firmy Begerow) oraz w celu porównawczym żelatynę, która jest stosowana powszechnie w winiarstwie. Związki te stosowano w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego. We wszystkich metodach dobór dawek substancji klarujących ustalano na podstawie klarowań próbnych. Przeprowadzono 3 serie doświadczeń.

Stosowane środki spowodowały w badanych winach zmniejszenie zawartości: związków fenolowych, alkoholu oraz azotu ogółem, niewielki wzrost pH i spadek kwasowości ogólnej, a także niewielkie zmiany zawartości pierwiastków. Nie zaobserwowano istotnych różnic w zawartości ekstraktu ogólnego, ilości i alkaliczności popiołu oraz ocenie sensorycznej. Stwierdzono, że rozpuszczony chitozan w kombinacji z bentonitem oraz zolem kwasu krzemowego może zastąpić żelatynę jako środek klarujący. Przeprowadzenie stabilizacji jest jednak utrudnione, ponieważ konieczny jest dobór dawek oddzielnie dla każdego zbiornika.

Słowa kluczowe: wino, klarowanie, metody stabilizacji, chitozan.

Wstęp

Jednym z najważniejszych parametrów jakości win jest klarowność. Zgodnie z rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi [12] klarowność wina powinna być całkowita, bez opalizacji i osadów (z niewielkimi odstępstwami).

Zmętnienia w winach często wywołane są niestabilnymi frakcjami polifenolowymi, przy czym większa ilość polifenoli występuje w winach czerwonych, a mniejsza w winach białych. Polifenole ulegają wytrąceniu między innymi poprzez łączenie się z aldehydami, powstającymi jako produkty uboczne fermentacji, w wyniku utleniania

siarczanów(IV) do siarczanów(VI) /uwalnianie aldehydów/, a także w czasie wtórnego zafermentowania. Utlenianie garbników i barwników podczas leżakowania i ich późniejsza kondensacja również prowadzą do powstawania osadów. W celu zabezpieczenia przed wytrąceniem związków polifenolowych stosuje się stabilizację win polegającą na usunięciu niestabilnych frakcji polifenolowych. Stosowane jest wychładzanie, klarowanie żelatyną, klarowanie żelatyną w kombinacji z zolem kwasu krzemowego, dodatek żywic poliamidowych (PVPP), klarowanie kazeinianem potasu, białkiem jaja kurzego [18].

Zmętnienia białkowe charakterystyczne są dla win gronowych i miodów pitnych. Powstawanie zmętnień wywołanych związkami białkowymi zachodzi pod wpływem wielu czynników, do których zaliczyć można: wzajemne odniesienie wartości pH wina i punktu izoelektrycznego białek [13], obecność jonów metali ciężkich [2], temperaturę, dostęp tlenu oraz zawartość garbników [19]. Związki garbnikowe inicjują powstawanie zmętnień białkowych, ponieważ łącząc się z białkami hydrofilowymi powodują ich odwodnienie, zmniejszenie rozpuszczalności i w rezultacie wytrącenie [4]. Białka niskocząsteczkowe mogą stać się labilne pod wpływem niewielkich ilości garbników i jonów metali ciężkich, co może prowadzić do ich wytrącenia [2]. Stabilizację białkową przeprowadza się stosując obróbkę bentonitem, klarowanie żelatyną w kombinacji z zolem kwasu krzemowego, ewentualnie z bentonitem lub stabilność zapewnia ultrafiltracja [1, 19].

Stosowane do stabilizacji fizykochemicznej środki nie są jednak doskonałe, dlatego trwa ciągle poszukiwanie nowych. Jednym z takich związków mógłby być chitozan. Firma Begerow oferuje na rynku chitozan w postaci preparatu Profloc i poleca go do klarowania soków owocowych [1].

Chitozan to biopolimer otrzymywany przez deacetylację chityny, która jest jednym z najbardziej dostępnych, łatwo otrzymywanych i odnawialnych polimerów, drugim (po celulozie) pod względem rozpowszechnienia w przyrodzie. Chitynę uzyskuje się z pancerzy bezkręgowców i ścian komórkowych grzybów [16], a w Polsce z pancerzy kryla arktycznego i strun kalmarów [17]. Podczas otrzymywania chitozanu stosuje się różne rodzaje obróbki chemicznej i enzymatycznej, dzięki czemu można uzyskać różne pochodne różniące się właściwościami fizycznymi i chemicznymi [16].

Chitozan jest biodegradowalny, nietoksyczny dla zwierząt [16], rozpuszczalny w rozpuszczalnikach kwaśnych, a nierozpuszczalny przy pH powyżej 6,5; ma masę cząsteczkową $10 \cdot 10^3 - 10 \cdot 10^5$ Da [8].

Chitozan znajduje zastosowanie w różnych gałęziach gospodarki. W przemyśle spożywczym stosuje się go do klarowania, odkwaszania napojów, stabilizacji barwy. Ponadto można go stosować jako środek teksturotwórczy, konserwujący, przeciwutleniający, zagęszczający i stabilizujący [16].

Polecany przez firmę Begerow [1] preparat o nazwie Profloc jest to chitozan o masie molekularnej $2 \cdot 10^5$ Da i stopniu deacetylacji 76%, produkowany ze skorupiaków morskich. Profloc ma strukturę kłaczkową, a zdolności klarujące zawdzięcza wysokiemu ładunkowi dodatniemu. W procesie klarowania reaguje – podobnie jak żelatyna – z polifenolami i innymi koloidami o ładunkach ujemnych. Wykazuje znaczną siłę adsorpcji wobec garbników i pektyn, a także cechuje go duża siła żelowania [1].

Dawki preparatu ustala się na drodze klarowań próbnych, ponieważ możliwe jest przeklarowanie. Firma Begerow poleca rozpuszczanie Proflocu w kwaśnym soku, w temp. 80–90°C oraz stosowanie go w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego. Producent zaleca też jak najszybsze zużywanie przygotowanego roztworu, co minimalizuje proces denaturacji Proflocu, a także ogrzewanie gorącą wodą przewodów dozujących podczas klarowania.

Celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania chitozanu w formie rozpuszczonej do stabilizacji win oraz określenie wpływu zastosowanych metod na stabilność fizykochemiczną i skład tych napojów.

Material i metody badań

Wina stosowane w badaniach pochodziły z jednego z krajowych zakładów winiarskich. Były to przemysłowe wina jabłkowe (białe) i aroniowe (czerwone) pobrane z tanków leżakowych. Przeprowadzono 3 serie doświadczeń, każda w 3 powtórzeniach.

Stosowano następujące środki stabilizujące: chitozan niskolepki ($< 200\text{cP}$), wyprodukowany w Morskim Instytucie Rybackim w Gdyni zgodnie z PN-89/A-86850 [9], SIHA Profloc – otrzymany z firmy Begerow, bentonit – NaCalit firmy Erbslöh, żelatynę winiarską typu A oraz Baykisol-30 firmy Bayer.

Metody stabilizacji

Chitozan w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego

Dawki środków stabilizujących określono metodą prób wstępnych (próbne klarowanie każdej serii win oddzielnie). Środki klarujące przygotowywano w następujący sposób:

- 1% roztwór chitozanu – 1 g chitozanu rozpuszczano na gorąco (temp. 80–90°C) w 100 cm^3 0,5% kwasu cytrynowego. Środek dozowano w tej temperaturze.
- 10% zawiesina bentonitu – 10 g bentonitu zalewano 100 cm^3 wody destylowanej i pozostawiano na 24 godziny w temperaturze pokojowej do napęcznienia. Przed dozowaniem do wina zawiesinę dokładnie mieszano.

- 3% roztwór zolu kwasu krzemowego otrzymywano przez rozcieńczenie wodą roztworu 30% (Baykisol-30).

Do pięciu cylindrów odmierzano po 100 cm³ wina i do każdego z nich wprowadzano 1 cm³ 10% zawiesiny bentonitu. Po wymieszaniu wprowadzano na gorąco chitozan w dawkach 1, 2, 3, 4, 5 cm³. Następnie do każdego cylindra dozowano 30% roztwór zolu kwasu krzemowego w dawkach odpowiednio: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 cm³. Po 24 godzinach wino sączono, a przesącz dzielono na dwie części. Do jednej dodawano 2–3 krople chitozanu, a ewentualne zmętnienie świadczyło o przeklarowaniu zolem kwasu krzemowego, do drugiej części dodawano 2–3 krople zolu kwasu krzemowego, a zmętnienie świadczyło o przeklarowaniu chitozanem. Wybierano taką dawkę preparatu, przy której po dodaniu odczynników na przeklarowanie nie obserwowano zmętnienia w żadnej z dwóch probówek.

Ustalone dawki preparatów w przeliczeniu na 1 dm³ wina wynosiły:

- wino białe: 10 cm³ 10% bentonitu (1 g), 20 cm³ 1% chitozanu (0,2 g) oraz 2 cm³ 30% zolu kwasu krzemowego;
- wino czerwone: 10 cm³ 10% bentonitu (1 g), 20 cm³ 1% chitozanu (0,2 g) oraz 2 cm³ 30% zolu kwasu krzemowego.

Środki klarujące wprowadzano do poszczególnych partii wina w kolejności: bentonit, następnie chitozan, a na końcu zol kwasu krzemowego.

Preparat Profloc w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego

Klarowanie próbne oraz przygotowanie środków klarujących prowadzono podobnie, jak w przypadku stabilizacji chitozanem w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego. Stosowano następujące dawki preparatów w przeliczeniu na 1 dm³ wina:

- wino białe: 10 cm³ 10% bentonitu (1 g), 30 cm³ 1% Profloc (0,3 g) oraz 3 cm³ 30% zolu kwasu krzemowego;
- wino czerwone: 10 cm³ 10% bentonitu (1 g), 30 cm³ 1% Profloc (0,3 g) oraz 3 cm³ 30% zolu kwasu krzemowego.

Środki klarujące wprowadzano do wina w kolejności: bentonit, chitozan, zol kwasu krzemowego.

Żelatyna w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego

Dobór dawki preparatów prowadzono jak w przypadku stabilizacji chitozanem w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego.

Bentonit i 3% roztwór zolu kwasu krzemowego przygotowano podobnie jak w przypadku stabilizacji chitozanem. Żelatynę rozpuszczano w wodzie destylowanej, w temp. 50°C. Do badań stosowano roztwór 1%. W przypadku wina czerwonego stosowano klarowanie tylko żelatyną i zolem kwasu krzemowego (bez bentonitu).

Stosowano następujące dawki środków klarujących w przeliczeniu na 1 dm³:

- wino białe: 10 cm³ 10% bentonitu (1 g), 5 cm³ 1 % żelatyny (0,05 g), 5 cm³ 3% zolu kwasu krzemowego;
- wina czerwone: 65 cm³ 1 % żelatyny (0,65 g), 13 cm³ 3% zolu kwasu krzemowego.

Poszczególne środki wprowadzano do wina w kolejności: bentonit (wino białe), roztwór żelatyny i roztwór zolu kwasu krzemowego.

W każdej z metod stabilizacji, po 24 godz. od momentu przeprowadzenia klarowania wino filtrowano przez płytę filtracyjną AF-70 firmy Filtrox i poddawano analizie.

W poszczególnych winach (przed i po obróbce) oznaczano zawartość podstawowych składników (stosując powszechnie przyjętą metodykę), zawartość azotu ogółem metodą Kjeldahla oraz związków fenolowych zmodyfikowaną metodą kolorymetryczną Folin-Denisa [14]. Pomiaru barwy dokonywano w fotokolorymetrze Momcolor w świetle odbitym na białym tle.

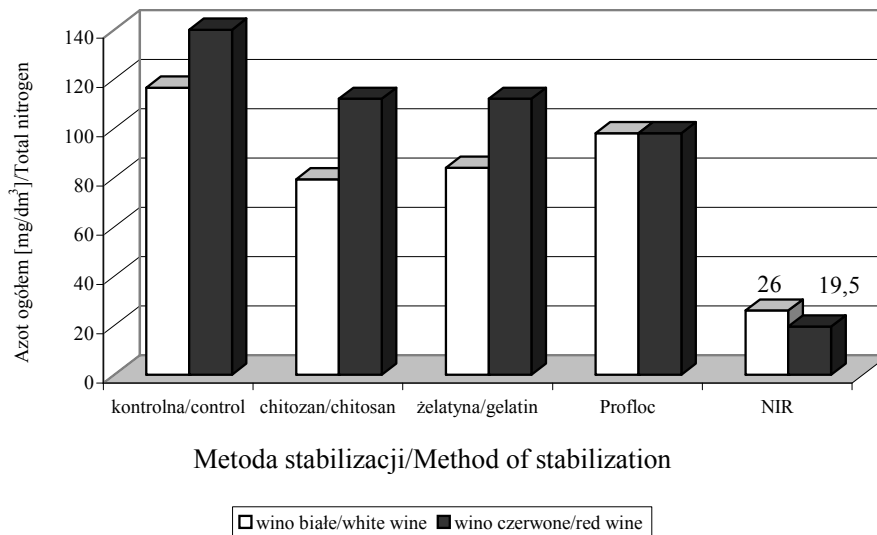
Analizę sensoryczną przeprowadzano zgodnie z zasadami analizy sensorycznej przez sześciuosobową fachową komisję, wykorzystując skalę pięciopunktową o 9 poziomach jakości. Ocenę ogólną obliczano jako średnią ważoną, stosując współczynniki ważkości: barwa – 1, zapach – 2, smak – 6.

Większość wyników poddano analizie statystycznej, stosując wieloczynnikową analizę wariancji przy poziomie istotności $PI = 0,05$, a najmniejszą istotną różnicę (NIR) wyliczano wg testu Tukey'a jako HSD. W przypadku, gdy wartość PI przekraczała założone 0,05 nie liczono NIR.

Wyniki i dyskusja

W omówieniu wyników przyjęto skrócone określenia poszczególnych metod stabilizacji: chitozan w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego – „chitozan”, preparat Profloc w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego – „Profloc”, żelatyna w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego – „żelatyna”.

Wina czerwone przed procesem klarowania zawierały średnio 140 mg/dm³ azotu ogółem. Stosowane metody stabilizacji spowodowały zmniejszenie jego zawartości: w przypadku preparatu Profloc – średnio o 42 mg/dm³, a w przypadku pozostałych metod o około 28 mg/dm³ (NIR = 19,5). W winach białych, w których zawartość azotu przed stabilizacją wynosiła średnio 116 mg/dm³, Profloc nie spowodował istotnego zmniejszenia zawartości azotu. Natomiast po obróbce chitozaniem stwierdzono 79 mg/dm³, a po zastosowaniu żelatyny – 84 mg/dm³ (NIR = 26) (rys. 1).



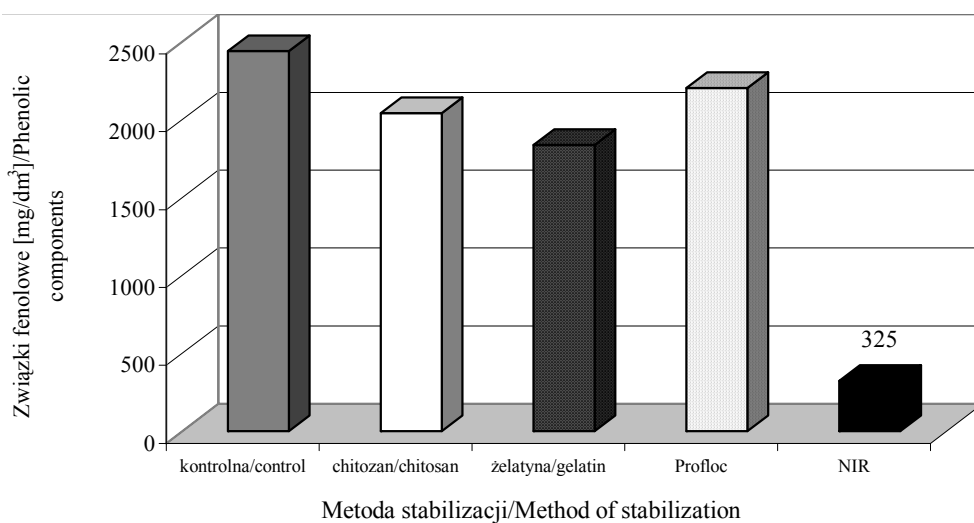
Rys. 1. Wpływ stabilizacji na zawartość azotu ogółem w winach (średnia z 3 serii).
 Fig. 1. Influence of stabilization on total nitrogen content in wines (average of 3 series).

W winie czerwonym początkowa zawartość związków fenolowych wynosiła średnio 2442 mg/dm^3 . Zastosowanie klarowania żelatyną, a także klarowania chitozaniem spowodowało zmniejszenie ich ilości średnio o 602 mg/dm^3 (24%) i o 398 mg/dm^3 (16%). W próbkach klarowanych preparatem Profloc zawartość związków fenolowych zmniejszyła się o 206 mg/dm^3 (8,5%), jednak różnica ta zawierała się w granicy błędu (rys. 2).

Zawartość związków fenolowych w winach białych wynosiła przed klarowaniem średnio 153 mg/dm^3 . W wyniku zastosowania badanych środków stabilizacyjnych uległa zmniejszeniu i kształtowała się na poziomie $121\text{--}126 \text{ mg/dm}^3$ (rys. 3).

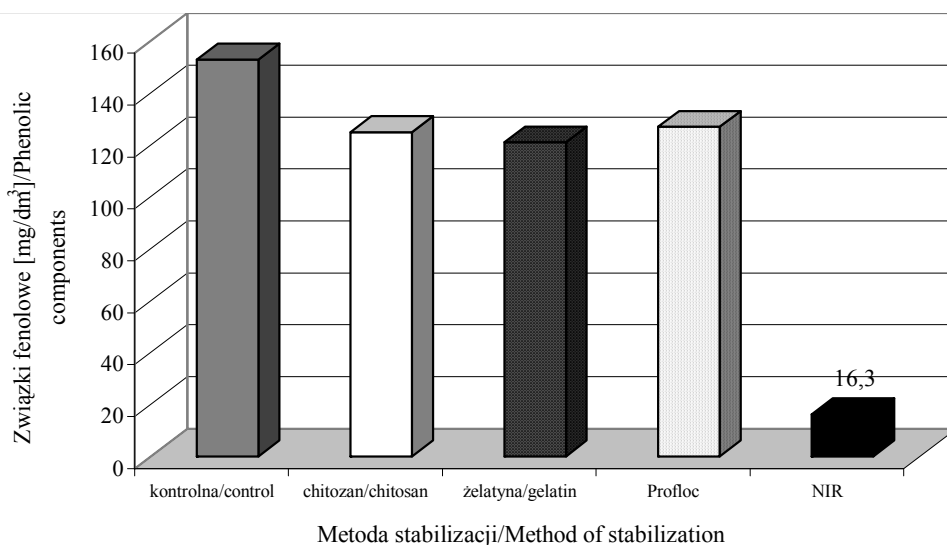
Wina białe zawierają znacznie mniej związków polifenolowych niż wina czerwone. Związane jest to ze składem owoców, a także procesem produkcji wina, podczas którego związki fenolowe wydobywane są ze skórek, nasion i tkanek [18].

Günther [5] przy zastosowaniu do klarowania żelatyny zaobserwował w sokach bogatych w garbniki i barwniki spadek zawartości związków polifenolowych o około 40%. Wzorek i Bielecka [18] prowadzili stabilizację win gronowych zawierających średnio 325 mg/dm^3 polifenoli. Stwierdzili, że zastosowanie żelatyny powodowało adsorpcję polifenoli średnio o 113 mg/dm^3 , a żelatyny w kombinacji z zolem kwasu krzemowego o 111 mg/dm^3 . Spagna i wsp. [15] stwierdzili, że zastosowane do stabilizacji win gronowych preparaty chitozanu usuwają 29–33% polifenoli.



Rys. 2. Wpływ stabilizacji na zawartość związków fenolowych w winach czerwonych (średnia z 3 serii).

Fig. 2. Influence of stabilization on phenolic compounds content in red wines (average of 3 series).



Rys. 3. Wpływ stabilizacji na zawartość związków fenolowych w winach białych (średnia z 3 serii).

Fig. 3. Influence of stabilization on phenolic compounds content in white wines (average of 3 series).

Wina białe przed procesem klarowania charakteryzowały się kwasowością ogólną średnio 3,51 g/dm³ i wartością pH 3,55. Zastosowane metody stabilizacji wpłynęły na obniżenie kwasowości ogólnej i wzrost wartości pH (tab. 1). Kwasowość ogólna kształtowała się na poziomie średnio ok. 3,1 g/dm³, a różnice występujące pomiędzy

metodami zawierały się w granicach błędu. Zastosowanie do stabilizacji chitozanu spowodowało wzrost wartości pH o 0,14. W przypadku zastosowania żelatyny wartość pH wzrosła o 0,12, a przy użyciu preparatu Profloc o 0,1 (NIR = 0,05).

W przypadku win czerwonych początkowa kwasowość ogólna wynosiła średnio 3,25 g/dm³, a wartość pH 3,99. Stabilizacja żelatyną spowodowała obniżenie kwasowości ogólnej do 2,72 g/dm³, chitozanem do 2,87 g/dm³, a preparatem Profloc do 2,82 g/dm³. W przypadku zastosowania preparatu Profloc stwierdzono wzrost wartości pH z 3,99 do 4,32. W pozostałych metodach różnice zawierały się w granicy błędu.

Należy zwrócić uwagę, że z chitozanem lub preparatem Profloc wprowadzano do wina niewielkie ilości kwasu cytrynowego stosowanego do rozpuszczania tych preparatów.

Wzorek i Bielecka [18] stwierdzili, że zastosowanie chitozanu niskolepkiego do stabilizacji gronowych win czerwonych w dawce 1 g/dm³ (bez rozpuszczania) powoduje wzrost wartości pH z 3,7 do 3,8 i spadek kwasowości ogólnej z 6,0 g/dm³ do 5,8 g/dm³. Zdaniem autorów zmiana pH i kwasowości ogólnej po obróbce chitozanem może być wynikiem wprowadzenia do wina wraz z preparatem jonów alkalicznych. Chitozan może zawierać domieszkę jonów wapnia, które pozostały po procesie technologicznym w wyniku obróbki szkieletów morskich organizmów.

Wpływ stosowanych metod stabilizacji na parametry barwy wina przedstawiono w tab. 1. W przypadku stabilizacji chitozanem, jak i żelatyną, w winie białym stwierdzono przesunięcie dominującej długości fali z 592 do 586 nm, czyli przesunięcie barwy w stronę żółtej, lecz zawierające się w zakresie barwy pomarańczowej. Natomiast w przypadku preparatu Profloc nie obserwowano zmian wartości dominującej długości fali. W wyniku zastosowania każdej z metod stabilizacji obserwowano nieznaczny wzrost jasności (średnio z 35 do 37) i nieznaczny spadek czystości pobudzenia.

W przypadku wina czerwonego stabilizacja żelatyną spowodowała przesunięcie dominującej długości fali z 494 nm do 610 nm. Odpowiada to przesunięciu barwy wina z czerwono-purpurowej do purpurowo-czerwonej i mogło być związane z powstałą opalizacją. Zaobserwowano w tym przypadku także wzrost jasności Y z 0,8 do 2,8 oraz wzrost czystości pobudzenia z 0,34 do 0,97. Stabilizacja preparatem Profloc oraz chitozanem nie wpłynęła na zmianę wartości dominującej długości fali. Spowodowała natomiast wzrost czystości pobudzenia z wartości 0,34 do 0,54 i 0,51, a w przypadku obróbki preparatem Profloc także wzrost jasności z 0,8 do 1,5. Wzorek i Bielecka [18] stwierdzili, że zastosowanie żelatyny i zolu kwasu krzemowego z żelatyną do stabilizacji czerwonego wina gronowego wpływa na rozjaśnienie barwy. W przypadku żelatyny wartość ta rosła średnio z Y = 2,29 w próbce kontrolnej do Y = 5,6 po obróbkę, natomiast po zastosowaniu zolu kwasu krzemowego z żelatyną do Y = 5,09. Günther i Junker [6] zaobserwowali, że klarowanie win gronowych żelatyną z zolem kwasu krzemowego wraz z usuwaniem związków polifenolowych powoduje rozjaśnienie

barwy o około 25%. Pogorzelski i Czyżowska [10] uważają, że intensywność barwy oraz zmiany sensoryczne są związane z zawartością związków polifenolowych. Za najważniejsze czynniki mające wpływ na stabilność polifenolową win uznali pH i zawartość SO_2 . Stwierdzili, że w winach wyleżakowanych barwa pochodzi głównie od produktów kondensacji garbników i barwników. Wzorek i Pogorzelski [19] poddają, że działanie żelatyny polega na łączeniu się z labilnymi frakcjami polifenoli, co prowadzi do ich wytrącania. Jednocześnie wytrącanie tych związków prowadzi do usunięcia brązowego odcienia barwy wywołanego utlenionymi frakcjami garbników i barwników.

W celu określenia czy stosowane preparaty nie powodują wprowadzania pierwiastków do wina wykonano oznaczenie zawartości wapnia, sodu, potasu i magnezu. W przypadku wina białego przeprowadzono trzy, zaś wina czerwonego jedną serię badań, a wyniki przedstawiono w tab. 2.

W winie białym istotne zmniejszenie zawartości wapnia stwierdzono tylko w przypadku stabilizacji preparatem Profloc. Ilość tego pierwiastka zmniejszyła się z 59 mg/dm^3 do 36 mg/dm^3 (NIR = 13). W przypadku zastosowania pozostałych środków stabilizujących nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości wapnia. Zawartość magnezu po zastosowaniu wszystkich środków nieznacznie wzrosła. Zawartość potasu w próbce kontrolnej wynosiła 596 mg/dm^3 . W winie stabilizowanym chitozanem, a także preparatem Profloc stwierdzono zmniejszenie zawartości potasu odpowiednio o 91 mg/dm^3 i 44 mg/dm^3 , natomiast obróbka żelatyną spowodowała wzrost tego pierwiastka o $51,5 \text{ mg/dm}^3$. Stosowane metody stabilizacji wpłynęły na wzrost zawartości sodu z 32 mg/dm^3 w winie kontrolnym do 52 mg/dm^3 w winie stabilizowanym preparatem Profloc, a także chitozanem oraz do 39 mg/dm^3 w przypadku klarowania żelatyną (NIR = 6,5).

W winie czerwonym nastąpił wzrost zawartości wapnia przy zastosowaniu wszystkich metod. W przypadku zastosowania żelatyny obserwowano spadek zawartości magnezu, potasu i sodu w stosunku do próbki kontrolnej. Chitozan i preparat Profloc nie wpłynęły na zawartość magnezu, natomiast spowodowały niewielkie zmniejszenie zawartości potasu i nieznaczny wzrost ilości sodu. Badania wykonane zostały w jednej serii, dlatego analiza wyników może odnosić się tylko do przeprowadzonego doświadczenia.

Hashimoto i wsp. [7] wykazali, że zwiększone ilości potasu, magnezu i cynku wpływają na pogorszenie jakości sensorycznej gronowych win białych. Podobne wyniki uzyskali Correa i Polo [3] w przypadku potasu i wapnia, a Rodriguez i wsp. [11] podają, że magnez nadaje winu kwaskowy posmak.

Tabela 1

Wpływ stabilizacji na zawartość wybranych składników win (średnia z 3 serii).
Influence of stabilization on selected wine components content (average of 3 series).

Metoda stabilizacji Method of stabilization	Kwasowość ogólna [g/dm ³] Total acidity	pH	Dominująca długość fali [λ ₀] Dominant wavelength	Jasność [Y] Brightness	Czystość pobudzenia [P _e] Excitation purity	Ocena sensoryczna [punkty] Sensoric assessment	Ekstrakt ogólny [g/dm ³] Total extract	Etanol [% _{obj.}] Ethanol [% _{vol}]	Popiół [g/dm ³] Ash	Alkaliczność popiołu [cm ³ 0,1M H ₂ SO ₄ / g popiołu] Alkalinity of ash
Wino białe / White wine										
kontrolna control	3,5	3,55	592	35	0,13	3,42	18,4	13,4	1,3	17,7
chitozan chitosan	3,1	3,69	586	37	0,11	3,92	17,7	11,9	1,3	19,8
żelatyna gelatin	3,1	3,67	587	37	0,12	3,56	18,0	12,0	1,4	19,0
Profloc	3,1	3,65	592	37	0,11	3,85	17,0	13,0	1,3	18,2
NIR	0,37	0,05	-	-	-	-	-	1,2	-	-
PI	-	-	-	-	-	0,9	1,0	-	0,9	0,6
Wino czerwone / Red wine										
kontrolna control	3,2	3,99	494	0,8	0,34	2,0	38,0	12,6	2,0	19,7
chitozan chitosan	2,9	4,00	493	1,0	0,51	2,0	37,7	11,5	2,0	24,4
żelatyna gelatin	2,7	4,10	610	2,8	0,97	1,87	37,4	11,1	1,9	20,6
Profloc	2,8	4,33	492	1,5	0,54	1,94	37,8	11,5	1,9	24,9
NIR	0,04	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
PI	-	0,05	-	-	-	0,1	0,3	-	0,1	0,4

Tabela 2

Zawartość wybranych pierwiastków w winach.
Content of selected elements in wine.

Pierwiastki Elements		Wino białe / White wine				Wino czerwone / Red wine				
		Próba kontrolna Control [mg/dm ³]	Metoda stabilizacji Method of stabilization			NIR	Próba kontrolna Control [mg/dm ³]	Metoda stabilizacji / Method of stabilization		
			chitozan chitosan [mg/dm ³]	żelatyna gelatin [mg/dm ³]	Profloc [mg/dm ³]			chitozan chitosan [mg/dm ³]	żelatyna gelatin [mg/dm ³]	Profloc+ [mg/dm ³]
Ca	I	59,4	56,6	51,7	41,6	13	103	146	125	193
	II	58,5	45,3	49,5	30,8					
	III	59,1	52,1	43,2	38,0					
	śr.	59,0	51,0	48,0	36,0					
Mg	I	30,0	32,5	32,5	31,8	1,3	67	63	31	65
	II	29,8	33,1	31,2	32,8					
	III	30,1	31,9	32,4	32,1					
	śr.	30,0	32,5	32,0	32,0					
K	I	602	503	616	551	44	797	758	556	754
	II	591	510	680	554					
	III	599	495	657	550					
	śr.	596	505	648	552					
Na	I	32,4	48,1	39,1	50,7	6,5	86	95	57	103
	II	32,3	56,8	39,3	52,5					
	III	32,3	54,0	39,0	51,9					
	śr.	32,0	52,0	39,0	52,0					

Stosowane metody stabilizacji nieznacznie wpłynęły na poprawę oceny sensorycznej wina białego, jednak różnice nie były statystycznie istotne. W przypadku wina czerwonego po klarowaniu nie stwierdzono podwyższenia jego jakości (tab. 1).

Spagna i wsp. [15] podają, że wina gronowe stabilizowane przy użyciu preparatu Profloc charakteryzowały się wyższą jakością w porównaniu z winami klarowanymi PVPP.

W celu określenia wpływu stosowanych metod stabilizacji fizykochemicznej na badane wina przeprowadzono oznaczenia także innych składników. W badanych wi-

nach nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości ekstraktu ogólnego, zawartości i alkaliczności popiołu. Stwierdzono natomiast niewielki spadek zawartości alkoholu, który wiązał się z rozcieńczeniem próbek wina dodanymi środkami stabilizacyjnymi rozpuszczanymi w roztworze wodnym.

Wnioski

1. Możliwe jest wykorzystanie zarówno chitozanu w formie rozpuszczonej, jak i preparatu Profloc w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego do stabilizacji fizykochemicznej wina.
2. Przeprowadzanie stabilizacji jest utrudnione, ponieważ konieczny jest dobór dawek dla każdego zbiornika produkcyjnego oddzielnie. Ponadto istnieje możliwość przeklarowania chitozanem oraz konieczność utrzymywania roztworu chitozanu w temp. 80–90°C podczas dozowania.
3. Zastosowanie do klarowania żelatyny w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego w przypadku win białych dało podobne rezultaty, jak zastosowanie chitozanu w kombinacji z bentonitem i zolem kwasu krzemowego.

Literatura

- [1] Begerow: Materiały firmy, 2002.
- [2] Bill R.: Analytische Aktualitäten bei Eiweiß. Trübungen. Zeitschr. Obst Weinbau, 1992, **128 (18)**, 478-481.
- [3] Correa Y., Pola M.c.: Tratamientos para la estabilizacion de los vinos frente a las precipitaciones tartaricas. Rev. Agrog. Technol. Aliment., 1990, **30**, 10-22.
- [4] Cordonnier R.: Étude des proteines et de substances azotec. Bulletin de L'O.I.V. 1966, **39**, 429, 1311- 1316.
- [5] Günther S.: Schönen von Fruchtsäften (3): Gelatineschönung. Flüss. Obst, 1994, **61 (12)**, 573-578.
- [6] Günther S., Junker R.: Schönen von Fruchtsäften (5): Zeitpunkt und Reinerfolge. Flüss. Obst, 1995, **62, (5)**, 207-209.
- [7] Hashimoto Y., Nomura T., Shipa K., Tanaka K.: Correlation between the contents of various constituents and the grade in quality assessments of wine. J. Instit. Enol. Viticul.Yamanashi Univ., 1980, **47**, 102-108.
- [8] Onsøyen E., Skaugrud Ø.: Metal recovery using chitosan. J. Chem. Technol. Biotechnol., 1990, **49**, 395-404.
- [9] PN-89/A-86850. Surowce i przetwory z ryb i innych zwierząt wodnych. Chitozan.
- [10] Pogorzelski E., Czyżowska A.: Adsorpcja polifenoli w procesie klarowania moszczów, win oraz napojów winopodobnych za pomocą wybranych bentonitów. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 2000, **44**, (5), 29-31.
- [11] Rodriguez M.S., Sotro G., Segovia G.A.: Influence of decantation of viura must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization. Food Res. Inter., 1999, **32 (10)**, 683-689.
- [12] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 4 lutego 2003 w sprawie szczególnych rodzajów fermentowanych napojów winiarskich oraz szczególnych wymagań organoleptycznych, fizykochemicznych i chemicznych dla tych napojów (Dz. U. 2003 r. Nr 25, poz 233).

- [13] Siebert K. J.: Formation of protein – polyphenol phase in beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44** (8), 1997-2005.
- [14] Sigelton V.L., Orthofer R., Lamuela-Rarentos R.M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocaltau reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, **299**, 152-178.
- [15] Spagna G., Pifferi P.G., Rangoni C., Mattivi F., Nicoloni G., Palmonari R.: The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Res. Inter.*, 1996, **29**, 3-4, 241-248.
- [16] Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V.: Chitin deacetylases; new versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 2000, **18** (7), 3105-3120.
- [17] Wojtasz-Pająk A.: Ocena przydatności pancerzy krewetek, krabów oraz płytek mątw do produkcji chityny i jej pochodnych. III Sympozjum „Chityna/Chitozan”, Morski Instytut Rybacki, Gdynia 1992.
- [18] Wzorek W., Bielecka K.: Wpływ wybranych środków na stabilizację polifenolową czerwonego wina gronowego. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1998, **42** (6), 24-28.
- [19] Wzorek W., Pogorzelski E.: Technologia winiarstwa owocowego i gronowego. SIGMA – NOT, Warszawa 1998.

AN ATTEMPT TO APPLY CHITOSAN IN A DISSOLVED FORM TO STABILIZE WINES

S u m m a r y

The objective of this paper was to investigate a possibility of applying chitosan in a dissolved form to stabilize wines, and to determine effects of stabilization methods applied on the content of selected components of wines. Red chokeberry and white apple wines from the Polish wineries were used in the experiments. A low-viscous chitosan and a chitosan in the form of a Profloc preparation (product of a Begerow company) were used as fining agents. Gelatine, widely used in wine technology, was also utilized for comparison. The adsorbents were applied in combination with bentonite and soliquid silicic acid. In all the methods utilized, doses of fining substances applied were determined on the basis of test fining procedures. Three series of experiments were conducted. In the wines analysed, substances applied caused a decrease in the contents of phenolic compounds, alcohol, and total nitrogen; they also produced a slight increase in the pH value, and a slight decrease in the total acidity, and in the content of elements. No statistically significant changes were stated in the content of total extract, nor in the amounts of ash and its alkalinity; the sensory assessment results did not differ statistically significantly. It was found that the dissolved chitosan, in combination with bentonite and soliquid silicic acid, can be used as a fining agent, and it can replace gelatine while stabilizing wines. The fact that it is necessary to choose individual doses for each container make it difficult to carry out the entire stabilization process.

Key words: wine, fining, methods of stabilization, chitosan. ☒

PIOTR ZAPOTOCZNY, MAGDALENA ZIELIŃSKA

ROZWAŻANIA NAD METODYKĄ INSTRUMENTALNEGO POMIARU BARWY MARCHWI

Streszczenie

W pracy przedstawiono rozważania nad metodyką pomiaru barwy materiałów niejednorodnych na przykładzie marchwi. Korzeń marchwi był krojony na kostkę o bokach 10 x 10 x 10 mm. Pomiaru dokonano na kostkach surowych, blanszowanych oraz suszonych fluidyzacyjnie w temp. 70°C. Suszeniu poddano zarówno kostki nieblanszowane, jak i blanszowane w wodzie o temp. 95°C prze 4 min z dodatkiem trójfosforanu sodowego. Sprawdzano także wpływ rozdrabniania kostek na pomiar barwy. Barwa mierzona była w systemie L*a*b*, wyliczone zostały indeksy barwy: bezwzględna różnica barwy DE* oraz indeks żółtości YI(313). Wykazano wpływ sposobu przygotowania próbek do pomiaru na interpretację uzyskanych wyników. Przed przystąpieniem do pomiarów wyliczono minimalną liczebność próby.

Minimalna liczba powtórzeń przy zakładanym błędzie pomiaru wyniosła od 15 do 36, w zależności od mierzonej składowej. Stwierdzono statystycznie istotne różnice ($p = 0,05$) pomiędzy składowymi barwy w kolejnych seriach pomiarowych tych samych kostek marchwi. Sposób przygotowania próbek do pomiaru miał wpływ na składowe barwy. Blanszowanie kostek, a następnie ich rozdrabnianie wpłynęło na zmniejszenie jasności barwy. Sposób przygotowania próbek marchwi poddanej suszeniu nie miał dużego wpływu na zmianę jasności barwy. Natomiast w przypadku składowych a*, b* oraz indeksu ΔE^* i YI313 sposób przygotowania próbek marchwi zarówno przed, jak i po suszeniu miał znaczący wpływ na badane parametry.

Słowa kluczowe: marchew, barwa, system L*a*b*, jakość, metodyka pomiaru.

Wprowadzenie

Pomiar barwy jest jednym z podstawowych parametrów w ocenie jakości produktów i surowców spożywczych. Barwa jest cechą fizyczną produktu, która w zdecydowany sposób wpływa na pozytywny bądź negatywny jego odbiór przez konsumenta. Może ona informować o składzie chemicznym produktu, a tym samym o jego przydatności do przetwórstwa, przechowywania czy transportu. Pomiar barwy

Dr inż. P. Zapotoczny, Katedra Inżynierii Procesów Rolniczych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Heweliusza 14, 10-718 Olsztyn, mgr inż. M. Zielińska, Katedra Podstaw Techniki,

znajduje zastosowanie także do oceny procesów technologicznych, m.in. procesu ekspandowania czy suszenia. Aktualnie wyróżnia się dwie metody opisu barwy, a mianowicie ocenę sensoryczną oraz pomiar instrumentalny. Analiza sensoryczna, pomimo zapewnienia powtarzalnych warunków jej przeprowadzenia, przeszkolenia zespołu oceniającego oraz zastosowania odpowiednich metod, może być obciążona pewnym subiektywizmem. Zaletą jej jest możliwość opisu barwy na podstawie całej powierzchni produktu, co jest szczególnie ważne w przypadku oceny produktów niejednorodnych. Metoda instrumentalna jest powtarzalna, wystandaryzowana i precyzyjna. Wykorzystuje się w niej różnego rodzaju spektrofotometri dokonywane pomiaru w świetle odbitym lub przechodzącym. Wadą metod instrumentalnych jest to, że pomiar dotyczy ograniczonej powierzchni próbki. Jest to szczególnie widoczne w pomiarach produktów o zróżnicowanej budowie anatomicznej lub różnym stopniu wybarwienia powierzchni. Strukturalna różnorodność owoców i warzyw jest ogromna. Różnorodna budowa tkanek owoców i warzyw oraz względne proporcje, w jakich one występują mają decydujący wpływ na teksturę, barwę i inne właściwości fizyczne oraz determinują sposób przetwarzania [4]. Rozkład związków chemicznych w tkankach roślinnych jest także nierównomierny. Przykładem może być zawartość karotenoidów w korzeniu marchwi. Czarniecka-Skubina i Gołaszewska [3] badały zawartość wybranych składników chemicznych w marchwi odmiany Perfekcja. Autorki wykazały, że najwięcej karotenoidów znajduje się w korze ($17,2 \pm 0,3$ mg/g), gdzie stanowiły one ok. 51% ich całkowitej zawartości, natomiast w rdzeniu i skórcie stanowiły odpowiednio 34 i 14,7%.

Z powyższych powodów pomiar barwy tego samego materiału biologicznego wykonywany przez różnych naukowców może się różnić. Zależec to będzie w dużej mierze od sposobu przygotowania próby do badań (np. sposobu rozdrobnienia) oraz sposobu i miejsca dokonania pomiaru (np. część korowa czy rdzeniowa korzenia marchwi).

W instrumentalnych pomiarach wykorzystuje się różnego rodzaju modele matematyczne opisujące barwę najczęściej w postaci punktu o trzech współrzędnych. Na podstawie rozkładu widma promieniowania, które zostało odbite od próby, program obsługujący urządzenie wylicza współrzędne barwy w systemie XYZ przy wcześniej ustalonym obserwatorze (10° i 2°) i iluminancji (D65, C, A). Na podstawie tych trzech składowych istnieje możliwość wyliczenia innych modeli barwy np. CIE LCh [20].

Aktualnie wielu autorów wykorzystuje system CIE $L^*a^*b^*$ do opisu barwy, a tym samym jakości owoców, warzyw i przetworów owocowo-warzywnych, jak też do opisu zmian zachodzących podczas procesów technologicznych, m.in. w marchwi [18], bananach [14], jabłkach [5], gruszkach [8]. Stosowanie systemu $L^*a^*b^*$ umożliwia także wyliczanie różnych indeksów np.: ΔE^* , ΔC^* , ΔH^* [16, 2, 19, 9, 6, 1, 12, 8],

które umożliwiają opisanie zmian barwy, jak również wskazują, które charakterystyki barwy uległy zmianie. Ozkan i wsp. [15] badali wpływ zawartości wody na barwę suszonej brzoskwini. Atrybuty barwy mierzono w 4 punktach 10 owoców brzoskwini. Maskan [14] opisał kinetykę zmian barwy owoców kiwi podczas suszenia konwekcyjnego i mikrofalowego. Pomiar barwy dokonywany był na świeżym surowcu oraz podczas procesu suszenia. Lewicki [11] przedstawił wpływ temperatury suszenia na stabilność barwy cebuli podczas przechowywania. Świeżą cebulę obierano i cięto na plastry o grubości 3 mm. Barwę świeżej cebuli mierzono bezpośrednio, natomiast po procesie suszenia badano barwę proszku w 10 powtórzeniach. Krokida i wsp. [10] opisali wpływ różnych metod suszenia na barwę jabłek, bananów, marchwi i ziemniaków. Badaniu poddano próbki o kształcie cylindrycznym o średnicy 20÷30 mm i wysokości 8÷10 mm. Zmierzono barwę 8 próbek, po 2 każdego materiału. Barwa próbki była mierzona w 5 różnych miejscach w celu określenia średnich wartości parametrów L^* , a^* , b^* . W prezentowanych pracach obserwuje się brak dokładnego opisu metodyki badań. Ponadto tak duża różnorodność sposobu przygotowania materiału badawczego do pomiaru staje się czynnikiem limitującym możliwość porównywania uzyskanych wyników przez różnych autorów.

Z powyższego przeglądu literatury wynika, że w większości prac mało jest informacji o sposobie przygotowania próby do pomiaru, doborze sposobu i miejsca pomiaru, liczby powtórzeń jak i analizie błędu. Z tego względu istotne wydaje się określenie wpływu sposobu przygotowania próby oraz metodyki pomiaru na parametry jakościowe badanego produktu, a w dalszym etapie opracowanie jednolitej metodyki pomiaru barwy poszczególnych grup surowców spożywczych, z uwzględnieniem materiałów o niejednorodnej strukturze.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie, a przede wszystkim określenie, w jaki sposób przygotowanie próbki może wpłynąć na interpretację wyników pomiaru barwy produktów o niejednorodnej budowie tkankowej.

Materiał i metody badań

Materiałem badawczym były korzenie marchwi odmiany Macon pochodzącej z uprawy Zakładu Warzywniczego w Skierniewicach. Marchew krojono w plastry o grubości 10 mm, a następnie z plastrów wykrawano sześciiany o wymiarach 10 x 10 x 10 mm. Pomiar barwy i analiza statystyczna wyników przebiegała kilkuetapowo:

- **etap I** polegał na przeprowadzeniu eksperymentu wstępnego polegającego na określeniu minimalnej liczebności próby ($N_{\min.}$), koniecznej do badań zasadniczych.

Zastosowano następującą formułę matematyczną:

$$N_{\min} \geq \frac{t_{\gamma}^2 * S_r^2}{d^2}$$

gdzie:

t_γ – wartość statystyki testu t Studenta dla określonego, przyjętego poziomu istotności oraz stopni swobody,

S_r – odchylenie standardowe z próby,

d^2 – zakładany maksymalny błąd pomiaru mierzonej wielkości,

Przyjęto następujące założenie: błąd pomiaru = 1 jednostce, liczebność próby 15, stopnie swobody 13, zakładany poziom istotności $p = 0,05$;

- **etap II** polegał na sprawdzeniu, czy w kolejnych seriach pomiarowych średnia wartość poszczególnych składowych barwy tych samych kostek będzie sobie równa. Wykonano sześć powtórzeń zakładając, że każda kostka w kolejnym pomiarze może mieć zmierzoną barwę innej powierzchni. Dokonano pomiaru kostek surowych, blanszowanych oraz suszonych fluidyzacyjnie w temp. 70°C. Suszeniu poddano zarówno kostki nieblanszowane, jak i blanszowane w wodzie o temp. 95°C prze 4 min z dodatkiem trójfosforanu sodowego;
- **etap III** obejmował sprawdzenie, w jak i sposób rozdrobnienie kostek wpływa na wyrównanie barwy. Kostki surowe, jak i suszone rozdrabniane były w młynku laboratoryjnym;
- **etap IV** polegał na sprawdzeniu w jaki sposób przygotowanie próbki wpływa na interpretację wyników pomiaru barwy kostek marchwi poddanej suszeniu fluidyzacyjnemu.

W każdym z etapów pomiar barwy wykonany został spektrofotometrem MiniScan XE Plus firmy HunterLab, obserwatora 10°, światła znormalizowanego D65 oraz przesłony 8°. Barwa została opisana w modelu barwy $L^*a^*b^*$. Na podstawie składowych zostały wyliczone indeksy barwy: bezwzględna różnica barwy (ΔE^*) oraz indeks żółtości (YI313). Standardem przy wyliczeniu ΔE^* był wzorec barwy białej o parametrach $L^* -94, a^* - (-0,95), b^* 0,49$.

W celu porównania średnich wartości cechy przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji przy poziomie istotności $p = 0,05$ (test Duncana). Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona z wykorzystaniem pakietu Statistica 6.1.

Wyniki i dyskusja

Wyliczenie liczebności próby

W tab. 1. przedstawiono wyniki obliczeń liczebności próby. W przypadku każdej składowej uzyskano inny wynik minimalnej liczebności próby.

Tabela 1

Minimalna liczebność próby do pomiarów poszczególnych składowych barwy.
The number of samples required for measurement of particulate colour parameters.

Wyróżnik barwy Colour parameters	Liczebność próby wstępnej Number of the preliminary sample	Zakładany błąd pomiaru Assumed error of the measurement [-]	Statystyki Statistics [-]		Liczebność obliczona N_{\min}
			\bar{X}	S_r	
L*	15	1	68,71	1,82	15
a*	15	1	42,39	2,36	26
b*	15	1	54,15	2,77	36

\bar{X} – wartość średnia / mean value, S_r – odchylenie standardowe / standard deviation.

W związku z tym, że minimalna liczebność próby do zmierzenia składowej b* wyniosła 36, w dalszych pomiarach za minimalną liczbę przyjęto pomiaru z co najmniej 40 kostek.

Pomiar barwy kostek marchwi w sześciu seriach pomiarowych

W wielu badaniach dotyczących wpływu określonego procesu na zmianę jakości produktu spożywczego dokonuje się pomiaru barwy jako jednego z jej wyróżników. W większości urządzeń mierzących barwę obszar pomiarowy jest niewielki. Z tego względu należy się liczyć z dużym współczynnikiem zmienności barwy w pomiarze produktów o zróżnicowanej budowie anatomicznej. Większość badaczy zakłada w swoich pomiarach świadomie, a najczęściej nieświadomie, że pomiar barwy materiałów niejednorodnych w seriach pomiarowych (ten sam niezmienny produkt) będzie taki sam. W tab. 2. zestawiono wyniki badań jakie uzyskano z 6 serii pomiarowych tych samych kostek surowej marchwi przed, jak i po procesie suszenia.

Na podstawie analizy statystycznej wyników wykazano, że pomimo wykonywania pomiaru tego samego materiału w 6 powtórzeniach, uzyskano istotne różnice w pomiarze barwy i jej indeksów. W opracowaniu wyników posłużono się kryterium przyjętym przez Międzynarodową Komisję Oświetleniową CIE [7]. Według tego kryterium sklasyfikowane są bezwzględne różnice barw ΔE^* , adekwatnie do postrzegania barw przez człowieka. Przyjęto, że bezwzględne różnice barw pomiędzy 0 i 2 są nierozpoznawalne, od 2 do 3,5 rozpoznawalne przez niedoświadczonego obserwatora, natomiast powyżej 3,5 obserwuje się wyraźne odchylenie barwy. W przypadku marchwi surowej różnice pomiędzy największą a najmniejszą wartością indeksu ΔE^* wynosiły 8,64 jednostki. Znaczną różnicę tj. 15,59 jednostek zaobserwowano również w indeksie YI313. Mniejsze różnice pomiędzy średnimi występowały w marchwi suszonej. Różnica pomiędzy najmniejszą a największą wartością indeksu ΔE^* wynosiła 3,32.

Tabela 2

Wartości średnie składowych barwy tych samych kostek marchwi uzyskane z sześciu serii pomiarowych oraz wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji.

The mean values of colour parameters and indices of particulate experimental row. The results of a one-factor analysis of variance.

Grupa Group	Liczebność próby Number of the sample	Wyróżniki barwy Colour parameters									
		L* [-]		a* [-]		b* [-]		ΔE* [-]		YI313 [-]	
		\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S
M _{ks} -1*	43	68,82 ^A	1,67	42,39 ^A	2,16	54,27 ^D	2,82	73,54 ^D	3,51	140,84 ^D	6,82
M _{ks} -2	43	68,91 ^A	2,11	40,32 ^B	3,45	51,08 ^B	4,39	70,00 ^B	5,16	134,78 ^B	9,87
M _{ks} -3	43	69,74 ^{AB}	2,47	39,13 ^B	3,72	49,51 ^{AB}	4,59	67,87 ^{AB}	5,68	130,62 ^{AB}	11,01
M _{ks} -4	43	69,59 ^{AB}	2,21	39,16 ^B	2,89	49,48 ^{AB}	3,36	67,91 ^{AB}	4,13	130,85 ^{AB}	8,28
M _{ks} -5	43	69,61 ^{AB}	2,34	38,93 ^{BC}	3,53	48,86 ^A	5,34	67,34 ^A	6,03	129,70 ^A	11,62
M _{ks} -6	43	70,03 ^B	1,89	37,63 ^C	3,19	46,76 ^C	4,26	64,90 ^C	4,86	125,25 ^C	9,49
M _{ks70} -1*	43	71,16 ^{AB}	4,50	17,26 ^{AB}	4,25	16,01 ^{AB}	4,88	33,17 ^{AB}	7,49	53,58 ^{AB}	16,18
M _{ks70} -2	43	69,81 ^{AB}	4,24	18,36 ^A	4,70	17,26 ^{AB}	5,24	35,34 ^A	7,60	57,97 ^{AB}	17,35
M _{ks70} -3	43	70,93 ^{AB}	4,55	17,60 ^{AB}	4,78	16,35 ^{AB}	5,31	33,69 ^{AB}	8,03	54,77 ^{AB}	17,76
M _{ks70} -4	43	69,88 ^{AB}	3,99	18,47 ^A	4,62	16,99 ^{AB}	4,96	35,21 ^{AB}	7,33	57,54 ^{AB}	16,94
M _{ks70} -5	43	69,31 ^B	4,29	19,18 ^A	3,98	18,11 ^B	4,60	36,49 ^A	7,02	60,87 ^B	15,54
M _{ks70} -6	43	71,70 ^A	4,30	16,25 ^B	3,96	15,08 ^A	4,27	31,82 ^B	6,77	50,31 ^A	14,46

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p < 0,05$ / Mean values in the same column with the different letters are significantly different at essential ($p < 0,05$);

M_{ks} – kostka surowa / raw cube; M_{ks70} – kostka suszona / dried cube, 1..6* – kolejne powtórzenia / the next repetition; \bar{x} – wartość średnia / mean value; S – błąd standardowy średniej / standard error of the mean value; L* – jasność / lightness; a* – żółtość / yellowness; b* – czerwoność / redness; ΔE* – bezwzględna różnica barwy / Hunter Lab total colour difference, YI313 – indeks żółtości, Yellowness index.

Wyniki uzyskanych pomiarów nakazują zwrócenie większej uwagi na metodykę pomiaru barwy produktów o zróżnicowanej budowie anatomicznej. Szczególnie istotny będzie właściwy dobór liczebności próby, przede wszystkim w przypadku porównywania różnych odmian tego samego gatunku, kiedy różnice w barwie są niewielkie.

Następnie został sprawdzony wpływ procesu blanszowania na barwę marchwi. W tab. 3. przedstawiono wartości średnie i wyniki analizy wariancji pomiaru barwy marchwi, która została poddana blanszowaniu, a następnie suszeniu.

T a b e l a 3

Wartości średnie składowych barwy kostek marchwi blanszowanej uzyskane z trzech serii pomiarowych oraz wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji.
The mean of colour parameters and indices of particulate experimental row for blanched carrot cubes. The results of a one-factor analysis of variance.

Grupa Group	Liczebność próby Number of the sample	Wyróżniki barwy Colour parameters									
		L* [-]		a* [-]		b* [-]		ΔE* [-]		YI313 [-]	
	N	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S
M _{kb} -1*	45	66,92 ^A	1,64	43,39 ^A	2,43	56,59 ^A	2,33	76,49 ^A	3,26	146,90 ^A	6,65
M _{kb} -2	45	66,70 ^A	1,51	43,27 ^A	2,54	56,17 ^A	3,03	76,19 ^A	3,82	146,58 ^A	7,37
M _{kb} -3	45	67,30 ^A	1,70	43,08 ^A	3,02	56,29 ^A	3,89	75,96 ^A	4,78	145,61 ^A	8,97
M _{kb70} -1*	45	71,21 ^A	5,41	18,83 ^A	6,12	19,90 ^A	7,33	35,98 ^A	10,63	62,79 ^A	23,66
M _{kb70} -2	45	70,98 ^A	4,97	19,44 ^A	6,19	20,23 ^A	7,19	36,64 ^A	10,34	64,15 ^A	23,25
M _{kb70} -3	45	71,20 ^A	4,02	18,82 ^A	4,83	19,82 ^A	6,45	35,96 ^A	8,48	62,30 ^A	19,18

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p < 0,05$ / Mean values in the same column with the different letters are significantly different at essential ($p < 0,05$);

M_{kb} – kostka surowa, blanszowana / raw cube, blanched; M_{kb70} – kostka blanszowana, wysuszona / blanched cube, dried, 1..3* – kolejne powtórzenia / the next repetition.

W związku z tym, że już wyniki trzech grup pomiarowych wykazywały wyrównanie barwy, w poszczególnych wariantach wykonano tylko trzy serie oznaczeń. Wartości średnie każdego wyróżnika barwy niezależnie od serii pomiarowej nie różniły się statystycznie istotnie przy zakładanym poziomie istotności. Różnica pomiędzy minimalną a maksymalną średnią bezwzględnej różnicy barwy ΔE* wynosiła 0,53 jednostki w kostkach surowych poddanych procesowi blanszowania, natomiast 0,68 w kostce poddanej procesowi blanszowania i suszenia, co można uznać za niezauważalną różnicę. Także wartości pozostałych składowych barwy w poszczególnych seriach pomiarowych nie różniły się statystycznie istotnie.

Pomiar barwy próbek rozdrobnionych

W tab. 4. zestawiono wartości średnie uzyskane z pomiaru barwy we wszystkich badanych grupach doświadczalnych. Dodatkowo przedstawiono współczynniki zmienności, obliczone z równania:

$$v = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100\% \text{ gdzie:}$$

v – współczynnik zmienności,

S – błąd standardowy średniej,
 \bar{x} – wartość średnia mierzzonego parametru.

Tabela 4

Wartości średnie składowych barwy kostek marchwi zróżnicowanych sposobem obróbki oraz wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji.

The mean values of colour parameters and indices of particulate experimental row for carrot cubes. The results of a one-factor analysis of variance.

Grupa Group	Liczba próby Number of the sample	Statystyki	Wyróżniki barwy Colour parameters									
			L* [-]		a* [-]		b* [-]		ΔE^* [-]		YI313 [-]	
M _{ks}	258	\bar{X}	69,45 ^A		39,58 ^A		49,97 ^C		68,57 ^C		131,96 ^C	
		S v	2,16	3,11	3,49	8,82	4,75	9,51	5,59	8,15	10,7	8,11
M _{kb}	129	\bar{X}	66,97 ^B		43,25 ^B		56,35 ^B		76,21 ^B		146,36 ^B	
		S v	1,63	2,43	2,66	6,15	3,13	5,55	3,98	5,22	7,69	5,25
M _{rs}	45	\bar{X}	49,40 ^C		24,16 ^C		28,53 ^A		58,38 ^A		106,48 ^A	
		S v	0,84	1,70	0,89	3,68	1,32	4,63	0,89	1,52	3,36	3,16
M _{rb}	45	\bar{X}	47,29 ^D		22,89 ^D		28,65 ^A		59,53 ^A		107,67 ^A	
		S v	0,31	0,66	0,62	2,71	0,81	2,83	0,58	0,97	2,32	2,15
M _{ks70}	258	\bar{X}	70,45 ^A		17,87 ^A		16,65 ^C		34,31 ^A		55,89 ^A	
		S v	4,35	6,17	4,46	24,96	4,94	29,67	7,48	21,80	16,62	29,74
M _{kb70}	129	\bar{X}	71,13 ^A		19,02 ^A		19,98 ^B		36,19 ^A		63,08 ^B	
		S v	4,82	6,78	5,73	30,13	6,96	34,83	9,82	27,13	22,02	34,91
M _{rs70}	45	\bar{X}	65,86 ^B		29,38 ^C		31,48 ^A		51,69 ^B		99,01 ^C	
		S v	0,39	0,59	0,31	1,06	0,27	0,86	0,44	0,85	0,96	0,97
M _{rb70}	45	\bar{X}	71,00 ^A		21,82 ^D		30,04 ^A		43,83 ^C		83,12 ^D	
		S v	0,67	0,94	0,52	2,38	0,56	1,86	0,75	1,71	1,54	1,85

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p < 0,05$ / Mean values in the same column with the different letters are significantly different at essential ($p < 0,05$);

M_{ks} – kostka surowa / raw cube; M_{kb} – kostka surowa, blanszowana / raw, cube blanched; M_{rs} – kostka rozdrobniona surowa / crumbled raw cube; M_{rb} – kostka blanszowana rozdrobniona / blanched crumbled cube; M_{ks70} – kostka suszona / dried cube; M_{kb70} – kostka blanszowana, wysuszona / blanched cube, dried; M_{rs70} – kostka suszona, rozdrobniona / dried cube, crumbled; M_{rb70} – kostka blanszowana, suszona / blanched cube, dried; v – współczynnik zmienności / coefficient of variance.

Rozdrobnienie kostek miało wpływ na zmianę barwy. Średnie wartości składowych barwy różniły się statystycznie istotnie pomiędzy próbkami rozdrobnionymi a całymi kostkami. Rozdrobnienie spowodowało, że barwa próby stała się ciemniejsza. Różnica pomiędzy wartościami parametru L* uzyskanymi z marchwi rozdrobnionej i nierozdrobnionej wynosiła 20 jednostek. Podobną sytuację

zaobserwowano w przypadku parametru a^* i b^* , gdzie wartości uzyskane po procesie rozdrabniania były 2-krotnie niższe w porównaniu z materiałem wyjściowym.

Natomiast rozdrabnianie próbek przed procesem suszenia spowodowało wyrównanie wartości średnich pomiarów barwy marchwi blanszowanej i nieblanszowanej. Różnica pomiędzy wartościami indeksu ΔE^* wynosiła tylko 1,15 jednostek, a indeksu YI313 1,19 jednostek. Współczynnik zmienności zmniejszył się 3-4 krotnie.

W tab. 5. przedstawiono uzyskane różnice barwy pomiędzy marchwią surową a suszoną w zależności od sposobu przygotowania próbki do pomiaru. Rozpiętość uzyskanych wyników składowej L^* , w zależności od grupy doświadczalnej, wynosiła od 1 do 23,71 jednostek. Tak duża różnica spowodowana była tym, że rozdrobnienie wpłynęło na zmianę jasności z 69,45 do 47,29 jednostek. Podobne rozpiętości zanotowano w pozostałych składowych barwy, odpowiednio w a^* od 1,07 do 21,71 oraz b^* od 1,39 do 36,37. Wartości indeksu ΔE^* wahały się od 6,69 do 40,02 w zależności od grupy doświadczalnej. Wyniki te dowodzą, jak różna mogła być interpretacja wyników w zależności od sposobu przygotowania próby, a tym samym możliwość błędnego wnioskowania. Przykładem na powyższe stwierdzenie może być analiza składowej jasności (L^*). W przypadku pomiaru barwy kostek nieblanszowanych i nierozdrobnionych można sformułować wniosek, że proces suszenia nie wpłynął istotnie na zmianę jasności (zmiana wynosi 1 jednostkę). Natomiast gdyby tę samą marchew blanszować i poddać suszeniu różnica jasności wyniesie już 4,16 jednostki, a w blanszowanej i rozdrobnionej aż 23, 71 jednostki. Przytoczony przykład potwierdza obserwację, że różny sposób przygotowania próbek prowadzi do odmiennych wniosków, co do wpływu procesu suszenia na zmianę barwy kostek marchwi.

Istotna jest także analiza wielkości odchylenia standardowego oraz współczynnika zmienności. Wielkość tych statystyk będzie miała wpływ na wielkość próby. Proces rozdrobnienia (tab. 4) znacząco wpłynął na ujednoczenie próby, a tym samym na zmniejszenie wartości współczynnika zmienności.

Po przeanalizowaniu powyższych danych należałoby zastanowić się, jak przygotować próbkę do pomiaru barwy oraz jaka powinna być liczebność próby, aby wynik był reprezentatywny dla populacji? Autorzy sugerują, aby na wstępie ocenić jednorodność materiału, który ma być poddany badaniom. W przypadku produktów jednorodnych próbek nie trzeba rozdrabniać. Natomiast produkty niejednorodne, a takie najczęściej występują w przemyśle owocowo-warzywnym, należałoby wstępnie rozdrabniać. Można także zwiększyć liczbę powtórzeń. Jak wynika z przedstawionych badań, liczba ta powinna być kilkakrotnie większa od przeprowadzonej w doświadczeniu. Przed przystąpieniem do badań należy także zastanowić się nad celem przeprowadzanego pomiaru barwy. Chcąc wykazać wpływ określonego procesu na

zmianę barwy, sposób przygotowania próby nie będzie miał decydującego znaczenia. Bezwzględna różnica barwy oraz indeks żółtości będzie na tyle duży, że możliwe będzie zaobserwowanie wpływu procesu na zmianę barwy. Problem może nastąpić wówczas, gdy badania będą dotyczyły różnic pomiędzy dwoma grupami doświadczalnymi poddanymi określonemu procesowi technologicznemu. W takim przypadku ewentualne różnice lub ich brak mogą być spowodowane niewłaściwą metodyką pomiaru (tabela 2, 3, 5).

Tabela 5

Składowe barwy oraz indeksy poszczególnych grup doświadczalnych kostek marchwi poddanych procesowi suszenia.

The comparison mean values of colour parameters and indices of particulate experimental groups for dried carrot cubes.

Grupa Group	Statystyka Statistics	Wyróżnik barwy / Colour parameters				
		L* [-]	a* [-]	b* [-]	ΔE^* [-]	YI313 [-]
M_{ks}	\bar{X}_1	69,45	39,58	49,97	68,57	131,96
M_{ks70}	\bar{X}_2	70,45	17,87	16,65	34,31	55,89
Różnica ($\bar{X}_1 - \bar{X}_2$)		-1,00	21,71	33,32	34,26	76,07
M_{kb}	\bar{X}_1	66,97	43,25	56,35	76,21	146,36
M_{kb70}	\bar{X}_2	71,13	19,02	19,98	36,19	63,08
Różnica ($\bar{X}_1 - \bar{X}_2$)		-4,16	24,23	36,37	40,02	83,28
M_{rs}	\bar{X}_1	49,40	24,16	28,53	58,38	106,48
M_{rs70}	\bar{X}_2	65,86	29,38	31,48	51,69	99,01
Różnica ($\bar{X}_1 - \bar{X}_2$)		-16,46	-5,22	-2,95	6,69	7,47
M_{rb}	\bar{X}_1	47,29	22,89	28,65	59,53	107,67
M_{rb70}	\bar{X}_2	71,00	21,82	30,04	43,83	83,12
Różnica ($\bar{X}_1 - \bar{X}_2$)		-23,71	1,07	-1,39	15,7	24,55

M_{ks} – kostka surowa / raw cube; M_{kb} – kostka surowa, blanszowana / raw cube, blanched; M_{rs} – kostka rozdrobniona surowa / crumbled raw cube; M_{rb} – kostka blanszowana rozdrobniona / blanched crumbled cube; M_{ks70} – kostka suszona / dried cube; M_{kb70} – kostka blanszowana, wysuszona / blanched cube, dried; M_{rs70} – kostka suszona, rozdrobniona / dried cube, crumbled; M_{rb70} – kostka blanszowana, suszona / blanched cube, dried.

Wnioski

1. Kostki marchwi poddane procesowi blanszowania charakteryzowały się wyrównaną barwą w porównaniu z kostkami nieblanszowanymi.
2. Rozdrobnienie kostek spowodowało zmniejszenie jasności barwy badanego materiału, zmianę jej odcienia i nasycenia.
3. Rozdrobnienie kostek blanszowanych, jak i nieblanszowanych przed procesem suszenia, spowodowało wyrównanie barwy marchwi rozdrobnionej.

Praca sfinansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych, projekt badawczy nr 2 P06T 024 26.

Literatura

- [1] Ahmed J., Shivhare U.S., Raghavan G.S.V.: Color degradation kinetics and rheological characteristics of onion puree. Transactions of ASAE, 2001, **44**, **1**, 95–98.
- [2] Avila I.M.L.B., Silva C.L.M.: Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. J. Food Eng., 1999, **39**, 161-166.
- [3] Czarniecka-Skubina E., Gołaszewska B.: Wpływ procesu kulinarnego na jakość wybranych warzyw. Żywność. Nuka. Technologia. Jakość, 2001, **2** (27), 103 – 116.
- [4] Duckworth R.B.: Fruits and vegetables. Pergamon Press. London 1966.
- [5] Feng H., Tang J.: Microwave finish drying of diced apples in a spouted bed. J. Food Sci., 1998, **63**, 679-683.
- [6] Gunawan M.I., Barringer S.A.: Green colour degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. J. Food Process Pres., 2000, **24**, 253-263.
- [7] Heidelberg - Anonim. Barwa i jakość. Heidelberg Druckmaschinen AG, Kurfursten-Anlage, 1999, s. 52-60.
- [8] Ibarz A., Pagan J., Garza S.: Kinetic models for colour changes in pear puree during heating at relatively high temperatures. J. Food Eng., 1999, **39**, 415–422.
- [9] Kidmose U., Hansen M.: The influence of postharvest storage, temperature and duration on quality of cooked broccoli florets. J. Food Quality, 1999, **22**, 135-146.
- [10] Krokida M.K., Maroulis Z.B., Saravacos G.D.: The effects of the method of drying on the colour of dehydrated products. Inter. J. Food Sci. Technol., 2001, **36**, 53-59.
- [11] Lewicki P.P., Pomarańska-Łazuka W., Witrowa-Rajchert D., Nowak D.: Effect of mode of drying on storage stability of colour of dried onion. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1998, **4** (7/48), 701-706.
- [12] Lozano J.E., Ibarz A.: Colour changes in concentrated fruit pulp during heating at high temperatures. J. Food Eng., 1997, **31**, 365-373.
- [13] Maskan M.: Microwave/air and microwave finish drying of banana. J. Food Eng., 2000, **44**, 71-78.
- [14] Maskan M.: Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. J. Food Eng. 2001, **48**, 169-175.
- [15] Ozkan M., Kirca A., Cemeroglu B.: Effect of moisture content on CIE color values in dried apricots. European Food Res. Techn. 2003, **216**, 217-219
- [16] Shin S., Bhowmik S.R.: Thermal kinetics of color changes in pea puree. J. Food Eng., 1995, **24**, 77-86.
- [17] Sikorski Z.E. (pod red.): Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT, Warszawa 1994.

- [18] Skrede G., Nilsson A., Baardseth P., Rosenfeld H.J., Enersen G., Slinde E.: Evaluation of carrot varieties for production of deep fried carrot chips—III. Carotenoids. *Food Res. Int.*, 1997, **30**, **1**, 73-81.
- [19] Tijskens L.M.M., Schijvens E.P.H.M., Biekman E.S.A.: Modelling the change in colour of broccoli and green beans during blanching. *Innovative Food Sci. Emerging Technologies*, 2001, **2**, 303-313.
- [20] <http://www.easyrgb.com/>

DISCUSSION ABOUT A MEASUREMENT OF COLOUR OF CARROT

S u m m a r y

This paper shows a careful examination and discussion about a measurement of colour of inhomogeneous biological materials. An example of such materials is a carrot. Samples were cut into 10 mm cubes. An instrumental method for determining the changes in colour of raw, blanched and dried carrots is used in this paper. The fluidized bed drying was used as a method of food preservation. The samples which were used to drying were divided into two parts: blanched or unblanched. The drying process was carried out under specific operating conditions: 70°C and the mean of air velocity 4.5 m/s. The blanching operation was carried out for 4 minutes in boiling water. The parameters L^* , a^* , b^* were applied to colour description. In an instrumental evaluation of colour and description of differences between the samples the following indices can be calculated and expressed in the form of: ΔE^* (total colour difference), YI (313) (index of yellowness). This paper shows the influence of sample preparation on measurement of carrot colour. The results of this study show that the sample preparation is an important and significant step in colour measurement and how it could influence on interpretation of obtained experimental results. Previously to samples preparation the number of repetition was calculated. The minimum number of repetition was from 15 to 36 on the accepted error of measurement level. It depends on measurement constituents. There were observed statistical differences ($p = 0,05$) between measurement constituents in the following series of the same carrot cubes measurement. It was observed that the way of sample treatment had a significant influence on constituents of colour. The blanching operation of carrot cubes and further coarse grinding had a significant influence on lightness deterioration. The way of sample treatment before drying is irrelevant and not significant for lightness. Moreover the way of sample treatments (blanching, powdering) had a significant influence on parameter a^* , b^* and indices: ΔE^* , YI 313. The way of sample treatment may play an important role for further interpretation of obtained experimental results, what is shown in discussion.

Key words: carrot, colour, system $L^*a^*b^*$, quality, methodology of measurement 