

ŻYWNOSĆ

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 2 (43)

Kraków 2005

Rok 12

SPIS TREŚCI

Od Redakcji	3
BOGUSŁAW KRÓL, ROBERT KLEWICKI: Wytwarzanie koncentratów fruktooligosacharydów (FOS) o zróżnicowanym składzie oligomerycznym z wykorzystaniem enzymatycznej biokonwersji sacharozy	5
SŁAWOMIR PIETRZYK, TERESA FORTUNA: Wpływ rodzaju skrobi i warunków jej utleniania na retrogradację	23
ALICJA KAWKA, AGNIESZKA LICZBAŃSKA, JUSTYNA ŁAPA: Wpływ całościarnowej mąki jęczmiennej i wybranych dodatków technologicznych na jakość pieczywa pszenno-jęczmiennego	33
MAŁGORZATA DAREWICZ, JERZY DZIUBA: Struktura a właściwości funkcjonalne białek mleka	47
MARIA WALCZYCKA: Metody inaktywacji i hamowania wzrostu <i>Listeria monocytogenes</i> w przetworach mięsnych	61
GRAŻYNA KRASNOWSKA, BEATA SOBKÓW, MARZENA DĄBROWSKA, MAŁGORZATA PELC: Określenie przydatności wybranych preparatów enzymatycznych do poprawy jakości mięsa wołowego	73
MONIKA KORDOWSKA-WIATER, BEATA ŁUKASIEWICZ: Wpływ sposobu pakowania na jakość mikrobiologiczną pasztetów	84
ELIZA GRUCZYŃSKA, EMILIA FASZCZA, PIOTR KOCZOŃ, BOLESŁAW KOWALSKI: Oznaczanie zawartości tłuszczu i wody w majonezach metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera	95
DOROTA MARTYSIAK-ŻUROWSKA, ANDRZEJ STOŁYHWO: Szkodliwe dla zdrowia izomery trienowych kwasów tłuszczowych w mleku początkowym i następnym do żywienia niemowląt	108
MONIKA RADZYMIŃSKA, ZBIGNIEW BOREJSZO, STEFAN S. SMOCZYŃSKI, MAŁGORZATA KURZYŃSKA: Skład kwasów tłuszczowych w całodziennych posiłkach dzieci, uczniów i studentów	118
HANNA HABEROWA, ANNA RACZYŃSKA-CABAJ, KLAUDIUSZ GRAJCAR: Wpływ wzbogacenia drożdży piwowarskich w magnez na ich aktywność fermentacyjną	127
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie krajowym	140
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Współczesny leksykon wiedzy o żywności	146
STANISŁAW POPEK: Nowe książki	148
Technolog Żywności	153

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 2 (43)

Kraków 2005

Vol. 12

CONTENTS

From the Editor	3
BOGUSŁAW KRÓL, ROBERT KLEWICKI: Production of fructooligosaccharides (FOS) concentrations with various contents of oligomers using enzymatic bioconversion of saccharose	5
SŁAWOMIR PIETRZYK, TERESA FORTUNA: Impact of starch type and its oxidation conditions on retrogradation properties.....	23
ALICJA KAWKA, AGNIESZKA LICZBAŃSKA, JUSTYNA ŁAPA: The effects of wholegrain barley flour and selected technological additives on the quality of wheat-barley bread	33
MAŁGORZATA DAREWICZ, JERZY DZIUBA: The structure of milk proteins versus their functional properties.....	47
MARIA WALCZYCKA: Methods to inhibit and prevent the growth of <i>Listeria monocytogenes</i> in meat products	61
GRAŻYNA KRASNOWSKA, BEATA SOBKÓW, MARZENA DĄBROWSKA, MAŁGORZATA PELC: Determination of the usefulness of selected enzymatic preparations to improve the quality of beef	73
MONIKA KORDOWSKA-WIATER, BEATA ŁUKASIEWICZ: Impact of packaging methods on the microbiological quality of Pâtés	84
ELIZA GRUCZYŃSKA, EMILIA FASZCZA, PIOTR KOCZOŃ, BOLESŁAW KOWALSKI: Determination of fat and water contents in mayonnaise by Fourier transform infrared spectroscopy.....	95
DOROTA MARTYSIAK-ŻUROWSKA, ANDRZEJ STOŁYHWO: Health impairing tri-unsaturated fatty acids in the infant formulas	108
MONIKA RADZYMIŃSKA, ZBIGNIEW BOREJSZO, STEFAN S. SMOCZYŃSKI, MAŁGORZATA KURZYŃSKA: The composition of fatty acids in daily meals eaten by children, pupils and students	118
HANNA HABEROWA, ANNA RACZYŃSKA-CABAJ, KLAUDIUSZ GRAJCAR: The effect of enriching brewer's yeast with magnesium on its fermentation activity	127
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish legislation	140
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Food science lexicon – contemporary terms.....	146
STANISŁAW POPEK: Book reviews	148
The Food Technologist	153

Only reviewed papers are published

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

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

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

ewaslawska@wp.pl

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

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

RADA PROGRAMOWA:

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

RADA KONSULTACYJNA:

prof. dr Henryk Daun (USA), prof. dr Jerzy Jankun (USA), dr Józef Korolczuk (Francja),
prof. dr Marian Naczk (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 83-89541-43-2

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 83-89541-43-2

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

BOGUSŁAW KRÓL, ROBERT KLEWICKI

**WYTWARZANIE KONCENTRATÓW
FRUKTOOLIGOSACHARYDÓW (FOS) O ZRÓŻNICOWANYM
SKŁADZIE OLIGOMERYCZNYM Z WYKORZYSTANIEM
ENZYMATYCZNEJ BIKONWERSJI SACHAROZY**

Streszczenie

Opisano warunki prowadzenia biokonwersji sacharozy z użyciem komercyjnych preparatów enzymatycznych Fructozyme i Novoferm, zawierających fruktozylotransferazę (FT) do wytwarzania trzech typów syropów FOS i dwóch proszkowych preparatów o zawartości fruktanów odpowiednio 50–60% s.s. i $\geq 90\%$ s.s.

Wykazano, że przy aktywności FT 1–2,5 U/g sacharozy proces transglikozylacji reszty fruktozy przebiega w trzech fazach. W pierwszej blisko 80% utworzonych oligomerów stanowi kestoza, w drugiej kestoza ulega transglikozylacji z utworzeniem ponad 50% udziału nystozy w sumie FOS, a w trzeciej ustala się równowagę pomiędzy kestozą, nystozą i fruktozylonystozą w proporcji 2 : 4 : 3.

Stwierdzono, że roztwory bogate w nystozę, po usunięciu glukozy na drodze enzymatycznego utleniania mogą być wysuszone metodą rozpyłową w warunkach otrzymywania mleka w proszku. Wykazano, że z syropów nystozowych o zawartości s.s. powyżej 72% (m/m) nystoza krystalizuje z niewielką domieszką kestozy w postaci niehigroskopijnej, drobnokrystalicznej substancji.

Słowa kluczowe: fruktooligosacharydy, fruktozydaza, fruktozylotransferaza, transglikozylacja.

Wstęp

Fruktooligosacharydy (FOS) są krótkołańcuchowymi fruktanami zbudowanymi z 2–10 reszt fruktofuranozowych połączonych wiązaniem $\beta(2\rightarrow1)$. FOS występują jako oligosacharydy homogenne, złożone wyłącznie z fruktozy, oraz jako oligosacharydy heterogenne zbudowane z jednej cząsteczki sacharozy i 1–8 reszt fruktozy przyłączonych wg wzoru: $1^F(1-\beta-D\text{-fruktofuranozylo})_n\text{-sacharoza}$, w którym $n = 1\div 8$ [14, 21]. W przyrodzie oraz w produktach otrzymanych w wyniku biokonwersji fruktanów lub sacharozy występują mieszaniny fruktooligosacharydów o stopniu polimeryzacji (DP) od 3 do 7 [20, 21]. Do fruktooligosacharydów zalicza się

również inulobiozę o DP = 2, której transport w przewodzie pokarmowym jest podobny do oligomerów o DP \geq 3 [1].

FOS, obok inuliny i sacharozy, jako węglowodany zapasowe występują w wielu roślinach. Powstawanie FOS w roślinach akumulujących inulinę jest związane z działaniem dwóch enzymów: sacharozo-sacharozo 1-fruktozylotransferazy E.C.2.4.1.99 i fruktano:fruktano 1-fruktozylotransferazy E.C.2.4.1.100 [20, 22].

Tworzenie FOS z sacharozy odbywa się przy udziale enzymów transfruktozylacyjnych, a w szczególności fruktozylotransferazy E.C.2.4.1.9 [13] oraz β -D-fruktofuranazy E.C.3.2.1.26 z niektórych źródeł biologicznych w ściśle określonym pH [19]. Fruktozylotransferazy występują w różnych anatomicznych częściach roślin z rodziny *Compositae* (*Asteraceae*) i *Liliaceae*, takich jak: cykorja, mniszek, cebula, czosnek [34]. Aktywność transfruktozylacyjną wykazuje również wiele mikroorganizmów np.: *Aspergillus niger* [12], *Aspergillus japonicus*, *Aureobasidium pullulans* [15], *Pichia pastoris* [7, 13].

Mechanizmy transglikozylacji sacharozy i fruktanów oraz innych sacharydów są zróżnicowane i zależą od pochodzenia enzymu, pH, stężenia substratu itp. Proces transglikozylacji sacharozy przy udziale fruktozylotransferazy z pleśni *Aspergillus niger* [34] i z bakterii *Bacillus macerans* EG – 6 [5] przebiega zgodnie ze schematem: $GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$ dla $n < 4$, a w części według równania $GF_n + GF \rightarrow GF_{n+1} + G$. W związku z tym głównymi produktami transglikozylacji sacharozy są: 1-kestoza, nystoza i fruktozylonystoza [5]. Udział wymienionych sacharydów w mieszaninie reakcyjnej zależy od pochodzenia enzymu i jego aktywności, występowania innych enzymów w środowisku oraz pH, dawki i czasu działania. Dzięki postępom enzymologii jest możliwe wytwarzanie fruktozylotransferaz o dużej aktywności w postaci immobilizowanej i preparatów ciekłych do stosowania w procesach biokonwersji sacharozy [11, 13, 28, 29, 30, 34].

Maksymalny udział FOS w mieszaninie po biokonwersji nie przekracza 60–62% w przeliczeniu na s.s. roztworu. Resztę do 100% stanowią: sacharoza, glukoza i fruktoza. Występowanie ww. cukrów w mieszaninie FOS nie stanowi istotnego ograniczenia w zastosowaniu syropów oligofruktozy jako składnika żywności i ciekłych suplementów diet [34]. Do otrzymania koncentratów FOS pozbawionych sacharozy i cukrów prostych oraz występujących w postaci proszków lub granulatów stosuje się zwykle procesy niskociśnieniowej chromatografii przemysłowej [4, 29, 33, 34]. Po chromatograficznym rozdzielaniu i dehydratacji otrzymuje się preparaty proszkowe typu Actilight 950, Meiologo i Nutraflora, które zawierają $95 \pm 2\%$ FOS, w tym stosunek kestozy do nystozy i F-nystozy wynosi zwykle: 4 : 5 : 1.

Preparaty FOS w postaci proszków są dogodniejsze do stosowania niż syropy. Preparaty proszkowe mogą mieć zastosowanie jako środki niskokaloryczne i wypełniacze do intensywnych środków słodzących [8, 32]. Znane są również złożone preparaty FOS w postaci toników [6] i granulatów [32]. Wiele doświadczeń dotyczących biologicznej oceny FOS (w szczególności wpływu na funkcje jelita grubego) wskazuje na potrzebę optymalnego doboru składu oligomerycznego

fruktooligosacharydów [4]. FOS mają dobrze udokumentowane właściwości prebiotyczne [2, 25, 26, 27].

Celem badań było opracowanie warunków wytwarzania koncentratów FOS o pożądanym i przewidywalnym składzie oligomerycznym z sukcesywnym zastosowaniem procesów: transglikozylacji reszty fruktozylowej na sacharozę i oligomery $DP \geq 3$, enzymatycznego utleniania glukozy, krystalizacji soli kwasu glukonowego oraz odsalania roztworu macierzystego.

Materiał i metody badań

Do procesu transglikozylacji użyto dwóch handlowych preparatów z *Aspergillus niger*, z których jeden jest przeznaczony do produkcji syropów fruktozylowych z inuliny, a drugi jest stosowany do przemysłowej produkcji pitnych soków owocowych. Obydwa preparaty zawierały mieszaninę fruktozylotransferazy (FT) i β -fruktofuranosyldazy (FD) w różnych proporcjach. Do utleniania glukozy zastosowano handlowy preparat zawierający mieszaninę oksydazy glukozowej EC 1.1.3.4 i katalazy EC 1.11.1.6.

W badaniach użyto następujących substancji i preparatów enzymatycznych:

- Cukier biały kategorii I wg PN [24] w zbuforowanych wodnych roztworach o stężeniu 20–70% (m/m) i ustalonym pH w zakresie 4,5–7,5.
- Preparaty enzymatyczne: Fructozyme i Novoferm firmy Novo Nordisk A/S oraz Gammazym 9000L o aktywności: oksydaza 9000 U/ml, katalaza 2400 U/ml.
- Sole do sporządzania buforów: fosforan dipotasowy cz.d.a firmy POCH i mleczan sodu firmy Polfarmex S.A.
- Substancje pomocnicze do enzymatycznego utleniania glukozy i odsalania: nadtlenek wodoru wg PN [23], węglan wapnia wg FP IV, wodorotlenek sodowy i 35% kwas solny cz.d.a. firmy POCh S.A.
- Eluenty do HPLC: woda i acetonitryl o czystości chromatograficznej firmy T. Baker.

W każdym zastosowanym preparacie enzymatycznym oznaczano aktywność fruktozylotransferazy (FT) i fruktofuranosyldazy (FD) w ustalonych warunkach biokonwersji. W celu oznaczenia aktywności FT i FD w probówkach ze szlifem poj. 15 ml umieszczano dwukrotnie po 1 μ l Fructozyme, 10 μ l Novoferm lub Gammazym 9000L, następnie do każdej próbki dodawano po 10 ml 50% roztworu sacharozy w 0,05 mol/l roztworu mleczanu sodu o pH 6,8. Równolegle wykonano próbki odniesienia bez dodatku enzymu. Roztwory badane wstawiano do łaźni wodnej o temp. 60°C i utrzymywano przez 18 godz. Po tym czasie pobierano próbki roztworów i oznaczano skład mieszanin sacharydów metodą HPLC z użyciem kolumny Bio-Rad HPX87C i detektora RI, przy elucji wodą 0,5 ml/min w temp. 85°C. Rozdział chromatograficzny rejestrowano z użyciem programu Knauer Eurochrom 2000. Alternatywnie stosowano kolumnę Asahipak NH2P-504E z detektorem RI, przy elucji 65% wodnym roztworem acetonitrylu z prędkością 0,8 ml/min w temp. 20°C [16].

Jedna jednostka aktywności FT (U_T) wyraża liczbę μ moli fruktozy przeniesionej w 50% roztworze sacharozy o pH 6,8 i temp. $57 \pm 1^\circ\text{C}$ z utworzeniem kestozy i oligomerów $DP \geq 4$ w czasie 1 min z udziałem 1 ml ciekłego preparatu. Jedna jednostka aktywności FD (U_F) wyraża liczbę μ moli fruktozy uwolnionej w 50% roztworze sacharozy o temp. $57 \pm 1^\circ\text{C}$ i pH 6,8, w czasie 1 min z udziałem 1 ml preparatu.

W celu określenia korzystnych warunków procesu transglikozylacji wykonano doświadczenia z użyciem roztworów sacharozy o stężeniu 20–73% (m/m), w zakresie pH 4,5–7,5. Wykonano również doświadczenia z mieszaniną fruktozy i sacharozy o udziale molowym odpowiednio 100, 67, 44, 34, 18% w roztworze o stężeniu 69% (m/m) i pH 7,2. Podwójne próby badanych roztworów utrzymywano w temp. $57 \pm 1^\circ\text{C}$ w czasie od 20 do 300 godz. w zależności od dawek enzymu. Doświadczenia prowadzono metodą periodyczną. Do wysterylizowanych flakonów poj. 165 ml odmierzano po 150 ml roztworu sacharozy o ustalonym stężeniu oraz pH i wprowadzano obliczoną objętość enzymu, zawierającą FT w ilości $1,0 \div 2,5 U_T/1$ g sacharozy, stosownie do jego aktywności. Następnie pojemniki z próbkami umieszczano w termostacie w temp. $57 \pm 1^\circ\text{C}$. W odstępach 4, 8 lub 24 godz. pobierano podwójne próbki do analizy metodą HPLC z detekcją RI, z użyciem kolumny Aminex HPX87C i Shodex Asahipak NH2. Wyniki podane w tabelach i na wykresach są średnią z dwóch prób równoległych. W wybranych warunkach procesu transglikozylacji wykonano doświadczenia z użyciem wysterylizowanych pojemników zawierających od 1 do 3 l roztworu.

Roztwory zawierające wybrane mieszaniny oligomerów FOS i glukozy poddawano działaniu nadtlenu wodoru w obecności oksydazy glukozowej i węgla wapnia w celu utlenienia glukozy do soli kwasu glukonowego. Proces utleniania glukozy do glukonianu wapnia prowadzono według wcześniej opisanego sposobu [17].

Roztwory glukonianu wapnia poddawano krystalizacji, po czym oddzielony roztwór macierzysty odsalano z użyciem kolumny kationitowej w postaci wodorowej i kolumny anionitowej w postaci wodorotlenowej. Roztwór po odsoleniu poddawano zateżaniu do zawartości suchej masy 70% (m/m) w przypadku koncentratów w postaci syropu. W celu otrzymania preparatów FOS w postaci proszków, roztwory po odsoleniu zateżano do zawartości 40% s.s. i suszono rozpyłowo w warunkach suszenia mleka do postaci proszku z użyciem ćwierćtechnicznej suszarni rozpyłowej Niro Atomizer.

Spektroskopia masowa (oznaczanie dokładnej wartości m/z) syntetyzowanych oligosacharydów została wykonana w Pracowni Spektrometrii Mas Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi przy zastosowaniu spektrometru mas Finnigan MAT 95 (Finnigan MAT GmbH, Brema, Niemcy).

Parametry spektrometru mas w trakcie pomiaru:

Technika jonizacji	LSI (Liquid Secondary-Ion) odpowiednik FAB
Temperatura źródła jonów	$\sim 40^\circ\text{C}$
Energia jonów cezu Cs^+	13 keV

Napięcie przyspieszające 4,8 kV

Rozdzielczość spektrometru w trakcie pomiaru – minimum 10 000.

Pomiarów dokonywano przy zastosowaniu wzorca wewnętrznego – glikolu etylenowego, który stanowił jednocześnie matrycę. Wartość średnią uzyskiwano z 20 zmierzonych wartości m/z .

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono aktywność fruktozylotransferazy (FT) i β -fruktozydazy (FD) w preparatach użytych do doświadczenia. Zwraca uwagę znacząco duży udział FD w sumie aktywności w przypadku preparatu Fructozyme.

Tabela 1

Aktywność fruktozylotransferazy (FT) i β -fruktozydazy (FD) preparatów handlowych użytych do biokonwersji sacharozy i utleniania glukozy do kwasu glukonowego.

Activity of fructosyltransferase (FT) and β -fructosidase (FD) in commercial preparations used for the bioconversion of saccharose and for the oxidation of glucose to gluconic acid.

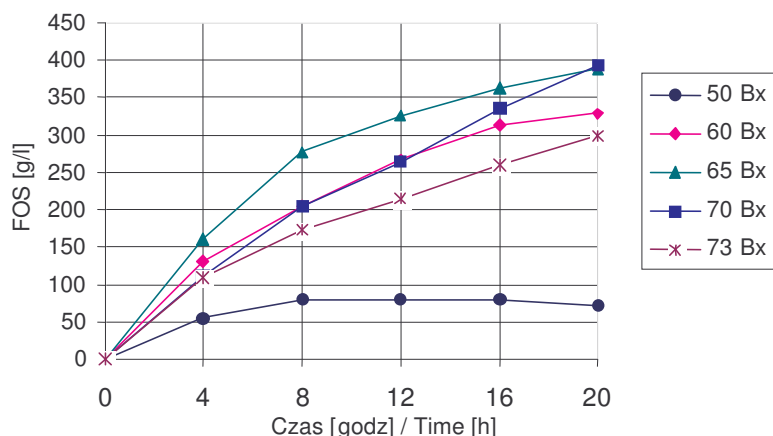
Preparat Preparation	Aktywność TF Activity TF	Aktywność FD Activity FD
	U_T /ml	U_F /ml
Fructozyme	3500	1050
Novoferm	195	≤ 10
Gammazym 9000	440	90

Objaśnienia: / Explanatory notes:

U_T i U_F – jednostki aktywności enzymów wyznaczone w ustalonych warunkach, opisanych w rozdziale “Materiał i metody badań”.

U_T , U_F – activity units determined under the fixed standard conditions (as described in the Chapter: “Materiały i metody badań”/“Materials and Methods of Investigation”).

Na rys. 1. przedstawiono zmianę zawartości utworzonych FOS w roztworze o pH 7,2 i stężeniu od 50 do 73% (m/m) w zależności od czasu biokonwersji w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l roztworu. Z przebiegu krzywych wynika, że ilość powstających FOS była proporcjonalna do czasu reakcji w pierwszych ośmiu godzinach, po czym następowało wyraźne spowolnienie szybkości syntezy fruktooligosacharydów. Zawartość FOS nie przekroczyła 100 g/l w roztworze o początkowym 50% stężeniu sacharozy. W roztworze o początkowym ponad 60% stężeniu sacharozy, a zwłaszcza bliskim 70% (m/m), zawartość utworzonych FOS osiągnęła wartość około 380 g/l i stanowiła około 40% udziału s.s. Zmianę składu jakościowego i ilościowego mieszaniny kilku sacharydów w czasie reakcji przedstawiono w tab. 2. Zwraca uwagę to, że dominującym fruktooligosacharydem była kestoza stanowiąca około 80–90% składu FOS.

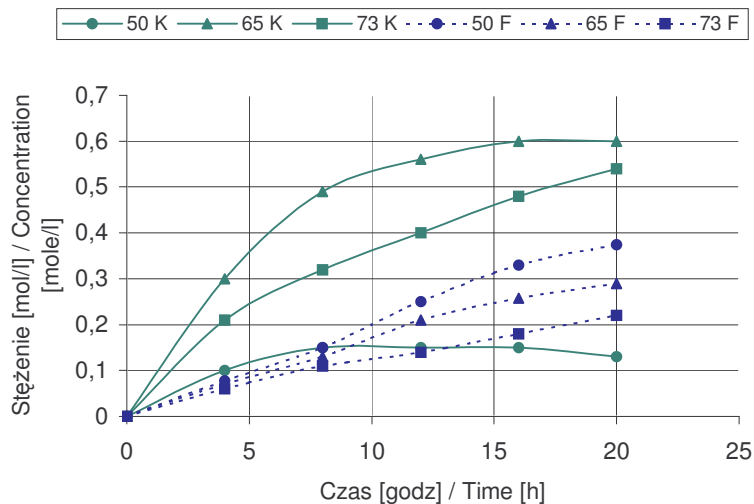


Rys. 1. Zmiana zawartości utworzonych FOS w roztworze o pH 7,2 i stężeniu 50–73% (m/m) w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l zależności od czasu biokonwersji.

Fig. 1. Change in the contents of FOS produced in the solution, its pH = 7.2 and its concentration rate = 50–73% (m/m) in the presence of Fructozyme the applied amount of which was 0.4 ml/l.

Na rys. 2. zilustrowano zmianę molowego stężenia kестоzy i fruktozy w roztworach o początkowej zawartości s.s. 50, 65 i 73% (m/m) w zależności od czasu reakcji. Przebieg krzywej badanego roztworu o stężeniu s.s. 50% (m/m) wskazuje, że szybkość transglukozyzacji była większa niż szybkość hydrolizy sacharydów tylko do około 10. godz. reakcji. Później proces hydrolizy stał się dominujący, przez to udział FOS w hydrolizacie (tab. 2.) był niski, a ponadto udział fruktozy wyraźnie zwiększał się z upływem czasu reakcji. W nasyconych i przesyconych roztworach sacharozy stężenie fruktozy nie przekraczało 0,3 mol/l, a stężenie kестоzy wzrosło do 0,6 mol/l. Udział kестоzy w sumie utworzonych FOS przekroczył 80% (tab. 1.), co wskazuje, że dominował proces transglukozyzacji według mechanizmu $GF + GF = GF_2 + G$ [5], a nadto konkurencyjny proces hydrolizy β -fruktanów, z udziałem β -fruktozydazy zwiększył w środowisku stężenie glukozy i fruktozy i prowadził do hamowania syntezy kестоzy i powstawania następnych oligomerów.

Na rys. 3. przedstawiono krzywe charakteryzujące zmiany zawartości sumy FOS w roztworze sacharozy o stężeniu 69% (m/m) o różnym pH w zakresie 5,8–7,3, w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l w zależności od czasu reakcji. Przebieg wykresów wskazuje, że pH bliskie 7 miało korzystny wpływ na tworzenie FOS w obecności enzymów zawartych w preparacie Fructozyme. W przypadku roztworów o pH 6,9 i 7,3 otrzymano mieszaninę kестоzy i nystozy o zawartości do 400 g/l z roztworu o początkowym 69% (m/m) stężeniu.



Rys. 2. Zmiany stężenia kestozy i fruktozy w roztworach o stężeniu 50, 65, 73% (m/m) i pH = 7,2 w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l w zależności od czasu biokonwersji.

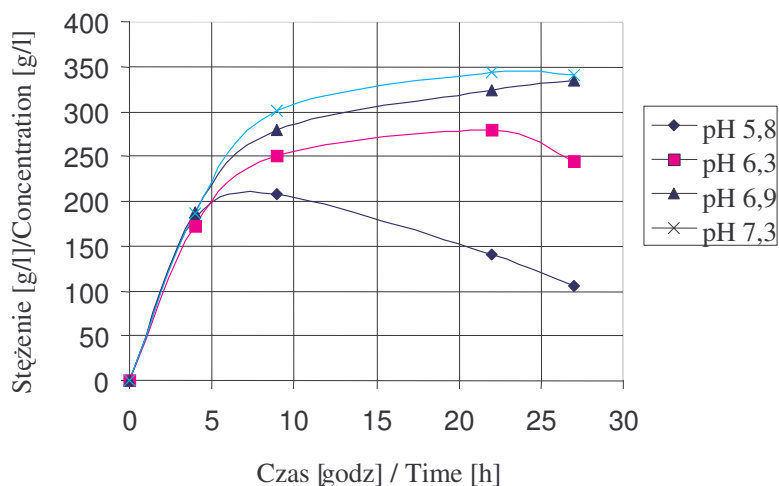
Fig. 2. Changes in the kestose and fructose concentration rates in the 50, 65, 73% (m/m) solutions having pH = 7.2, in the presence of Fructozyme (the applied amount of which is 0.4 ml/l) depending on the duration of the bioconversion reaction.

Tabela 2

Zmiana udziału sacharydów w s.s. roztworu o stężeniu 50–73 % (m/m) w zależności od czasu biokonwersji w obecności preparatu Fructozyme w dawce 0,4 ml/l roztworu.

Changes in the FOS content in dry matter contained in the hydrolysate solution, its concentration being 50–73%, depending on the time of bioconversion proceeding in the presence of the preparation Fructozyme applied in the amount of 0.4 ml/l solutions.

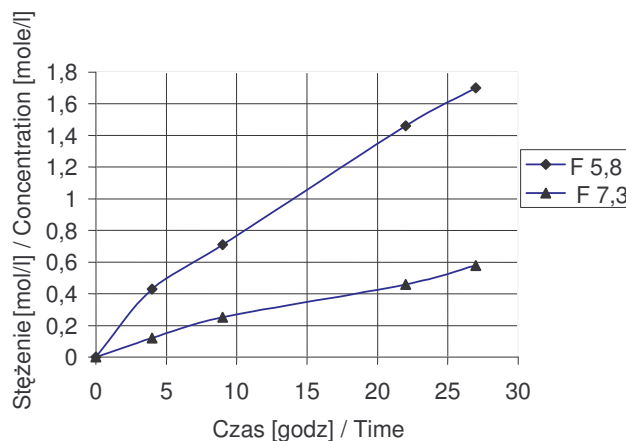
Stężenie sacharozy Concentration of saccharose [%]	Zawartość [% s.s.] / Content [% d.m.]														
	Kestozyna / Kestose					FOS DP _{≥4}					Fruktoza / Fructose				
	Czas [godz.] / Time [h]														
	4	8	12	16	20	4	8	12	16	20	4	8	12	16	20
50	8,5	12,0	12,2	12,2	10,5	0,4	0,8	0,8	0,8	1,0	2,0	4,3	6,9	9,7	10,9
60	16,0	23,5	29,8	33,8	34,3	0,8	3,0	5,0	6,9	8,3	1,8	3,7	4,4	4,8	5,2
65	18,0	29,0	33,0	35,3	35,5	0,8	3,4	5,2	7,2	9,9	1,4	2,7	4,5	5,2	6,2
70	11,5	19,8	25,1	31,7	36,2	0,5	2,0	3,0	3,9	5,5	1,2	2,3	2,9	3,7	4,5
73	10,6	16,4	20,3	24,4	27,3	0,3	0,9	1,4	1,8	2,8	1,1	2,0	2,5	3,2	4,0



Rys. 3. Zmiana zawartości sumy FOS w roztworze sacharozy o stężeniu 69% (m/m) i pH w zakresie 5,8–7,3 w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l w zależności od czasu reakcji.

Fig. 3. A reaction-time depending change in the FOS sum in a 69% (m/m) saccharose with a pH value from 5.8 to 7.3 in the presence of Fructozym added in an amount of 0.4 ml/l fructose.

Na podstawie rys. 4. można stwierdzić różnicę w skutkach działania fruktofuranazy w roztworach sacharozy o wartościach pH 5,8 i 7,3. Doświadczenie powyższe wykazuje, że β -fruktofuranazyda z *Aspergillus niger* zawarta w preparacie Fructozyme zmienia aktywność, podobnie jak fruktofuranazyda z *Aspergillus oryzae* [19]. W związku z powyższym preparat Fructozyme w ściśle określonych warunkach biokonwersji jest przydatny do otrzymywania syropów zawierających FOS w ilości około 40% s.s. i stężeniu s.s. 70–73% (m/m). Zaletą stosowania Fructozyme do otrzymania syropu typu kestozowego jest niska cena enzymu i możliwość wytwarzania syropów bez potrzeby zateżenia z minimalną obróbką termiczną. Wadą stosowania tego preparatu jest względnie wysoki udział fruktozy w mieszaninie sacharydów, który wynika z obecności w roztworze β -fruktozydazy o aktywności FD 1050 U_F/1 ml (tab. 1.). Inną wadą obecności fruktozy w roztworze jest tendencja do jego brązowienia oraz hamowanie transglikozylacji. W tab. 3. przedstawiono skład sacharydów na początku oraz po 8 godz. transglikozylacji w 69% roztworze wodnym o pH 7,2 i o różnym udziale sacharozy i fruktozy w obecności preparatu Fructozyme w dawce 1 ml/l.



Rys. 4. Zmiana stężenia fruktozy podczas biokonwersji w roztworach sacharozy o stężeniu 69% (m/m) przy pH 5,8 i 7,3 w zależności od czasu reakcji.

Fig. 4. A change in the fructose concentration during the bioconversion occurring in 69% (m/m) saccharose solutions, at a pH value equalling 5.8 and 7.3 depending on the time of reaction.

Z danych tab. 3. wynika, że w miarę zmniejszania udziału molowego sacharozy w mieszaninie z fruktozą, od 100% do 18%, proporcjonalnie malała wydajność tworzenia kestozy i nystozy, odpowiednio od 70% do 23%. Wydajność tworzenia inulobiozy wzrosła jedynie do około 30% i przez to sumaryczna wydajność FOS przy ponad 50% udziale molowym w mieszaninie reakcyjnej wyniosła średnio 55%, wobec 70% w roztworze sacharozy i 65% z 33% udziałem molowym fruktozy. Dane zawarte w tab. 3. świadczą o dwukrotnym wzroście natężenia zabarwienia roztworów zawierających 33% udział fruktozy w porównaniu z zabarwieniem roztworu mieszaniny sacharydów otrzymanych wyłącznie z sacharozy. Enzymatyczna modyfikacja sacharozy w mieszaninie z fruktozą przy udziale Fructozyme prowadziła do otrzymania mieszaniny FOS o gorszych cechach fizykochemicznych i składzie FOS. Działanie probifidogenne inulobiozy jest bowiem mniejsze niż oligomerów o $DP \geq 3$. W związku z powyższym, wzorując się na pracach Hanga [9, 10], podjęto próbę znalezienia handlowych preparatów enzymatycznych otrzymywanych z *Aspergillus niger* o korzystnych proporcjach aktywności FT i FD. Zbadano kilkanaście preparatów pektolitycznych, celulolitycznych i amylolitycznych, z których kilka wykazało pożądane właściwości transglukozytacji reszty fruktozy w roztworach sacharozy. Jednym z interesujących enzymów o wymienionych właściwościach jest Novoferm, użyty w dawce 1–2,5 U_T/g sacharozy.

Tabela 3

Skład mieszaniny sacharydów i zabarwienie hydrolizatów po 8 godz. transglikozylacji w 69% roztworach wodnych o pH 7,2 i o różnym udziale początkowym sacharozy i fruktozy w obecności preparatu Fructozyme w dawce 1 ml/l.

The composition of saccharides mixtures and colour of hydrolysates after the 8-hour transglycosylation proceeding in 69% aqueous solutions (69% of dry matter), their pH = 7.2, in the presence of Fructozyme (its applied dose: 1 ml/l) with various initial content rates between the saccharose and fructose.

Stężenie sacharydów Concentration of saccharides									Zabarwienie Colour ICUMSA		Wydajność transglikozylacji Yield of transglycosylation [%]		
Stężenie początkowe Initial concentration			Stężenie po 8 godz. [mol/l] Concentration after 8 hours [mole/l]										
S [mol/l]	F [mol/l]	Udział molewowy S [%]	N	K	I	S	G	F	IU	Δ	K+N	IN	Σ FOS
2,70	0,00	100	0,079	0,66	0	0,90	1,05	0,22	85	0	70,3	0	70,3
2,16	1,03	67	0,051	0,52	0,07	0,77	0,99	0,92	170	85	57,7	7	64,7
1,62	2,06	44	0,024	0,32	0,16	0,57	0,88	1,89	265	180	39,0	18	57
1,35	2,57	34	0,018	0,24	0,19	0,43	0,86	2,35	310	225	30,0	22	52
0,81	3,60	18	0,005	0,10	0,22	0,24	0,66	3,30	335	245	23,0	33	56

Objaśnienia: / Explanatory notes:

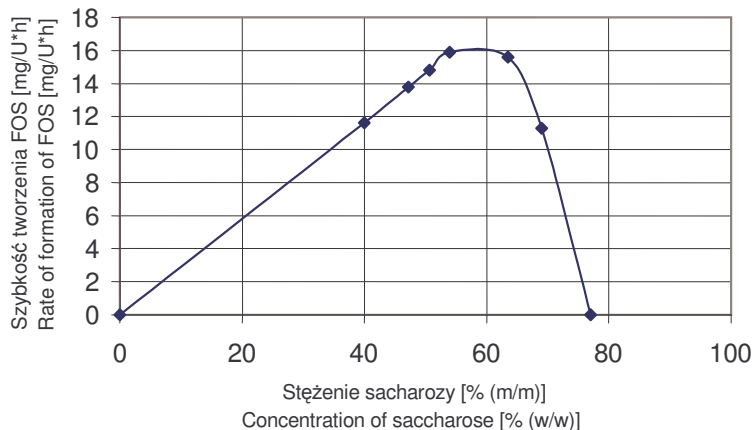
Wydajność / yield KN = $(C_{nys} + C_{kes}) / C_{gl} \cdot 100$;

Wydajność / yield IN = $C_n / C_{gl} \cdot 100$;

S – sacharoza / saccharose, F – fruktoza / fructose, N – nystoza / nystose, K – kestoza / kestone, I – inulobioza / inulobiose, G – glukoza / glucose;

Δ – przyrost zabarwienia w stosunku do roztworów sacharozy / increase in the colour intensity if compared with the colour of saccharose solutions.

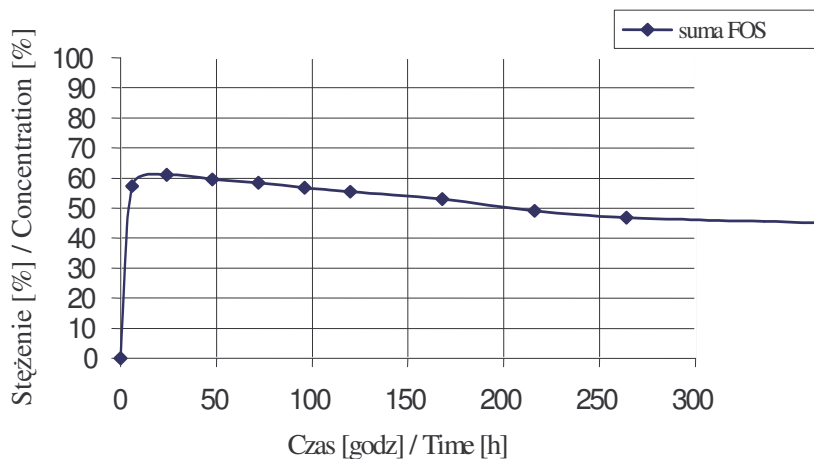
Na rys. 5. przedstawiono średnią szybkość tworzenia FOS w mg/U·godz. w zależności od początkowego stężenia sacharozy w obecności preparatu Novoferm w dawce 1,4 U/ml i T=55°C. Największą szybkość powstawania FOS, wynoszącą ~16 mg/U·godz. uzyskano przy stężeniu roztworu 55–60% (m/m). Zatem było to stężenie o 10 jednostek mniejsze od optymalnego stężenia s.s. dla enzymów zawartych w preparacie Fructozyme. Jest to pośrednie potwierdzenie małej aktywności β-fruktozydazy w preparacie Novoferm.



Rys. 5. Średnia szybkość tworzenia FOS w roztworach sacharozy o różnym stężeniu w obecności preparatu Novoferm.

Fig. 5. The average rate of forming FOS in various saccharose solutions with different concentration values in the presence of Novoferm.

Na rys. 6. zilustrowano zmianę zawartości sumy FOS w czasie biokonwersji sacharozy o stężeniu 55% (m/m) w ciągu 300 godz. (dawka enzymu 2,0.U/g). Maksimum 61% udziału FOS w s.s. wystąpiło po ok. 25 godz., po czym ogólna zawartość FOS zmniejszała się stopniowo do ~48% po 300 godz. reakcji. Zmiany udziału kestozy, nystozy i fruktozylonytozy w sumie FOS w czasie powyższej biokonwersji przedstawiono na rys. 7.

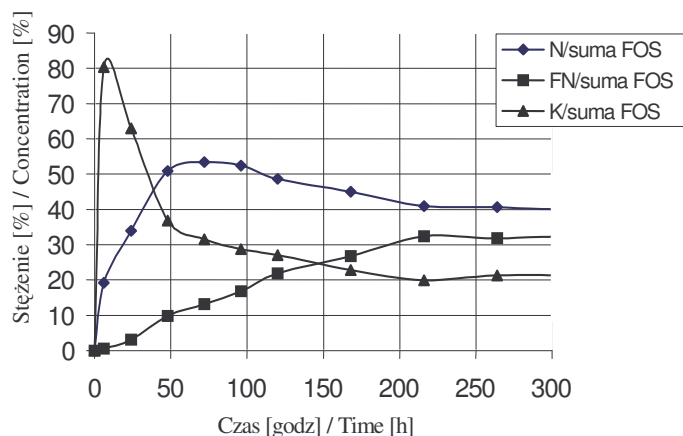


Rys. 6. Zmiana zawartości sumy FOS [%] w czasie biokonwersji sacharozy w roztworze o stężeniu 55% (m/m) z użyciem preparatu Novoferm w dawce 2 U/g sacharozy w czasie do 300 godz.

Fig. 6. A change in the FOS sum content [%] during the bioconversion of saccharose in a 55% (m/m) solution with a Novoferm preparation added (2 U Novoferm per 1 g of saccharose) during a period not exceeding 300 h.

Ponad 82-procentowy udział kestozy uzyskano po około 20 godz. reakcji, a następnie zawartość jej zmniejszała się asymptotycznie do około 20% s.s. po 250 godz. Maksymalny 55% udział nystozy wystąpił po około 100 godz. reakcji, po czym jej

udział zmniejszył się do 40% po blisko 300 godz. Fruktozylonystoza osiągnęła 33% zawartości w s.s. po około 250 godz.

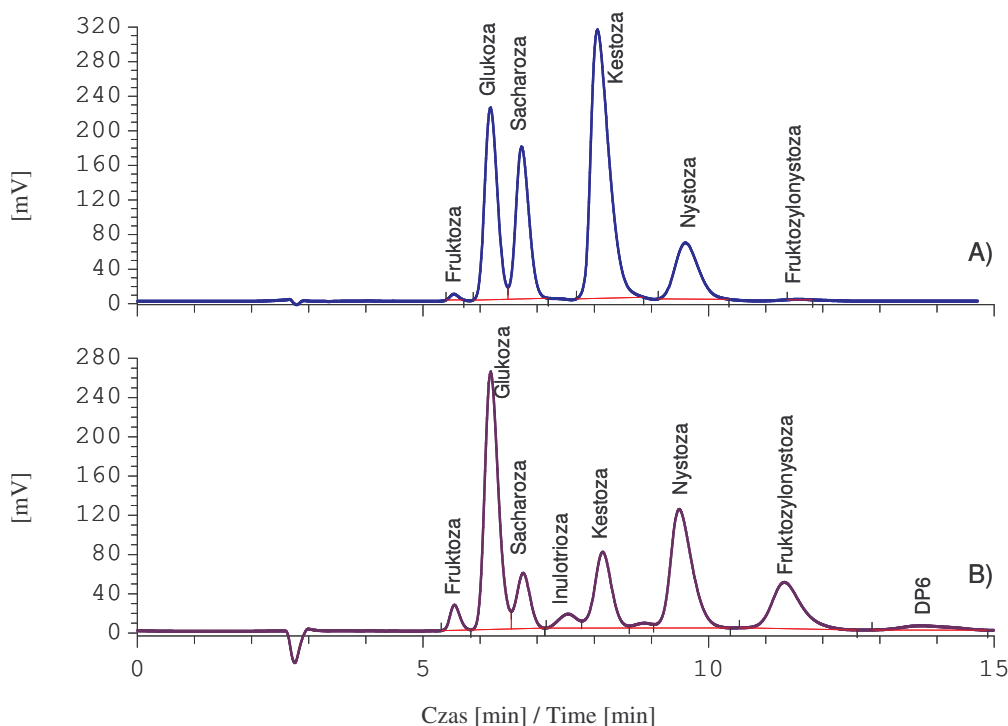


Rys. 7. Zmiany ilościowe w mieszaninie kestosy, nystozy i fruktozylonystozy w czasie biokonwersji sacharozy (początkowe stężenie 55% m/m) z użyciem preparatu Novoferm (2 U/g sacharozy).

Fig. 7. Quantitative changes in a mix of kestose, nystose, and fructosyl-nystose during a saccharose bioconversion (initial solution concentration: 55% m/m) with a Novoferm preparation (2 U/g saccharose).

Wnioskować można zatem, że sukcesywne procesy transglikozylacji reszty fruktozy w środowisku już powstałych oligomerów przebiegają konsekwentnie, jednak z coraz mniejszą wydajnością z uprzywilejowanym udziałem nystozy w składzie s.s. W związku z powyższym przerywając transglikozylację w określonym czasie lub etapie tworzenia FOS można otrzymać różne typy syropów różniące się składem chemicznym, a w konsekwencji również właściwościami fizycznymi i biologicznymi. Ze względów praktycznych, a w szczególności możliwie krótkiego czasu biokonwersji, można wyróżnić dwa zasadnicze typy syropów: kestozowy (K), w którym udział kestosy w sumie FOS jest większy niż 60% oraz nystozowo-glukozowy (NG) o przybliżonym równym udziale glukozy i nystozy.

Na rys. 8. przedstawiono chromatogramy koncentratu FOS typu K z dominującym udziałem kestosy i koncentratu FOS typu NG. W dotychczasowych publikacjach dotyczących enzymatycznej modyfikacji sacharozy w celu otrzymania krótkołańcuchowych FOS zwracano zasadniczą uwagę na optymalizację warunków otrzymywania ich sumy [4, 10, 29, 34]. Z drugiej strony w skali przemysłowej możliwe jest skrócenie procesu transglikozylacji, zwłaszcza jeżeli w dalszym etapie prowadzone jest chromatograficzne rozdzielanie składników z wykorzystaniem zjawiska wykluczania [34].

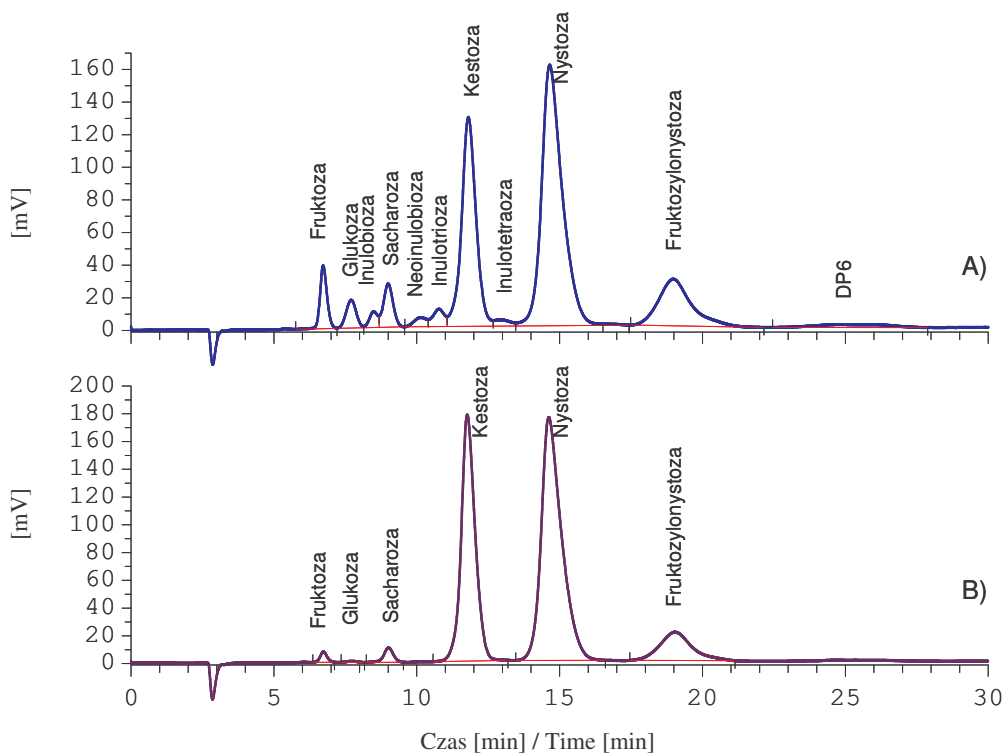


Rys. 8. Chromatogramy sacharydów zawartych w koncentracie FOS typu K (A) i koncentracie FOS typu NG (B) [16].

Fig. 8. HPLC profiles of saccharides in concentrates: FOS type K (A) and FOS type NG (B) [16].

Doświadczenia przedstawione poniżej wskazują na możliwość ominięcia drogiego procesu chromatograficznego rozdzielania składników. W wyniku należytego doboru preparatu enzymatycznego, jego dawki i warunków biokonwersji oraz ewentualnego zastosowania dodatkowych procesów korzystnych do selektywnego usuwania glukozy ze środowiska reakcji, można wytwarzać dwa rodzaje syropów bogatych w nystozę. Jeden syrop wraz z glukozą, tj. typ nystozowo-glukozowy (NG) i drugi syrop nystozowy (N) otrzymany po usunięciu glukozy, zawierający w suchej masie co najmniej 75% FOS. Roztwory o stężeniu około 40% s.s. zawierające blisko 80% FOS w s.s. można przeprowadzić w postać proszku przez suszenie rozpyłowe. Na rys. 9. przedstawiono przykładowy chromatogram preparatu w proszku otrzymanego według opisu przedstawionego w niniejszej pracy i chromatogram oligosacharydów preparatu standardowego firmy Wako Pure (handlowe preparaty FOS firmy Wako Pure są otrzymywane przez biokonwersję sacharozy, po której następuje proces niskociśnieniowej chromatografii przemysłowej z otrzymaniem frakcji kestozy-nystozowej poddawanej zateżaniu i suszeniu rozpyłowemu [34]). Zauważalne jest podobieństwo składu jakościowego obydwu preparatów i nieznaczne różnice w składzie ilościowym. Preparat FOS Wako Pure, oprócz kestozy i nystozy zawartych w równych ilościach, zawierał F-nystozę, niewielkie ilości fruktozy i sacharozy oraz

śladowe ilości glukozy, inulobiozy i neoinulobiozy. Preparat własny FOS PL 90 oprócz trzech głównych oligomerów FOS (nystozy, kestozy i Fnystozy) zawierał niewielkie ilości oligomerów homogennych, tj. inulotetraozy, inulotriozy i inulobiozy.



Rys. 9. Chromatogramy sacharydów preparatu FOS PŁ-90 (A) i preparatu firmy Wako Pure (B).

Fig. 9. HPLC profiles of saccharides in an FOS PŁ-90 (A) preparation and in a preparation made by Wako Pure (B) company.

Zawierał również fruktozę, glukozę i sacharozę w ilości do 10%. Preparat FOS PL 90 składowany w warunkach typowych dla preparatów sypkich nie ulegał zbryleniu, może to wynikać z dużego udziału nystozy i jej małej higroskopijności. W preparacie FOS WP i FOS PL 90 w śladowych ilościach występował składnik, który jest typowy dla biokonwersji sacharozy w obecności β -fruktozydazy [7], jest to β -D-fruktofuranozylo(2 \rightarrow 6)- α -D-glukopiranoza (neoinulobioza).

Roztwory zawierające powyżej 72% s.s., w których udział FOS w s.s. przekraczał 70%, podczas składowania w temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ulegały zmętnieniu, a następnie pojawiał się w nich krystaliczny osad. Na podstawie oznaczeń chromatograficznych i analizy MS stwierdzono, że jest to nystoza ($M=667,2$). Wydaje się dalece prawdopodobne, że nieoczekiwana łatwość krystalizacji nystozy z odpowiednich roztworów po enzymatycznej modyfikacji sacharozy przynosi nowe możliwości wytwarzania ściśle zdefiniowanego składu oligomerycznego FOS w postaci bardzo dogodnej do

stosowania. Na obecnym etapie badań brak jest uzasadnienia łatwości krystalizacji nystozy ze złożonych roztworów.

T a b e l a 4

Skład oligomeryczny syropów FOS różnego typu oraz preparatów FOS różnego pochodzenia.
Content of oligomers contained in FOS syrups of various types and in commercial FOS preparations of different origins.

Produkt Product	Zawartość [% s.s.] Content [% d.m.]											
	GlF	S	I	NIN	K	N	FN	DP ≥ 6	Σ FOS	$\frac{N}{FOS} \cdot 100$	$\frac{DP \geq 4}{FOS}$	
FOS typ K _F	31,5	27,5	-	0,9	32,2	7,7	0,2	0	40,1	19,2	19,7	
FOS typ K	19,7	28,6	-	0,6	42,1	8,7	0,2	0	51,6	16,9	17,2	
FOS typ NG	34,0	8,3	0,8	1,9	17,0	29,2	8,5	0,3	57,7	50,6	65,9	
FOS typ N	11,5	9,0	0,5	1,5	27,9	40,3	8,4	0,3	79,5	50,7	61,6	
FOS PL 90	5,8	3,5	1,1	3,0	25,9	45,1	13,7	1,9	90,7	49,7	66,9	
Nystoza PL	0,6	0,9	-	-	5,1	91,8	1,6	0	98,5	93,2	94,8	
FOS WP	0,9	1,5	-	-	35,9	52,0	9,7	0	97,6	53,3	63,2	
Raftilose	2,7	0,2	3,0	29,0	0,7	27,6	3,8	11,8	7,6	13,6	96,1	32,7 ¹⁾

Objaśnienia / Explanatory notes:

S – sacharoza / saccharose, F – fruktoza / fructose, N – nystoza / nystose, K – kestoza / kestose, I – inulobioza / inulobiose, NIN – neoinulobioza / neoinulobiose, G – glukoza / glucose;

¹⁾ jako / as $\frac{IT + N}{FOS}$

W tab. 4. zestawiono skład oligomeryczny typowych syropów FOS otrzymanych w pracy, dwóch własnych preparatów stałych oraz handlowego preparatu Wako Pure (FOS WP) i Raftilose. Syrop typu kestożowego (FOS K), otrzymany z udziałem preparatu Fructozyme, zawierał najmniejszy udział oligofruktozy w s.s. przy zachowaniu podobnego udziału nystozy do s.s. jak w syropie typu kestożowego, otrzymanego z zastosowaniem preparatu Novoferm. Syropy oligofruktozy typu nystozowego, niezależnie od obecności glukozy, zawierały ponad 65% oligomerów DP ≥ 4 w s.s., tj. nieco więcej niż w preparatach FOS Wako Pure, otrzymanych z zastosowaniem procesu chromatograficznego. Krystaliczna nystoza, wyizolowana z syropów FOS typu nystozowego, była najbardziej skoncentrowaną postacią oligofruktozy o zawartości 94,8% oligomerów o DP ≥ 4.

Skład oligomeryczny syropów FOS typu nystozowego i preparatów proszkowych FOS 90 PL był bogatszy niż preparatów Wako Pure o oligomery homogenne: inulotriozę i inulobiozę, typowe dla preparatów FOS otrzymanych przez biokonwersję inuliny [3].

Wnioski

1. Syropy fruktooligosacharydowe o dominującym udziale kestozy w s.s. otrzymuje się najłatwiej i najtaniej, nawet z dużym udziałem aktywnej fruktozylotransferazy, towarzyszącej fruktofuranozydazie, pod warunkiem użycia roztworu sacharozy o dostatecznie wysokim stężeniu i pH bliskiego 7.
2. Niektóre preparaty enzymatyczne z *Aspergillus niger*, przeznaczone do produkcji soków owocowych i piwa, np. Novoferm, zawierają aktywną fruktozylotransferazę i dzięki temu są przydatne do wytwarzania koncentratów FOS o różnym, lecz przewidywalnym udziale kestozy, nystozy i fruktozylonystozy.
3. Roztwory po enzymatycznej modyfikacji sacharozy, zawierające ponad 50% nystozy w przeliczeniu na sumę fruktooligosacharydów, a w szczególności pozbawione glukozy przez enzymatyczne jej utlenienie, umożliwiają otrzymanie preparatów proszkowych zawierających co najmniej 80% fruktanów w s.s.
4. Z roztworów mieszaniny sacharydów o stężeniu 72% i udziale fruktooligosacharydów ponad 70% w s.s. krystalizuje nystoza i dzięki temu można otrzymać bardzo dogodną postać użytkową składnika prebiotycznego.

Badania finansowane przez KBN w ramach projektu PBZ-KBN/021/PO6/99/27/B

Literatura

- [1] Anderson H.B., Alleged L.H., Bosses I.G.: Nondigestibility characteristics of inulin and oligofructose in humans. *J. Nutr.*, 1999, **129** (75), 14289-14309.
- [2] Biedrzycka E., Bielecka M.: Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci. Technol.*, 2004, **15**, 170-175.
- [3] Booten K., Deleenheer L.: Method for preparing a polydispersed saccharide composition. Patent USA, 2001, 2001016572 (EP 0917588).
- [4] Bornet F.R.J., Brouns F., Tashiro Y., Duvilier V.: Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digest Liver Dis.*, 2002, (34) Suppl., 5111-5120.
- [5] Byung W.K., Yun J.W.: Selective production of GF₄-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. *Biotechnol. Lett.*, 1998, **20** (11), 1031.
- [6] Cheng Tao: Tonic oligofructose salt as oral liquid. Patent chiński, 2001, CN 1289596.
- [7] Farine S., Versluis C., Bonnici P.J., Heck A., Peschet J.L., Puigserver A., Biagini A.: Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatog. A*, 2001, **920**, 299-308.
- [8] Fritz M.: Self-foaming soluble beverage powder. Patent USA, 2003, 6669979.
- [9] Hang U.D., Woodams E.E., Jang K.Y.: Fructosyltransferase activity of commercial enzyme preparations used in fruit juice processing. *Biotechnol. Lett.*, 1995, **17**, 741-747.
- [10] Hang Y.D., Woodams E.E.: Optimization of enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Lebensmittel-Wirtschaft und Techn.*, 1996, **29** (5/6), 578-580.
- [11] Hayashi S., Tobouchi M., Takasaki Y., Smada K.: Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase. *Biotechnol. Lett.*, 1994, **16**, 227-228.

- [12] Hidaka H., Hirayama M., Sumi N.: A fructooligosaccharide producing enzyme from *A. niger* Agric. Biol. Chem., 1998, **52**, 1181-1187.
- [13] Iiang S.: Yeast gene engineering bacterium and endoinulase preparation and its application method. Patent chiński, 2002, 1341709.
- [14] IUB – IUPAC, Abbreviated terminology of oligosaccharide chains.: J. Biol. Chem., 1982, **257**, 3347-3351.
- [15] Jung K.H., Lim J.Y., Yon S/L: Production of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett., 1987, **9**, 703-708.
- [16] Król B., Gałązka I. Grzelak K.: Jakościowy i ilościowy skład β -fruktooligosacharydów w preparatach prebiotycznych różnego pochodzenia. Złożone do druku w Żyw. Człow i Met.
- [17] Król B., Klewicki R.: Sposób enzymatyczny wytwarzania glukonianu wapnia. Patent polski, 2004, P-326112.
- [18] Król B.: Sposób wytwarzania mieszanin fruktooligosacharydów o pożądanej zawartości kestozy i nystozy. Zgłoszenie patentowe, 2003, P-3262881.
- [19] Kurakake M., Onoue T., Kumaki T.: Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *A. oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996, **45**, 236-239.
- [20] Lüscher M., Erdin Ch., Sprenger N.: Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. FEBS Lett., 1996, **385**, 39-42.
- [21] Ninness K.,R.: Inulin and oligofructose: What a they?. J. Nutr., 1999, **129 (75)**, 14023.
- [22] Nisher M., Frehner M., Nösberger J.: Purification and some properties of fructan: fructan fructosyltransferase from dandelion (*Taraxacum officinale*). New Phytologist, 1993, **123**, 437 – 442.
- [23] PN-91/L-84102:1991. Nadtlenek wodoru.
- [24] PN-A-74850:1996. Cukier biały.
- [25] Rao A.V.: Dose response effects on inulin and oligofructose on intestinal bifidogenic effects. J. Nutr., 1999, 129, 14425-14459.
- [26] Rao A.V.: The probiotic properties of oligofructose and low intake levels. Nutr. Research, 2001, **21**, 843-848.
- [27] Ritsema T., Smeekens S.: Fructans: beneficial for plants and humans. Current Opinion in Plant Biology, 2003, **6**, 223-230.
- [28] Sangette P.T., Ramshur M.N., Prapulla S.G.: Production of Fructo-oligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. Process Biochem., 2004, **39**, 753-758.
- [29] Schiweck H., Munir M., Rapp K.M., Schneider B., Vogel M.: New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. In: Carbohydrates as organic raw materials, ed. Lichtenthaler F.W., VCV, New York 1991, pp. 57-94.
- [30] Seike M. Patent japoński 59-95895.
- [31] Spiegel J.E., Frankos V.H., Schmitt D.F., Rose K., Karabell P.: Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. Food Technol., 1994, **48 (1)**, 85-89.
- [32] Wilson J.: Nutritional formulation containing prebiotic substances. Patent USA, 2003, US 060445.
- [33] Yun J.W., Song S.K., Han J.H., Cho Y.C., Lee J.H.: Separation and purification of fructooligosaccharides by ion-exchange resin column. Korean J. Biotechnol. Bioeng., 1993, **9**, 35- 39.
- [34] Yun J.W.: Fructooligosaccharides – occurrence, preparation and application. Enzyme and Microbiol. Technology, 1996, **19**, 107-117.

**PRODUCTION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES (FOS) CONCENTRATIONS WITH
VARIOUS CONTENTS OF OLIGOMERS USING ENZYMATIC
BIOCONVERSION OF SACCHAROSE**

S u m m a r y

In the paper, there are described conditions for bioconversion of saccharose into FOS preparations by commercial enzyme preparations (Fructozyme or Novoferm containing fructosyltransferase). The main objective of this bioconversion was to manufacture 3 FOS syrups and 2 powders containing 50%-60%, and over 90% of fructans respectively.

It was proved that the transglycosylation of the fructose moiety was a three-phase process when the enzyme was applied in doses of 1.0–2.5 U/g saccharose.

During the first phase, kestose is a major fructan formed (nearly 80% of the synthesized FOS). During the second stage, kestose is transformed into nystose (over 50% of the synthesized FOS). Additionally, during the third stage, a balance state among kestose, nystose and F-nystose (their proportion rates are 2:4:3) is settled.

It was proved that after the glucose has been removed by an enzymatic oxidation, the nystose-rich solutions of FOS can be dried off using a spray-drying method; the dry-off process shall occur under the conditions similar to the production of powder milk. Furthermore, it was evidenced that from among all the nystose syrups containing over 72% (w/w) of dry matter, the nystose crystallizes with a little amount of kestose applied in the form of a non-hygroscopic fine-crystal substance.

Key words: fructooligosaccharides, fructosyltransferase, fructosidase, transglycosylation ☒

SŁAWOMIR PIETRZYK, TERESA FORTUNA

WPŁYW RODZAJU SKROBI I WARUNKÓW JEJ UTLENIANIA NA RETROGRADACJĘ

Streszczenie

Skrobie: ziemniaczaną, pszenną, kukurydzianą i kukurydzianą woskową poddano reakcji utleniania: chloranem(I) sodu, nadtlaniem wodoru w obecności jonów Cu^{2+} , chloranem(III) sodu w obecności formaldehydu. W celu określenia efektywności utleniania w uzyskanych skrobiach modyfikowanych oznaczono zawartość grup karboksylowych oraz grup aldehydowych. Zmiany podatności skrobi naturalnych i uzyskanych preparatów modyfikowanych na retrogradację określono sporządzając 2-procentowe kleiki skrobiowe, które następnie przetrzymywano w temp. 8°C przez okres 21 dni. Kolejnych pomiarów turbidancji dokonano w 1., 3., 5., 7., 10., 14. i 21. dniu przechowywania. W skrobiach wyjściowych oraz w uzyskanych preparatach modyfikowanych oznaczono ponadto zawartość amylozy.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że utlenianie skrobi ziemniaczanej wszystkimi zastosowanymi czynnikami ograniczyło retrogradację. Chloran(I) sodu jako jedyny czynnik modyfikujący spowodował zmniejszenie podatności na retrogradację wszystkich użytych rodzajów skrobi. Różnice w zachowaniu się skrobi w procesie retrogradacji są związane nie tylko z rodzajem zastosowanego utleniacza, ale przede wszystkim z odmienną naturą i budową ziarenek skrobi zależną od jej botanicznego pochodzenia.

Słowa kluczowe: skrobia, utlenienie, retrogradacja.

Wprowadzenie

Żel skrobiowy podczas przechowywania zwłaszcza w niskiej temperaturze ulega retrogradacji, tzn. następuje wytrącanie z roztworu nierozpuszczalnej skrobi [13, 16, 21].

Retrogradacja zachodzi nie tylko z udziałem amylozy, ale również amylopektyny zawartej w skleikowanych ziarenekach. Asocjacja liniowych cząsteczek amylozy następuje szybko w pierwszej fazie procesu retrogradacji, zaś powolny wzrost sztywności starzejącego się żelu skrobiowego przypisuje się krystalizacji amylopektyny [6, 9, 16, 20].

Efekty retrogradacji skrobi w produktach spożywczych mogą mieć charakter korzystny lub niepożądany. Czasami retrogradacja przyczynia się do uzyskania wymaganej struktury i tekstury, co ma wpływ na sensoryczne właściwości niektórych produktów otrzymanych na bazie skrobi, np. w procesie wytwarzania purée ziemniaczanego. Jednak częściej zdarza się, że proces ten niekorzystnie wpływa na produkty zawierające w swoim składzie skrobię. Przykładem może być czerstwienie i twardnienie pieczywa [7, 12, 13].

W celu ograniczenia efektu retrogradacji skrobi stosuje się jej modyfikację m.in. metodami fizycznymi lub chemicznymi np. poprzez utlenianie.

Utlenianie polega na wytworzeniu w skrobi grup karboksylowych i aldehydowych. Liczba tych grup uzależniona jest nie tylko od rodzaju czynnika utleniającego i warunków utleniania, ale również od pochodzenia botanicznego skrobi [4, 5, 14].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu pochodzenia botanicznego skrobi oraz warunków jej utleniania wybranymi czynnikami na retrogradację.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły skrobie różnego pochodzenia tj. skrobia ziemniaczana „Superior” i skrobia pszenna wyprodukowane w ZPZ Niechlów oraz skrobia kukurydziana i kukurydziana woskowa (National Starch & Chemical).

Wyżej wymienione skrobie poddano procesowi utleniania trzema metodami.

1. Modyfikację chloranem(I) sodu wg Forsell i wsp. [2] prowadzono w następujący sposób: odważano 400 g skrobi i sporządzano 40% zawiesinę wodną. Następnie dodawano stopniowo wodnego roztworu NaOCl (forma handlowa o aktywności 100 g Cl/dm³, POCh). Modyfikację wykonywano w temp. 20 ±2°C, mieszając zawiesinę skrobi w środowisku alkalicznym (pH = 10,0) przez 50 min. Następnie mieszaninę reakcyjną neutralizowano 1 M roztworem H₂SO₄ do pH = 7,0. Ilość użytego NaOCl do utleniania była równoważna 40 g Cl/kg skrobi.
2. Modyfikację nadtlenkiem wodoru (z dodatkiem CuSO₄·5H₂O o stężeniu 0,1%) przeprowadzono zgodnie z metodą Parovuori i wsp. [18]. Odważano 400 g skrobi, a następnie dodawano wody destylowanej w takiej ilości, aby otrzymać 42% zawiesinę skrobi. Mieszaninę termostatowano w temp. 40°C. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawano kroplami 30% roztwór H₂O₂ (cz.d.a., POCh), tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 2%. Mieszaninę termostatowano jeszcze przez 60 min.
3. Modyfikację skrobi przy użyciu chloranu(III) sodu w obecności formaldehydu prowadzono zgodnie z metodą Hebeisha i wsp. [8]. Z 400 g skrobi sporządzano 28% zawiesinę wodną wraz z dodatkiem 4 g chloranu(III) sodu (cz.d.a., Fluka) i 1,2 g formaldehydu (roztwór wodny, cz.d.a, Chempur). Zawiesinę mieszano w temp. 50°C przez 90 min.

Skrobie modyfikowane przemywano (do zaniku reakcji na chlorki), suszono (48 godz. w temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$) i rozdrabniano, a następnie przesiewano.

W skrobiach naturalnych (tab. 1) zawartość amylozy kształtowała się od 29,7% w skrobi ziemniaczanej do 1,1% w skrobi kukurydzianej woskowej (jest to skrobia wysokoamylopektynowa).

W skrobiach wyjściowych i utlenionych oznaczano zawartość:

- grup karboksylowych zgodnie z normą ISO 11214 [10];
- grup aldehydowych wg Potze'a [19];
- amylozy metodą spektrofotometryczną z jodem [15]. Pomiar absorpcji wykonywano przy długości fali $\lambda = 635 \text{ nm}$, używając spektrofotometru Specord M 42 (Carl Zeiss, Niemcy).

Ponadto oznaczano zmiany podatności skrobi naturalnych i uzyskanych modyfikatorów na retrogradację [11]. Sporządzano 2-procentowe kleiki skrobiowe, które następnie przetrzymywano w temp. 8°C przez 21 dni. Kolejnych pomiarów turbidancji ww. skrobi dokonano w 1., 3., 5., 7., 10., 14. i 21. dniu przechowywania.

W celu określenia istotności różnic w zawartości grup karboksylowych, aldehydowych oraz amylozy zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Duncana. W przypadku zmian podatności skrobi naturalnych i utlenionych na retrogradację wyznaczano odchylenia standardowe, które zaznaczono na wykresach.

Wyniki i dyskusja

Wszystkie rodzaje analizowanych skrobi (tab. 1) utlenione metodą z wykorzystaniem chloranu(I) sodu odznaczały się wyższą zawartością grup karboksylowych w porównaniu ze skrobiami modyfikowanymi pozostałymi metodami. Wyjątek stanowiła skrobia pszenna, w której najwyższą zawartość grup karboksylowych stwierdzono po modyfikacji czynnikiem utleniającym – nadtlutkiem wodoru. Utlenianie skrobi metodą z wykorzystaniem chloranu(III) sodu w obecności formaldehydu okazało się najmniej skuteczne. Jest to potwierdzenie naszych wcześniejszych badań [4], jak również badań Hebeisha i wsp. [8], którzy utleniając skrobie kukurydzianą i ryżową chloranem(III) sodu w obecności formaldehydu uzyskali niski stopień utlenienia. Najbardziej podatną skrobią na utlenianie zastosowanym metodami z udziałem chloranu(I) sodu i nadtlutku wodoru była skrobia ziemniaczana, a chloranem(III) sodu – skrobia kukurydziana.

Na podstawie analizy wyników zawartości grup aldehydowych (tab. 1) można stwierdzić, że najbardziej podatną na hydrolizę była skrobia ziemniaczana, w której zaobserwowano największy przyrost grup aldehydowych w porównaniu z pozostałymi skrobiami. Potwierdza to wyniki badań Kuakpetoona i Wanga [14]. Metoda z nadtlutkiem wodoru w porównaniu z pozostałymi metodami powodowała największy przyrost grup aldehydowych. Jest to zgodne z danymi literaturowymi [4,

18], wg których utlenienie skrobi nadtlakiem wodoru powoduje większy przyrost grup aldehydowych w porównaniu z innymi utleniaczami.

Tabela 1

Zawartość grup karboksylowych i aldehydowych w skrobiach utlenionych.
Content of carboxyl and aldehyde groups in oxidized starches.

Skrobia Starch	Zawartość grup karboksylowych w skrobiach utlenionych [%] Content of carboxyl groups in starches oxidized with [%]			Zawartość grup aldehydowych w skrobiach utlenionych [g CHO/100 g s.s.] Content of aldehyde groups in starches oxidized with [g CHO/100 g d.w.]		
	chloranem(I) sodu sodium chlorate(I)	nadtlenkiem wodoru hydrogen peroxide	chloranem(III) sodu sodium chlorate(III)	chloranem(I) sodu sodium chlorate(I)	nadtlenkiem wodoru hydrogen peroxide	chloranem(III) sodu sodium chlorate(III)
Ziemniaczana Of potato	0,432	0,351	0,008	0,054 ^b	0,157	0,017 ^a
Pszenna Of wheat	0,226	0,325	0,056	0,014 ^a	0,113	0,001 ^c
Kukurydziana Of maize	0,380 ^d	0,301	0,061	0,053 ^b	0,102	0,002 ^c
Kukurydziana woskowa Of waxy maize	0,390 ^d	0,195	0,018	0,021	0,079	0,010

Małymi literami oznaczono wartości średnie nie różniące się statystycznie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.
The same small letters indicate values that are not significantly different at $\alpha=0.05$.

Proces modyfikacji (tab. 2) spowodował zmniejszenie zawartości amylozy w skrobiach utlenionych. Autio i wsp. [1] wykazali, że stopień depolimeryzacji amylozy w skrobi jęczmiennej w wyniku działania chloranu(I) sodu jest równy stopniowi depolimeryzacji amylozy uzyskanemu po hydrolizie 1M kwasem solnym. Można zatem stwierdzić, że obniżenie zawartości amylozy spowodowane jest depolimeryzacją skrobi, która następuje równocześnie z reakcją utleniania. Veelaert i wsp. [22] w swoich badaniach stwierdzili, iż zawartość amylozy w skrobi ziemniaczanej utlenionej metajodanem(VII) sodu maleje wraz ze wzrostem stopnia

utlenienia. Według tych badaczy podczas utleniania następuje skrócenie regularnej helisy amylozy.

Przyrost zawartości amylozy zaobserwowano jedynie w skrobi pszennej i kukurydzianej utlenionej chloranem(III) sodu. Przyrost ten jest najprawdopodobniej pozornym zwiększeniem jej zawartości. Być może podczas utleniania następuje rozkład wiązań α -1-6-glikozydowych w amylopektynie i wówczas mogą powstawać długie łańcuchy, które dają reakcję barwną z jodem. Pozorne zwiększenie zawartości amylozy w skrobiach utlenionych chloranem(III) sodu stwierdzono w badaniach wcześniejszych [5]. Największe różnice zawartości amylozy obserwowano w skrobi ziemniaczanej modyfikowanej chloranem(I) sodu i nadtlakiem wodoru. Świadczy to o wysokim stopniu depolimeryzacji amylozy tymi utleniaczami w przypadku skrobi ziemniaczanej. W pozostałych skrobiach tzn. pszennej, kukurydzianej i kukurydzianej woskowej spadek ten był nieznaczny.

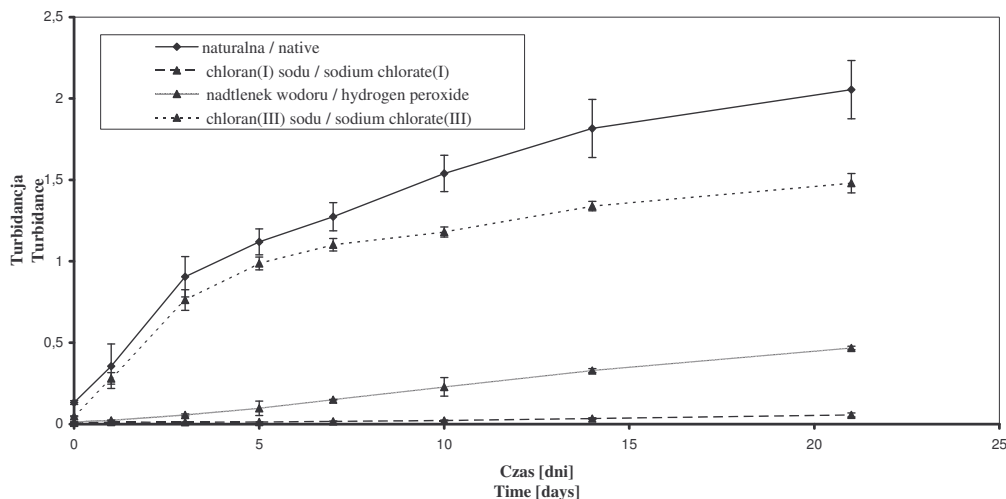
Tabela 2

Zawartość amylozy w skrobi przed i po utlenieniu.
Content of amylose in starch before and after the oxidation.

Skrobia Starch	Zawartość amylozy w skrobiach [g/100 g s.s.] Content of amylose in starches [g/100g d.w.]			
	naturalnych native	utlenionych / oxidized with		
		chloranem(I) sodu sodium chlorate(I)	nadtlenkiem wodoru hydrogen peroxide	chloranem(III) sodu sodium chlorate(III)
Ziemniaczana Of potato	29,7	20,6 ^d	23,3	27,7
Pszenna Of wheat	18,7 ^{bc}	18,2 ^a	16,5	20,6 ^d
Kukurydziana Of maize	18,5 ^{ab}	18,3 ^a	18,5 ^{ab}	18,9 ^c
Kukurydziana woskowa Of waxy maize	1,1	0	0	0

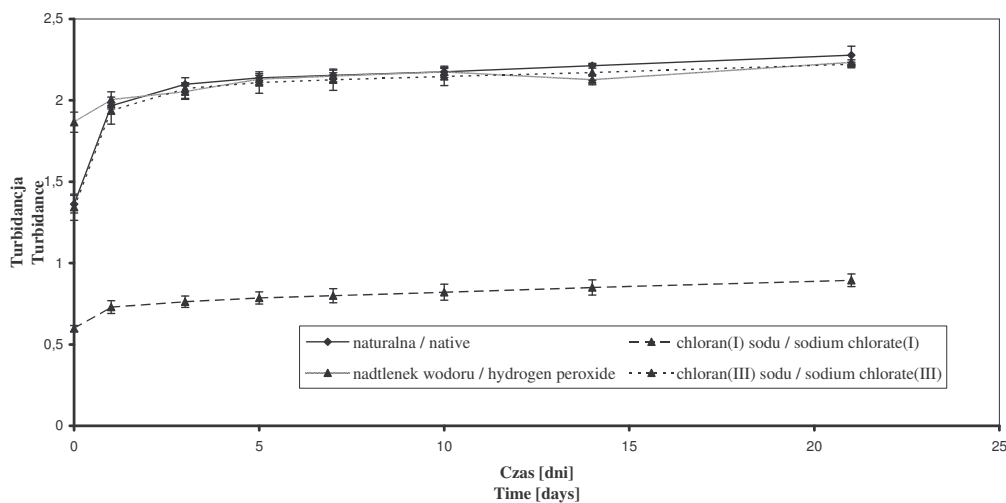
Małymi literami oznaczono wartości średnie nie różniące się statystycznie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.
The same small letters indicate values that are not significantly different at $\alpha=0.05$.

Na rys. 1., 2., 3. i 4. przedstawiono zmiany retrogradacji skrobi naturalnych i utlenionych w czasie 21 dni, w temp. 8°C.



Rys.1. Podatność na retrogradację skrobi ziemniaczanej przed i po utlenieniu, przechowywanej w temp. 8°C.

Fig. 1. Susceptibility of potato starches to retrogradation before and after the oxidation while storing them at 8°C.

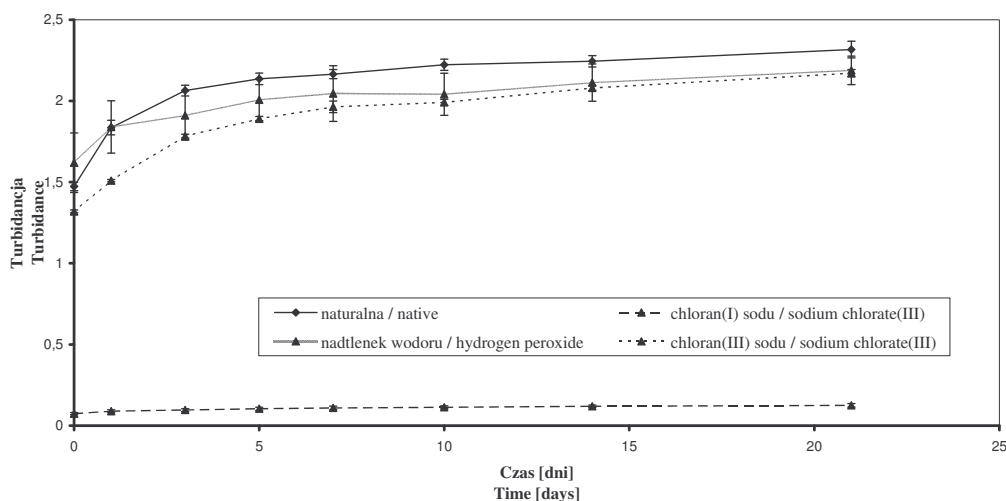


Rys.2. Podatność na retrogradację skrobi pszennej przed i po utlenieniu, przechowywanej w temp. 8°C

Fig. 2. Susceptibility of wheat starches to retrogradation before and after the oxidation while storing them at 8°C.

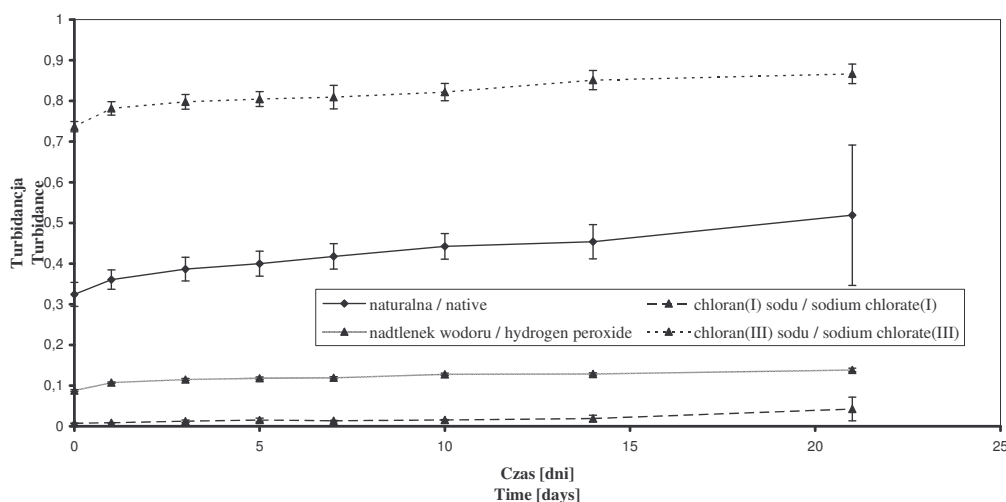
Spośród skrobi naturalnych najbardziej podatne na retrogradację w czasie przechowywania były skrobie: pszena (rys. 2) i kukurydziana (rys. 3). Natomiast najslabiej retrogradowała skrobia kukurydziana woskowa (rys. 4). Jest to potwierdzenie danych literaturowych [3, 11, 21], w których autorzy stwierdzają, że

podatność skrobi na retrogradację w dużej mierze uzależniona jest od pochodzenia botanicznego.



Rys.3. Podatność na retrogradację skrobi kukurydzianej przed i po utlenieniu, przechowywanej w temp. 8°C.

Fig. 3. Susceptibility of maize starches to retrogradation before and after the oxidation while storing them at 8°C.



Rys. 4. Podatność na retrogradację skrobi kukurydzianej woskowej przed i po utlenieniu, przechowywanej w temp. 8°C

Fig. 4. Susceptibility of waxy starches to retrogradation before and after the oxidation while storing them at 8°C.

Podatność na retrogradację skrobi ziemniaczanej i uzyskanych z niej preparatów utlenionych (rys. 1) wzrastała wraz z czasem przechowywania kleiku. W przypadku skrobi wyjściowej i utlenionej chloranem(III) sodu wzrost był najintensywniejszy w pierwszych trzech dniach przechowywania.

Można stwierdzić, że uzyskane preparaty utlenionej skrobi ziemniaczanej charakteryzowały się mniejszą podatnością na retrogradację w całym okresie przechowywania w stosunku do skrobi naturalnej. Duży wpływ na podatność skrobi na retrogradację ma zawarta w niej amyloza [6, 9, 17, 21]. W badanych modyfikatach skrobi ziemniaczanej nastąpiło znaczne zmniejszenie zawartości amylozy, co być może wpłynęło na obniżenie stopnia retrogradacji. Najmniej podatna na retrogradację okazała się skrobia ziemniaczana utleniona chloranem(I) sodu, w której zmniejszenie zawartości amylozy było największe. Visser i wsp. [23] w swoich badaniach wykazali większy stopień retrogradacji skrobi ziemniaczanej przechowywanej w temp. 5°C w stosunku do skrobi ziemniaczanej bezamylozowej.

Na rys. 2. przedstawiono zmiany retrogradacji skrobi pszennej i uzyskanych z niej preparatów modyfikowanych. Największą retrogradację stwierdzono w całym okresie przechowywania w przypadku skrobi wyjściowej oraz utlenionej nadtlutlenkiem wodoru i chloranem(III) sodu. Utlenienie tylko chloranem(I) sodu spowodowało zmniejszenie podatności skrobi pszennej na retrogradację, która utrzymywała się na stałym poziomie w czasie przechowywania. Brak zmian można tłumaczyć większym wpływem tłuszczu (zawartego w skrobi) na retrogradację [21] niż samego procesu utleniania nadtlutlenkiem wodoru i chloranem(III) sodu. Ponadto według Parkera i Ringa [17] amyloza zawarta w skrobi pszennej ma krótkie łańcuchowe frakcje, które w dużym stopniu przyczyniają się do wysokiego stopnia retrogradacji.

Zmiany retrogradacji w czasie przechowywania skrobi kukurydzianej i utlenionej przedstawiono na rys. 3. Skrobie: kukurydziana naturalna oraz utlenione nadtlutlenkiem wodoru i chloranem(III) sodu wykazywały wysoką retrogradację. Najmniejszą podatnością na retrogradację charakteryzowała się skrobia kukurydziana utleniona chloranem(I) sodu, w której retrogradacja była minimalna. Również w skrobi kukurydzianej prawdopodobnie większy wpływ na retrogradację miały substancje lipidowe niż sam proces utlenienia nadtlutlenkiem wodoru i chloranem(III) sodu.

Parker i Ring [17] stwierdzili, że w skrobi kukurydzianej dodatkowo duży wpływ na retrogradację mają krótkie łańcuchy amylopektyny o DP 16-30. Można zatem przypuszczać, że chloran(I) sodu zmniejszył podatność skrobi kukurydzianej na retrogradację, powodując depolimeryzację tych właśnie łańcuchów.

Zmiany retrogradacji w czasie przetrzymywania skrobi kukurydzianej woskowej i jej modyfikatów przedstawiono na rys. 4. Stwierdzono minimalny wzrost retrogradacji skrobi naturalnej, natomiast pozostałe skrobie nie wykazały wzrostu retrogradacji w czasie przechowywania. Proces utlenienia chloranem(I) sodu i nadtlutlenkiem wodoru spowodował, że uzyskane preparaty modyfikowane retrogradowały wolniej od skrobi

naturalnej. Jedynie modyfikacja chloranem(III) sodu skrobi kukurydzianej woskowej spowodowała, że podatność na retrogradację wzrosła. Skrobie kukurydziane woskowe charakteryzują się niską podatnością na retrogradację w odniesieniu do innych skrobi naturalnych. Związane jest to z niską zawartością amylozy w tych skrobiach. Można więc przypuszczać, że spadek podatności skrobi kukurydzianej woskowej utlenionej chloranem(I) sodu i nadtlakiem wodoru związany jest z depolimeryzacją (która jest większa niż przy użyciu chloranu(III) sodu) amylopektyny. Wynika z tego, że chloran(III) sodu spowodował depolimeryzację amylopektyny na łańcuchy, które łatwiej retrogradują.

Wnioski

1. Jedynie w skrobi ziemniaczanej utlenienie wszystkimi zastosowanymi czynnikami ograniczyło retrogradację
2. Użycie chloranu(I) sodu jako czynnika modyfikującego spowodowało zmniejszenie podatności na retrogradację wszystkich użytych rodzajów skrobi.
3. Różnice w zachowaniu się skrobi w procesie retrogradacji są związane nie tylko z rodzajem zastosowanego utleniacza, ale przede wszystkim z odmienną naturą i budową ziarenek skrobi zależną od jej botanicznego pochodzenia.

Literatura

- [1] Autio K., Suortii T., Hamunen A., Poutanen K.: Heat-induced structural changes of acid hydrolysed and hypochlorite-oxidized barley starches. *Carbohydrate Polymers*, 1996, **29**, 155-161.
- [2] Forsell P., Hamunen A., Autio K., Suorti T., Poutanen K.: Hypochlorite oxidation of barley and potato starch. *Starch/Stärke*, 1995, **47**, 371-377.
- [3] Fortuna T., Juszczak L.: Retrogradacja skrobi rozsegregowanych pod względem wielkości ziaren. *Zeszyty Naukowe AR w Krakowie*, 1998, **10**, 31-39.
- [4] Fortuna T., Pietrzyk S.: Porównanie właściwości fizykochemicznych skrobi utlenionych chloranem(III) sodu i nadtlakiem wodoru. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2002, **489**, 401-413.
- [5] Fortuna T., Juszczak L., Pietrzyk S., Wróbel M.: Physico-chemical properties of oxidized starches of different origin. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2002, **11/52**, 21-27.
- [6] Fredriksson H., Silverio J., Andersson R., Eliasson A.C., Aman P.: The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydrate Polymers*, 1998, **35**, 119-134.
- [7] Gambuś H.: Wpływ fizyko-chemicznych właściwości skrobi na jakość i starzenie się pieczywa. *Zeszyty Naukowe AR w Krakowie* 1997, Rozprawa 226.
- [8] Hebeish A., El-Sisy F., Abdel-Hafiz S.A. Abdel-Rahman A.A., El-Rafie M.H.: Oxidation of maize and rice starches using sodium chlorite along with formaldehyde. *Starch/Stärke*, 1992, **44**, 388-393.
- [9] Hoover R.: Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: review. *Carbohydrate Polymers*, 2001, **45**, 253-267.
- [10] ISO 11214: 1996. Modified Starch – Determination of Carboxyl Group Content of Oxidized Starch.
- [11] Jacobson M.R., Obanui M., Becuiler J.M.: Retrogradation of starch from different botanic sources. *Carbohydrate*, 1997, **74/5**, 511-518.

- [12] Jankowski T.: Termodynamiczna i mechaniczna charakterystyka kleikowania i retrogradacji skrobi w ziarnie pszenicy i ziemniaka. Roczniki AR w Poznaniu 1990, Rozprawy Naukowe 204.
- [13] Karim A.A., Norziah M.H., Seow C.C.: Methods for the study of starch retrogradation. Food Chem., 2000, **71**, 9-36.
- [14] Kuakpetoon D., Wang Y.J.: Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. Starch/Stärke, 2001, **53**, 211-218.
- [15] Morrison W.R., Laignelet B.: An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. J. Cereal Sci., 1983, **1**, 9-20.
- [16] Paredes-Lopez O., Bello-Perez A.L., Lopez MG.: Amylopectin: Structural, gelatinization and retrogradation studies. Food Chemistry, 1994, **50**, 411-417.
- [17] Parker S., Ring S.G.: Aspects of the physical chemistry of starch. J. Cereal Sci., 2001, **34**, 1-17.
- [18] Parovuori P., Hamunen A., Forsell P., Autio K., Poutanen K.: Oxidation of potato starch by hydrogen peroxide. Starch/Stärke, 1995, **47**, 19-23.
- [19] Potze J., Hiemstra P.: Über den Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Oxydation der Kartoffelstärke mit Hypochlorit. Starch/Stärke, 1963, **15**, 217-225.
- [20] Silverio J., Fredriksson H., Andersson R., Eliasson A., Aman P.: The effect of temperature cycling on the amylopectin retrogradation of starches with different amylopectin unit-chain length distribution. Carbohydrate Polymers, 2000, **42**, 175-184.
- [21] Swinkels J.J.M.: Composition and properties of commercial native starch. Starch/Stärke, 1985, **37**, 1-5.
- [22] Veelaert S., Polling M., Wit D.: Structural and physicochemical changes of potato starch along periodate oxidation. Starch/Stärke, 1994, **46**, 263-268.
- [23] Visser R.G.F., Suurs L.C.J.M., Bruinenberg P.M., Jacobsen E.: Comparison between amylose-free and amylose containing potato starch. Starch/Stärke, 1997, **49**, 438-443.

IMPACT OF STARCH TYPE AND ITS OXIDATION CONDITIONS ON RETROGRADATION PROPERTIES

S u m m a r y

Native starches of potato, wheat, maize, and waxy maize were oxidized using sodium chlorate(I), hydrogen peroxide in the presence of Cu^{2+} ions, and sodium chlorate(III) in the presence of formaldehyde. In order to evaluate the effectiveness of oxidation, the content of carboxyl & aldehyde groups was evaluated in the modified starches. Changes in the susceptibility of native starches and modified starch preparations to retrogradation were determined on the basis of 2% starch pastes prepared and stored at 8°C for 21 days. The turbidity was measured on the 1st, 3rd, 5th, 7th, 10th, 14th, and 21st day of storage. Moreover, the amylose content was measured in those native & modified starches.

The results obtained allowed for the statement that the oxidation of potato starch using all the agents as quoted above reduced the retrogradation. Sodium chlorate(I) was the only modifying agent to cause the decrease in the susceptibility of all the starch types to retrogradation. The fact that various starch types differently behaved during the retrogradation process are not connected only with the type of oxidant used, but, first of all, with a different nature and structure of starch granules which depends on its botanic origin.

Key words: starch, oxidation, retrogradation 

ALICJA KAWKA, AGNIESZKA LICZBAŃSKA, JUSTYNA ŁAPA

WPLYW CAŁOZIARNOWEJ MĄKI JĘCZMIENNEJ I WYBRANYCH DODATKÓW TECHNOLOGICZNYCH NA JAKOŚĆ PIECZYWA PSZENNO-JĘCZMIENNEGO

Streszczenie

W pracy określono wpływ całościarnowej mąki jęczmiennej na jakość pieczywa otrzymanego przy zastosowaniu różnych metod prowadzenia ciasta pszenno-jęczmiennego. Oceniano też wpływ dodatków glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej na cechy jakościowe pieczywa zawierającego do 40% całościarnowej mąki jęczmiennej. Pieczywo z 20–30% udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej, otrzymane metodą z fazą wstępnego rozmiękczenia mąki jęczmiennej, odznaczało się najlepszą jakością. Pieczywo zawierające tylko 20% mąki jęczmiennej charakteryzowało się również dobrą jakością przy zastosowaniu metod: jedno- i trójfazowej. Całościarnowa mąka jęczmienna stosowana jako zamiennik mąki pszennej, w ilości do 40%, wpływała na zmniejszenie objętości pieczywa i pogorszenie struktury jego miękiszu, a zwiększenie jego wilgotności i kwasowości. Stwierdzono, że dodatki glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej wprowadzone do ciasta z 20–40% udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej, przygotowanego metodą jednofazową, polepszają zarówno cechy ciasta, jak i jakość pieczywa. Dodatek kompleksowy (7% glutenu witalnego i 0,5% lecytyny sojowej) uznano za najbardziej efektywny przy produkcji pieczywa zawierającego do 40% całościarnowej mąki jęczmiennej.

Słowa kluczowe: całościarnowa mąka jęczmienna, metody prowadzenia ciasta, dodatki technologiczne, jakość pieczywa pszenno-jęczmiennego.

Wstęp

Pieczywo jako podstawowy produkt żywnościowy jest wytwarzane z mąki chlebowej o zróżnicowanej wartości odżywczej. W Polsce konsumenci wciąż preferują pieczywo jasne, o niższej wartości odżywczej. Dlatego też należy dążyć do poprawiania wartości żywieniowej tego rodzaju pieczywa przez stosowanie, oprócz tradycyjnych zbóż, surowców naturalnych, takich jak: specjalne przetwory zbożowe, mleko i produkty

Dr hab. A. Kawka, mgr inż. A. Liczbańska, mgr inż. J. Łapa, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, e-mail: alikaw@au.poznan.pl

mleczne, nasiona roślin oleistych, strączkowych i ich przetwory, a także roślinne preparaty białkowe, owoce świeże i suszone itp. Mogą być one stosowane jako dodatek lub część składowa surowców, np. mąki chlebowej do produkcji pieczywa [4].

Spośród wielu naturalnych surowców pochodzenia roślinnego na szczególną uwagę zasługują zboża niechlebne, takie jak jęczmień i owies – surowce o wysokiej wartości żywieniowej. Przetwory z tych zbóż, bogate w białko, lipidy, błonnik pokarmowy i jego składniki, sole mineralne oraz witaminy, stanowią wartościowy surowiec do produkcji nowych rodzajów pieczywa, które można zaliczyć do grupy żywności funkcjonalnej, o korzystnym wpływie na określone funkcje organizmu ludzkiego [2, 5, 6, 7, 8, 10, 18, 19, 24].

Z punktu widzenia technologii piekarstwa, jęczmień i produkty jęczmienne mogą być stosowane jako zamienniki mąki chlebowej. Produkty te w mieszance z mąką chlebową wpływają na zmianę właściwości reologicznych ciasta i cech jakościowych pieczywa. Zwiększenie udziału produktów jęczmiennych w pieczywie istotnie zmienia jego skład chemiczny, a także wartość odżywczą i energetyczną [1, 2, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 22].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu całościarnowej mąki jęczmiennej na jakość pieczywa otrzymanego przy stosowaniu różnych metod prowadzenia ciasta pszenno-jęczmiennego. Ponadto oceniano wpływ dodatków glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej na cechy jakościowe pieczywa pszenno-jęczmiennego otrzymanego metodą jednofazową.

Material i metody badań

Do badań zastosowano handlową mąkę pszenną typu 500, całościarnową mąkę jęczmienną z przemiału laboratoryjnego oraz dodatki technologiczne: gluten witalny i lecytynę sojową.

Mąka pszenna typu 500 pochodziła z Polskich Zakładów Zbożowych S.A. w Brzegu. Obłuszczone ziarno jęczmienia, jako surowiec do uzyskania całościarnowej mąki jęczmiennej, otrzymano z Zakładów Zbożowo-Młynarskich w Kruszwicy. Gluten witalny, o nazwie handlowej Amygluten 160, zakupiono w firmie Hortimex Sp. z o.o. w Koninie. Lecytynę sojową otrzymano z firmy Central Soya Rolpol Sp. z o.o. w Warszawie.

Charakterystykę technologiczną mąki pszennej typu 500 i całościarnowej mąki jęczmiennej stosowanych w doświadczeniach przedstawiono w tab. 1.

Wykonano cykl wypieków laboratoryjnych, sporządzając ciasta, w których udział mąki pszennej zmniejszano wprowadzając całościarnową mąkę jęczmienną w ilości do 40% ogólnej masy mąki pszennej. Ciasta z 20 i 30% udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej sporządzano metodami: jednofazową (metoda A), z fazą wstępnego roz-

miękczenia całoziarnej mąki jęczmiennej (metoda B) i trójfazową na kwasach jęczmiennych (metoda C) z dodatkiem drożdży do ciasta.

Tabela 1

Charakterystyka technologiczna mąki pszennej i całoziarnej mąki jęczmiennej.
Technological characteristics of wheat flour and whole barley flour.

Wskaźniki Indices	Mąka pszenna typu 500 Wheat flour type 500	Całoziarowa mąka jęczmienna Whole barley flour
Wilgotność [%] Moisture [%]	14,5	12,6
Zawartość białka [% s.m.] Protein content [% d.m.]	11,6*	12,4**
Wydajność mokrego glutenu [%] Wet gluten yield [%]	30	-
Rozpływalność glutenu [mm] Gluten spreadibility [mm]	6	-
Liczba glutenowa Gluten number	48	-
Liczba opadania [s] Falling number [s]	203	498
Kwasowość [stopnie] Acidity [degree]	3,0	3,9

* mąka pszenna: N x 5,7 / wheat flour: N x 5.7;

** całoziarowa mąka jęczmienna: N x 6,25 / whole barley flour: N x 6.25.

Ciasto pszenne oraz ciasta z 20–40% udziałem całoziarnej mąki jęczmiennej, bez i z dodatkami technologicznymi, sporządzano metodą A. Stosowano dodatki glutenu witalnego (3, 5, 7%), lecytyny sojowej (0,5%) oraz glutenu witalnego (7%) i lecytyny sojowej (0,5%). Ciasta przygotowywano w mieszarce szybkoobrotowej Stephan UMTA 10, zachowując stały czas mieszenia (30 s). Masę ciasta po wstępnej fermentacji w komorze fermentacyjnej ($t = 30\text{--}32^{\circ}\text{C}$, wilgotność względna 75%) dzielono, formowano i uformowane kęsy ciasta poddawano fermentacji końcowej w warunkach jak wyżej. Kęsy ciasta, po przeprowadzeniu pełnej fermentacji, wypiekano w piecu laboratoryjnym w temp. ok. 200°C .

We wszystkich próbkach ciasta, po wstępnej fermentacji, oznaczano kwasowość zgodnie z PN-A-74100:1992 [21].

Charakterystykę jakościową pieczywa wykonano po 24 godz. od wypieku, uwzględniając oznaczenia: objętości pieczywa, wilgotności, kwasowości miększu według PN-A-74108:1996 [21] oraz przeprowadzono ocenę sensoryczną według skali punktowej 1–10 [11] i porowatości miększu według tablic Dallmana [3].

Powyższe analizy wykonano w trzech równoległych powtórzeniach, a wyniki badań przedstawione w tabelach i na wykresach stanowią ich średnie wartości.

Omówienie wyników i dyskusja

Charakterystykę parametrów technologicznych prowadzenia ciasta z 20- i 30-procentowym udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej przygotowanego metodami: A, B i C przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Wpływ całościarnowej mąki jęczmiennej na parametry technologiczne prowadzenia ciasta pszenno-jęczmiennego.

Effects of whole barley flour on technological parameters of wheat-barley dough making.

Ciasto Dough	Całościarnowa mąka jęczmienna Wheat barley flour [%]	Kwasowość faz [stopnie] Acidity [degree]			Wydajność ciasta Dough yield [%]	Czas fermentacji Fermentation time [min]		Czas wypieku Baking time [min]
		zaczątek starter	kwask sour	ciasto dough		ciasta dough	kęsów pieces	
Metoda jednofazowa (A) / One-stage method (A)								
PJ*	20	-	-	3,8	164,0	60	38	25
WB*	30	-	-	3,8	169,5	60	38	25
Metoda z fazą wstępnego rozmiękania całościarnowej mąki jęczmiennej (B) Whole baryle flour soak - stage method (B)								
PJ*	20			2,8	164,4	60	25	25
WB*	30	-	-	3,1	165,6	60	25	25
Metoda trójfazowa na kwasach jęczmiennych (C) / Three-stage method with barley sour dough (C)								
PJ*	20	8,5	7,5	4,5	177,8	25	47	25
WB*	30	8,5	7,5	4,8	178,8	25	47	25

* PJ – ciasto pszenno-jęczmienne / WB – wheat-barley dough.

Kwasowość ciasta z 20- i 30-procentowym udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej, otrzymanego powyższymi metodami, była zależna od sposobu wprowadzania całościarnowej mąki jęczmiennej do masy ciasta, warunków fermentacji faz, a w mniejszym stopniu od ilości całościarnowej mąki jęczmiennej wprowadzanej jako zamiennik mąki pszennej. Wydajność ciasta pszenno-jęczmiennego wahała się w granicach 164–179%, a najwyższą jej wartość uzyskano przy zastosowaniu metody C. Ponadto ciasta z 30-procentowym udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej cechowały się nieznacznie większą wydajnością niż ciasta z 20-procentowym jej udziałem. Czas fermentacji końcowej kęsów ciasta pszenno-jęczmiennego otrzymanego metodą B był zdecydowanie krótszy niż kęsów ciasta otrzymanych metodami A i C.

Wypiek laboratoryjny wszystkich prób prowadzono przy stałym ubytku wypiekowym 7%.

Wykazano, że zwiększenie udziału całościarnowej mąki jęczmiennej w masie ciasta, jak również metoda prowadzenia ciasta, przyczyniają się do zwiększenia jego wydajności i kwasowości. Wartości te jednak bardziej różnicuje sposób przygotowania ciasta pszenno-jęczmiennego.

Procentowy udział całościarnowej mąki jęczmiennej w masie ciasta i metoda jego wytwarzania wpływają na zróżnicowanie wskaźników jakościowych pieczywa pszenno-jęczmiennego, takich jak: objętość, współczynniki objętości i porowatości oraz kwasowość miękiszu (tab. 3). Pieczywo z 20-procentowym udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej, otrzymane metodami: A, B i C, wykazywało większą objętość niż pieczywo z 30-procentowym jej udziałem. Największą jednak objętością cechowało się pieczywo z 20 i 30-procentowym udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej uzyskane metodą B.

Wilgotność pieczywa z 20- i 30-procentowym udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej była wyrównana. Kwasowość była zróżnicowana we wszystkich badanych próbkach pieczywa. Niezależnie od procentowego udziału całościarnowej mąki jęczmiennej pieczywo otrzymane na kwasach jęczmiennych (metoda C) cechowało się zdecydowanie większą kwasowością niż próbki otrzymane metodami A i B.

W wyniku ogólnej oceny sensorycznej pieczywo z 20- i 30-procentowym udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej, otrzymane metodą B, uzyskało 9,6 pkt, a metodami A i C odpowiednio 9,5 i 9,4 pkt, z wyjątkiem pieczywa z 30-procentowym jej udziałem, otrzymanego metodą C (tab. 3). Pieczywo to uzyskało najniższą notę (8,9 pkt) ze względu na bardziej zbity, o mniejszej elastyczności miękisz.

Miękisz chleba pszenno-jęczmiennego był lekko wilgotny w dotyku, o dobrej elastyczności i dość równomiernej porowatości oraz walorach smakowo-zapachowych zbliżonych do pieczywa żytnio-pszenne (metody B i C).

Zaobserwowano, że stosując trzy różne metody prowadzenia ciasta pszenno-jęczmiennego otrzymano pieczywo o dobrych cechach jakościowych. Najlepsze efekty technologiczne uzyskano stosując metodę B. Metody A i C dały także dobre efekty, ale tylko w odniesieniu do pieczywa z 20-procentowym udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej.

Polepszenie właściwości technologicznych ciasta i pieczywa można osiągnąć stosując dodatki technologiczne. Wśród wielu informacji dotyczących efektów technologicznych dodatku glutenu witalnego lub/i emulgatorów na cechy ciasta i jakość pieczywa pszenne, pszenno-żytniego czy żytniego [4, 23], niewiele jest prac na temat ich wpływu na układ ciasta pszenno-jęczmiennego, o specyficznej strukturze i stosunkowo dużej zawartości substancji rozpuszczalnych między innymi pentozanów, β -glukanów [2, 13, 14].

Tabela 3

Wpływ całoziarnej mąki jęczmiennej na cechy jakościowe pieczywa otrzymanego przy stosowaniu różnych metod prowadzenia ciasta.
Effects of wholegrain barley flour on the quality of breads obtained using different dough making methods.

Pieczywo Bread	Całoziarowa mąka jęczmienna Wholegrain barley flour [%]	Objętość pieczywa [cm ³ /100 g mąki] Bread volume [cm ³ /100 g of flour]	Współczynnik objętości [punkty] Volume index [score]	Współczynnik porowatości [punkty] Porosity index [score]	Wilgotność miększu [%] Crumb moisture [%]	Kwasowość miększu [stopnie] Crumb acidity [degree]	Ocena sensoryczna [punkty] Sensory evaluation [score]
Metoda jednofazowa (A) / One-phase method (A)							
PJ*	20	432	116	95	46,7	1,6	9,5
WB*	30	369	69	90	46,8	1,9	9,4
Metoda z fazą wstępnego rozmiękania całoziarnej mąki jęczmiennej (B) Method (B) with a wholegrain barley flour soaking phase							
PJ*	20	464	132	95	46,9	1,9	9,6
WB*	30	424	112	95	46,5	2,0	9,6
Metoda trójfazowa na kwasach jęczmiennych (C) / Three-phase method (C) with barley sour dough (C)							
PJ*	20	438	119	90	46,7	3,9	9,4
WB*	30	382	82	85	46,7	4,7	8,9

* PJ – pieczywo pszenno-jęczmienne / WB – wheat-barley breads

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że dodatki glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej wprowadzone do ciasta z 20–40% udziałem całoziarnej mąki jęczmiennej (metoda A) powodowały zmianę jego wydajności i kwasowości (tab. 4). Przy 3, 5 i 7% dodatku glutenu witalnego wydajność ciasta z 20-procentowym udziałem całoziarnej mąki jęczmiennej zwiększyła się odpowiednio o 4,8, 6,9 i 6,4% w porównaniu z ciastem pszenno-jęczmiennym bez dodatku. Powyższe poziomy dodatku glutenu witalnego, jak również 0,5% dodatek lecytyny sojowej, wprowadzone do ciasta z 30–40% udziałem całoziarnej mąki jęczmiennej, nieznacznie wpłynęły na zmianę jego wydajności, z wyjątkiem próbki zawierającej 40-procentowy udział mąki jęczmiennej i 7% dodatek glutenu witalnego. Dodatek kompleksowy w ilości 7% glutenu witalnego i 0,5% lecytyny sojowej wyraźnie zwiększył wydajność ciasta pszenno-jęczmiennego. Kwasowość ciasta pszenno-jęczmiennego z dodatkami glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej były większe niż w próbkach bez tych dodatków. Dodatki glutenu witalnego lub lecytyny sojowej do ciasta pszenno-jęczmiennego wpływały na zwiększenie jego wydajności i kwasowości. Dodatek kompleksowy natomiast wyraźnie zwiększał tylko jego wydajność. Uzyskane rezultaty potwierdzają sugestie innych autorów [13, 14], że rodzaj i poziom dodatku technologicznego ma wyraźny wpływ na jakość ciasta i chleba pszenno-jęczmiennego.

Dane charakteryzujące wyniki wypieku laboratoryjnego pieczywa z 20–40% udziałem całoziarnej mąki jęczmiennej i dodatkami technologicznymi przedstawiono w tab. 5. i na rys. 1. i 2. Udział całoziarnej mąki jęczmiennej, w ilości 20, 30 i 40%, w masie ciasta otrzymanego metodą A, wpłynął na zróżnicowanie cech jakościowych pieczywa, takich jak: współczynnik objętości, współczynnik porowatości, wilgotność, kwasowość struktura miększu jego smak i zapach, w porównaniu z pieczywem pszennym.

Objętość pieczywa z 20–40% udziałem całoziarnej mąki jęczmiennej zmniejszyła się odpowiednio o 47, 109 i 142 cm³ w porównaniu z pieczywem pszennym (rys. 1). Pieczywo pszenno-jęczmienne cechowało się mniejszą objętością, ale większą wilgotnością i kwasowością niż pieczywo pszenne (tab. 5).

Całoziarowa mąka jęczmienna, podobnie jak inne produkty jęczmienne, w masie ciasta przyczyniała się do osłabienia właściwości lepkością glutenu, a tym samym zmniejszenia zdolności do zatrzymywania gazów w układzie ciasta pszenno-jęczmiennego. Przypuszczalnie efekt ten jest związany ze wzrostem ilości białek rozpuszczalnych i frakcji azotu niebiałkowego, a zmniejszaniem się ilości frakcji prolamin lub interakcji niekorzystnie oddziałujących na zdolność zatrzymywania gazów [2, 10, 16].

Tabela 4

Wpływ całościarnowej mąki jęczmiennej, glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej na parametry technologiczne prowadzenia ciasta pszenno-jęczmiennego.
Effects of whole barley flour, vital gluten or/and soy lecithin on the technological parameters of a wheat-barley dough making process

Ciasto Dough	Poziom dodatku Addition level [%]		Wydajność ciasta Dough yield [%]	Kwasowość ciasta po fermentacji [stopnie] Dough acidity after fermentation [degree]	Czas fermentacji Fermentation time [min]		Czas wypieku Baking time [min]
	Gluten witalny Vital gluten	Lecytyna sojowa Soy lecithin			Ciasto Dough	Kęsy Piec- es	
Metoda jednofazowa (A) / One-phase method (A)							
Pszenne / Wheat	-	-	160,4	1,3	60	45	20
	-	-	164,0	3,8	60	38	25
	3	-	168,8	4,0	60	38	25
20% CMJ*	5	-	170,9	4,2	60	38	25
20% WBF*	7	-	170,4	4,6	60	38	25
	-	0,5	171,1	4,2	60	38	25
	7	0,5	184,6	3,4	60	38	25
	-	-	169,5	3,8	60	38	28
	3	-	169,8	4,4	60	38	28
30% CMJ*	5	-	169,3	4,1	60	38	28
30% WBF*	7	-	170,5	4,3	60	38	28
	-	0,5	170,8	4,2	60	38	28
	7	0,5	185,2	3,6	60	38	28
	-	-	171,0	4,0	60	38	30
	3	-	171,1	4,5	60	38	30
40% CMJ*	5	-	171,6	4,7	60	38	30
40% WBF*	7	-	179,0	4,3	60	38	30
	-	0,5	171,3	4,3	60	38	30
	7	0,5	187,2	4,0	60	38	30

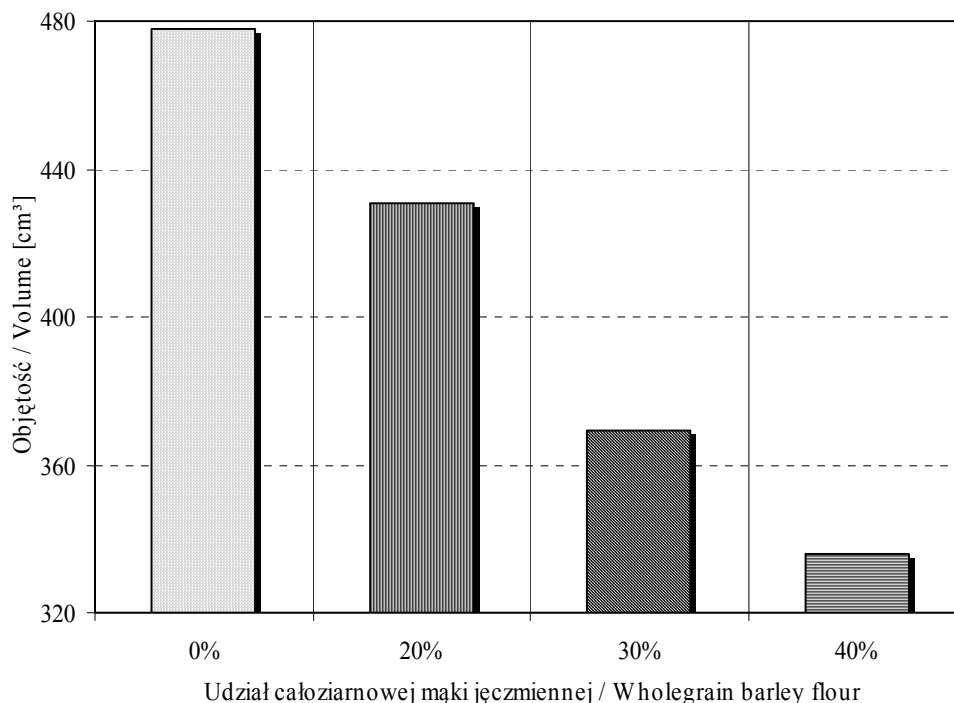
* CMJ – pieczywo z udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej / WBF – breads containing wholegrain barley flour

Tabela 5

Wpływ całoziarnowej mąki jęczmiennej, glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej na cechy jakościowe pieczywa.
Effects of whole barley flour, vital gluten or/and soy lecithin on the qualitative parameters of breads.

Pieczywo Bread	Poziom dodatku Amount level of an additive [%]		Wyróżniki jakościowe pieczywa Bread quality indicators					Ocena sensoryczna [punkty] Sensory evaluation [score]
	Gluten witalny Vital gluten	Lecytyna sojowa Soy lecithin	Wydajność pieczywa Bread yield [%]	Współczynnik objętości [punkty] Volume index [score]	Współczynnik porowatości [punkty] Porosity index [score]	Wilgotność miększu [%] Crumb moisture [%]	Kwasowość miększu [stopnie] Crumb acidity [degree]	
Metoda jednofazowa (A) / One-phase method (A)								
Pszenne / Wheat	-	-	136,6	139	90	43,9	1,3	10,0
	-	-	137,9	116	90	46,7	1,6	9,5
	3	-	148,2	123	90	46,6	1,8	9,5
	5	-	152,5	125	90	46,3	1,9	9,5
	7	-	151,8	127	95	46,5	2,0	9,7
	-	0,5	152,8	118	95	43,9	2,0	9,8
	7	0,5	165,3	131	95	46,6	1,7	10,0
	-	-	149,2	69	80	46,8	1,9	9,4
	3	-	152,6	70	90	46,5	1,8	9,4
	5	-	152,5	99	90	46,4	1,7	9,4
	7	-	152,9	102	90	46,2	1,8	9,7
	-	0,5	153,7	85	85	44,5	1,7	9,6
	7	0,5	168,3	113	90	48,0	1,8	10,0
	-	-	143,8	36	80	46,1	2,0	8,7
	3	-	154,7	39	80	46,3	1,9	8,9
	5	-	155,8	44	80	47,1	1,5	8,9
	7	-	160,4	48	80	47,2	1,8	9,1
	-	0,5	153,1	40	80	45,6	1,7	9,0
	7	0,5	170,5	100	90	47,0	1,8	9,7

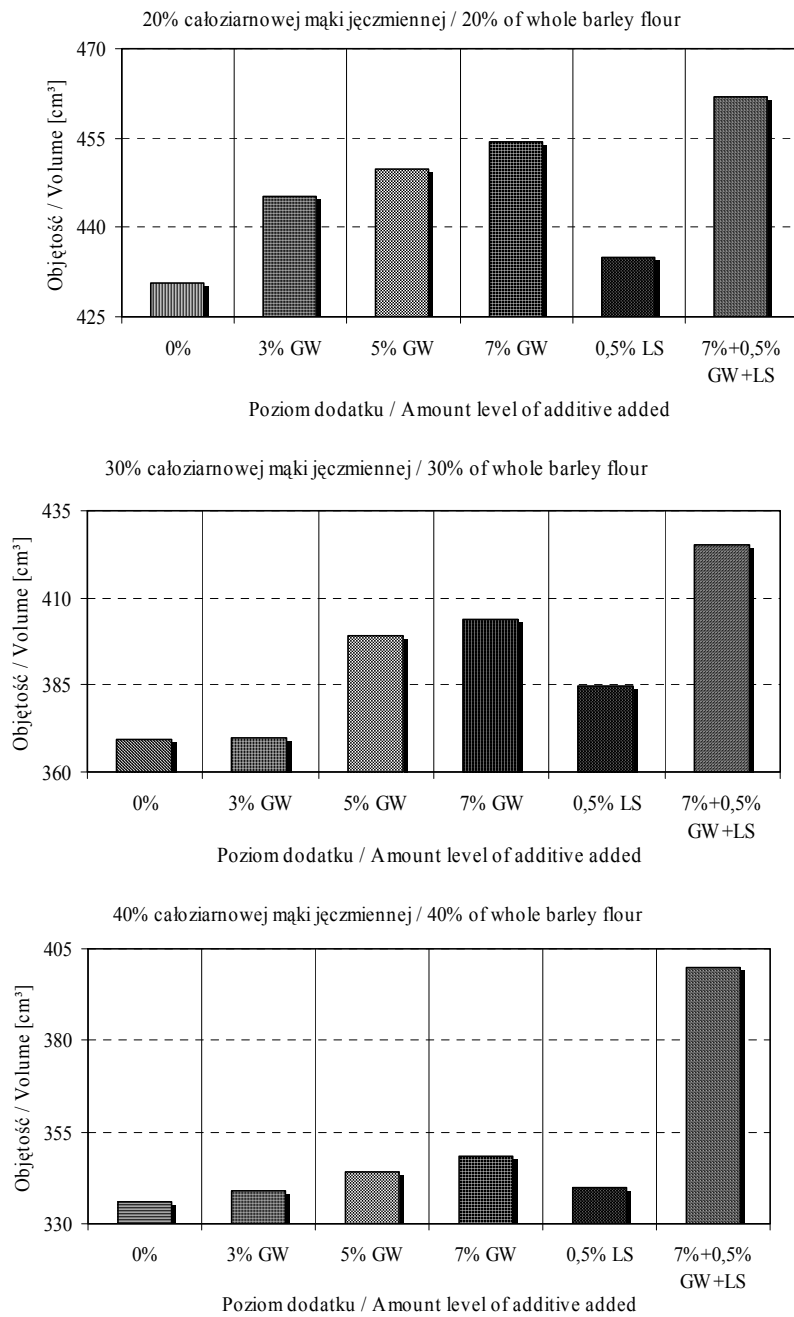
* CMJ – pieczywo z udziałem całoziarnowej mąki jęczmiennej / WBF – breads containing wholegrain barley flour



Rys. 1. Wpływ całościarnowej mąki jęczmiennej na objętość chleba.

Fig. 1. Effects of whole barley flour on loaf volume of bread.

Zastosowane dodatki glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej wpłynęły wyraźnie na poprawę cech jakościowych pieczywa pszenno-jęczmiennego (tab. 5, rys. 2). Objętość pieczywa z 20–40% udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej i dodatkami: glutenu witalnego (3, 5, 7%), lecytyny sojowej (0,5%) oraz glutenu witalnego (7%) i lecytyny sojowej (0,5%) była większa niż pieczywa bez tych dodatków. Największą objętością cechowało się pieczywo pszenno-jęczmienne zawierające dodatek kompleksowy (gluten witalny – 7% i lecytyna sojowa – 0,5%). Wartości współczynnika porowatości miększu pieczywa pszenno-jęczmiennego z dodatkami glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej były wyższe niż pieczywa pszenno-jęczmiennego bez dodatku. Pieczywo z udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej, w porównaniu z pieczywem pszennym, cechowało się większą wilgotnością i kwasowością, a dodatki glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej w niewielkim stopniu wpływały na zmianę obu tych wskaźników.



Rys. 2. Wpływ glutenu witalnego (GW) lub/i lecytyny sojowej (LS) na objętość chleba pszenno-jęczmiennego.

Fig. 2. Effects of vital gluten (GW) or/and soy lecithin (LS) on loaf volume of wheat-barley bread.

W ocenie sensorycznej pieczywo z 20–40% udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej uzyskało niższe noty punktowe niż pieczywo pszenno-jęczmienne z dodatkiem glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej (tab. 5). Obniżenie not w ocenie sensorycznej pieczywa bez dodatku wynikało ze zmian w wyglądzie zewnętrznym (zmniejszona objętość) oraz we właściwościach miękiszu, takich jak porowatość i elastyczność. Walory smakowo-zapachowe pieczywa pszenno-jęczmiennego były zbliżone do chleba pszennego typu Graham. Dodatki glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej poprawiły wyraźnie jakość pieczywa z udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej. Największą liczbę punktów uzyskało pieczywo z dodatkiem kompleksowym, które cechowało się bardzo dobrą elastycznością miękiszu i równomierną porowatością, w porównaniu z pozostałymi próbkami. Niższe noty uzyskało pieczywo z 20–40% udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej i 0,5% dodatkiem lecytyny sojowej, a także dodatkiem glutenu witalnego, z wyjątkiem 7% poziomu jego dodatku. Mimo, że jakość miękiszu badanego pieczywa z udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej i dodatkami glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej była zróżnicowana, to jego wyjątkowa smakowość nie ulegała zmianie.

Zaobserwowano, że dodatki technologiczne wprowadzone do ciasta pszenno-jęczmiennego, sporządzanego metodą jednofazową, dają możliwość zwiększenia ilości całościarnowej mąki jęczmiennej w pieczywie do 40%.

Wnioski

1. Udział całościarnowej mąki jęczmiennej w masie ciasta, metody prowadzenia ciasta oraz stosowane dodatki technologiczne wpływają na zróżnicowanie cech ciasta i pieczywa pszenno-jęczmiennego.
2. Ciasta z udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej, otrzymane metodą trójfazową na kwasach jęczmiennych, cechują się wyższą wydajnością i kwasowością oraz dłuższym czasem fermentacji kęsów niż otrzymane metodami: jednofazową i z fazą wstępnego rozmiękania całościarnowej mąki jęczmiennej.
3. W celu otrzymania pieczywa z 20–30% udziałem całościarnowej mąki jęczmiennej uzyskano najlepsze efekty technologiczne przy stosowaniu metody z fazą wstępnego rozmiękania całościarnowej mąki jęczmiennej, a w odniesieniu do pieczywa zawierającego tylko 20% całościarnowej mąki jęczmiennej również metodą jednofazową.
4. Całościarnowa mąka jęczmienna stosowana jako zamiennik mąki pszennej w ilości do 40% powoduje znaczne zmniejszenie objętości pieczywa, współczynników: objętości i porowatości oraz zwiększenie wilgotności i kwasowości pieczywa otrzymanego metodą jednofazową.
5. Dodatki glutenu witalnego lub/i lecytyny sojowej polepszają jakość ciasta i pieczywa pszenno-jęczmiennego. Dodatek kompleksowy (gluten witalny 7% i lecytyna

na sojowa 0,5%) uznano za najbardziej efektywny przy 40% udziale całościarnowej mąki jęczmiennej w pieczywie.

Literatura

- [1] Basman A., Köksel H.: Properties and composition of Turkish flat bread (Bazlama) supplemented with barley flour and wheat bran. *Cereal Chem.*, 1999, **76**, 506-511.
- [2] Bhatti R.S.: Non-malting uses of barley. In: MacGregor A.W., Bhatti R.S. (eds), *Barley: Chemistry and Technology*. AACC, St. Paul, MN, USA, 1993, pp. 355-417.
- [3] Ćwiczenia z technologii zbóż i strączkowych jadalnych – pod red. S. Jankowskiego. Wyd. AR w Poznaniu, 1973.
- [4] Flaczyk E., Kawka A.: Zastosowanie wybranych dodatków technologicznych do produkcji pieczywa. W: *Surowce, technologia i dodatki a jakość żywności* - pod red. J. Czapskiego, W. Grajka, E. Pospiecha. Wyd. AR w Poznaniu, 1999, s. 167-186.
- [5] Gąsiorowski H.: Aspekty profilaktyczne owsa i jego przetworów. W: *Owies - chemia i technologia* – pod red. H. Gąsiorowskiego, PWRiL, Poznań 1995, s. 117-123.
- [6] Gąsiorowski H.: Skład chemiczny i wartość odżywcza jęczmienia. *Przegl. Zboż.-Młyn.*, 1998, **42**, 2-3.
- [7] Gąsiorowski H., Kawka A.: Jak wykorzystać żyto, jęczmień i owies do produkcji pieczywa specjalnego. *Mat. Międzyn. Konf. Nauk.*, Bydgoszcz, 1998, s. 49-55.
- [8] Górecka D., Kawka A., Gąsiorowski H., Sroczyńska B., Węgłerska-Smolarkiewicz E.: Charakterystyka błonnika pokarmowego w chlebie z udziałem płatków jęczmiennych. *Przegl. Piek. Cuk.*, 1998, **45**, 2-3.
- [9] Kawka A.: Wykorzystanie produktów jęczmiennych do produkcji chleba. W: *Jęczmień - chemia i technologia* - pod red. H. Gąsiorowskiego, PWRiL, Poznań 1997, s. 231-241.
- [10] Kawka A.: Jęczmień i jego produkty. Charakterystyka, otrzymywanie i wykorzystanie w żywieniu człowieka. *Rocz. AR Poznań, Rozpr. Nauk.*, 342, 2004, s. 1-78.
- [11] Kawka A., Górecka D., Gąsiorowski H.: The effects of commercial barley flakes on dough characteristic and bread composition. *Electr. J. Pol. Agric. Univ. Food Sci. Techn.* 1999, **2**, 1-8.
- [12] Kawka A., Konieczna E.: Wpływ wysokobłonnikowego produktu jęczmiennego na jakość i skład chemiczny pieczywa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2002, **9 (4)**, 71-81.
- [13] Kawka A., Nyk Z.: Wpływ wybranych dodatków technologicznych na cechy ciasta i jakość chleba pszenno-jęczmiennego. *Przegl. Piek. Cuk.*, 2001, **49**, 8-11.
- [14] Kawka A., Wład B.: Wpływ glutenu witalnego i stearylo-2- mleczanu sodu na cechy ciasta i jakość chleba pszenno- jęczmiennego. *Przegl. Piek. Cuk.*, 1999, **47**, 6-7.
- [15] Klameczyński A.P., Czuchajowska Z.: Quality of flours from waxy and non-waxy barley for production of baked products. *Cereal Chem.*, 1999, **76**, 530-535.
- [16] Knuckles B.E., Hudson C.A., Chiu M. M., Sayre R.N.: Effect of β -glucan barley fractions in high-fiber bread and pasta. *Cereal Foods World*, 1997, **42**, 94-99.
- [17] Marklinder I., Sundberg B.: Barley sour doughs fermented by *Lactobacillus* spp. for making beta-glucan enriched bread. *Book of ICC/SCF International Symposium, Uppsala, Sweden*, 1992, pp. 250-255.
- [18] McIntosh G., Jorgensen L., Royle P., Kerry A.: A role for barley foods in human health and nutrition. *Book of ICC/SCF International Symposium, Uppsala, Sweden*, 1992, pp. 152-158.
- [19] Newman C.W., Newman R.K.: Nutritional aspects of barley as a food grain. *Book of ICC/SCF International Symposium, Uppsala, Sweden*, 1992, pp. 134-138.

- [20] Newman, R.K., Ore K.C., Abbot J., Newman W.: Fiber enrichment of baked products with barley milling fraction. *Cereal Foods World*, 1998, **43**, 23-25.
- [21] Normy, receptury, porady piekarskie. Rolniczo-Handlowa Izba Gosp. „Samopomoc Chłopska”, Zakład Badawczy Przemysłu Piekarskiego (ZBPP), Warszawa 1993, 1997.
- [22] Prentice N., D'Appolonia B. L.: High-fiber bread containing brewer's spent grain. *Cereal Chem.*, 1977, **54**, 1084-1095.
- [23] Spicher G., Stephan H. (ed.): *Handbuch Sauerteig - Biologie, Biochemie, Technologie* Berhr's Verlag GmbH & Co., Hamburg, Niemcy 1993.
- [24] Webster F.H. (ed.): *Oats: Chemistry and Technology*. AACC, St. Paul, MN, USA 1986.

THE EFFECTS OF WHOLEGRAIN BARLEY FLOUR AND SELECTED TECHNOLOGICAL ADDITIVES ON THE QUALITY OF WHEAT-BARLEY BREAD

S u m m a r y

The objective of the study was to determine effects of wholegrain barley flour on the quality of wheat-barley bread manufactured using different dough making methods. Additionally, it was assessed the effect of vital gluten or/and soy lecithin additives on the quality of bread containing up to 40% of the wholegrain barley flour. The study proved that the best quality had breads containing 20% to 30% of the wholegrain barley flour, and produced using a method with an initial phase of soaking barley flour. The comparably good quality had breads containing 20% of barley flour and made using one- and three-phase methods. When wholegrain barley flour was added, and its amount replaced 40% of the wheat flour in the breads, the results were: a reduced bread volume, and a deteriorated crumb structure of the breads. Furthermore, it was stated that vital gluten or/and soy lecithin additives, added to a bread dough containing 20% to 40% of whole barley flour, and made using a single-phase method, improved the quality of both the dough and the bread features. A complex additive (7% of vital gluten and 0.5% of soy lecithin) was found and assessed as the most effective agent if applied in the production of breads with up to 40% of wholegrain barley flour.

Key words: whole barley flour, dough making methods, technological additives, wheat-barley bread quality. ☒

MAŁGORZATA DAREWICZ, JERZY DZIUBA

STRUKTURA A WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE BIAŁEK MLEKA

Streszczenie

W pracy przedstawiono i zanalizowano wyniki badań dotyczących zależności między strukturą białek mleka a ich wybranymi właściwościami funkcjonalnymi. Ważnymi czynnikami wpływającymi na właściwości funkcjonalne białek są wymiary molekularne, hydrofobowość, ładunek i elastyczność. Na właściwości funkcjonalne mają wpływ także takie czynniki zewnętrzne, jak: temperatura, pH, siła jonowa czy obecność innych cząsteczek. Podstawową przyczynę różnic we właściwościach funkcjonalnych między białkami upatruje się w ich odmiennej strukturze. Właściwości funkcjonalne można modyfikować metodami fizycznymi, chemicznymi, enzymatycznymi i genetycznymi. Rozpuszczalność jest właściwością fizykochemiczną, od której mogą zależeć inne właściwości funkcjonalne. Białka mogą adsorbować na granicy faz olej/woda i powietrze/woda i obniżać napięcie powierzchniowe, zmieniając jednocześnie swoją strukturę. Dobre właściwości powierzchniowe białek łączy się ze specyficzną dystrybucją ich reszt hydrofobowych i hydrofilowych w ściśle odizolowane obszary, połączoną z zapewnieniem minimalnej masy cząsteczkowej. Stwierdzono istnienie związku między udziałem struktury α -helikalnej, indukowanej adsorpcją na hydrofobowej powierzchni, a kształtowaniem się zdolności do tworzenia emulsji przez peptydy. W opisywaniu zależności między strukturą a funkcją białek coraz większą rolę zaczynają odgrywać wielowymiarowe metody statystyczne. Znajomość molekularnych podstaw kształtowania się rozpuszczalności, zdolności do tworzenia/stabilizowania emulsji/piany przez białka jest podstawową wiedzą w badaniach nad zastosowaniami białek mleka w żywności o pożądanym i zaprojektowanym cechach.

Słowa kluczowe: białka mleka, emulsje, modele statystyczne, piany, rozpuszczalność, struktura.

Wprowadzenie

Istnieje wiele definicji funkcjonalnych właściwości białek żywności. Pour-El [44] określa właściwości funkcjonalne jako „jakiegokolwiek właściwości produktu żywnościowego lub składników żywności, wyłączając funkcję odżywczą, które decydują o ich zastosowaniu”. Według Kinselli [30], funkcjonalne właściwości białek obecnych w produktach żywnościowych „to te fizyczne i chemiczne właściwości, które wpływają na zachowanie się białek w produktach żywnościowych podczas ich

Dr hab. M. Darewicz, prof. UWM, prof. dr hab. J. Dziuba, Katedra Biochemii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Pl. Cieszyński 1, 10-928 Olsztyn

wytwarzania, przechowywania i spożywania”. Z kolei Sikorski [50] definiuje właściwości funkcjonalne białek jako „te, dzięki którym w produkcie żywnościowym zawierającym białka w odpowiednich ilościach, poddanym obróbce przy optymalnych parametrach, wytwarzają się pożądane cechy sensoryczne”. Białka mogą pełnić w produktach surowcach i produktach żywnościowych rolę składników o określonych właściwościach funkcjonalnych i biologicznych, co może być wykorzystane w produkcji żywności funkcjonalnej [32]. W Europie, za żywność funkcjonalną przyjęto uważać żywność, co do której „udowodniono korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu ponad efekt odżywczy, który to wpływ polega na poprawie stanu zdrowia oraz samopoczucia i/lub zmniejszeniu ryzyka chorób” [28]. Biologiczna aktywność białek przypisywana jest obecności w sekwencjach ich łańcuchów polipeptydowych, fragmentów obdarzonych specyficzną aktywnością [18, 19, 32].

Właściwości funkcjonalne można rozpatrywać jako: właściwości powierzchniowe, np. zdolność do tworzenia i stabilizowania emulsji (powierzchnia międzyfazowa olej/woda), zdolność do tworzenia i stabilizowania piany (powierzchnia międzyfazowa powietrze/woda) czy rozpuszczalność (oddziaływania woda/białko); właściwości hydrodynamiczne (oddziaływania międzycząsteczkowe) np. żelifikujące czy właściwości tekstury oraz sensoryczne (smak i zapach). Właściwości funkcjonalne białek są pochodną specyficznych cech ich cząsteczek [29]: wielkości, kształtu, elastyczności, podatności na denaturację, sekwencji aminokwasów oraz ich hydrofilowości i hydrofobowości, ładunku i jego rozmieszczenia, charakteru i liczby struktur mikrodomenowych, zdolności adaptacji całej cząsteczki lub jej domen składowych do zmiennych warunków środowiskowych, charakteru wzajemnych interakcji białek z innymi składnikami żywności, a także najważniejszych cech środowiska: pH, temperatury, ciśnienia oraz siły jonowej. Na kształtowanie się właściwości funkcjonalnych wpływa fakt tworzenia przez białka kompleksowych układów z innymi składnikami żywności [53]. Procesy technologiczne, jakim poddawane są surowce żywnościowe, również odgrywają znaczącą rolę w kształtowaniu właściwości funkcjonalnych białek.

Prężnie rozwijające się metody bioinformatyczne oraz wielowymiarowe metody statystyczne skutecznie poszerzyły spektrum metod badawczych stosowanych w charakterystyce białek jako nośników zdefiniowanych właściwości funkcjonalnych. Wykorzystując wielowymiarowe metody statystyczne opracowano modele matematyczne umożliwiające przewidywanie właściwości funkcjonalnych białek na podstawie znajomości ich właściwości molekularnych [13, 34, 36, 59, 60]. Metody bioinformatyczne mogą być pomocne w hierarchicznym klasyfikowaniu białek w tzw. homologiczne rodziny z uwzględnieniem poziomu organizacji ich struktury, a następnie w prawidłowym formułowaniu hipotez na temat zależności między właściwościami funkcjonalnymi a molekularnymi i ich weryfikowaniu jako uniwersalnych hipotez w stosunku do homologicznych grup białek [17, 38, 39].

Strukturalne właściwości białek

W większości białek prawie wszystkie hydrofilowe grupy funkcyjne zlokalizowane są na powierzchni cząsteczek białkowych, ale nie wszystkie grupy hydrofobowe umieszczone są w ich wnętrzu. W przypadku białek globularnych 40-50% powierzchni cząsteczek mogą zajmować reszty aminokwasowe o charakterze hydrofobowym [50]. Ich specyficzne rozmieszczenie w łańcuchach polipeptydowych wpływa na ukształtowanie powierzchni cząsteczek białek, zdolności do tworzenia oligomerów i struktur micelarnych oraz właściwości funkcjonalne. Przykładowo, w kazeinach- α_{s1} i - β prawie 2/3 ich łańcuchów polipeptydowych jest silnie hydrofobowa [52]. W kazeinie- β wszystkie reszty fosfoserynowe i większość wolnych grup karboksylowych umieszczone są we fragmentach N-końcowych, zaś w kazeinie- α_{s1} w obrębie między pozycją 40. a 80. w liczącym 199 aminokwasów łańcuchu peptydowym. Amfifilowy charakter łańcuchów polipeptydowych obydwu białek, z dużym udziałem łatwo dostępnych niepolarnych reszt aminokwasowych powoduje, że wykazują one silną tendencję do adsorbowania na powierzchniach hydrofobowych [14]. Stwierdzono, że N-końcowa i C-końcowa części łańcuchów polipeptydowych kilku cząsteczek kazeiny- α_{s1} mogą łączyć się, tworząc układ liniowy [25]. Z kolei cząsteczki kazeiny- β w wyniku oddziaływań hydrofobowych mogą łączyć się w micelle ze zwartym, położonym centralnie, hydrofobowym rdzeniem okrytym luźną warstwą pozostałych części łańcuchów polipeptydowych. Obok specyficznej dystrybucji reszt aminokwasowych na właściwości funkcjonalne ma wpływ skład aminokwasowy. Około 17% reszt aminokwasowych w kazeinie- β i 8,5% w kazeinie- α_{s1} to reszty prolinowe. Ich w miarę jednolite rozmieszczenie wzdłuż łańcuchów polipeptydowych ww. białek oraz brak reszt cysteiny utrudnia formowanie struktur uporządkowanych. Darewicz i wsp. [10, 11], stosując metodę dichroizmu kołowego ustalili, że ok. 10% cząsteczki kazeiny- β ma strukturę α -helikalną, ok. 15% – pofałdowanej kartki, a ok. 73% – nieuporządkowanego kłęбка. Holt i Sawyer [24] zaproponowali, aby zaliczyć kazeinę- β do tzw. białek reomorficznych.

Dużą rolę w kształtowaniu struktury i funkcji białek przypisuje się aminokwasom siarkowym [3]. Grupy tiolowe mogą ulec utlenieniu, tworząc wewnątrz- i międzycząsteczkowe mostki dwusiarczkowe. W wyniku takich interakcji zmienia się struktura, a wraz z nią funkcje pełnione przez białka. Tworzenie poprzecznych mostków dwusiarczkowych stabilizuje strukturę trzeciorzędową białek oraz wpływa na właściwości funkcjonalne np. ma znaczenie w poprawie cech jakościowych pieczywa wyprodukowanego z dodatkiem odtłuszczonego proszku mlecznego [41].

Podstawową przyczynę różnic we właściwościach funkcjonalnych między białkami upatruje się w ich odmiennej strukturze [58], stąd jako skrajne przykłady takich różnic można przytoczyć kazeinę- β i laktoglobulinę- β . Kazeina- β to fosfoproteina o masie cząsteczkowej ok. $24 \cdot 10^3$ Da stanowiąca ok. 35% ogólnej ilości

kazeiny w mleku [26]. Model cząsteczki kazeiny- β ma wygląd „krabopodobny” z dwoma dużymi, wykrzywionymi ramionami [33]. Kształt cząsteczki w przybliżeniu może być przedstawiony jako elipsoida, ze stosunkiem osi 2:1. Gdy pH wynosi 6,6, N-końcowy segment kazeiny- β obejmujący 21 reszt aminokwasowych jest źródłem wypadkowego ujemnego ładunku netto (-12), pozostała część cząsteczki jest praktycznie pozbawiona ładunku. Polarna domena białka, mimo że zawiera mniej reszt aminokwasowych niż domena hydrofobowa, wykazując większą elastyczność zajmuje większą objętość molekularną. Wyjątkową cechą kazeiny- β jest amfifilowa natura jej cząsteczki [15]. W temp. poniżej 4°C kazeina- β występuje jako monomer [25], w wyższej temperaturze i powyżej stężenia krytycznego tj. 1,5 mg/ml podlega samoasocjacji [51]. Z kolei laktoglobulina- β stanowi ok. 50% ogólnej ilości białek serwatkowych w mleku [4]. Jest ona białkiem globularnym zawierającym pięć reszt cysteinowych, z których cztery są zaangażowane w tworzenie mostków dwusiarczkowych, stabilizujących strukturę czwartorzędową. Wolna grupa tiolowa ułatwia tworzenie nowych struktur. W mleku, lub bardziej ogólnie w zakresie pH od 5,2 do 7,5, natywna laktoglobulina- β występuje jako dimer dwóch identycznych podjednostek o masie ok. $18 \cdot 10^3$ Da [23]. Przy pH powyżej 7,5 laktoglobulina- β denaturuje nieodwracalnie. Przy pH poniżej 3,5 ulega odwracalnej dysocjacji tworząc monomery, a przy pH między 3,5 i 5,2 odwracalnie tworzy formy tetramerów/oktamerów. W drugorzędowej strukturze laktoglobuliny- β udział struktury α -helikalnej wynosi ok. 1,5%, pofałdowanej kartki – ok. 43%, a nieuporządkowanego kłęбка – ok. 47%. Należy się więc spodziewać, że zarówno właściwości powierzchniowe, jak hydrodynamiczne zachowanie się globularnej laktoglobuliny- β i reomorficznej kazeiny- β będą całkowicie odmienne.

Rozpuszczalność

Spośród właściwości funkcjonalnych na szczególną uwagę zasługuje rozpuszczalność, która jest uważana za podstawową właściwość funkcjonalną białek żywności. Kinsella [30] podkreśla, że rozpuszczalność białek jest fizykochemiczną właściwością, od której mogą zależeć inne właściwości funkcjonalne. Właściwość ta w dużym stopniu określa możliwości zastosowania preparatów białkowych w przetwórstwie spożywczym. Dobrą rozpuszczalność białka często kojarzy się z jego dobrymi właściwościami funkcjonalnymi [48], chociaż niektórzy autorzy wskazują na brak zależności między tym wyróżnikiem a np. właściwościami emulgującymi białek [1]. Utrata rozpuszczalności wskutek obróbki żywności w drastycznych warunkach jest w wielu przypadkach wskaźnikiem denaturacji i następczego sieciowania białka [36]. Rozpuszczalność białek zależy od budowy i właściwości rozpuszczalnika, temperatury, pH środowiska, stężenia i ładunku jonów oraz charakteru oddziaływań z innymi cząsteczkami [6, 27]. Hydrofobowość powierzchniowa oraz wypadkowy ładunek

elektryczny to najważniejsze cechy charakterystyczne cząsteczki białka determinujące jego zachowanie wobec rozpuszczalnika. Hydrofobowość powierzchniowa jest wskaźnikiem charakteryzującym zróżnicowany potencjał elektrostatyczny różnych fragmentów powierzchni białka, decydującym o jej przestrzennym kształcie oraz zachowaniu wobec polarnych i apolarnych rozpuszczalników [47, 56]. Jednym ze sposobów modyfikowania charakteru hydrofobowego/hydrofilowego powierzchni cząsteczki białka mogą być modyfikacje chemiczne np. glikozylacja, a gęstości ładunku – modyfikacje enzymatyczne np. defosforylacja. Do modyfikowania właściwości kazeiny- β Darewicz i Dziuba [12] oraz Dziuba i wsp. [16] wykorzystali spontaniczny proces przyłączania pojedynczych cząsteczek cukrów redukujących, niekontrolowany przez enzymy, zwany nieenzymatyczną glikacją. Pod wpływem modyfikacji glukozą zaobserwowano poprawę rozpuszczalności kazeiny- β . Z kolei usunięcie reszt fosforanowych z kazeiny- β spowodowało spadek jej rozpuszczalności [11]. Nie zawsze białka zachowują się zgodnie z ogólnie przyjętym mechanizmem towarzyszącym ich wsalaniu i wysalaniu. W badaniach białek nasion bobiku Darewicz i wsp. [6] stwierdzili, że wyizolowane z nich albuminy i globuliny charakteryzują się odmiennymi cechami rozpuszczalności. Istniała graniczna wartość siły jonowej, powyżej której rozpuszczalność albumin nasion bobiku malała. Zaś globuliny bobiku, w przeciwieństwie do albumin, paradoksalnie zwiększały swoją rozpuszczalność wraz ze wzrostem siły jonowej nawet powyżej granicznej wartości, przy której albuminy ulegały wysalaniu. Zjawisko to tłumaczono oddysocjowaniem frakcji białkowych oraz zmianą stanu poligonowego cząsteczek białkowych, powodowanego zmianą wartości hydrofobowości powierzchniowej w wyniku ekranizującego wpływu jonów soli. Wynikiem takich zmian mogła być preferencyjna hydratacja molekuł białkowych. Znajomość opisanego mechanizmu zmian rozpuszczalności albumin i globulin może mieć znaczenie podczas ekstrakcji tych białek z roztworów wodnych oraz opracowywania technologii otrzymywania izolatów tych białek.

Zastosowanie białek zdecydowanie wzrasta wszędzie tam, gdzie zachowana jest ich wysoka rozpuszczalność. Szczególne znaczenie odgrywa ta właściwość w środowisku kwaśnym. Wówczas istnieje możliwość zastosowania białek jako dodatków do soków i napojów bez obawy, że zajdzie ich koagulacja.

Właściwości powierzchniowo czynne

Zjawisko stabilizowania emulsji lub piany przez białka jest spowodowane ich zdolnością do adsorbowania się na granicy faz, zmniejszania napięcia powierzchniowego i tworzenia spójnej warstwy wokół kropelek oleju lub pęcherzyków powietrza [57]. Eksperymenty dotyczące kinetyki adsorpcji białek globularnych dowiodły, że większość z nich musi pokonać barierę energetyczną, aby zaadsorbować się na granicy faz. Natura tej bariery nie jest do końca poznana, ale przypuszcza się, że jest to bariera ciśnienia i elektrostatyczna [56]. W najprostszym przypadku przy

nieobecności obu tych barier dyfuzja byłaby uzależniona od rozmieszczenia grup hydrofilowych i hydrofobowych na powierzchni cząsteczki białka i ich wzajemnych proporcji [5]. Jeżeli powierzchnia cząsteczek ma charakter hydrofilowy wówczas adsorpcja na granicy faz może nie zachodzić. Jeśli jednak zawiera dodatkowo tylko kilka reszt hydrofobowych i wejdą one w oddziaływanie z powierzchnią faz, wówczas adsorpcja może zachodzić. Innymi słowy adsorpcja na granicy faz powietrze/woda, olej/woda zależy od statystycznego prawdopodobieństwa zderzeń grup hydrofobowych znajdujących się na powierzchni cząsteczek białka z granicą faz.

Szczególny wpływ na adsorpcję i formowanie błon ma stabilność konformacji, zdolność do jej przearanżowania na granicy faz oraz symetria/asymetria rozmieszczenia polarnych i apolarnych grup funkcyjnych, a w konsekwencji amfifilowość struktur białkowych. Wielu autorów wskazywało na amfifilowość struktur białkowych jako warunek konieczny, po którego spełnieniu białka/peptydy charakteryzowały się dobrymi właściwościami powierzchniowymi, w tym emulgującymi i pianotwórczymi [9, 10, 15, 57]. Silnie amfifilowa natura kazeiny- β ułatwia jej koncentrację na powierzchni międzyfazowej, co jest wstępnym etapem procesu formowania emulsji lub piany [11, 15].

Piany

Piana powstaje wskutek zdyspergowania pęcherzyków powietrza w fazie ciekłej. Dodatek białka powoduje wzrost lepkości fazy wodnej, co zwiększa trwałość filmu międzyfazowego, a tym samym wytworzonej piany [58]. Białka obniżają napięcie powierzchniowe przez interakcje zarówno z cząsteczkami wody, jak i powietrzem, co pozwala na formowanie większej ilości pęcherzyków piany. Po adsorpcji cząsteczek białka na powierzchni pęcherzyków powietrza polarne reszty aminokwasów znajdujące się na powierzchni cząsteczek białek zwracają się w stronę cieczy, zaś niepolarne – w stronę powietrza. Wokół pęcherzyków powietrza powstaje spójny, elastyczny film międzyfazowy. Pęcherzyki nie łączą się ze sobą, gdyż stykają się jednoimiennie naładowanymi fragmentami cząsteczek białek. Objętość pęcherzyków powietrza może stanowić nawet 99% ogólnej objętości piany, a ich średnice zawierają się w przedziale 0,1–1 mm [55]. Do czynników wpływających na tworzenie piany można zaliczyć hydrofobowość powierzchniową, umiejscowienie hydrofobowych reszt aminokwasowych na powierzchni białka, obecność grup tiolowych, kationów i anionów, węglowodanów, lipidów. Dowiedziono, że białko o idealnych właściwościach pianotwórczych powinno mieć dużą hydrofobowość powierzchniową, dobrą rozpuszczalność, niski ładunek netto przy wartości pH produktu spożywczego, a jego łańcuch polipeptydowy powinien ulegać łatwo rozfałdowaniu [43]. Bigelow [2] podaje, że minimalna wartość hydrofobowości białka umożliwiająca adsorpcję na granicy faz wynosi ok. 1000 kJ/mol. Adsorpcja białka na powierzchni międzyfazowej powietrze/woda czy olej/woda związana jest z prawdopodobieństwem zetknięcia się

cząsteczki białka z powierzchnią międzyfazową. Im większa liczba obszarów hydrofobowych, tym większe będzie prawdopodobieństwo zetknięcia się tych obszarów z powierzchnią międzyfazową [5]. Dobre właściwości pianotwórcze wykazują białka podobne budową do kazeiny- β , która łatwo adsorbuje się na powierzchni powietrze/woda, zmniejszając w ten sposób napięcie powierzchniowe [7, 9, 10]. Jednakże piana utworzona z jej udziałem jest mało stabilna ze względu na słabe właściwości lepkosprężyste [43].

Stabilność uformowanych pian nie jest zjawiskiem niezmiennym. Stabilność piany zależy od zdolności białka do ochrony utworzonej piany przed działaniem sił grawitacji i mechanicznymi interakcjami. Stabilne piany są zwykle tworzone przy pH bliskim punktowi izoelektrycznemu białka, kiedy to siły oddziaływań elektrostatycznych są najmniejsze.

Procesy, które podwyższają wartość hydrofobowości polepszają właściwości pianotwórcze. Pianotwórcze właściwości białka można zwiększyć przez krótkotrwałe ogrzanie. Termiczna denaturacja w zakresie temp. 40-60°C przez 30 min poprawia właściwości pianotwórcze białek serwatkowych. Optymalne warunki ogrzewania zależą od rodzaju i stężenia białka [36].

Emulsje

Emulsjami nazywamy układy dyspersyjne, składające się z dwóch lub więcej niemieszających się ze sobą cieczy, z których jedna występuje w postaci fazy ciągłej, a druga w formie rozproszonych kropelek. Podczas mieszania oleju i roztworów wodnych białek pojawia się tendencja do ograniczenia kontaktu między nimi i separacja faz. Początkowo minimalny kontakt jest osiągany wskutek formowania sferycznych kropelek przy nakładzie energii z zewnątrz. Emulsje stabilizowane białkami zapewniają minimalny kontakt grup hydrofobowych z wodą. Jest to stan najkorzystniejszy energetycznie [56]. Czas niezbędny do utworzenia spójnej warstwy wokół kropelek oleju i ustalenia się równowagi termodynamicznej zależy od rodzaju białka. Zjawiska te przebiegają szybko z udziałem białek o luźnej, elastycznej strukturze (np. kazeina- β), ze średnią szybkością w przypadku białek globularnych (np. bydlęca albumina serum) oraz wolno z białkami o zwartej strukturze (np. lizozym). Wielkość kropelek fazy rozproszonej jest podstawową wielkością charakteryzującą emulsje. Średnica tych kropelek w emulsjach produktów spożywczych waha się w granicach od 0,2 do 10 μm i zależy od metody wytwarzania emulsji, różnicy lepkości obu faz, rodzaju użytego emulgatora oraz od nakładu energii przy tworzeniu emulsji [55]. W produktach o niskiej jakości występują krople o średnicy ok. 10 μm i powyżej. W majonezie dobrej jakości krople wynoszą 2–4 μm .

W celu ułatwienia powstawania emulsji, a także poprawy jej stabilności należy wprowadzić do układu czynnik stabilizujący. Może nim być działanie polegające na wprowadzeniu emulgatora, np. białka [56]. W przeciwieństwie do

niskocząsteczkowych emulgatorów struktura białek może ulec zmianie pod wpływem adsorpcji. Po adsorpcji na hydrofobowej powierzchni struktura kazeiny- β ulega zmianie [40]. Pierwsze 50 aminokwasów części N-końcowej łańcucha polipeptydowego ma bezpośredni kontakt z polarnym środowiskiem. Tworzą one pętlę, która jest „zakotwiczona” na powierzchni międzyfazowej dzięki obecności aminokwasów hydrofobowych. Pozostała część cząsteczki kazeiny- β jest „przyczepiona” do hydrofobowej powierzchni w postaci powyginanego łańcucha.

Dobry emulgator powinien nie tylko tworzyć, ale również stabilizować nowo utworzoną powierzchnię międzyfazową. Dowiedziono, że emulsje stabilizowane przez białka są bardziej stabilne przy pH różnym od wartości punktów izoelektrycznych białek np. właściwości emulgujące laktoglobuliny- β zależą od wartości pH środowiska [56, 57]. Wykazuje ona lepsze właściwości przy pH powyżej 7,0. Stabilność emulsji zależy m.in. od lepkości fazy ciągłej, sił ciężenia, ładunku wypadkowego i struktury białka. Rodzaj urządzenia do wytwarzania emulsji, ilość energii dostarczanej podczas emulgowania w dużym stopniu wyznaczają zakres i charakter zmian emulsji w czasie [35]. Również czynniki środowiskowe, np. stężenie białka, kwasowość czynna, stosunek faz olej/woda i siła jonowa decydują o stabilności emulsji [9, 10, 11]. Kazeina- β jest najbardziej efektywnym stabilizatorem spośród wszystkich białek mleka, ponieważ w najwyższym stopniu zmniejsza napięcie powierzchniowe. Zdolność obniżania napięcia powierzchniowego maleje według kolejności: kazeina- β > $-\alpha_{s1}$ > $-\kappa$ > laktoglobulina- β > laktoalbumina- α > albumina serum [16, 31].

Zmieniając strukturę białka można doprowadzić do zmian jego konformacji, co z kolei może wpływać na zmiany jego zdolności do tworzenia i stabilizowania emulsji. Wzrost hydrofilowości może w niektórych przypadkach odegrać pozytywną rolę w kształtowaniu właściwości emulgujących. Glikozylacja β -laktoglobuliny powoduje wzrost masy cząsteczkowej, zmniejszenie wypadkowego ładunku netto, zwiększenie hydrofobowości powierzchniowej, a co za tym idzie poprawę właściwości emulgujących [21, 45]. Podobne zmiany emulgujących właściwości glikozyłowanej kazeiny- β obserwowali w swoich badaniach Darewicz i Dziuba [12] oraz Dziuba i wsp. [16]. Zmiany te obejmowały nowy sposób aranżacji struktury kazeiny- β na hydrofobowej powierzchni. Zaobserwowano wówczas zmniejszenie udziału struktury nieuporządkowanej i większy stopień „upakowania” cząsteczek na hydrofobowej powierzchni. Zmniejszona hydrofobowość powierzchniowa tak zmodyfikowanej cząsteczki, jej zwiększony ładunek wypadkowy netto promowały siły elektrostatycznego i sterycznego odpychania, stabilizując emulsję i zapobiegając jej koalescencji. Z kolei stosując w swoich badaniach fosfatazę alkaliczną, Darewicz i wsp. [8, 10, 11] modyfikowali wartość ładunku wypadkowego netto cząsteczki kazeiny- β . Paradoksalnie mimo usunięcia reszt fosforanowych, będących źródłem oddziaływań elektrostatycznych i sterycznych, emulsja stabilizowana defosforylowaną kazeiną- β nie uległa destabilizacji. Zjawisko to tłumaczono wciąż amfifilowym

charakterem całej cząsteczki kazeiny- β oraz, co bardziej istotne, zmianami strukturalnymi tj. indukowaniem przyrostu struktury α -helikalnej. Zmniejszenie sił odpychania o charakterze elektrostatycznym i sterycznym było kompensowane przez bardziej zwartą architekturę struktury defosforylowanej kazeiny- β , co w konsekwencji zapobiegało destabilizacji emulsji.

Wielu autorów [20, 42, 46] sugeruje istnienie zależności między obecnością struktury drugorzędowej w roztworach naturalnych i syntetycznych peptydów a ich biofizycznymi właściwościami. Zwracano m.in. uwagę na związek między udziałem amfifilowej struktury α -helikalnej w drugorzędowej strukturze laktoferyny i białek hemowych oraz ich peptydów a ich właściwościami antybakteryjnymi. Starano się także udowodnić istnienie statystycznie istotnej korelacji między udziałem procentowym amfifilowego α -heliksu w strukturze drugorzędowej peptydów syntetycznych a ich zdolnościami do tworzenia i stabilizowania emulsji. Darewicz i wsp. [7, 10, 11] stwierdzili istnienie związku między udziałem struktury α -helikalnej, indukowanej adsorpcją na hydrofobowej powierzchni, a kształtowaniem się zdolności do tworzenia emulsji przez peptydy.

Matematyczna formalizacja zależności struktura-funkcja

Pomimo dość dużej liczby publikacji, w których autorzy podejmują problem relacji pomiędzy strukturą a funkcjami białek i peptydów, wciąż w wyjaśnieniach mechanizmów leżących u podstaw kształtowania się zależności między strukturą białek a ich funkcją trudno znaleźć pewne uniwersalne tezy. Nakai i wsp. [36] próbowali sformułować zależności między strukturą białek żywności a ich właściwościami funkcjonalnymi. Stwierdzili wówczas, że rozpuszczalność, ładunek wypadkowy netto, zdolność do asocjacji cząsteczek białkowych, zawartość grup tiolowych lub mostków dwusiarczkowych oraz hydrofobowość bocznych reszt aminokwasowych w białkach mają wpływ na ich właściwości emulgujące i pianotwórcze. Jednocześnie Nakai i wsp. [36] oraz Giuliani i wsp. [22] twierdzą, że zależności między strukturą białek a ich właściwościami funkcjonalnymi są w wielu przypadkach nieliniowe. Z tego powodu coraz większym zainteresowaniem cieszą się wielowymiarowe metody statystyczne wykorzystujące analizę regresji wielokrotnej, regresji metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów, regresji składowych głównych czy sieci neuronowe [34, 49]. Nakai i wsp. [36, 37], posługując się równaniami regresji, zwrócili uwagę na znaczenie rozpuszczalności białek w matematycznej interpretacji wyników oceny ich właściwości funkcjonalnych. Wprowadzenie wyników oznaczeń hydrofobowości powierzchniowej i rozpuszczalności do zaproponowanego modelu regresji wielokrotnej, pozwalającego oszacować właściwości emulgujące badanych białek, spowodowało wzrost współczynnika determinacji [37]. Podobną metodę analizy matematycznej wykorzystali też Voutsinas i wsp. [54] w badaniach właściwości emulgujących białek różnego pochodzenia po ich

obróbce cieplnej. Autorzy wskazali na możliwość przewidywania właściwości pianotwórczych i emulgujących za pomocą równań regresji uwzględniających rozpuszczalność i hydrofobowość.

Van der Ven i wsp. [59, 60] wykorzystali w charakterze narzędzia statystycznego analizę regresji metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów, opracowując model umożliwiający przewidywanie właściwości pianotwórczych i emulgujących hydrolizatów białek mleka na podstawie mas cząsteczkowych obecnych w nich peptydów oznaczonych metodą chromatografii żelowej. Ponadto van der Ven i wsp. [60] zastosowali tę metodę do opracowania modelu matematycznego wyjaśniającego różnice we właściwościach pianotwórczych, emulgujących oraz gorzkim smaku hydrolizatów białkowych na podstawie różnic w ich widmach FTIR [60].

Wyniki dotychczasowych badań Darewicz i wsp. [13] pozwoliły na zastosowanie metody regresji wielokrotnej do opisu zależności między zdolnościami do tworzenia oraz stabilizacji piany oraz tworzenia emulsji przez białka i peptydy a ich rozpuszczalnością oraz czasem retencji (analiza chromatograficzna) lub parametrami spektroskopowymi (analiza widm UV). Poniżej przedstawiono przykładowe równanie opisujące zależności między zdolnością do tworzenia piany (F_0) przez białka i peptydy a ich rozpuszczalnością i czasem retencji (t_R), dla którego współczynniki korelacji wielokrotnej były istotne statystycznie ($p < 0,05$).

$$F_0^a = 105,4843 - 0,9379 \times \text{Rozp} + 0,5216 \times t_R$$

Analizując wyniki badań uzyskiwane w różnych ośrodkach naukowych można stwierdzić, że obok licznych procesów i zjawisk, w przypadku których matematyczne modele zależności są stosunkowo dobrze poznane, występują także liczne procesy i zjawiska, których struktura lub prawa działania nie zostały jeszcze poznane i opisane w stopniu wystarczającym do tego, żeby zbudować ich efektywne modele. Co więcej, w przypadku niektórych zjawisk sam problem przyczynowości bywa otwarty, gdyż często nie ma pewności, jakie czynniki naprawdę wpływają na rozważane procesy, determinując ich przebieg oraz rezultaty. Ogromną zaletą wielowymiarowych metod statystycznych jest fakt, że pozwalają one poszukiwać modeli opisujących takie właśnie słabo znane zjawiska i procesy.

Podsumowanie

Jako podstawową przyczynę różnic we właściwościach funkcjonalnych między białkami wymienia się ich odmienne właściwości strukturalne. Modyfikacje łańcuchów polipeptydowych białek oraz zmiany warunków środowiska wpływają na konformacje ich cząsteczek i w konsekwencji na rozpuszczalność, zdolności do tworzenia/stabilizowania emulsji/pian. Sugeruje się, że warunkiem koniecznym występowania korzystnych właściwości emulgujących i pianotwórczych białek jest amfifilowość ich struktur. Zależności między strukturą białek i ich właściwościami funkcjonalnymi mogą być opisane z wykorzystaniem wielowymiarowych metod

statystycznych, co może znaleźć zastosowanie przy projektowaniu żywności o pożądanym i przewidywalnym cechach.

Praca finansowana w ramach badań własnych Katedry Biochemii Żywności UWM w Olsztynie, temat nr 522-0712-0203.

Literatura

- [1] Aoki T.: Emulsifying properties of soy protein: characteristics of 7S and 11S proteins. *J. Food Sci.*, 1980, **45**, 534-538.
- [2] Bigelow C. C.: On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theor. Biol.*, 1967, **16**, 187-211.
- [3] Bryant C.M., McClements D.J.: Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.*, 1998, **9**, 143-151.
- [4] Creamer L.K., Harris D.P.: Relationship between milk protein polymorphism and physicochemical properties. *Int. Dairy Fed. Spec. Issue*, 1997, **97-02**, 110-123.
- [5] Damodaran S.: Protein-stabilized foams and emulsions. In: *Food proteins and their applications* – eds. S. Damodaran, A. Paraf. Marcel Dekker Inc., New York 1997, pp. 57-110.
- [6] Darewicz M., Kostyra H., Dziuba J.: Rozpuszczalność i stabilność cieplna albumin i globulin nasion bobiku – charakterystyka i zmiany pod wpływem przechowywania. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olszt.*, 1996, **29**, 125-138.
- [7] Darewicz M., Dziuba J., Caessens P. W. J. R., Gruppen H.: Effect of dephosphorylation on the functionality of bovine β -casein and its plasmin-derived peptides. In: *Functional foods – a new challenge for the food chemists* – eds. R. Lasztity, W. Pfannhauser, L. Simon-Sarkadi, S. Tomoskozi. Publ. Com. TUB, Budapest 1999, pp. 665-671.
- [8] Darewicz M., Dziuba J., Mioduszevska H., Minkiewicz P.: Modulation of physico-chemical properties of bovine β -casein by non-enzymatic glycation associated with enzymatic dephosphorylation. *Acta Aliment. Hung./Int. J. Food Sci.*, 1999, **4**, 339-354.
- [9] Darewicz M., Dziuba J., Caessens P. W. J. R.: Effect of enzymatic hydrolysis on emulsifying and foaming properties of milk proteins – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2000, **9**, 3-8.
- [10] Darewicz M., Dziuba J., Caessens P. W. J. R., Gruppen H.: Dephosphorylation-induced structural changes in β -casein and its amphiphilic fragment in relation to emulsion properties. *Biochimie*, 2000, **82**, 191-195.
- [11] Darewicz M.: Wpływ enzymatycznych modyfikacji kazeiny- β na jej strukturę i wybrane właściwości funkcjonalne. Wyd. UWM, Olsztyn 2001.
- [12] Darewicz M., Dziuba J.: The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine β -casein. *Nahrung/Food*, 2001, **45**, 15-20.
- [13] Darewicz M., Dziuba J., Panfil T.: Zaawansowane metody statystyczne jako nowe narzędzia w analizie danych w nauce o żywności i żywieniu. Materiały XXXVI Sesji Naukowej KNoŻ PAN, Szczecin 2005.
- [14] Dickinson E., Horne D.S., Pinfield V.J., Leermakers F.A.M.: Self-consistent Fidel modeling of casein adsorption: comparison of results for α_{s1} -casein and β -casein. *J. Chem. Soc. Faraday Transactions*, 1997, **93**, 425-432.
- [15] Dickinson E.: Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 305-312.
- [16] Dziuba J., Darewicz M., Mioduszevska H.: Physico-chemical characteristics of different genetic variants of bovine β -casein, modified covalently by glucose, galactose and lactose. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1998, **2**, 166-170.

- [17] Dziuba J., Darewicz M.: Structural aspects of functional properties of milk proteins. *Natur. Sci.*, 2000, **4**, 257-272.
- [18] Dziuba J., Iwaniak A., Niklewicz M.: Database of protein and bioactive peptide sequences – BIOPEP.2003, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>.
- [19] Dziuba J., Iwaniak A., Niklewicz M., Darewicz M., Minkiewicz P.: Bioinformatic-aided prediction for release possibilities of bioactive peptides from plant proteins. *Acta Aliment./Int. J. Food Sci.*, 2004, **33**, 227-235.
- [20] Enser M., Bloomberg G. B., Brock C., Clark D. C.: De novo design and structure-activity relationships of peptide emulsifiers and foaming agents. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1990, **12**, 118-124.
- [21] Foegeding E.A., Davis J.P., Doucet D., McGuffey M.K.: Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends Food Sci. Technol.*, 2002, **13**, 151-159.
- [22] Giuliani A., Benigni R., Zbilut J. P., Webber Jr. C. L., Sirabella P., Colosimo A.: Nonlinear signal analysis methods in the elucidation of protein sequence-structure relationships. *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1471-1491.
- [23] Hambling S.G., McAlpine A.S., Sawyer L.: β -Lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry. Proteins. Vol.1* – eds. P.F. Fox. Elsevier Applied Science, London 1992, pp.141-190.
- [24] Holt C., Sawyer L.: Caseins as rheomorphic proteins: Interpretation of primary and secondary structures of the α_{s1} - and β - and κ -caseins. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1993, **89**, 2683-2692.
- [25] Horne D.S.: Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.*, 1998, **8**, 171-177.
- [26] Inafidon G. I., Farkye N. Y., Spanier A. M.: Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1997, **37**, 663-689.
- [27] Ismond M.A., Georgiu C., Arntfield S.D., Murray E.D.: Role of noncovalent forces in micellization using legumin from *Vicia faba* as a study system. *J. Food Sci.*, 1990, **55**, 1638-1642.
- [28] Katan M.B., De Roos N.M.: Promises and problems of functional foods. *Crit. Rev. Food Sc. Nutr.*, 2004, **44**, 369-377.
- [29] Kilara A., Harwalker V.R.: Denaturation. In: *Food Proteins: Properties and characterization* – eds. S. Nakai, H.W. Modler. VCH Publishers Inc., 1996, pp. 71-135.
- [30] Kinsella J. E.: Physical properties of food and milk components. Research needs to expand uses. *J. Dairy Sci.*, 1987, **70**, 2419-2429.
- [31] Klemaszewski J. L., Das K. P., Kinsella J. E.: Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. *J. Food Sci.*, 1992, **57**, 366-371.
- [32] Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A.: Milk protein-derived bioactive peptides – novel opportunities for health promotion. *Biul. IDF*, 2001, **363**, 17-26.
- [33] Kumosinski T. F., Brown E. M., Farrel H. M. Jr.: Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: Energy minimized β -casein structure. *J. Dairy Sci.*, 1993, **76**, 931-945.
- [34] Lavine B. K., Workman J. J.: Chemometrics. *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2763-2770.
- [35] Leman J.: Właściwości emulgujące albuminy serum krwi. *Przegl. Mlecz.*, 2002, **5**, 225-228.
- [36] Nakai S., Li-Chan E., Hayakawa S.: Contribution of protein hydrophobicity to its functionality. *Nahrung*, 1986, **3-4**, 327-336.
- [37] Nakai S., Li-Chan E. C. Y., Artega G. E.: Measurement of surface hydrophobicity. In: *Methods of testing protein functionality* – ed. G. M. Hall. Chapman, London 1996, pp. 226-260.
- [38] Nakai S., Chan J. C. K., Li-Chan E. C., Dou J., Ogawa M.: Homology similarity analysis of sequences of lactoferricin and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 1215-1223.
- [39] Nakai S., Alizadeh-Pasdar N., Dou J., Buttamor R., Rousseau D., Paulson A. Pattern similarity analysis of amino acid sequences for peptide emulsification. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 927-934.
- [40] Nylander T., Tiberg F., Wahlgren N.M.: Evaluation of the structure of adsorbed layers of β -casein from ellipsometry and surface force measurements. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 313-317.
- [41] Pomerantz Y.: New and novel foods. In: *Functional properties of food components* – ed. S. L. CH. Taylor, Academic Press Inc., London 1991.
- [42] Poon S., Clarke A., Currie G., Schultz C. 2001. Influence of α -helices on the emulsifying properties of proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, **65**, 1713-1723.

- [43] Poole S., Fry J. Developments in Food Proteins. In: *Advances in food emulsions and foam* – ed. B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science Publishers, London 1987, pp. 257-298.
- [44] Pour-El A. Preface. In: *Functionality and protein structure* – ed. A. Pour-El., ACS Symp. Ser. 92, Am. Chem. Soc., Washington D. C. 1979, s. ix-xii.
- [45] Rahali V., Chobert J. M., Haertle T., Gueguen J. Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin: characterization of the peptides adsorbed at the interface. *Nahrung*, 2000, **44**, 89-95.
- [46] Saito M., Ogasawara M., Chikuni K., Schimizu M.: Synthesis of a peptide emulsifier with an amphiphilic structure. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, **3**, 388-392.
- [47] Scarsi M., Majeux N., Caflisch A.: Hydrophobicity at protein surface. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 1999, **37**, 565-575.
- [48] Schein C.: Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Biotechnology*, 1990, **8**, 308-318.
- [49] Schlehel-Zawadzka M., Przystawski J., Babicz-Zielińska E., Wądołowska L.: Sieci neuronowe – nowe narzędzie w analizie danych w naukach żywieniowych. *Żyw. Czł. Met.*, 2001, **28**, Supl., 898-903.
- [50] Sikorski Z.E.: *Chemia żywności*. WNT. Warszawa 2002.
- [51] Sood S. M., Slattery Ch. W.: Monomer characterization and studies of self-association of the major β -casein of human milk. *J. Dairy Sci.*, 1987, **80**, 1554-1560.
- [52] Swaisgood H. E.: Chemistry of the caseins. In: *Advanced Dairy Chemistry. Vol 1. Dairy Proteins* – eds. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, pp. 63-110.
- [53] Thomas M.E.C., Scher J., Desobry-Banon S., Desobry S.: Milk powders ageing: Effect on physical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sc. Nutr.*, 2004, **44**, 297-322.
- [54] Voutsinas L. P., Cheung E., Nakai S.: Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J. Food Sci.*, 1983, **48**, 26-32.
- [55] Walstra P.: Overview of emulsion and foam stability. In: *Food emulsions and foams* – ed. E. Dickinson. Royal Society of Chemistry, London 1987, pp. 242-257.
- [56] Walstra P., de Roos A. L.: Proteins at air-water and oil-water interfaces: static and dynamic aspects. *Food Rev. Int.*, 1993, **9**, 503-525.
- [57] Walstra P.: Emulsion stability. In: *Encyclopaedia of emulsion technology. Vol. 4* – eds. P. Becher, M. Dekker, New York 1996, pp. 1-62.
- [58] Wilde P.J.: Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2000, **5**, 176-181
- [59] Van der Ven C., Gruppen H., de Bont D. B. A., Voragen A. G. J.: Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and –stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 2938-2946.
- [60] Van der Ven C., Muresan S., Gruppen H., de Bont D. B. A., Merck K. B., Voragen A. G. J.: FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 6943-6950.

THE STRUCTURE OF MILK PROTEINS VERSUS THEIR FUNCTIONAL PROPERTIES

Summary

In the paper, results of the study on the relationship between a structure of milk proteins and some selected functional properties of them were presented and analyzed. Several factors, such as: molecular size, hydrophobicity, charge, and flexibility are important for the functional properties of proteins. Additionally, external factors, such as: temperature, pH, ionic strength, and the presence of other molecules influence these functional properties. A distinct structure of individual proteins is considered

the main reason why there are differences in functional properties of the proteins. Functional properties can be modified in several ways, e.g. by the physical, chemical, enzymatic, or genetic modification. Other functional properties may also depend on solubility which is a physical-chemical feature. Proteins can adsorb at oil/water and air/water interfaces, and, thereby, they can lower the surface tension; at the same time, they also change their structure. Good interfacial properties of proteins are attributed both to the specific distribution of clustering hydrophilic and hydrophobic residues into exactly isolated zones and to the minimum molecular mass of the peptide enabling this distribution. It was stated that there was a relationship between the α -helical adsorption-induced structure on the hydrophobic surface and the emulsion forming ability of peptides. Advanced statistical methods become more and more popular and they are used to describe the structure-function relationships of proteins. The knowledge of molecular basis of proteins solubility, and foam/emulsion forming/stabilizing abilities is fundamental for the purpose of studying the milk proteins applications in food with required and design properties.

Key words: emulsion, foam, milk proteins, solubility, statistical models, structure 

MARIA WALCZYCKA

**METODY INAKTYWACJI I HAMOWANIA WZROSTU
LISTERIA MONOCYTOGENES W PRZETWORACH MIĘSNYCH**

Streszczenie

Konsumenci wymagają od producentów żywności wygodnej, łatwej w przygotowaniu, o odpowiednich walorach odżywczych. Pojawia się więc coraz więcej dań gotowych do spożycia. W warunkach całkowitej sterylności produkcji zagrożenie może stanowić poprodukcyjne, wtórne zakażenie żywności spowodowane kontaktem z personelem produkcyjnym bądź handlowym, zanieczyszczonymi powierzchniami składowymi i przechowalniczymi. Może pojawić się w produkcie spożywczym mikroflora patogenna, uodporniona na niekorzystne czynniki środowiska. Do takich mikroorganizmów należy m.in. *Listeria monocytogenes*.

Omówiono najczęściej stosowane naturalne (ekstrakty ziół, bakteriocyny) i chemiczne (kwasy, sole azotowe) substancje dodatkowe, a także procesy utrwalania (wędzenie) wykorzystywane do zabezpieczania mięsa i jego przetworów, w celu inaktywacji *L. monocytogenes* i zachowania dobrej jakości mikrobiologicznej przechowywanej żywności. Naturalne, odpowiednio dobrane składniki żywności zawierające w swym składzie substancje hamujące pochodzenia mikrobiologicznego są skutecznym inhibitorem *L. monocytogenes*, także większość dopuszczonych do użycia w przemyśle mięsnym dodatków, stosowanych z wykorzystaniem zjawiska synergizmu, może chronić żywność przed wzrostem *L. monocytogenes*.

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, bakteriocyny, mięso i przetwory, techniki konserwacji.

Wprowadzenie

Aktualnie, konsumenci wymagają od producentów żywności wygodnej, łatwej w przygotowaniu, o odpowiednich walorach sensorycznych i wartości odżywczej. Pojawia się więc coraz więcej dań typu „ready-to-eat” (gotowych do spożycia) [45]. Jednocześnie konsumenci zmieniają swój styl odżywiania się i częstotliwość posiłków oraz miejsca dokonywania zakupów żywności. Najczęściej żywność kupowana jest w dużych centrach handlowych i ma określone cechy produktu wytwarzanego na skalę masową. W tej sytuacji mogą wystąpić zagrożenia mikrobiologiczne związane

Dr inż. M. Walczycka, Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych Wydział Technologii Żywności,
Akademia Rolnicza, al. 29 Listopada 52; 31-425 Kraków tel. 662-50-68
e-mail: mariawalczycka@poczta.onet.pl

z nieprawidłowym stanem jakościowym produktów, złymi warunkami obrotu lub przechowywania, niewłaściwą obróbką termiczną. W wielu krajach głównym problemem nie są jednak zagrożenia związane ze złym stanem sanitarnym zakładów przetwórczych, wręcz przeciwnie, nadmierna czystość może stać się przyczyną groźnych schorzeń. W warunkach całkowitej sterylności produkcji zagrożenie stanowi poprodukcyjne, wtórne zanieczyszczenie żywności spowodowane kontaktem z personelem produkcyjnym, bądź handlowym, zanieczyszczonymi powierzchniami składowymi i przechowalniczymi. Powyższe czynniki mogą być przyczyną zanieczyszczenia żywności mikroflorą patogenną, uodpornioną na niekorzystne czynniki środowiska [1, 2]. Do wyżej wymienionych mikroorganizmów należy m.in. *Listeria monocytogenes*.

Charakterystyka bakterii

Znanych jest kilkanaście szczepów Gram dodatnich, nieprzetrwalnikujących pałeczek. Najważniejsze z nich to: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi*. Dwa pierwsze szczepy są jednymi z najgroźniejszych patogenów ludzi i zwierząt [5, 41]. *Listeria monocytogenes* została wyizolowana od zwierząt domowych i wolno żyjących, z gleby oraz z kiszonek (pasz) [41]. Według FAO/WHO około 10% populacji ludzi jest nosicielami tej bakterii [27]. *Listeria* istnieje w postaci kilkunastu podtypów-serotypów [41], z których najbardziej niebezpieczne to serotypy 1/2a 1/2b i 4b. Były one identyfikowane u większości chorych na listeriozę (tab. 1) [34]. *Listeria monocytogenes* ma szerokie spektrum działania, ponieważ przeżywa w temp. od -2°C do $+45^{\circ}\text{C}$ (optimum 37°C), bez zmian swoich funkcji życiowych i patogeniczności. Może przetrwać krótkotrwałą pasteryzację i mrożenie, łatwo uodpornia się na podprogowe dawki konserwantów i środków myjących, tworząc swoiste biofilmy na powierzchni urządzeń przetwórczych [44, 46]. Całkowitą inaktywację tych bakterii uzyskuje się w temp. powyżej 75°C . Mogą one dominować w toksycznej mikroflorze w temperaturze chłodniczej, zasiedlać środowisko o pH w przedziale od 4,4 do 9,4, z optimum 7,0 [27]. *L. monocytogenes* ma dobrze rozwinięte zdolności adaptacyjne – zmiana hydrofobowości zewnętrznej warstwy bakterii na hydrofilową i odwrotnie [8]. Zdolności adaptacyjne *L. monocytogenes* dotyczą także szerokiego zakresu wartości a_w do 0,92. Jest to minimalna wartość umożliwiająca rozwój tych bakterii.

Rozwijają się one zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Przeżywają stężenie do 30% CO_2 . Dopiero 100% tego gazu całkowicie je inaktywuje [27].

Bakteria ta powoduje listeriozę, tj. chorobę, która pośród innych chorób pochodzenia pokarmowego cechuje się wysoką bo aż 30% śmiertelnością. Zakażenie następuje poprzez niewłaściwie przetworzoną i przechowywaną żywność. Źródłem bakterii są najczęściej produkty typu ready-to-eat (niewłaściwie odgrzewane i przechowywane), surowe mleko, sery dojrzewające produkowane z mleka

niepasteryzowanego, mięso i jego przetwory, a zwłaszcza drób, warzywa i wszelkiego rodzaju sałatki z dodatkiem surowych warzyw oraz większość żywności pochodzenia morskiego (tab.1) [45]. Najbardziej narażeni są: ludzie o obniżonej odporności, dzieci, osoby starsze, diabetycy, alergicy, chorzy po przeszczepach. U osób w pełni zdrowych zakażenie *L. monocytogenes* przebiega z objawami typowego nieżytu żołądka, natomiast dla przyszłych matek stanowi zagrożenie wczesnoporonne, a u dzieci grozi zapaleniem opon mózgowych i mózgowo-rdzeniowych, sepsą, zakażeniem krwi.

Sposoby zapobiegania obecności *L. monocytogenes* i jej inaktywacja poprzez wprowadzanie do mięsa i jego przetworów chemicznych i naturalnych substancji dodatkowych

Zastosowanie konserwantów do hamowania wzrostu *L. monocytogenes* w mięsie

Kwasy

Niskie pH stanowi barierę dla *L. monocytogenes*, ale trzeba wziąć pod uwagę rodzaj kwasu, temperaturę i inne związki antybakteryjne obecne w danym środowisku. Zgodnie z badaniami niektórych autorów można uszeregować kwasy przeciwdziałające wzrostowi *L. monocytogenes* w następujący ciąg: kwas octowy > mlekowy > cytrynowy > malonowy > solny [5, 12]. W większości doświadczeń opisywano synergiczne działanie kwasów i niskiej temperatury. Z innych substancji bakteriostatycznych wspierających działanie kwasów obecnych w środowisku można wymienić sól kuchenną (NaCl) [35]. Kwasy octowy i mlekowy wzmacniają działanie antybakteryjne monolaurynianu, a w środowisku wodnym powodują większą wrażliwość *L. monocytogenes* na ogrzewanie. Stosowanie kwasów bywa jednak niekiedy nieskuteczne. Bakterie, które przeżyją ich działanie mogą się zregenerować podczas przechowywania chłodniczego i gwałtownie namnażać w braku obecności naturalnych konkurentów. Bakterie takie stają się odporne na działanie kwasów, etanolu i nadtlenu wodoru [12].

W badaniach dotyczących mięsa surowego i przetworów wykazano, że zastosowanie kwasów: mlekowego, octowego i fumarowego, w stężeniach 1-3%, jako elementów składowych kąpieli zanurzeniowej tusz wieprzowych i wołowych dawało efekt obniżenia populacji *L. monocytogenes* o 2-3 log przez 7 (tusze) oraz 15 (tłuszcz wieprzowy) dni przechowywania chłodniczego [19]. Do zanurzania tuszek drobiu zaproponowano dawkę 10% roztworu buforu: kwasu mlekowego z mleczanem sodu, o pojemności buforującej w zakresie 3 jednostek pH. Tuszki były następnie pakowane w MAP (atmosfera modyfikowanej zdominowanej przez azot – do 70%, w opakowaniach barierowych) w celu utrzymania sterylności [52]. Stwierdzono także, że mleczan sodu (4%) zastosowany do gotowanej wołowiny ograniczał wzrost *L. monocytogenes*, ale po przechowywaniu chłodniczym ciągle jeszcze obserwowano obecność żywych komórek *Listeria* [31].

Tabela 1

Epidemie listeriozy w latach 1990-2002 związane z żywnością.

The outbreaks of listeriosis in 1990-2002 connected with the infected food.

Rok Year	Produkt żywnościowy Food product	Państwo Country	Liczba stwierdzonych przypadków Registered cases	Poronienia [liczba] i [%] Stillbirth [% of registered cases]	Śmiertelność [liczba] i [%] Mortality rate [% of registered cases]	Serotyp Serotype
1990	Paszтет i pasty mięsne Pates and meat pastries	Australia	11	11 (100,0)	6 (54,5)	1/2 a
1991	Wędzone małże Smoked shellfish	Tasmania , Australia	4	0 (0)	0 (0)	1/2 a
1992	Wędzone małże Smoked shellfish	Nowa Zelandia	4	0 (0)	0 (0)	1/2
1992	Jęzory wieprzowe w galarecie Auspick pork tongues	Francja	280	93 (33,2)	63 (22,5)	4 b
1993	Pasta mięsna / Rillettes	Francja	38	31 (81,6)	11 (28,9)	4 b
1994- 1995	Wędzone owoce morza Smoked sea fruit	Szwecja	9	3 (33,3)	2 (22,2)	4 b
1995	Łagodnie dojrzewające sery, >50% wilgotności (brie, feta camembert, mozzarella) Mild-ripened cheeses, > 50% humidity	Francja	33	9 (45,0)	4 (20,0)	4 b
1997	Ser Pont l'Évêque Pont l'Évêque cheese	Francja	14	Nieznane Not known	0 (0)	4 b
1998- 1999	Masło Butter	Finlandia	25	0 (0)	6 (0)	3 a
1998- 1999	Hot dogi, mięsa delikatesowe Hot dog, deli meats	USA	101	Nieznane Not known	21 (20,8)	4 b
1999	Paszтет Pate	USA	11	2 (18,2)	Nieznana Not known	1/2a
1999- 2000	Świńskie języki w auszpiku Auspick pork tongues	Francja	26	Nieznane Not known	7 (0)	NZ
2000	Mięso indycze Deli turkey meat	USA	29	8 (27,6)	7 (24,1)	NZ
2000- 2001	Wytwarzany domowymi sposobami ser meksykański z surowego mleka Home made Mexican raw milk cheese	USA	12	10 (83,3)	5 (41,7)	NZ
2000	Paszтety Paties	Polska	10	Nieznane Not known	Nieznana Not known	NZ
2001	Produkty mięsne Meat products	Polska	9	Nieznane Not known	Nieznana Not known	NZ
2002	Plastry z mięsa indyczego Deli turkey sliced meat	USA	63	3 (4,8)	7 (11,1)	NZ

Opracowanie własne na podstawie literatury: / Prepared by: [2, 7, 27, 36, 45].

NZ - nie zidentyfikowany/ not identified

Przetwory z mięsa wędzonego, które zawierają sól i inne konserwanty (azotan(III) sodu lub potasu) wzmacniające antylisteryjne działanie kwasów organicznych są stabilne pod względem jakości mikrobiologicznej [22].

pH i aktywność wody (a_w)

Jednoczesne zastosowanie dodatku różnych soli (NaCl, KCl) oraz regulacja pH środowiska (NaOH, kwas octowy) pozwoliło na stwierdzenie, że *L. monocytogenes* przeżywa w pH alkalicznym, natomiast obniżenie pH i a_w powoduje hamowanie wzrostu bakterii [6]. Jako czynnik obniżający pH produktu zastosowano także delta-glukono-lakton, który z dodatkiem mleczanu sodu hamował wzrost *Listeria* w chłodzonych gotowanych produktach mięsnych [40].

NaCl

L. monocytogenes jest halotolerancyjna. Dodatek soli może powodować zmiany w ciśnieniu osmotycznym poprzez obniżenie a_w , ale *Listeria* jest bardzo oporna na działanie soli – może przeżyć przez kilka godzin w 26% roztworze solanki [24]. Natomiast w mielonej wieprzowinie chlorek sodu dodany w niewielkich ilościach powodował, że *Listeria* przed ogrzewaniem zyskiwała pewną oporność na działanie temperatury [51].

Azotany(V) i azotany(III) sodu lub potasu

Sam azotan(V) sodu jest mało skuteczny w stosunku do *L. monocytogenes* i wymaga stosowania go w dużych dawkach, do 800 ppm, by samodzielnie mógł spełniać rolę inhibitora tych bakterii. Azotan(III) sodu w obecności innych czynników wspomagających [35] inaktywuje te bakterie w temp. chłodniczej [4].

Fosforan sodu (TSP)

Związek ten hamuje wzrost komórek *L. monocytogenes* dziesięciokrotnie (wołowina) lub stukrotnie (drób) [13, 42]. Obniżenie temperatury (z 10 do 4°C) w trakcie zanurzania tusz zwierząt ciepłokrwistych w 10% roztworze fosforanu wspomaga znacząco inaktywację *Listeria* (z 39 do 81%) [11].

Dym wędzarniczy/preparat dymu wędzarniczego

Tradycyjne wędzenie mięsa i ryb oraz dodatek dymu wędzarniczego w płynie mają silny antibakteryjny wpływ na *Listeria* - do 99,9% inaktywacji bakterii w produkcie z preparatem dymu, przechowywanym w temp. 4°C [15]. Substancją czynną dymu jest w tym przypadku izoeugenol lub mieszanina innych stężonych fenoli [43].

Ekstrakty roślinne /ziołowe/ i zioła w naturalnej postaci

Ekstrakty przypraw i roślin, które powodują zahamowanie wzrostu *L. monocytogenes* to m.in.: ekstrakty chmielu [28], eugenol [3], destylaty korzenia chrzanu [48], kwas cynamonowy [26] oraz rozmaryn i goździki [38]. Do konserwacji mięs stosuje się głównie rozmaryn – kiełbasy podrobowe [38], destylaty chrzanu – rostbef [48], ekstrakty chmielu – mięsa o niewielkiej zawartości tłuszczu [28].

Monoglicerydy (monolaurynian)

Zestryfikowane pochodne glicerolu mają działanie bakteriobójcze. Monolaurynian, monokaprin, monoglicerydy z orzecha kokosa inhibują *L. monocytogenes* [47] w solankach do wołowiny (o pH 5,0 i 5,5). *Listeria* broni się przed monoglicerydami stosowanymi w składzie środków myjących tworząc biofilmy na powierzchniach stalowych urządzeń przetwórczych [37].

Związki chelatowe (cytryniany i EDTA)

Związki te samodzielnie nie inhibują *Listeria* w przetworach mięsnych, ale współdziałają z innymi substancjami tj. eugenolem i monolaurynianem [3], solą kuchenną, obniżonym pH i bakteriocynami [39].

Lizozym

Dodatek do farszu kilkunastu procent (w postaci białka) lizozymu białka jaja kurzego powstrzymuje wzrost *L. monocytogenes* w surowych kiełbasach wieprzowych przez 2 do 3 tygodni [25].

Sorbiniany (kwas sorbowy)

Efekt działania antybakteryjnego sorbinianów w produktach mięsnych jest wspomagany przez niskie pH (5,2) i obniżoną temp. (4°C). Przy większych zawartościach tłuszczu w produkcie wskazane jest stosowanie wyższej temp. chłodzenia (10°C), aby zaszła inaktywacja *L. monocytogenes* [23].

Mleczany

W 1999 roku USDA FSIS (United States Drugs Administration - Food Safety and Inspection Service) dopuściło stosowanie 4,8% mleczanu sodu wraz z 0,25% dwuacetylu sodu do mięsnych i drobiowych produktów spożywczych w celu zapobieżenia rozwojowi *Listeria monocytogenes* i *Clostridium botulinum* [17].

Zastosowanie naturalnych bakteriocyn produkowanych przez drobnoustroje do kontroli *Listeria monocytogenes* w mięsie

Bakteriocyny są to antybakteryjne substancje białkowe produkowane przez wiele gatunków bakterii. W postaci czystego dodatku można je stosować do specyficznej stabilizacji jakości mikrobiologicznej żywności bez zasadniczych i/lub negatywnych zmian w smaku i wyglądzie zewnętrznym produktu. Można też wprowadzać do produktu mięsnego produkujące je mikroorganizmy, jako kultury starterowe [12, 33]. Pośród najbardziej znanych producentów bakteriocyn znajdują się niewątpliwie bakterie kwasu mlekowego (LAB), które nie tylko produkują bakteriocyny w produktach mięsnych fermentowanych, ale także wytwarzają kwas mlekowy, który poprzez obniżenie pH dodatkowo hamuje wzrost *Listeria* [10, 21]. Zdolnych do produkcji bakteriocyn szczepów LAB, wyizolowanych z naturalnych źródeł, jest stosunkowo mało bo tylko 0,06% [3].

Kultury starterowe

W ofercie producentów kultur starterowych znalazły się ostatnio mieszanki lub czyste kultury zawierające *Leuconostoc carnosum*, którego modelowe badania potwierdziły bardzo wysoką skuteczność hamowania wzrostu *L. monocytogenes*. Infekowano kiełbasy plasterkowane 100 jtk/g *Listeria* i obserwowano hamowanie jej wzrostu w temp. 5°C, przy przechowywaniu przez 28 dni [2, 7].

Laktocyna

Laktocyna 705, produkowana przez *Lactobacillus casei* CRL 705 ma wpływ na umiarkowaną inhibicję *L. monocytogenes* w mielonej wołowinie [50]. Laktocyna produkowana przez *Leuconostoc carnosum* 4010 skutecznie hamuje wzrost *L. monocytogenes* w plasterkowanych wyrobach mięsnych [2, 7].

Nizyna

Nizyna jest uznawana za substancję GRAS (substancję bezpieczną dla zdrowia konsumenta) o udowodnionych właściwościach antybakteryjnych. Ponieważ optimum jej działania przypada na środowisko kwaśne, jest ona mniej skuteczna w stosunku do *L. monocytogenes*, bowiem patogen ten mutuje i uodpornia się na działanie kwasów i nizyny [49]. Natomiast nizyna zastosowana w kombinacji z dodatkowymi substancjami antybakteryjnymi lub odpowiednimi technologiami obróbki skutecznie hamuje *Listeria*. Zastosowano mieszaninę nizyny i pediocyny na powierzchnię następnie opakowanego mięsa – obie substancje hamowały wzrost *Listeria*, pozostając obojętne w stosunku do opakowania [32]. Również stosowano nizynę w postaci rozpuszczonej do zanurzania porcji mięsa wieprzowego, które pakowano w atmosferze powietrza lub MAP. Tak przygotowane mięso przechowywano chłodniczo (5°C). W

przypadku MAP obserwowano całkowite zahamowanie wzrostu *L. monocytogenes*, podczas gdy warunki tlenowe umożliwiały mutację i dalszy rozwój *Listeria* [16, 34]. Przemycanie roztworem nizin tuszek indyczych skutkowało hamowaniem wzrostu *L. monocytogenes* w trakcie przechowywania chłodniczego [30].

Pediocyna AcH

Pediocynę można zastosować do przetworów mięsnych ogrzewanych, ponieważ jest ona ciepłooporna. Tę cechę pediocyny wykorzystano w stabilizacji mikrobiologicznej gotowanych tuszek kurczaków [20]. W mięsie surowym pediocyna stosunkowo łatwo ulega rozkładowi pod wpływem enzymów proteolitycznych mięsa i tylko częściowo hamuje wzrost *L. monocytogenes* – około 2 jednostki log w ciągu pierwszych 24 godz. przechowywania mięsa wieprzowego [34]. W celu zabezpieczenia przed enzymami tej bakteriocydy stosowano kapsułkowanie jej w liposomach, dodawanie emulsyfikatora oraz wspomaganie jej działania innymi czynnikami konserwującymi tj. azotanem(III) sodu, dwuacetylem, mleczanem sodu [9]. *Listeria* może uodpornić się na pediocynę i cecha ta jest przekazywana dziedzicznie następnym pokoleniom mikroorganizmu patogennego; aby temu zapobiec należy wspomagać działanie bakteriocydy dodatkiem soli (np. NaCl) i obniżeniem pH [18].

Reuteryna

Substancja produkowana przez *Lactobacillus reuteri* o szerokim spektrum działania antybakteryjnego, rozpuszczalna w wodzie, działa w szerokim zakresie pH, jest oporna na działanie enzymów lipo- i proteolitycznych, współdziała z kwasem mlekowym w hamowaniu wzrostu *L. monocytogenes*, najczęściej stosowana do wieprzowiny [13, 14].

Sakacyna

Kilka rodzajów tej bakteriocydy produkują mikroorganizmy z gatunku *Lactobacillus sake*. Przeciwdziałają one wzrostowi *Listeria* zwłaszcza w warunkach obniżonego pH i dodatku chlorku sodu, co czyni *Lactobacillus sake* idealnym składnikiem mieszanek kultur starterowych stosowanych do produkcji suchych kiełbas fermentowanych [7, 29].

Podsumowanie

Opracowując nowe produkty mięsne należy odpowiednio dobrać ich skład i ilość substancji, które będą stabilizować jakość mikrobiologiczną wyrobu, tak aby użyć jak najmniejszych dawek środków chemicznych, a zarazem nie spowodować mutacji i uodpornienia *L. monocytogenes* na zastosowane dodatki i konserwanty. Odpowiednio dobrane składniki żywności, zawierające w swym składzie naturalne substancje

hamujące pochodzenia mikrobiologicznego, są skutecznym inhibitorem *Listeria* pod warunkiem, że nie mają zdolności działania antybiotycznego w stosunku do organizmu człowieka lub jego naturalnej mikroflory jelitowej.

Literatura

- [1] American Meat Institute. Fact Sheet: *Listeria monocytogenes*, 2002, pp. 1-3.
- [2] Albin M.: Pokonać zagrożenie. Gosp. Mięś. 2004, **1**, 32-33.
- [3] Blaszyk M., Holley R.A.: Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. Int. J. Food Microbiol., 1998, **39** (3), 175-183.
- [4] Buchanan R.L., Stahl H.G., Whitting R.C.: Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*, 1989, **52** (12), 844-85.
- [5] Center for Food Safety and Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual Online. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods, 2003 ch.10.
- [6] Cheroutre-Viallette M., Lebert I., Hebraud M., Labadie J.C., Lebert A.: Effects of pH or a_w stress on growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 1998, **42** (1-2), 71-77.
- [7] Chr. Hansen: Materiały Sympozjum „*Listeria* – pokonać zagrożenie”. IPH Kraków 5 maja 2004.
- [8] Dąbrowski W., Iwański R., Czeszejko K., Mędrała D.: The influence of culture conditions on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hexadecane. El. J. Polish Agri. Univ., Food Sci. & Technol., 2001, **4** (2), 1-9.
- [9] Degnan A.J., Buyong N., Luchansky J.B.: Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. Int. J. Food Microbiol., 1993, **18** (2), 127-138.
- [10] De Martims E.C., Franca B.D.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. Int. J. Food Microbiol., 1998, **42** (1-2), 119-126.
- [11] Deledesma A.M.R., Riemon H.P., Farver T.B.: Short-time treatment with alkali and/or hot water to remove common pathogenic and spoilage bacteria from chicken wing skin. J. Food Protect., 1996, **59** (7), 746-750.
- [12] Doyle M.E. Literature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention. Food Res. Inst., USA. 1999, Brief pp.1-11.
- [13] Dorsa W.J., Cutter C.N., Siragusa G.R.: Effects of acetic acid, lactic acid and trisodium phosphate on the microflora of refrigerated beef carcass surface inoculated with *Escherichia coli* 0157-H7, *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes*. J. Food Protect., 1997, **60** (6), 619-624.
- [14] El-Ziney M.G., van dem Tempel T., Debevere J., Jakobsen M.: Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. J. Food Protect., 1994, **62**(3), 257-261.
- [15] Faith N.G., Yousef A.E., Luchansky J.B.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic compound found in smoke. J. Food Safety, 1992, **12** (4), 303-314.
- [16] Fang T.J., Lin L.W.: Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in modified atmosphere packaging/nisin combination system. J Food Protect., 1994, **57** (6), 479-495.
- [17] Glass K., Smith A., Granberg D., Johnson E.: Effect of sodium lactate, sodium diacetate, and monolaurin on *Listeria monocytogenes* on processed meat products. Food Res. Inst. Annual Report, 1999, pp.33-34.
- [18] Gravesen A., Jydegaard Axelsen A-M., Medes da Silva J., Hansen T.B., Knochel S.: Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. Appl. & Environ. Microbiol., 2002, **68** (2), 756-764.

- [19] Greer G.G., Dilts B.D.: Lactic acid inhibition on the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on broths and on pork. *Int. J Food Microbiol.*, 1995, **25** (2), 141-151.
- [20] Goff J.H., Bhunia A.K., Johnson M.G.: Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. *J Food Protect.*, 1996, **59** (11), 1187-1192.
- [21] Holley R.A., Doyon G., Fortin J., Rodrigue N., Carbonneau M.: Post-process packaging – induced fermentation of delicatessen meats. *Food Res. Int.*, 1996, **29** (1), 35-48.
- [22] Houtsma P.R., Kaut-Muermans M.L., Rombouts F.M., Zwietering M.H.: Model for the combined effects of temperature, pH and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and bologna-type sausages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62** (5), 1616-1622.
- [23] Hu A.C., Shelef L.A.: Influence of fat content and preservatives on the behavior of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage. *J. Food Safety*, 1996, **16** (3), 175-181.
- [24] Hudson J.A. Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1992, **14** (4), 178-180.
- [25] Hughey V.L., Wilger P.A., Johnson E.A.: Antibacterial activity of hen egg white lysosyme against *Listeria monocytogenes* ScottA in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55** (3), 631-638.
- [26] Konassi Y., Shelef L.A.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cinnamic acid – possible interaction of the acid with cysteinyl residues. *J. Food Safety*, 1998, **18** (3), 231-242.
- [27] Lake R., Hudson A., Cressey P., Nortje G.: Risk profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats. Institute of Environmental Science & Research Ltd. New Zealand 2002, Report pp. 4-5.
- [28] Larson A.E., Yu R.R.Y., Lee O.A., Price S., Haas G.J., Johnson E.A.: Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **33** (2-3), 195-207.
- [29] Leroy F., de Vuyst L.: Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of antylisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65** (3), 974-981.
- [30] Mahadeo M., Tatini S.R.: The potential use of nisin to control *Listeria monocytogenes* in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1994, **18**, 323-326.
- [31] Miller R.K., Acuff G.R.. Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. *J. Food Sci.*, 1994, **59** (1), 15-19.
- [32] Ming X.T., Weber G.H., Ayres J.W., Sandine W.E.: Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J Food Sci.*, 1997, **62** (2), 413-415.
- [33] Muriana P.M.: Bactericins for control of *Listeria spp.* in food. *J. Food Protect.*, 1996 **59** (suppl. S), 54-63.
- [34] Murray M., Richard J.A.: Comparative study of the antilisterial acitivity of nizyn A and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 5°C. *J Food Protect.*, 1997, **60** (12), 1534-1540.
- [35] Nerbrink E., Borch E., Blom H., Nesbakken T.: A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, NaCl, Na-lactate and Na-acetate. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **47** (1-2), 99-109.
- [36] Office of Laboratory Security. Health Canada. Material safety Data Sheets, 2001 pp.1-3
- [37] Oh D.H., Marshall D.L.: Monolaurin and acetic acid inactivation of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel. *J. Food Protect.*, 1996, **59** (3), 249-252.
- [38] Pandit V.A., Shelef L.A.: Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *Food Microbiol.*, 1994, **11** (1), 57-63.
- [39] Parente E., Giglio M.A., Riccardi A., Clementi F.: The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **40** (1-2), 65-75.

- [40] Qvist S., Sehested K., Zeuthen P.: Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in meat products. Int J. Food Microbiol., 1994, **24**, 283-293.
- [41] Rocourt J.: The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In *Listeria*, listeriosis and food safety. Ed. Ryser E.J. & Marth E.H., Marcel Dekker Inc. New York 1999, 2nd ed., pp. 1-20.
- [42] Salvat G., Coppen P., Allo J.C., Fenner S., Laisney M.J., Toquin M.T., Humbert F., Collin P.: Effects of avant-garde treatment on the microbial flora of poultry carcasses. Brit. Poultry Sci., 1997, **38** (5), 489-498.
- [43] Suñen E.: Minimum inhibitory concentration of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. Lett. Appl. Microbiol., 1998, **27** (1), 45-48.
- [44] Szymańska L., Mędrala D.: *Listeria monocytogenes* in meat, meat products and meat-processing environment. Med. Wet., 2003, **59** (1), 18-22.
- [45] USDA Center for Food Safety and Applied Nutrition. Report, Quantitative Assessment of relative risk to public health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. II Hazard identification 2003, pp. 1-12.
- [46] Walker S.J., Archer P., Banks J.G.: Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Appl. Bacteriol. 1990, **68**, 157-162.
- [47] Wang L.L., Johnson E.A.: Control of *Listeria monocytogenes* by monoglycerides in foods. J Food Protect., 1997, **60** (2), 131-138.
- [48] Ward S.M., Delaquis P.J., Holley R.A., Marra G.: Inhibition of spoilage and pathogenic listeria on agar and precooked roast beef by volatile horseradish distillates. Food Res. Int., 1998, **31** (1), 19-26.
- [49] Van Schaik W., Gahan C.G.M., Hill C.: Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the antibiotics nisin and lactacin 3147. J. Food Protect., 1999, **62** (5), 536-539.
- [50] Vignolo G., Fadda S., de Kairuz M.N., Holgado A.A.P.D., Oliver G.: Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 750. Int. J. Food Microbiol., 1996, **29** (2-3), 397-402.
- [51] Yen L.C., Sofos J.N., Schmidt G.R.: Effect of meat curing ingredients on thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork. J. Food Protect., 1991, **54** (6), 408-412.
- [52] Zeitoum A.A.M., Debevere J.M.: Inhibition, survival and growth of *Listeria monocytogenes* on poultry as influenced by buffered lactic acid treatment and modified atmosphere packaging. Int. J. Food Microbiol., 1991, **14**, 161-170.

METHODS TO INHIBIT AND PREVENT THE GROWTH OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN MEAT PRODUCTS

S u m m a r y

Consumers require from food manufacturers that food products are ready-to-eat dishes, easy to prepare, and showing good quality and proper nutritional value. Throughout the world, more and more products appear in the form of ready-to-eat dishes. Under the conditions of absolutely sterile manufacturing processes, the key risk may be attributed to the secondary, post-production food cross-contamination caused by the manufacturing or trading personnel, or by polluted storage areas. Pathogen microflora, resistant to inconvenient environmental factors, can be introduced into food. *Listeria monocytogenes* is one of such pathogens. In this paper, there were discussed some natural and chemical additives, as well as some treatment technologies (smoking process) that were most frequently used during the production of meat and its products. The purpose of these additives and treatment technologies was to prevent the growth of *Listeria monocytogenes*, as well to maintain the adequate microbial quality

of meat products being stored. The natural and effectively selected food components containing inhibitors of microbial origin are effective inhibitors of *Listeria*. Additionally, the majority of preservatives permitted for application in the meat industry, and comprising the effect of synergy, is able to protect food from *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, bacteriocins, meat and meat products, preservatives 

GRAŻYNA KRASNOWSKA, BEATA SOBKÓW, MARZENA DĄBROWSKA,
MAŁGORZATA PELC

OKREŚLENIE PRZYDATNOŚCI WYBRANYCH PREPARATÓW ENZYMATYCZNYCH DO POPRAWY JAKOŚCI MIĘSA WOŁOWEGO

Streszczenie

Jedną z ważniejszych cech jakości kulinarnego mięsa wołowego jest kruchość. Kształtowana jest ona przede wszystkim podczas dojrzewania mięsa. Ten długotrwały proces, przebiegający z udziałem endogennych enzymów można przyspieszyć, poddając mięso działaniu egzogennych enzymów proteolitycznych. Celem pracy była próba oceny przydatności dwóch preparatów enzymatycznych (YG i YO), uzyskanych z hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* (szczep PII6a) do skruszania kulinarnego mięsa wołowego i porównanie jego efektywności w stosunku do pepsyny. Surowiec doświadczalny poddano hydrolizie enzymatycznej wybranymi preparatami w temp. 4 i 18°C, przez okres 6 i 24 godz., w dwóch wariantach pH środowiska (3,5 i 6,0). Ocenę działania doświadczalnych enzymów przeprowadzono w oparciu o stopień degradacji białek mięsa określony przyrostem zawartości wolnych grup aminowych, hydroksyproliny i azotu w roztworach po hydrolizie oraz na podstawie instrumentalnego pomiaru kruchości mięsa. Stwierdzono, że największą zdolnością proteolityczną w stosunku do białek mięsa wołowego charakteryzował się preparat enzymatyczny YO. Optymalną kwasowością środowiska działania ocenianych preparatów enzymatycznych okazała się wartość pH 3,5, natomiast temperatura nie miała istotnego wpływu na przebieg procesu degradacji białek. Dowiedziono, że wydłużenie czasu trwania procesu skruszania mięsa wołowego z 6 do 24 godz. miało istotny wpływ na polepszenie jego kruchości, jednak degradacja białek przebiegała najintensywniej w pierwszych 6 godz.

Słowa kluczowe: preparaty enzymatyczne, hydroliza enzymatyczna, kruchość, mięso wołowe.

Wprowadzenie

Jakość żywności to pojęcie obejmujące wiele składowych, które dotyczą jej zdrowotności, atrakcyjności sensorycznej i dyspozycyjności. O jakości mięsa decydują takie jego cechy, jak: wartość odżywcza, wartość biologiczna, soczystość, kruchość, smak czy zapach, przy czym konsument ocenia ją w dużej mierze na podstawie jakości

Dr hab. G. Krasnowska, mgr B. Sobków, mgr inż. M. Dąbrowska, mgr inż. M. Pelc, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych, Wydział Nauk o Żywności, Akademia Rolnicza, ul. C.K. Norwida

sensorycznej [6, 8]. W przypadku mięsa wołowego bardzo ważną cechą, wpływającą na jego ocenę, jest kruchość. Kształtowana jest ona poprzez wzajemne oddziaływanie wielu składowych, jak: udział i jakość tkanki łącznej, zawartość tłuszczu, struktura włókien i pęczków mięśniowych, zmiany enzymatyczne przy dojrzewaniu mięsa. Ponadto wiele czynników przyżyciowych, m.in. wiek, płeć, żywienie, postępowanie przedubojowe istotnie wpływają na ten wyróżnik jakości. Wzrost kruchości jest głównie wynikiem dezintegracji składników włókna mięśniowego w wyniku działania enzymów własnych, a zmiany w tkance łącznej są niewielkie. Proces ten jest długotrwały i w przypadku wołowiny zadowalającą kruchość uzyskuje się po 10–14 dniach [7, 14, 16, 23]. Jedną z metod stosowanych do poprawy kruchości są metody biologiczne. W celu przyspieszenia endogennej autolizy wzbogaca się naturalny układ enzymatyczny mięsa preparatami enzymów egzogennych o podobnych właściwościach katalitycznych. Mogą to być enzymy pochodzenia roślinnego, drobnoustrojowego bądź zwierzęcego [1, 3, 5, 19, 22]. Pod wpływem działania proteaz w mięsie zachodzi częściowy rozkład makrocząsteczek białek mięśniowych, rozerwanie wiązań dwusiarczkowych, zwiększenie reaktywności grup sulfhydrylowych, wodorotlenowych, karboksylowych i aminowych. W trakcie tego procesu w znacznym stopniu ulegają hydrolizie białka sarkoplazmatyczne, a w zależności od specyficzności enzymów, częściowo białka miofibrylarne i łącznotkankowe. Mięso staje się delikatne, zwiększa się stopień jego hydratacji oraz wzrasta strawność białek, czyli dostępność dla proteolitycznych enzymów trawiennych. Dzięki tym procesom wzrasta zawartość rozpuszczalnych oraz wolnych aminokwasów i niewielkich peptydów, co poprawia smakowitość mięsa. Następuje też polepszenie kruchości i skrócenie czasu jego dojrzewania [6, 16, 17, 20].

Wzrastające zapotrzebowanie przemysłu spożywczego na preparaty enzymatyczne o ściśle określonych właściwościach powoduje ogromny rozwój technik ich wytwarzania. Ekonomicznie najbardziej uzasadniona jest produkcja tych preparatów z wykorzystaniem źródeł mikrobiologicznych [19, 22]. Drobnoustroje cechuje szybkie rozmnażanie się; mogą one być hodowane w warunkach przemysłowych przy użyciu tanich surowców odpadowych jako pożywek i dostarczać dowolnych ilości biomasy o znacznej zawartości enzymów. Dodatkowe możliwości zwiększania ilości enzymów w biomasie stanowi adaptacja enzymatyczna i użycie do produkcji specjalnie dobranych i wyselekcjonowanych mutantów odznaczających się zdolnością produkcji znacznie większej ilości enzymów. Drobnoustroje wytwarzają olbrzymią ilość różnorodnych, pod względem specyficzności substratowej, optimum pH i temperatury, enzymów proteolitycznych. Poza tym mikroorganizmy wytwarzają też enzymy niedostępne z innych źródeł. Stwarza to duże możliwości zastosowań w wielu procesach technologicznych i ich modyfikacjach [1, 5, 22].

Wykorzystanie drożdży *Yarrowia lipolytica* wynika z ich zdolności syntezy kwasu cytrynowego oraz produkcji lipaz i proteaz znajdujących zastosowanie w przemyśle chemicznym, kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym. Drożdże te produkują enzymy pozakomórkowe takie, jak: kwaśne proteazy, fosfatazy, RN-azę, lipazy, esterazę i α -mannozydazę [4, 18, 24].

Preparaty enzymatyczne zastosowane podczas procesu dojrzewania mięsa umożliwiają znaczne skrócenie czasu trwania osiągania pożądanych cech sensorycznych. Problemem jest jednak umiejętne ich stosowanie, przez które rozumie się zarówno ilość, czas działania, jak i sposób przeprowadzenia enzymu w mięsie [1, 3, 22].

Celem przeprowadzonych badań było określenie przydatności preparatów enzymatycznych pochodzących z hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* (szczepu PII6a) do prowadzenia procesu skruszania mięsa wołowego.

Materiał i metody badań

Materiałem doświadczalnym było mięso wołowe (*m. semitendinosus*). Surowiec pobrano jednorazowo w ilości wystarczającej do zaplanowanych badań i przechowywano w warunkach zamrażalniczych.

Źródłem enzymów proteolitycznych zastosowanych w doświadczeniu były drożdże *Yarrowia lipolytica* (szczep PII6a) pochodzące z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Hodowle ww. szczepów prowadzono na podłożach mineralno-organicznych, w których jako źródło węgla zastosowano glukozę (G) lub olej słonecznikowy (O). Preparaty enzymatyczne otrzymano po podczyszczeniu poprzez odwirowanie płynu pochodowlanego i w dalszej części pracy oznaczono je odpowiednio YG lub YO. W otrzymanych preparatach enzymatycznych oznaczano aktywność wobec kazeiny i hemoglobiny. Przyrost produktów degradacji substratów oznaczano spektrofotometrycznie, (przy długości fali 280 nm) po inkubacji w buforze fosforanowo-cytrynianowym w temp. 35°C przez 30 min [2, 11, 13]. Na podstawie uzyskanych wyników dobrano odpowiednie rozcieńczenia stosowanych preparatów w celu wyrównania ich aktywności.

Proteolizę białek mięsa prowadzono w temp. 4 i 18°C, przy dwóch wybranych wartościach pH: 3,5 i 6,0 w ciągu 6 i 24 godz. Porcje mięsa (ok. 50 g) poddano działaniu preparatu enzymatycznego metodą zalewową, stosując mieszaninę roztworu enzymu i buforu Brittona-Robinsona o odpowiednim pH w ilości 20 cm³. Porównawczo przeprowadzono degradację mięsa wołowego pepsyną (P) (firmy Sigma) przy takich samych parametrach prowadzenia procesu. Ponadto we wszystkich wariantach doświadczenia wykonano próby kontrolne, w których surowiec nie był poddany hydrolizie enzymatycznej. Po upływie założonego czasu próby homogenizowano, wirowano przy 10 tys. obr./min w ciągu 10 min i w supernatancie oznaczano produkty degradacji białek mięsa, tj. zawartość wolnej hydroksyproliny

[15], wolnych grup aminowych [10, 21] i białka [12]. Efekt oddziaływania enzymów na białka mięsa określano na podstawie analizy przyrostu ich zawartości w stosunku do prób kontrolnych.

Ponadto w surowcu i mięsie poddanym skruszaniu enzymatycznemu, po przeprowadzeniu obróbki cieplnej w temp. 95°C przez 1 godz. w roztworze soli fizjologicznej, przeprowadzano instrumentalny pomiar kruchości mięsa, polegający na określeniu wartości siły cięcia prostopadłościanów o wymiarach 1 x 1 x 5 cm, za pomocą aparatu Stevens QTS 25.

Uzyskane wyniki, z przeprowadzonych 3 serii doświadczenia (n = 12), poddano analizie statystycznej, stosując metodę jednoczynnikowej i wieloczynnikowej analizy wariancji z wykorzystaniem programu Statgraphics.

Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki oznaczeń zawartości: białka, wolnych grup aminowych, hydroksyproliny oraz pomiarów kruchości mięsa zamieszczono w tab. 1. (analiza jednoczynnikowa), natomiast analizę wieloczynnikową zilustrowano graficznie (rys. 1–4).

Przedstawione dane wskazują, że pierwsze 6 godz. hydrolizy doprowadziło do najintensywniejszego przyrostu wartości oznaczanych wyróżników. Zawartość białka w roztworach po hydrolizie mięsa kształtowała się na poziomie od ~ 6568 µg/g surowca, przy zastosowaniu preparatu drożdżowego YO w pH = 3,5, do ~ 8633 µg/g surowca po hydrolizie preparatem YG w pH = 6,0. Wydłużenie czasu skruszania o dalsze 18 godz. powodowało nieznaczny przyrost białka przy czym najczęściej statystycznie nieistotny. Tylko w przypadku użycia preparatu YO w pH = 3,5 i temp. 18°C przyrost ilości białka rozpuszczalnego był istotny i osiągnął wartość 8560,96 µg/g surowca. Porównując efektywność działania ocenianych enzymów na białka mięśniowe nie zanotowano istotnych różnic, jakkolwiek nieco wyższe ilości białka oznaczano w przypadku degradacji mięsa pepsyną.

Analizując wpływ pH środowiska na przebieg hydrolizy, należy zwrócić uwagę na zwykle statystycznie nieistotny wpływ tego czynnika na ilość białka uwalnianego do roztworu, chociaż użycie preparatów drożdżowych (YO i YG) w pH = 6,0 było nieco efektywniejsze niż w pH = 3,5, szczególnie w krótszym czasie (6 godz.). Jednokierunkowa analiza wariancji wyników nie potwierdziła również wpływu temperatury na stopień degradacji białek mięsa wołowego, jakkolwiek w wyższej temperaturze stwierdzono intensywniejszy przyrost jego zawartości.

Analiza wariancji przy wielokierunkowej klasyfikacji dowodzi, że preparat enzymatyczny YO wykazywał wyższą efektywność degradacji białek surowca niż to miało miejsce po zastosowaniu preparatu YG, ale niższą od pepsyny (rys. 1).

Czynnikami istotnie wpływającymi na zwiększenie przyrostu uwolnionego białka były pH równe 6,0 i całodobowy czas prowadzenia hydrolizy mięsa wołowego.

Tabela 1

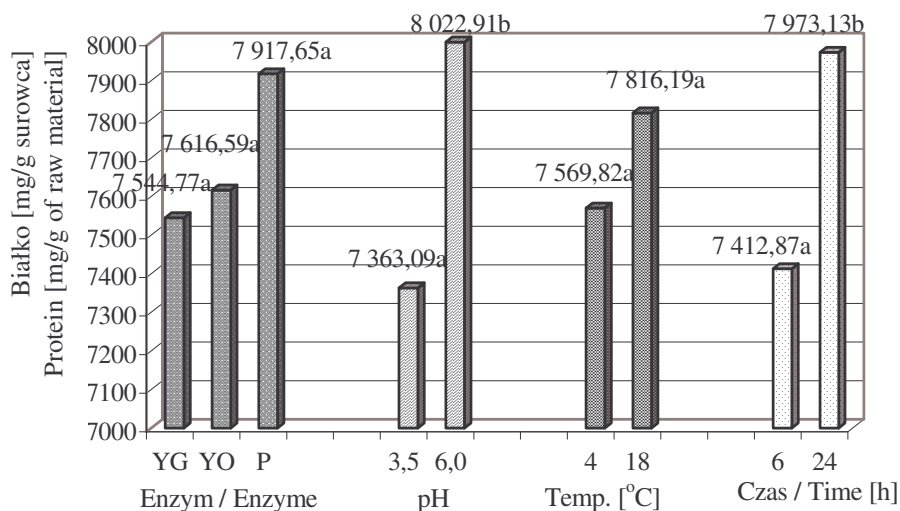
Wyniki oznaczeń zawartości: białka, wolnych grup aminowych, hydroksyproliny oraz siły cięcia po enzymatycznej degradacji białka mięsa wołowego. Analiza jednoczynnikowa.

Results of determining the contents of protein, free amino groups, hydroxyprolin, and shear force after the enzymatic degradation of protein from beef. One-way analysis of variance.

Enzym Enzyme	Parametry procesu Process parameters			Białko Protein [μg/g substrate]	Wolne grupy aminowe Free amine groups [μg/g substrate]	Hydroksypolina Hydroxyproline [μg/g substrate]	Siła cięcia Shear force [N/cm ²]
	pH	temp. [°C]	czas time [h]				
P	3,5	4	6	6930,17 a*	121,66 a	10,98 b	75523 jk
			24	7812,43 ab	280,70 b	12,42 bc	59300 fgh
	3,5	18	6	7606,92 a	122,99 a	9,76 b	76029 jk
			24	8170,18 ab	239,22 b	11,65 bc	57457 efg
	6,0	4	6	7956,43 ab	104,15 a	8,04 a	87641 l
			24	8864,65 bc	254,74 b	10,84 b	80818 kł
6,0	18	6	7993,34 ab	131,10 a	8,40 a	83355 lł	
		24	8007,07 ab	236,01 b	9,63 b	76309 jk	
YO	3,5	4	6	6670,39 a	183,50 b	12,25 c	74396 jk
			24	7665,56 ab	227,63 b	15,07 d	59299 de
	3,5	18	6	6568,10 a	221,71 b	13,71 c	65155 hi
			24	8556,50 b	245,93 b	13,88 c	34042 a
	6,0	4	6	7614,35 a	161,89 ab	9,13 b	63244 gh
			24	7983,34 ab	182,34 ab	9,89 b	54786 def
6,0	18	6	7813,48 ab	231,02 b	11,84 b	49851 cd	
		24	8060,96 ab	235,68 b	12,50 bc	36602 ab	
YG	3,5	4	6	6709,18 a	186,26 b	13,72 c	71267 ij
			24	7739,49 ab	203,47 b	15,44 d	60512 fgh
	3,5	18	6	6764,17 a	187,10 b	11,62 b	64661 hi
			24	7164,01 a	202,45 b	12,72 c	57234 efg
	6,0	4	6	7132,10 a	153,36 a	10,93 b	71195 ij
			24	7759,70 ab	155,59 a	12,90 c	60212 fgh
6,0	18	6	8632,54 b	227,40 b	12,62 c	54190 def	
		24	8656,93 b	230,51 b	12,73 c	43305 bc	

* Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone jednakowymi literami oznaczają brak różnic statystycznie istotnych przy poziomie ufności $\alpha \leq 0,05$ (n = 12).

* Means appearing in the same column and designated by identical letters indicate no statistically significant differences at a trust level of $\alpha \leq 0,05$ (n = 12).

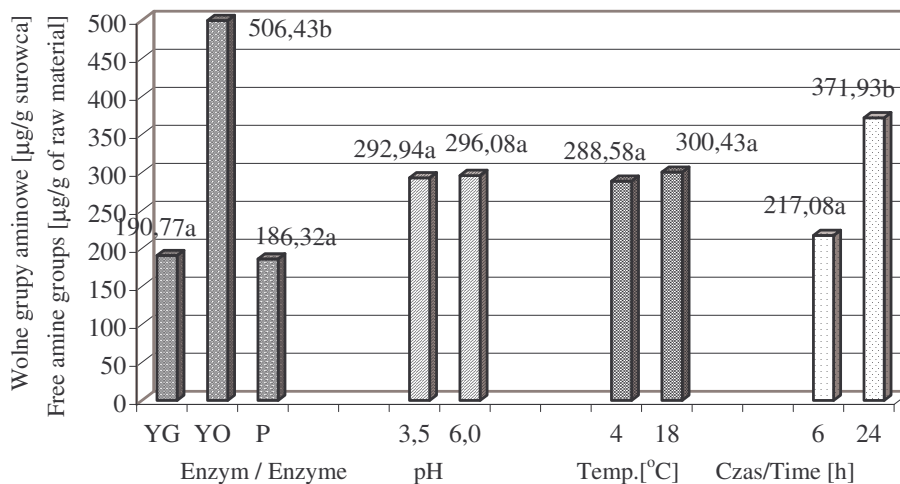


Rys. 1. Zawartość białka w roztworach po degradacji enzymatycznej mięsa wołowego. Analiza wieloczynnikowa.

Fig. 1. Protein content in the solutions after the enzymatic degradation of beef. Multifactor analysis of variance.

W przypadku oznaczeń wolnych grup aminowych po przeprowadzeniu hydrolizy enzymatycznej mięsa analizowanymi preparatami enzymatycznymi stwierdzić można, że wydłużenie czasu prowadzenia procesu degradacji wpłynęło istotnie na ich zwiększenie w roztworze po zastosowaniu pepsyny, a ilość oznaczonych wolnych grup aminowych wynosiła maksymalnie 280,70 $\mu\text{g/g}$ surowca (tab. 1). Natomiast preparaty drożdżowe już po 6 godz. prowadzenia degradacji uwalniały więcej grup aminowych. W tym przypadku wydłużenie czasu ich działania nie powodowało istotnego przyrostu tego wyróżnika. Z danych (tab. 1) wynika, że pH = 3,5 było zwykle efektywniejszym środowiskiem prowadzenia procesu niż pH = 6,0 w przypadku obu porównywanych preparatów. Podwyższenie temperatury, w której prowadzono hydrolizę, powodowało istotny wzrost intensywności uwalniania grup aminowych, ale stwierdzono go tylko przy wyższym pH środowiska w przypadku enzymów z *Yarrowia lipolytica*.

Analiza wieloczynnikowa omawianych oznaczeń wskazuje na wpływ czasu prowadzenia skruszania oraz podkreśla lepszą efektywność degradacji białek mięsa wołowego doświadczalnymi enzymami YO (rys. 2). Badania przeprowadzone przez Czajgucką i wsp. [4] wskazały również na wysoką aktywność proteaz z *Yarrowia lipolytica* w pH = 3,5. Natomiast badania Krasnowskiej [9] dowiodły, że zmiana źródła węgla w podłożu hodowlanym miała istotny wpływ na aktywność proteolityczną ocenianych preparatów drożdżowych. Autorka [9], prowadząc hydrolizę skór wieprzowych analogicznymi preparatami enzymatycznymi, wykazała również najintensywniejszą degradację białka przy zastosowaniu preparatu YO.



Rys. 2. Zawartość wolnych grup aminowych w roztworach po degradacji enzymatycznej mięsa wołowego. Analiza wieloczynnikowa

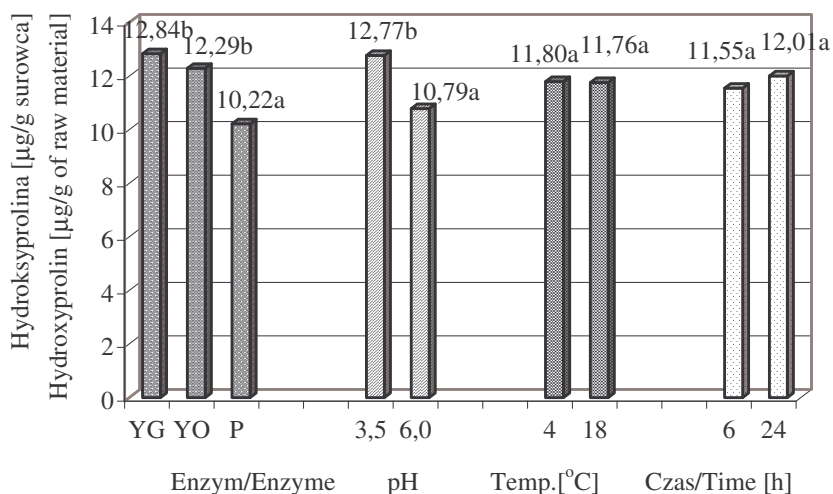
Fig. 2. Content of free amine groups in the solutions after the enzymatic degradation of beef. Multi-factor analysis of variance.

Na podstawie oznaczeń hydroksyprowliny w roztworach po procesie skruszania wnioskować można, że preparaty pochodzenia drożdżowego charakteryzowały się wyższą zdolnością kolagenolityczną niż pepsyna (tab. 1). Najwięcej hydroksyprowliny po skruszaniu pepsyną oznaczono w doświadczeniu prowadzonym w pH = 3,5 przez 24 godz. w temp. 4°C i wartość ta wynosiła 12,42 µg Hyp z 1 g surowca. W analogicznych warunkach procesu prowadzonego z zastosowaniem proteaz drożdżowych wartości te kształtowały się na istotnie wyższym poziomie i wynosiły 15,07 µg Hyp, przy zastosowaniu preparatu YO oraz 15,44 µg Hyp z 1 g surowca, przy zastosowaniu preparatu YG. Oba preparaty drożdżowe charakteryzowały się wysoką aktywnością wobec białek kolagenowych w pH = 3,5. Natomiast nieistotny okazał się wpływ podwyższenia temperatury prowadzenia procesu, a wydłużenie czasu hydrolizy tylko nieznacznie zwiększało zawartość tego aminokwasu w roztworze.

Analiza wieloczynnikowa (rys. 3) potwierdziła lepszą efektywność degradacji kolagenu mięsa preparatami drożdżowymi (najwyższa w przypadku YG) i istotny wpływ pH środowiska przy braku różnic w degradacji tego białka w wyższej temperaturze i przy wydłużeniu czasu prowadzenia procesu.

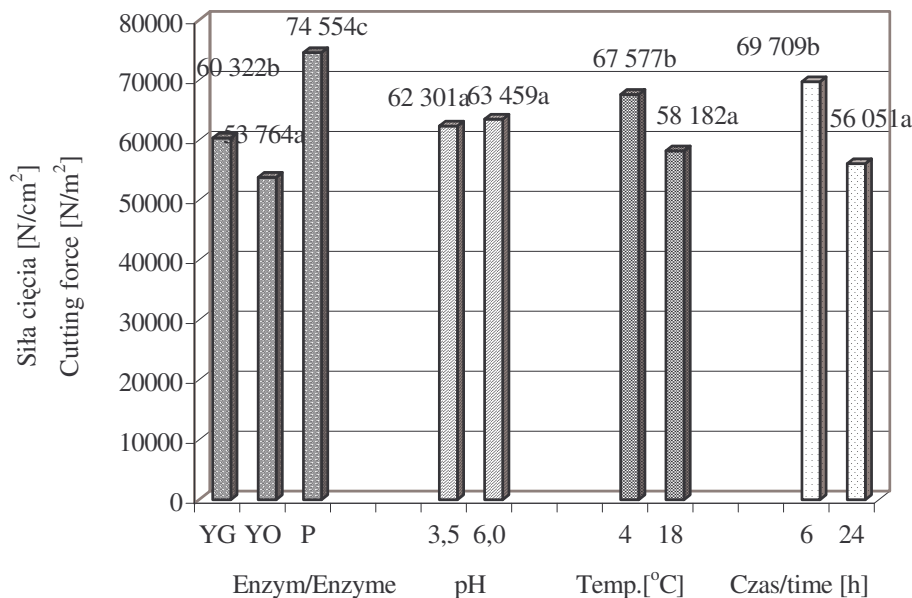
Po przeprowadzonej w doświadczeniu hydrolizie enzymatycznej mięsa wołowego dokonano pomiarów siły cięcia prób po uprzedniej modelowej obróbce termicznej. Analiza wariancji przy jednokierunkowej klasyfikacji wykazała znaczne zróżnicowanie wartości tego wyróżnika kruchości, wyrażonej w N/cm², kształtowały się one w przedziale od 34042 N/cm² (wariant skruszania preparatem YO w pH = 3,5 w

temp. 18°C przez 24 godz.) do 87641 N/cm² (przy skruszaniu pepsyną w pH = 6,0 w temp. 4°C przez 6 godz.), przy czym niższe wartości siły cięcia dowodzą lepszej kruchości mięsa. Porównując uzyskane wyniki (tab. 1) należy stwierdzić, że wydłużenie czasu przetrzymywania mięsa w obecności enzymu miało pozytywny wpływ na jego kruchość. Najlepsze efekty uzyskano prowadząc proces z użyciem preparatu drożdżowego YO w temp. 18°C przez 24 godz., gdzie przy obu wariantach pH siła cięcia była najmniejsza. Pepsyna natomiast okazała się enzymem najmniej efektywnym w pH = 6,0, a wydłużenie czasu prowadzenia procesu nie wpłynęło istotnie na poprawę kruchości mięsa wołowego (tab. 1), co wynika z faktu, że optimum jego działania jest w pH = 2,0. Analiza wielokierunkowa wykazała, iż czynnikami wpływającymi na zmniejszenie wartości siły cięcia są pH = 3,5, temp. 18°C oraz 24-godzinny czas prowadzenia degradacji białek (rys. 4). Reasumując, po analizie wykonanych oznaczeń chemicznych i instrumentalnym pomiarze kruchości mięsa poddanego hydrolizie enzymatycznej, należy podkreślić dobre właściwości proteolityczne ocenianych preparatów drożdżowych, w tym szczególnie enzymów preparatu YO. Ponadto godnym uwagi jest fakt, że poprawa kruchości mięsa doświadczalnymi preparatami była większa niż miało to miejsce w przypadku zastosowania pepsyny.



Rys. 3. Zawartość hydroksyproliny w roztworach po degradacji enzymatycznej mięsa wołowego. Analiza wieloczynnikowa.

Fig. 3. Hydroxyprolin content in the solutions after the enzymatic degradation of beef. Multifactor analysis of variance.



Rys. 4. Kruchość mięsa wołowego po degradacji enzymatycznej. Analiza wieloczynnikowa.

Fig. 4. Tenderness of beef after the enzymatic degradation. Multifactor analysis of variance.

Wnioski

1. Aktywność kolagenolityczna dwóch badanych preparatów drożdżowych, oceniona na podstawie przyrostu wolnej hydroksyproliny w roztworach po przeprowadzonej degradacji surowca, jest zdecydowanie wyższa niż pepsyny.
2. Wydłużenie czasu skruszania mięsa wołowego z 6 do 24 godz. ma istotny wpływ na degradację białek mięśniowych, jednak najintensywniejsza jest w pierwszych 6 godz. prowadzenia procesu.
3. Najlepszy efekt poprawy kruchości mięsa wołowego po hydrolizie enzymatycznej uzyskano stosując preparat enzymatyczny z drożdży *Yarrowia lipolytica* (szcep PII6a) z hodowli, w której źródłem węgla był olej (YO).
4. Pepsyna, w stosunku do ocenianych preparatów drożdżowych, w mniejszym stopniu wpływa na poprawę kruchości mięsa.

Literatura

- [1] Bednarski W.: Enzymatyczna modyfikacja składników żywności. W: Biotechnologia żywności. Red.: W. Bednarski i A. Rejs. WNT. Warszawa 2001, s. 376-397.
- [2] Bichodka M.J., Khachatourians G.G.: Purification and properties of an extracellular proteinase produced by entomopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, **7**, 1679-1684.
- [3] Buckenhüskes H., J.: Enzyme in der Fleischverarbeitung. *Fleischwirt.*, 2000, **3**, 29-33.

- [4] Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szołtysik M., Wojtatowicz M.: Aktywność proteolityczna szczepów drożdży pochodzących z serów Rokpol. *Biotechnologia*, 2003, **2** (1-2), 73-81.
- [5] Kalinowska H., Bielecki S., Turkiewicz M.: Enzymy nowej generacji w produkcji żywności. Cz. I. *Przem Spoż.*, 2000, **10**, 3-5.
- [6] Kijowski J.: Podstawy technologii mięsa drobiowego. W: *Mięso i przetwory drobiowe, technologia, higiena i jakość* - pod red. T. Grabowskiego i J. Kijowskiego. PWN. Warszawa 2004, s. 40-152.
- [7] Kołczak T.: Wpływ czynników poubojowych na kruchość wołowiny. *Gosp. Mięs.*, 2000, **5**, 28-31.
- [8] Kołczak T.: Jakość mięsa kulinarnego. *Gosp. Mięs.*, 2000, **8**, 32-33.
- [9] Krasnowska G.: Ocena właściwości proteolitycznych preparatów enzymatycznych uzyskanych z różnych szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **1** (38), 95-103.
- [10] Kuchroo C.V., Ramilly I.P., Fox P.F.: Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzoesulphonic acid. *J. Food Technol.*, 1983, **7**, 129-133.
- [11] Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K.: Cuticle-degradation enzymes of enthomopatogenic fungi. Cuticle degradation in vitro by enzymes from enthomopathogen. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986, **47**, 167-177.
- [12] Mejbbaum-Katzenellenbogen W., Mochnacka I.: Kurs praktyczny biochemii. PWN. Warszawa 1968.
- [13] Morihara K., Tsuzuki H.: Elastolytic properties of various proteinases of microbiological origin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, **120**, 68-78.
- [14] Nowak D., Korzeniowski W.: Czynniki wpływające na jakość mięsa wołowego. *Gosp. Mięs.*, 2003, **2**, 22-23.
- [15] PN-ISO 1346:2000. Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości hydroksyproliny.
- [16] Pospiech E., Grześ B., Łyczyński A., Borzuta K., Szalata M., Mikołajczak B., Iwańska E.: Białka mięśniowe, ich przemiany a kruchość mięsa. *Mięso i Wędliny*, 2003, **1**, 26-33.
- [17] Powell T.H., Hunt M.C., Dickeman M.E.: Enzymatic assay to determine collagen thermal denaturation and solubilization. *Meat Sci.*, 2000, **54**, 307-311.
- [18] Robak M.: Studia nad wykorzystaniem octanu i wydzielaniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Zesz. Nauk. AR, Rozprawy*, Wrocław 2002, s. 442.
- [19] Rawicka-Żukowska R.: Zastosowanie preparatów enzymatycznych w przemyśle rolno-spożywczym. *Przem. Spoż.*, 1998, **3**, 19-22.
- [20] Sikorski Z.E.: Charakterystyka białek głównych surowców żywnościowych. W: *Chemia żywności* - pod red. Z. E. Sikorski, WNT. Warszawa 2002, s. 304-333.
- [21] Snyder S. L., Sobociński P.Z.: An improved 2,4,6-trinitrobenzoesulphonic acid method for determination of amines. *Analys. Bioch.*, 1975, **64**, 285-288.
- [22] Warchalewski J.R.: Zastosowanie enzymów w produkcji żywności na przełomie wieków. *Przem. Spoż.*, 2001, **8**, 40-44.
- [23] Wajda S.: Możliwości poprawy jakości mięsa wołowego. *Gosp. Mięs.*, 2001, **7**, 24-26.
- [24] Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczyk P., Skiba A., Gdula A.: Identification and biochemical characteristic of yeast microflora of Rokpol cheese, In. *J. Food Microbiol.*, 2001, **69**, 135-140.

**DETERMINATION OF THE USEFULNESS OF SELECTED ENZYMATIC PREPARATIONS
TO IMPROVE THE QUALITY OF BEEF**

S u m m a r y

Tenderness of meat is one of the most important features of culinary beef. It is primarily created during the aging of meat. This long-term process with endogenic enzymes participating in it may be accelerated using exogenous proteolytic enzymes. The objective of the present study was to assess the usefulness of two enzymatic preparations (YG and YO), obtained from a culture of *Yarrowia lipolytica* yeasts (strain PII6a) and applied to tenderize beef, as well as to compare their effectiveness with the effectiveness of pepsin. The experimental material was enzymatically hydrolyzed using some selected preparations at two temperatures: 4°C and 18°C, for 6 and 24 hours, and at two pH values of the environment (3.5 and 6.0). The effect of the experimental enzymes was assessed on the basis of the degree of meat protein degradation. The latter was determined by the increase in the content of free amine groups, hydroxyproline, and nitrogen contained in post-hydrolysis solutions, as well as on the basis of measured levels of meat tenderness using special gauges. It was stated that the enzymatic preparation 'YO' showed the highest proteolytic activity if compared with the proteins of beef. The pH acidity of the environment equalling 3.5 was optimal for the activity of the assessed enzymatic preparations; the temperature did not have any relevant impact on the protein degradation process. It was proved that a prolonged hydrolysing process, from 6 to 24 hours, had a significant effect on the improvement of meat tenderness although the degradation was the most intensive during the first 6 hours.

Key words: enzymatic preparations, enzymatic hydrolysis, tenderness, beef 

MONIKA KORDOWSKA-WIATER, BEATA ŁUKASIEWICZ

WPLYW SPOSOBU PAKOWANIA NA JAKOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ PASZTETÓW

Streszczenie

Celem badań była charakterystyka mikroorganizmów wybranych 20 pasztetów mięsnych i drobiowych, pakowanych w różne opakowania i próba ustalenia wpływu sposobu pakowania na jakość mikrobiologiczną tych produktów.

Oznaczenia wykonane wg PN lub PN-ISO obejmowały: ogólną liczbę bakterii mezofilnych i psychrotrofowych, bakterii fermentacji mlekowej, drożdży i pleśni, bakterii z grupy coli i enterokoków, obecność bakterii proteolitycznych, beztlenowców przetrwalnikujących oraz bakterii chorobotwórczych z gatunku *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* i z rodzaju *Salmonella*. Pasztety w puszkach zawierały najmniejszą liczbę mikroorganizmów. W produktach pakowanych w słoiki, puszki i folię PE/PA nie wykryto bakterii chorobotwórczych. Wszystkie pasztety były wolne od bakterii z grupy coli, zaś w 35% prób wykryto obecność enterokoków. Pakowanie próżniowe pasztetów sprzyjało rozwojowi bakterii fermentacji mlekowej. Wszystkie pasztety były bezpieczne dla zdrowia konsumentów.

Słowa kluczowe: pasztet, jakość mikrobiologiczna, bezpieczeństwo zdrowotne, opakowanie.

Wprowadzenie

Pasztety należące do grupy wyrobów garmażeryjnych podrobowych cieszą się w Polsce od wielu lat dużym zainteresowaniem konsumentów. Należą one do przetworów produkowanych z podrobów, mięsa, tłuszczu, uprzednio parzonych, gotowanych lub duszonych, różnych surowców uzupełniających niemięsnych (np. izolatów białka sojowego, błonnika, skrobi) i przypraw. Wszystkie składniki muszą być rozdrobnione lub zhomogenizowane, wymieszane, uformowane i poddane procesowi parzenia bądź pieczenia [10, 23]. Niezależnie od użytych do produkcji składników, wytworzone wyroby podrobowe powinny spełniać wymagania odpowiednich norm, dotyczące ich właściwości sensorycznych, składu chemicznego, a także powinny spełniać określone wymagania mikrobiologiczne dotyczące bezpieczeństwa zdrowotnego (obecność mikroflory patogennej: *Salmonella* spp., *E.*

coli O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* i jakości handlowej [5, 25, 26]).

Niektóre etapy produkcji pasztetów sprzyjają namnażaniu się mikroflory (np. rozdrabnianie, kutrowanie, mieszanie farszu), jednak stosowana w końcowym etapie obróbka termiczna powinna znacznie ograniczyć rozwój wielu grup drobnoustrojów. Wiadomo, że stosowana rutynowo w przemyśle mięsnym obróbka cieplna nie zapewnia pełnej jałowości konserw, a jedynie stan mniej lub bardziej pogłębionej anabiozy [8]. Zwykle końcowe zanieczyszczenia stanowią tylko formy przetrwalne *Bacillus* (np. *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*) i *Clostridium* (np. *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*) i ewentualnie ciepłooporne enterokoki [2, 8]. Przyczyną niskiej jakości mikrobiologicznej wyrobów podrobowych mogą być: stopień rozdrobnienia i liczba składników farszu, stopień zanieczyszczenia początkowego farszu, higiena produkcji i warunki przechowywania [5, 9]. Niewystarczające ogrzanie lub zbyt długi czas przetrzymywania wyrobu przed obróbką termiczną sprzyja rozwojowi mikroorganizmów powodujących zepsucie wędlin podrobowych [1].

Jakość wytworzonego produktu podrobowego w istotnej mierze zależy również od sposobu przechowywania oraz zastosowanego opakowania. Problem zabezpieczenia produktu w czasie transportu i przechowywania nabiera istotnego znaczenia w miarę wydłużania się drogi wyrobu od producenta do konsumenta. W praktyce do pakowania pasztetów stosuje się opakowania zarówno tradycyjne np. puszki stalowe, słoiki szklane, jak i opakowania nowoczesne np. pojemniki aluminiowo-polipropylenowe oraz specjalne folie i laminaty stosowane w technice pakowania próżniowego. Na rynku wciąż można nabyć również pasztety pieczone, sprzedawane bezpośrednio z ład chłodniczych, zwykle pakowane w papier pergaminowy.

Celem pracy była charakterystyka mikroflory wybranych pasztetów mięsnych i drobiowych pakowanych w różne opakowania i próba ustalenia czy sposób pakowania determinuje rozwój określonych grup drobnoustrojów w produktach.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiło 20 próbek dwóch rodzajów pasztetów: z mięsa i podrobów zwierząt rzeźnych oraz z drobiu, wyprodukowanych przez krajowe zakłady przemysłu mięsnego, których charakterystykę przedstawiono w tab. 1. Pasztety były pakowane w puszki, słoiki, opakowania aluminiowo-polipropylenowe, próżniowo w folię PE/PA oraz w papier pergaminowy przy zakupie bezpośrednio z lady chłodniczej. W zależności od sposobu pakowania producenci deklarowali różną temperaturę przechowywania i różne okresy przydatności do spożycia. Pasztety były kupowane w placówkach sprzedaży detalicznej, głównie w supermarketach na terenie Lublina i w dniu zakupu analizowane. Nabywane wyroby pakowane w puszki, słoiki i opakowania aluminiowo-polipropylenowe były składowane bezpośrednio na półkach sklepowych,

zaś pasztety pakowane próżniowo oraz pieczone w dużych formach przechowywano w ladach chłodniczych.

Tabela 1

Charakterystyka prób badanych pasztetów.
Profile of pâté samples under analysis.

Nr próby No. of sample	Nazwa produktu Name of product	Deklarowane składniki pochodzenia mięsnego Meat constituents as declared by the manufacturers	Rodzaj opakowania Type of package
1	Pasztet mazowiecki Mazowiecki pâté	Tłuszcz i mięso wieprzowe, wątroba Pork fat and meat, liver	Puszka Tin
2	Pasztet mazowiecki Mazowiecki pâté	Podroby, tłuszcz wieprzowy, mięso wieprzowe i wołowe Offal, pork fat, pork and beef meat	Puszka Tin
3	Pasztet podlaski Podlaski pâté	Mięso z kurcząt, podroby Poultry meat, offal	Puszka Tin
4	Pasztet drobiowy +ECO +ECO poultry pâté	Mięso, skórki i podroby drobiowe, tłuszcz Poultry meat, poultry skin and offal, fat	Puszka Tin
5	Pasztet mazowiecki Mazowiecki pâté	Mięso i wątroba wieprzowa Pork meat and liver	Stoik Jar
6	Pasztet mazowiecki Mazowiecki pâté	Podroby, tłuszcz wieprzowy, mięso wieprzowe i wołowe Offal, pork fat, pork and beef meat	Stoik Jar
7	Pasztet drobiowy Poultry pâté	Wątroba, mięso drobiowe Liver, poultry meat	Stoik Jar
8	Pasztet drobiowy +ECO +ECO poultry pâté	Mięso, skórki i podroby drobiowe, tłuszcz Poultry meat, skin and offal, fat	Stoik Jar
9	Pasztet delikatesowy Delikatesowy pâté	Wątroba wieprzowa, tłuszcz wieprzowy, skórki i mięso wieprzowe Pork liver, fat, skin and meat	Opakowanie aluminiowo- polipropylenowe Aluminium- polypropylene package
10	Pasztet mazowiecki Mazowiecki pâté	Surowiec wieprzowy, podroby, tłuszcz Pork, offal, fat	Jak wyżej As above
11	Pasztet podlaski Podlaski pâté	Mięso z kurcząt, podroby Poultry meat, offal	Jak wyżej As above
12	Pasztet drobiowy +ECO +ECO poultry pâté	Mięso, skórki i podroby drobiowe, tłuszcz Poultry meat, skin and offal, fat	Jak wyżej As above

c.d. Tab. 1

13	Pasztet wiejski porcjowany Wiejski pâté	Mięso z głów wieprzowych, wątroba, tłuszcz Meat from pigs' heads, liver, fat	Folia PE/PA – próżnia PE/PA foil - vacuum
14	Pasztet wieprzowy Pork pâté	Mięso wieprzowe Pork	Jak wyżej As above
15	Pasztet drobiowy Poultry pâté	Mięso drobiowe, wątroba, skórki i tłuszcz drobiowy Poultry meat, skin and offal, fat	Jak wyżej As above
16	Pasztet drobiowy +ECO +ECO poultry pâté	Mięso drobiowe, podroby Poultry meat, offal	Jak wyżej As above
17	Pasztet mięsny Meat pâté	Mięso wieprzowe, podroby Pork meat, offal	Bez trwałego opakowania Without durable package
18	Pasztet Łukowski Łukowski pâté	Mięso i tłuszcz wieprzowy, podroby Pork meat and fat, offal	Jak wyżej As above
19	Pasztet drobiowy Poultry pâté	Mięso, podroby drobiowe Poultry meat and offal	Jak wyżej As above
20	Pasztet drobiowy +ECO +ECO poultry pâté	Mięso drobiowe, podroby Poultry meat and offal	Jak wyżej As above

Opakowania pasztetów sterylnie otwierano, po czym pobierano próbki z różnych miejsc, odważano sterylnie 10 g, homogenizowano z 90 cm³ rozcieńczalnika zawierającego pepton i NaCl, uzyskując w ten sposób rozcieńczenia wyjściowe. Następnie sporządzano kolejne rozcieńczenia wg PN-A-82055-3:1994 [16].

Analiza mikrobiologiczna obejmowała określenie występowania zarówno mikroflory chorobotwórczej, jak i saprofitycznej. Oznaczenia wykonywano w 2 powtórzeniach, po czym wyliczano średnią arytmetyczną. Analizy obejmowały:

- ogólną liczbę bakterii mezofilnych tlenowych i psychrotrofowych na agarze odżywcym wg PN-A-82055-6:1994 [17];
- obecność bakterii proteolitycznych na bulionie odżywcym zestalonym żelatyną spożywczą wg PN-A-82055-14:1997 [12];
- liczbę drożdży i pleśni na podłożu z chloramfenikolem wg PN-A-82055-16:1994 [14];
- liczbę bakterii kwasu mlekowego na podłożu MRS wg PN-A-82055-17:1997 [15];
- obecność bakterii beztlenowych przetrwalnikujących w podłożu Wilsona-Blaira wg PN-A-82055-12:1997 [11];
- najbardziej prawdopodobną liczbę bakterii z grupy coli w podłożu z laktozą, żółcią i zielenią brylantową wg PN-ISO 4831 11:1998 [20];
- obecność enterokoków w pożywce z azydkiem sodowym i fioletem krystalicznym wg PN-A-82055-7:1997 [18];

- obecność i liczbę bakterii *Bacillus cereus* na agarze odżywczym z emulsją żółtka jaja + testy potwierdzające wg PN-A-82055-15:1999 [13];
- obecność i liczbę *Staphylococcus aureus* na podłożu Baird-Parkera z tellurem potasu i emulsją żółtka jaja + testy potwierdzające wg PN-A-82055-9:1994 [19];
- obecność bakterii z rodzaju *Salmonella*, stosując nieselektywne namnażanie w wodzie peptonowej zbuforowanej, namnażanie selektywne w pożywce Rappaporta-Vasiliadis oraz wzrost na podłożach selektywnych z czerwienią fenolową i zielenią brylantową (BGA) oraz z siarczanem bizmutowym wg PN-ISO 6579:1998 [21].

Wyniki i dyskusja

Wg rozporządzenia Ministra Zdrowia [22] w wyrobach garmazeryjnych i potrawach kulinarnych gotowych (mięsnych lub niemięsnych, podrobowych) pałeczki *Salmonella* nie powinny być obecne w 25 g, *Staphylococcus aureus* jest dopuszczalny do liczby $5 \cdot 10^2$ jtk·g⁻¹, pałeczki z grupy coli powinny być nieobecne w 0,001 g, beztlenowe laseczki przetrwalnikujące nieobecne w 0,1 g, obecność pleśni dopuszcza się do liczby 2×10^2 jtk·g⁻¹, a drożdży maksymalnie do 10^2 jtk·g⁻¹.

Spośród bakterii chorobotwórczych w dwóch próbach pasztetów mięsnych, z których jeden był pakowany w pojemnik aluminiowo-polipropylenowy, a drugi kupowany bezpośrednio z lady chłodniczej i przewożony do badań w papierze pergaminowym, stwierdzono obecność laseczek *Bacillus cereus*. Wiadomo, że obecność *B. cereus* można traktować jako niebezpieczną dla konsumenta dopiero po przekroczeniu liczby 10^3 jtk·g⁻¹ produktu, gdyż za dawkę infekcyjną uważa się liczbę 10^5 – 10^8 żywych komórek lub spor w 1 g, zaś przy syndromie biegunkowym szacuje się, że objawy są widoczne przy całkowitej dawce infekcyjnej 10^5 – 10^7 komórek [3]. Natomiast zanieczyszczenie tą laseczką analizowanych pasztetów sięgało 10^1 – 10^2 jtk·g⁻¹, co nie stanowiło zagrożenia dla bezpieczeństwa zdrowotnego konsumenta.

Obecność gronkowca złocistego odnotowano również w dwóch próbach (co stanowi 10%): w pasztecie mięsny i drobiowym kupowanym z lady chłodniczej, co daje podstawy do stwierdzenia, że drobnoustrój ten mógł pochodzić z rąk osób obsługujących stoiska z wyrobami mięsnymi. W analizowanych próbach nie stwierdzono obecności pałeczek *Salmonella*, a także przetrwalnikujących laseczek beztlenowych redukujących siarczany. Nieobecność pałeczek *Salmonella* w pasztetach, chociaż jest to drobnoustrój popularny w mięsie i drobiu, może wytłumaczyć stosowaną skuteczną obróbkę termiczną produktów. Tyburcy [25] podaje za Viwegnis i wsp., którzy w Belgii badali różne produkty mięsne, w tym pasztety, że stwierdzono obecność gronkowca złocistego w 2% próbek, zaś pałeczki *Salmonella* w 1 na 249 przebadanych prób.

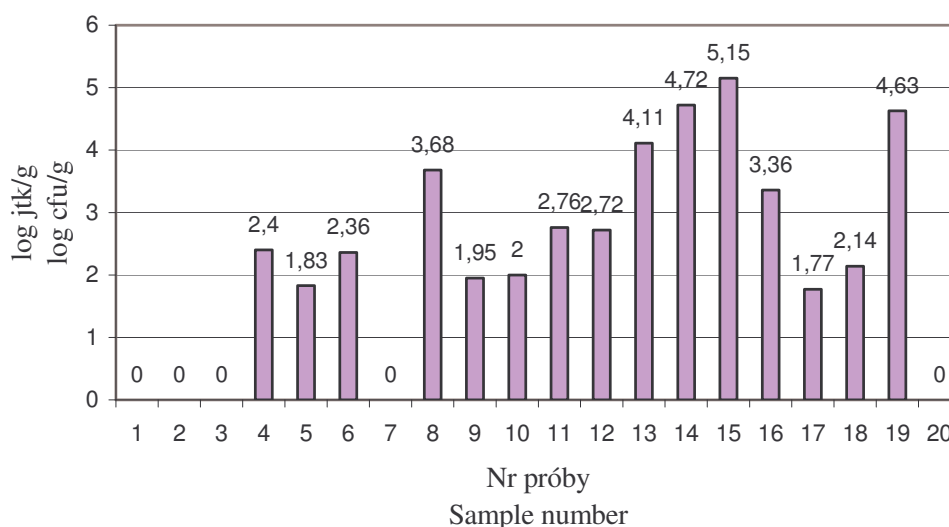
Spośród bakterii uważanych za wskaźniki jakości higienicznej, w próbach nie stwierdzono obecności bakterii z grupy coli, wrażliwych na wysoką temperaturę

obróbki. Natomiast stwierdzono występowanie ciepłoopornych enterokoków w liczbie około 10^1 jtk·g⁻¹ (log z liczby komórek zawierał się pomiędzy 0,96 a 1,63) w 7 próbach (35% ogółu prób): w 3 pasztetach mięsnych (dwa były pakowane próżniowo w folię PE/PA (log = 0,96 i 1,32), a jeden był kupowany z lody chłodniczej (log = 1,17)) oraz w 4 pasztetach drobiowych (w 1 pakowanym próżniowo (log = 1,63), 1 w puszcze (log = 1,36), 1 w słoiku (log = 1,04) i 1 kupowanym z lody chłodniczej i pakowanym w papier pergaminowy (1,63)). Obecność enterokoków i ich zdolność do wzrostu w stosunkowo niskiej temperaturze może powodować psucie konserw pasteryzowanych, a nawet prowadzić do zatruc pokarmowych [8]. Fernandez-Lopez i wsp. [3], podczas badań pasztetów zawierających mięso wieprzowe i wątrobę strusia, pakowanych próżniowo i przechowywanych w warunkach +4°C, nie stwierdzili obecności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, co potwierdza spostrzeżenia prezentowanych badań.

Przebadano obecność i liczbę bakterii mezofilnych, psychrotrofów, bakterii mlekowych i proteolitycznych, które nie są objęte wymaganiami rozporządzenia Ministra Zdrowia i nie stanowią zagrożenia dla bezpieczeństwa zdrowotnego. Przyjmuje się za dopuszczalne zanieczyszczenie drobnoustrojami saprofitycznymi rzędu 10^6 jtk·g⁻¹, powyżej którego mogą być widoczne objawy zepsucia produktu. W badanych próbach pasztetów bakterie nie osiągnęły tego krytycznego poziomu. W tej grupie drobnoustrojów nie stwierdzono obecności mikroflory proteolitycznej. W swoich badaniach nad jakością i trwałością pasztetów drobiowych pakowanych próżniowo, Świdorski i wsp. [24] nie zaobserwowali bakterii proteolitycznych w produktach świeżych, jednak w trakcie 14-dniowego przechowywania wyrobów w warunkach częściowej próżni, w chłodni, liczba bakterii proteolitycznych osiągnęła poziom $5 \cdot 10^4$ jtk·g⁻¹, zaś w warunkach wysokiej próżni rozwoju bakterii nie stwierdzono.

W większości prób znajdowały się bakterie kwasu mlekowego w zakresie od 10^1 jtk·g⁻¹ do 10^5 jtk·g⁻¹ (rys. 1), z czego 3 na 4 pasztety w puszkach były wolne od tych drobnoustrojów, natomiast zdecydowanie największe ich ilości wykryto w pasztetach pakowanych próżniowo z uwagi na zdolność tych bakterii do życia i namnażania się w warunkach beztlenowych. Stosunkowo licznie drobnoustroje te występowały w pasztetach sprzedawanych bez opakowań. Obecność bakterii mlekowych, zwłaszcza w opakowaniach próżniowych potwierdzają obserwacje Leszczyńskiej-Fik i Fika [7], dotyczące chłodniczego przechowywania pakowanej próżniowo mielonki wieprzowej, gdzie obserwowano namnażanie się bakterii mlekowych w temp. +2°C do poziomu 10^5 jtk·g⁻¹ po 15 dniach przechowywania, a po 21 dniach do poziomu 10^7 jtk·g⁻¹ z wyjściowego zanieczyszczenia wędliny rzędu 10^2 jtk·g⁻¹, a w temp. +8°C po 3 tygodniach ich liczba sięgała poziomu 10^{11} jtk·g⁻¹. Również w badaniach Świdorskiego i wsp. [24] zaobserwowano rozwój beztlenowców nieprzetwarzających, do których zaliczają się bakterie mlekowe, w pasztetach pakowanych próżniowo, a zwłaszcza w środowisku próżni wysokiej. W badaniach Fernandez-Lopez i wsp. [3] bakterie mlekowe były także obecne przez cały okres

przechowywania pasztetów wieprzowo-strusich, pakowanych próżniowo i ich liczba osiągnęła wartość ok. $5,5 \log$ z $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ po 28 dniach przechowywania. Obecność bakterii tego rodzaju może wywołać niepożądane zmiany sensoryczne np. smak i zapach kwaśny, gryzący, jełki, serowaty oraz śluzowacenie. Pałeczki *Lactobacillus* spp. tworzące nadtlenki powodują powstawanie jasnych lub kremowych obszarów w wyrobie wędliniarskim [1]. Wg Anonima [1] problem obecności i rozwoju bakterii fermentacji mlekowej w różnych wędlinach pakowanych próżniowo wynika z niskiego poziomu higieny podczas pakowania.

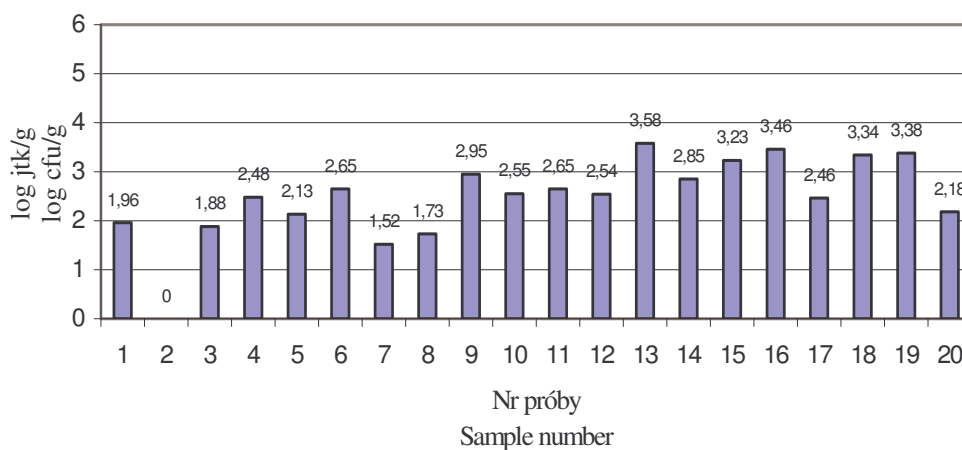


Rys. 1. Liczba bakterii mlekowych w próbach pasztetów.

Fig. 1. Lactic acid bacteria count in the pâté samples.

Bakterie mezofilne były obecne w 19 próbach badanych pasztetów. Generalnie pasztety mięsne i drobiowe w puszkach i słoikach zawierały najmniej liczne populacje mezofili (\log z $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1} = 1-2$), zaś najwięcej było ich w pasztetach pakowanych próżniowo (\log z $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1} = 2,85-3,58$) (rys. 2). Pełczyńska i Szkucik [9] w badaniach mikroflory kiszonej pasztetowej odnotowali stopień zanieczyszczenia drobnoustrojami mezofilnymi na poziomie $10^2 \text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ (\log z $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1} = 2,37$) bezpośrednio po produkcji i aż $10^4 \text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ (\log z $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1} = 4,40$) w kiełbasie pasztetowej znajdującej się w obrocie, zaś Świdorski i wsp. [24] w pasztetach pakowanych próżniowo zaobserwowali wzrost tej grupy bakterii w trakcie przechowywania nawet do ok. $2\cdot 10^6 \text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$, a w pasztecie drobiowym pakowanym w folię spożywczą liczba mezofili sięgała powyżej $5\cdot 10^5$ po 7 dniach i ok. $2,6\cdot 10^6 \text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ po 14 dniach chłodniczego przechowywania. W pasztetach badanych przez Fernandez-Lopez i wsp. [3] liczba początkowa mezofili wynosiła ok. 1 log i sukcesywnie rosła w trakcie przechowywania do ok. 2,5 log z $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ po 28 dniach. W badanych próbach zdecydowanie mniej oznaczono psychrotrofów – na ogół log z $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ zawierał się między 1 a 3 (rys. 3), lecz tendencje były podobne jak w

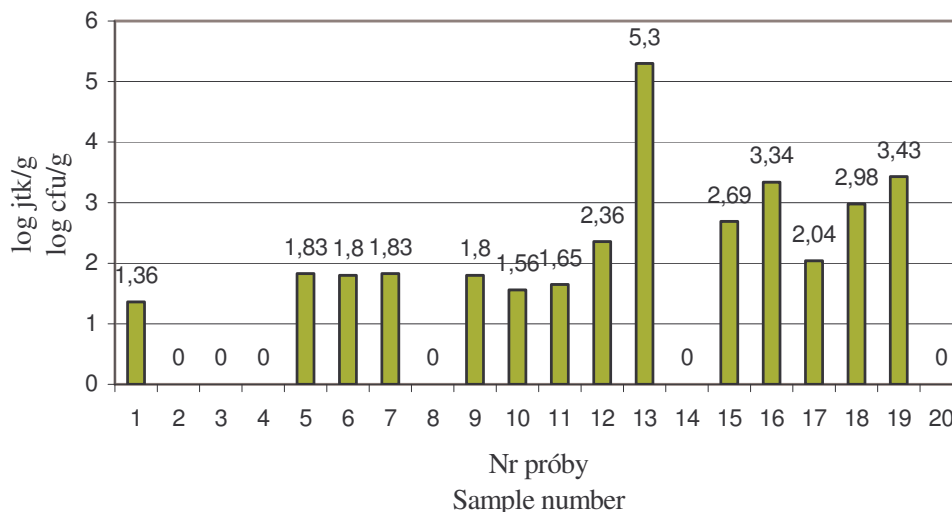
przypadku mezofili – przewaga w pasztetach pakowanych próżniowo, zaś na ogół nieobecność w pasztetach w puszkach bez względu na rodzaj użytego surowca mięsnego. Kreyenschmidt i wsp. [6] w badaniach modelowych nad drobnoustrojem dominującym w grupie psychrotrofów (*Pseudomonas*), stwierdzili, że poziom 10^8 jtk·g⁻¹ tych bakterii wywołuje objawy zepsucia sensorycznego, więc poziom bakterii zanotowany w tej pracy nie budził większych zastrzeżeń z punktu widzenia jakości sensorycznej produktów.



Rys. 2. Ogólna liczba bakterii mezofilnych w próbach pasztetów.

Fig. 2. Total count of mesophilic bacteria in the pâté samples.

Drożdże, których obecność może być przyczyną powstawania białego nalotu na powierzchni oraz zmian smakowo-zapachowych [26], stwierdzono w 4 próbach: w 2 pasztetach mięsnych (1 pakowany w pojemnik aluminiowo-polipropylenowy i 1 próżniowo w folię PE/PA) i 2 drobiowych (1 pakowany w słoik i 1 w folię PE/PA), natomiast wzrostu pleśni nie odnotowano w żadnej z prób. Świdorski i wsp. [23] w swoich badaniach zaobserwowali również niewielki wzrost drożdży w pasztecie drobiowym pakowanym i przechowywanym w próżni.



Rys. 3. Ogólna liczba bakterii psychrotrofowych w próbach pasztetów.

Fig. 3. Total count of psychrotrophic bacteria in the pâté samples.

Wnioski

1. Pasztety pakowane w puszki charakteryzowały się najmniejszą liczbą mikroorganizmów.
2. W pasztetach pakowanych w puszki, słoiki oraz folię PE/PA nie wykryto drobnoustrojów chorobotwórczych.
3. W pasztetach pakowanych w pojemniki aluminiowo-polipropylenowe oraz w papier pergaminowy bezpośrednio po zakupie z lody chłodniczej sporadycznie oznaczono bakterie chorobotwórcze z gatunku *B. cereus* i *S. aureus* w liczbie niezagrażającej zdrowiu konsumentów.
4. Próżniowy sposób pakowania w folię PE/PA stwarza dogodne warunki do rozwoju bakterii kwasu mlekowego.
5. Obecność enterokoków – ciepłoopornych bakterii wskaźnikowych jakości higienicznej – świadczy szczególnie o nieprawidłowo prowadzonych procesach obróbki termicznej produktów.
6. Nie stwierdzono istotnej różnicy w jakości mikrobiologicznej pasztetów mięsnych i drobiowych bez względu na rodzaj opakowania.
7. Wszystkie badane pasztety były bezpieczne dla zdrowia konsumentów.

Literatura

- [1] Anonim: Eliminowanie przyczyn wadliwej produkcji. Mięso i Wędliny, 1995, **4**, 22-27.
- [2] Danyluk B., Pietrończyk K., Pyrcz J., Kowalski R., Kałakuka.: Sterylizacja konserw mięsno-podrobowych. Gosp. Mięs., 1999, **6**, 32-36.
- [3] Fernandez-Lopez J., Sayas-Barbera E., Sendra E., Perez-Alvares J.A.: Quality characteristics of ostrich liver pâté. J. Food Sci., 2004, **69** (2), SNQ85-SNQ91.
- [4] Granum P.E., Lund T.: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Let., 1997, **157**, 223-228.
- [5] Kisielska E., Kordowska-Wiater M.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i mikrobiologii żywności. Wyd. AR, Lublin 1999.
- [6] Kreyenschmidt J., Lohmeyer K., Stahl N.: Charakterisierung des Verderbs von Frischfleisch. Fleischwirt., 2002, **10**, 108-111.
- [7] Leszczyńska-Fik A., Fik M.: Wpływ chłodniczego przechowywania na jakość mikrobiologiczną pakowanej próżniowo mielony wieprzowej. Przem. Spoż., 1997, **10**, 40-42.
- [8] Michalski M., Wojtoń B., Wojciechowski J.: *Bacillus subtilis* oraz enterokoki jako mikroflora konserw mięsnych. Med. Wet., 1993, **49**, 89-90.
- [9] Pełczyńska E., Szkucik K.: Zmienność zanieczyszczenia bakteryjnego w produkcji kielbas. Med. Wet., 1993, **49**, 214-215.
- [10] PN-A-82007:1996. Przetwory mięsne. Wędliny.
- [11] PN-A-82055-12:1997. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności beztlenowych bakterii przetrwalnikujących i beztlenowych bakterii przetrwalnikujących redukujących siarczany (IV).
- [12] PN-A-82055-14:1997. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności bakterii proteolitycznych.
- [13] PN-A-82055-15:1999. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii *Bacillus cereus*.
- [14] PN-A-82055-16:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby drożdży i pleśni.
- [15] PN-A-82055-17:1997. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii kwasu mlekowego.
- [16] PN-A-82055-3:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Przygotowanie próbek i rozcieńczeń.
- [17] PN-A-82055-6:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów.
- [18] PN-A-82055-7:1997. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności i oznaczanie liczby enterokoków.
- [19] PN-A-82055-9:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności i oznaczanie liczby *Staphylococcus aureus*.
- [20] PN-ISO 4831:1998. Mikrobiologia. Ogólne zasady oznaczania liczby bakterii z grupy coli. Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby.
- [21] PN-ISO 6579:1998. Mikrobiologia. Ogólne zasady metod wykrywania pałeczek *Salmonella*.
- [22] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 13 stycznia 2003 r. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności. Dz. U. 2003 r. Nr 337, poz. 326.
- [23] Słowiński M., Mroczek J.: Sprzedaż mięsa i jego przetworów. Polska norma na wyroby gotowe z mięsa i podrobów. Mięso i Wędliny, 2000, **8**, 51-52.
- [24] Świdorski F., Russel S., Waszkiewicz-Robak B., Cholewińska E.: Ocena jakości mięsa drobiowego i jego przetworów pakowanych próżniowo. Roczniki PZH, 1997, **48**, 193-199.

- [25] Tyburcy A.: Bakterie chorobotwórcze w mięsie i produktach mięsnych. *Gosp. Mięś.*, 1997, **10**, 32-35.
- [26] Zakowska Z., Stobińska H.: *Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym*. Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź 2000.

IMPACT OF PACKAGING METHODS ON THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF PÂTÉS

S u m m a r y

The first objective of this study was to characterize microorganisms present in 20 selected pâté types manufactured of red and poultry meat, and packed in different packaging, and the second was an effort to determine the impact of packaging methods on the microbiological quality of products under analysis. The analyses were performed according to the rules as pointed out in the Polish Specifications or in the Polish standard PN-ISO. The analyses performed included the determination of total counts of the following species: mesophilic and psychrotrophic bacteria, lactic acid bacteria, yeasts and moulds, coliforms and enterococci, as well as the occurrence detection of proteolytic bacteria, spore-forming anaerobes, and pathogens such as *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. The counts of microorganisms were the lowest in pâtés packed in tins. No pathogens were detected in products packed in jars, tins, and PE/PA foil. All pâtés were free from coliforms, but enterococci were present in 35% of all the samples. Vacuum packages in PE/PA foil stimulated the growth of lactic acid bacteria. All the pâtés examined were safe for consumers to use and showed no health risk.

Key words: pâté, microbiological quality, health safety, package ☒

ELIZA GRUCZYŃSKA, EMILIA FASZCZA, PIOTR KOCZOŃ,
BOLESŁAW KOWALSKI

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU I WODY W MAJONEZACH METODĄ SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI Z TRANSFORMACJĄ FOURIERA

Streszczenie

Celem pracy było wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) do ilościowego oznaczania tłuszczu i wody w majonezach. Zweryfikowano również poprawność osiągniętych metodą FTIR wyników oznaczeń poprzez odniesienie ich do odpowiednich wartości uzyskanych metodami odwoławczymi. Materiał do badań stanowiły majonezy niskotłuszczowe, stołowe i wysokotłuszczowe. Oznaczeń spektrometrycznych dokonywano rejestrując widma próbek majonezów w 1-propanolu. Widma rejestrowano stosując technikę całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR), przy wykorzystaniu przystawki z okienkiem pomiarowym z selenku cynku (ZnSe) lub kryształu KRS. Na podstawie otrzymanych widm, w części odpowiadającej drganiom charakterystycznym dla grupy estrowej acylogliceroli oraz grupy hydroksylowej wody, obliczano powierzchnie pod pasmami przy częstościach 1748 cm^{-1} i 1650 cm^{-1} . Następnie z krzywych kalibracji roztworów wzorcowych przeliczano powierzchnie na zawartość odpowiednich składników majonezu.

Wyniki oznaczeń zawartości tłuszczu i wody metodą FTIR są liniowo skorelowane z wynikami otrzymanymi metodami odwoławczymi. Najlepszą zgodność wyników oznaczeń zawartości tłuszczu uzyskano w grupie majonezów wysokotłuszczowych.

Słowa kluczowe: FTIR, ATR, majonez, oznaczanie tłuszczu, oznaczanie wody.

Wprowadzenie

Tradycyjny majonez jest mieszaniną żółtka jaja, octu, oleju i przypraw (przede wszystkim musztardy). Najczęściej stosowanymi olejami do produkcji majonezów są: rzepakowy, sezamowy, słonecznikowy, bawełniany, sojowy, kukurydziany. Zawartość oleju wpływa na konsystencję majonezów, która determinuje zastosowanie tego rodza-

ju wyrobów spożywczych. Majonezy do sałat mają konsystencję płynną, natomiast przeznaczone do dekoracji potraw powinny być półstałe [9, 11]. Typowy majonez zawiera 70–80% tłuszczu i mimo wysokiej zawartości tłuszczu w stosunku do wody, jest on emulsją typu olej w wodzie. Majonez, sklasyfikowany jako trwała emulsja, zostaje wytworzony, gdy przyłożona siła ścinania powoduje rozproszenie fazy olejowej w postaci kropelek w fazie wodnej. Amfifilowy charakter emulgatora (np. lecytyny z żółtka jaja) sprzyja utrzymaniu pożądanej stabilności emulsji. Właściwa jakość majonezów jest warunkowana odpowiednią obróbką składników fazy wodnej i tłuszczowej w warunkach specyficznych procesów ścinania [3].

Stale rosnące wymagania konsumentów i zalecenia dietetyków sprawiają, że na rynku dostępna jest szeroka gama majonezów, zróżnicowanych pod względem zawartości tłuszczu. Zastosowanie szybkiej, niezawodnej metody ilościowego oznaczania zawartości tłuszczu i wody w tego typu produktach jest kluczowe w kontroli jakości. Występują bowiem znaczne trudności w oznaczeniach tłuszczu i wody w stabilnych emulsjach spożywczych, utworzonych dzięki właściwej kombinacji sił ścinania w połączeniu z efektem działania emulgatora [2]. Badania wykonywane przez zespół z Uniwersytetu McGill w Kanadzie [13, 14] dowodzą, że metoda spektroskopii w podczerwieni z zastosowaniem transformacji Fouriera jest alternatywą dla wielu chemicznych metod analizy żywności. Zawartość tłuszczu i wody w majonezach może być monitorowana za pomocą spektrometrii FTIR/ATR [7]. Celem takich badań jest przede wszystkim wykluczenie niekorzystnych zmian w produkcji, jak np. rozpad emulsji, ale także umożliwienie producentowi szybkiej ingerencji w proces produkcji w trakcie jego przebiegu [13]. Metoda FTIR/ATR umożliwia posługiwanie się próbkami produktów żywnościowych mającymi postać ciał stałych, cieczy czy past, dając przy tym powtarzalne wyniki [8]. Do wykonania dokładnego oznaczenia zaleca się dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, w którym rozpuszczeniu ulegają triacyloglicerole oraz woda [7]. To założenie spełnia 1-propanol, który stosowany jest przy oznaczeniach w majonezach, maśle orzechowym, itp. Dokonywane są pomiary absorpcji promieniowania IR przez wiązania estrowe przy częstotliwości $\sim 1748 \text{ cm}^{-1}$ oraz wiązania H–OH przy $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$, po tym jak odjęte zostanie pasmo pochodzące od rozpuszczalnika. Na podstawie krzywych kalibracji odczytuje się dane ilościowe dotyczące tłuszczu i wody w emulsji. Kalibracja polega na określeniu absorbancji mieszanin o znanej zawartości tłuszczu i wody na podstawie wysokości lub powierzchni pasm, przy charakterystycznych częstotliwościach. Mieszaniny takie są sporządzane z czystych składników, zmieszanych w różnych proporcjach w 1-propanolu bądź poprzez dodanie do rozpuszczalnika znanej ilości produktu o wcześniej sprawdzonej (metodami odwoławczymi) zawartości oznaczanych składników. Analiza próbki masła, margaryny czy majonezu trwa 5–7 min, przy czym rzeczywisty czas pracy aparatu to zaledwie 30 s [16]. Ze względu na

prostą procedurę przygotowywania mieszanin standardowych metoda FTIR/ATR odnosi się do kontrolowania zawartości tłuszczu i wody także w emulsjach typu w/o [13].

W technikach spektroskopowych, mimo że ciągle jeszcze mało powszechnych w kontroli jakości tłuszczów, tkwi niewątpliwie duży potencjał, czyniący z nich funkcjonalne, wygodne narzędzia w badaniach lipidów [17]. Spektroskopia w podczerwieni może być stosowana zarówno do określania właściwości chemicznych tłuszczów (liczby: jodowa, zmydlania, kwasowa, nadtlenkowa), jak i do śledzenia postępujących zmian chemicznych, np. podczas utwardzania lub autooksydacji [7, 15]. Spektroskopia FTIR dostarcza bowiem informacji o grupach funkcyjnych związków powstających w procesie utleniania, ponieważ każdy z nich daje charakterystyczne sygnały w podczerwieni [4]. Metoda FTIR/ATR jest stosowana także do wykrywania zafałszowań tłuszczów. Tego typu badania dotyczą np. monitorowania autentyczności oliwy z oliwek typu virgin [12]. Rejestrowane są widma czystej oliwy z oliwek i próbek z dodatkiem różnych ilości oleju słonecznikowego. Na podstawie uzyskanych wyników opracowano metodykę wykrywania obecności i określania zawartości tego typu zafałszowań. Wykorzystując technikę ATR można oznaczać również zawartość wolnych kwasów tłuszczowych. Dokładność wyników oznaczeń porównywalna jest z odwoławczą metodą miareczkową zamieszczoną w zbiorze oficjalnych metod analitycznych AOAC [5].

Niniejsza praca miała na celu:

1. Wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni, z zastosowaniem transformacji Fouriera, do ilościowego oznaczania zawartości tłuszczu i wody w różnego typu majonezach.
2. Zweryfikowanie poprawności osiągniętych, za pomocą metody FTIR, wyników oznaczeń poprzez odniesienie ich do odpowiednich wartości uzyskanych metodami odwoławczymi.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły majonezy o różnej zawartości tłuszczu, tzn. nisko-tłuszczowe, stołowe oraz wysokotłuszczowe, dostępne na polskim rynku, producentów polskich, jak i zagranicznych. Wszystkie produkty stanowiące materiał doświadczalny kupowano w jednym ze stołecznych supermarketów.

W badanych majonezach oznaczano zawartość tłuszczu metodami: Mojonnier, Soxhleta, FTIR oraz zawartość wody wg Polskiej Normy [10] i metodą FTIR.

Oznaczanie zawartości tłuszczu metodą Mojonnier

Procedurę zaczerpnięto ze zbioru Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis [1]. Metodę Mojonnier klasyfikuje się do ekstrakcyjno –

wagowych, periodycznych. Próbkę majonezu traktowano NH_4OH w celu zobojętnienia kwasów, następnie dodawano fenoloftaleinę, aby wyraźniej zaobserwować granicę podziału między fazami eterową i wodną. Tłuszcz ekstrahowano mieszaniną eterów naftowego i dietylowego (1:1, v/v) ze znanej odważki majonezu (ok. 5 g). Ekstrakcję wykonywano trzykrotnie. Ekstrakt eterowy dekantowano do zważonej kolby, a następnie mieszaninę eterów odparowywano. Wyodrębniony tłuszcz suszono do stałej masy. Równoległe wykonywano próbę kontrolną, gdzie zamiast próbki majonezu dozowano wodę i powtarzano przedstawioną procedurę. Oznaczenia wykonywano w dwóch powtórzeniach. Wyniki oznaczeń wyrażano w procentach wagowych.

Oznaczanie zawartości tłuszczu metodą Soxhleta

Zawartość tłuszczu metodą Soxhleta oznaczano wg Polskiej Normy [10].

Oznaczanie zawartości tłuszczu i wody metodą FTIR

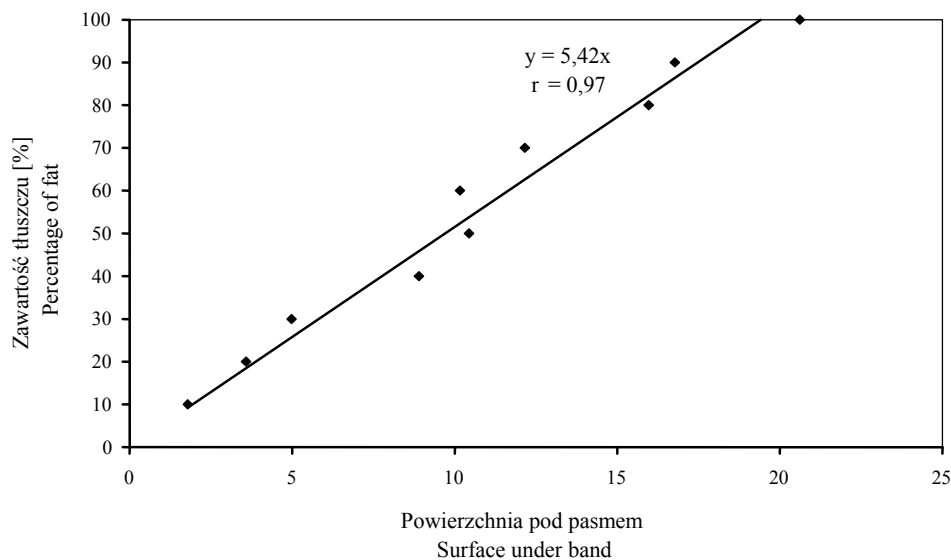
Widma w podczerwieni rejestrowano przy użyciu aparatu FTIR, firmy Perkin Elmer System 2000. Widma próbek majonezów handlowych w 1-propanolu rejestrowano, stosując technikę całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR), przy wykorzystaniu przystawki z okienkiem pomiarowym z selenku cynku (ZnSe) lub kryształu KRS. Wykonywano również widma roztworów wzorcowych, sporządzonych na bazie różnych ilości oleju rzepakowego i wody w 10 g 1-propanolu.

Spektrometr FTIR był sterowany komputerowo przy użyciu programu GRAMS RESEARCH 2000. Oprogramowanie to umożliwiło graficzno-matematyczną obróbkę zarejestrowanych widm. Wykresy funkcjonalnej zależności intensywności promieniowania od częstotliwości rejestrowano w zakresie częstości $1950\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ (średnia podczerwień) w skali absorbancji, stosując rozdzielczość 4 cm^{-1} . Każde widmo skanowano 40 razy. Po odjęciu widma czystego 1-propanolu, obliczano powierzchnie pod pasmami występującymi przy częstościach 1748 cm^{-1} i 1650 cm^{-1} . Pasma przy częstości 1748 cm^{-1} jest związane z rozciąganiem wiązania atomów $\text{C}=\text{O}$ należących do grupy estrowej acylogliceroli. Pasma 1650 cm^{-1} jest związane z drganiami $\text{O}-\text{H}$ cząsteczki wody [6]. Każde widmo rejestrowano 3–4 razy, otrzymując powierzchnie pod pasmami nieróżniące się o więcej niż 1–2%.

Na podstawie widm roztworów wzorcowych wykreślano krzywe kalibracji, przedstawiające zależności zawartości tłuszczu (rys. 1) i wody (rys. 2) w funkcji powierzchni pasm zarejestrowanych przy danych częstościach drgań. Równania krzywych kalibracji oraz powierzchnie pasm charakterystycznych dla roztworów badanych majonezów w 1-propanolu, wykorzystywano do oznaczeń zawartości tłuszczu i wody w analizowanych produktach. Nazwy badanych majonezów zaszyfrowano pod odpowiednimi symbolami (tab. 1 i 2).

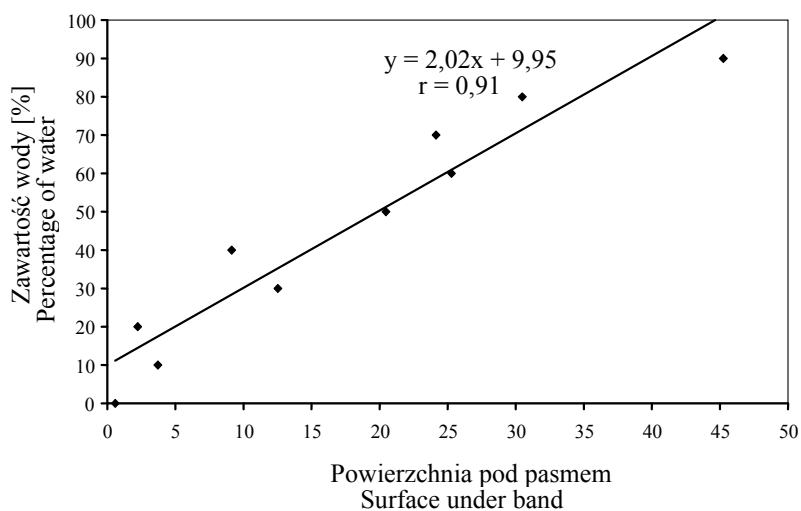
Oznaczanie zawartości wody metodą suszenia

Zawartość wody oznaczano wg Polskiej Normy [10].



Rys. 1. Krzywa kalibracji – zawartość tłuszczu w funkcji powierzchni pasm uzyskanych metodą FTIR (częstość drgań $\sim 1748 \text{ cm}^{-1}$).

Fig. 1. Standard curve for the percentage of fat (at frequency $\sim 1748 \text{ cm}^{-1}$).



Rys. 2. Krzywa kalibracji – zawartość wody w funkcji powierzchni pasm uzyskanych metodą FTIR (częstość drgań $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$).

Fig. 2. Calibration curve – water content (per cent) as a function of surfaces of bands obtained using FTIR (at a vibration frequency $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$).

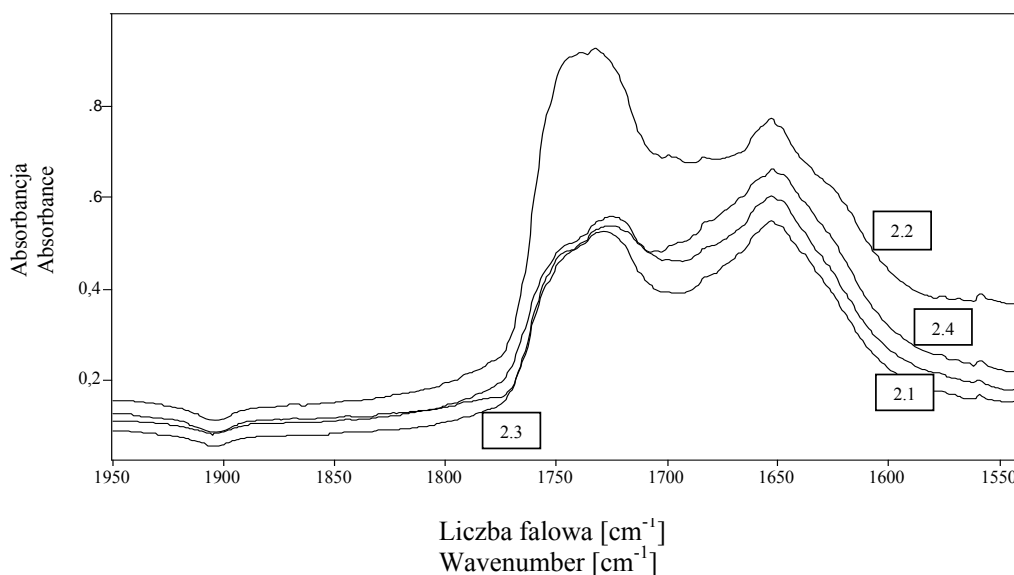
Tabela 1

Zawartość tłuszczu w majoneżach w odniesieniu do wartości deklarowanych przez producenta.
Fat content (expressed as per cent rate) in mayonnaises referred to values as declared by the producer.

Grupa majoneżów The group of mayonnaises	Symbol produktu Symbol of the product	Zawartość tłuszczu [%] The percentage of fat				Różnica między metodami standardowymi a metodą FTIR [%] The difference between standard and FTIR methods [%]
		Deklarowana przez producenta Declared by the producer	Oznaczona metodą Soxhleta Determined by Soxhlet method	Oznaczona metodą Mojonniera Determined by Mojonnier method	Oznaczona metodą FTIR Determined by FTIR method	
Nisko tłuszczowe Low FAT	1.1	40,0	41,4	41,2	35,3	6,0
	1.2	45,0	46,2	46,0	39,5	6,6
	1.3	45,0	46,2	45,8	39,7	6,3
	1.4	52,2	49,4	47,2	48,3	1,1
Stołowe Regular	2.1	65,0	66,4	65,8	60,7	5,4
	2.2	51,0	52,5	52,2	46,0	6,4
	2.3	70,0	71,5	71,0	67,6	3,6
	2.4	52,5	53,6	53,2	49,4	4,0
Wysoko tłuszczowe High FAT	3.1	80,0	81,4	81,2	77,9	3,4
	3.2	79,2	80,0	79,9	78,8	1,2
	3.3	80,0	80,9	79,0	79,7	0,2
	3.4	79,4	80,4	79,6	77,0	3,0

Wyniki i dyskusja

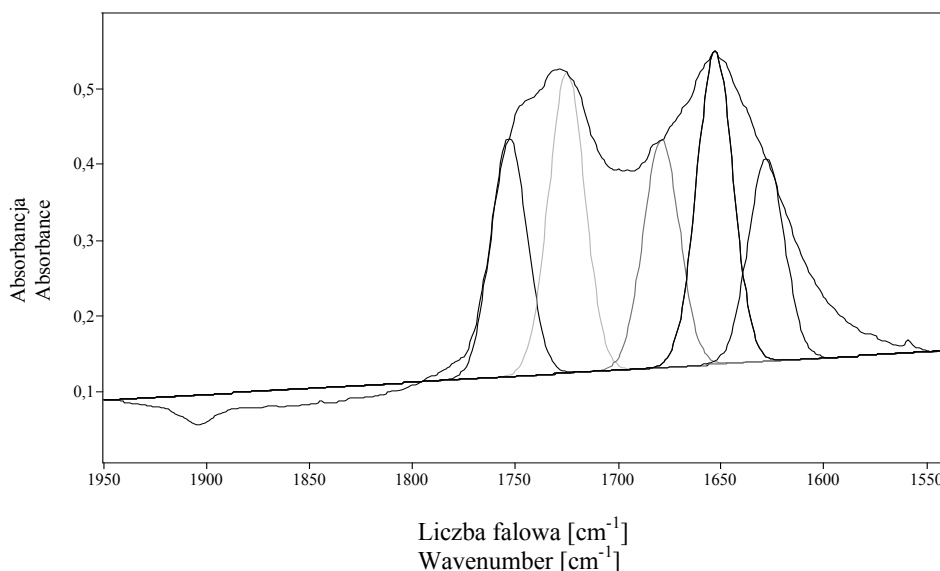
Na rys. 3. przedstawiono przykładowe zarejestrowane widma majonezów stołowych. W widmach badanych majonezów nie zawsze uzyskiwano symetryczne pasma obecne dokładnie przy częstościach 1748 cm^{-1} i 1650 cm^{-1} . Najbardziej symetryczne były pasma majonezów wysokotłuszczowych. Wyraźne, lecz nieco przesunięte na skali częstości, były pasma majonezów stołowych. Na widmach majonezów niskotłuszczowych zaobserwowano, bez przeprowadzenia obróbki matematycznej, jedynie pasmo odpowiadające częstości 1650 cm^{-1} . Prawidłowość tę może powodować większa różnorodność składu majonezów niskotłuszczowych i stołowych, w porównaniu z tradycyjną recepturą produktów wysokotłuszczowych. Zastosowane oprogramowanie komputerowe (GRAMS Research 2000) oraz zdolność rozdzielcza aparatu były przyczyną przedstawionych powyżej problemów analitycznych. Pomimo tego określono ilościowo zawartość tłuszczu w produktach niskotłuszczowych i stołowych, dzięki rozłożeniu niesymetrycznych pasm na 5 pasm składowych (rys. 4). Powierzchni pasm charakterystycznych, pochodzących od tłuszczu i wody, poszukiwano przy zadanych częstościach drgań. Procedurę tę wykonywano w identyczny sposób w przypadku widm roztworów wzorcowych. Można było oczekiwać, że wyniki oznaczeń tłuszczu w produktach o zredukowanej zawartości tego składnika, ze względu na utrudnioną procedurę obliczania powierzchni pod pasmem charakterystycznym dla drgań atomów grupy estrowej, będą odbiegały od osiągniętych metodami odwoławczymi.



Rys. 3. Widma FTIR majonezów stołowych w 1-propanolu.

Fig. 3. The FTIR spectra of regular mayonnaise samples in 1-propanol.

Wyniki oznaczeń zawartości tłuszczu w majonezach w odniesieniu do wartości deklarowanych przez producenta zamieszczono w tab. 1. Wartości oznaczone metodą Soxhleta stanowią średnią arytmetyczną wyników dwóch równoległych oznaczeń, nieróżniących się między sobą więcej niż o 0,2%. Różnice pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń metodą Mojonnier'a były nie większe niż 0,03%. Metodami uznawanymi za odwoławcze (Soxhleta, Mojonnier'a) osiągnięto wyniki kształtujące się na podobnych poziomach, wyższych jednak od wartości uzyskanych metodą FTIR. Największe różnice (ok. 6%) zanotowano w grupie majonezów niskotłuszczowych. Podobną tendencję zaobserwowano także w majonezach stołowych. Otrzymane różnice są jednak mniejsze i kształtują się na poziomie ok. 4%. Wyjątkiem jest majonez o symbolu 2.2, w przypadku którego metodą FTIR otrzymano wynik o ok. 6% niższy od wartości uzyskanych metodami odwoławczymi. Zadeklarowana przez producenta zawartość tłuszczu (51%) kwalifikuje wymieniony majonez do grupy stołowych, jednak jest to wartość zbliżona do górnej granicy określonej w Polskiej Normie [10] dla majonezów niskotłuszczowych. Fakt ten może stanowić prawdopodobne wytłumaczenie zanotowanego odstępstwa. W majonezach wysokotłuszczowych wyniki oznaczeń zawartości tłuszczu kształtowały się na podobnym poziomie. Zawartość tłuszczu w majonezach ma zatem wpływ na zgodność wyników oznaczeń pomiędzy metodami ekstrakcyjnymi a metodą instrumentalną. Im większa była zawartość tłuszczu w analizowanych produktach, tym rezultaty osiągnięte metodą FTIR były bliższe uzyskanym metodami Soxhleta i Mojonnier'a.



Rys. 4. Rozkład widma FTIR majonezu stołowego (2.3) w 1-propanolu na pasma składowe.

Fig. 4. FTIR spectrum distribution of a regular mayonnaise sample (2.3) in 1-propanol into component bands.

Wyniki oznaczeń zawartości wody zamieszczono w tab. 2. Wartości otrzymane metodą suszenia stanowią średnią arytmetyczną wyników dwóch równoległych oznaczeń, które nie różniły się między sobą więcej niż o 0,5%. Stosując metodę FTIR otrzymano wyższe wyniki (o ok. 1,2–8,3%) w porównaniu z metodą standardową (suszenie). Obecność jonów oraz związków polarnych ogranicza ruchliwość cząsteczek wody, utrudniając jej parowanie. Prawdopodobnie dlatego wyniki oznaczeń zawartości wody otrzymywane metodą suszenia próbki są zaniżone. Najmniejsze różnice wyników oznaczeń zanotowano w grupie majonezów niskotłuszczowych (ok. 1,2–5,5%).

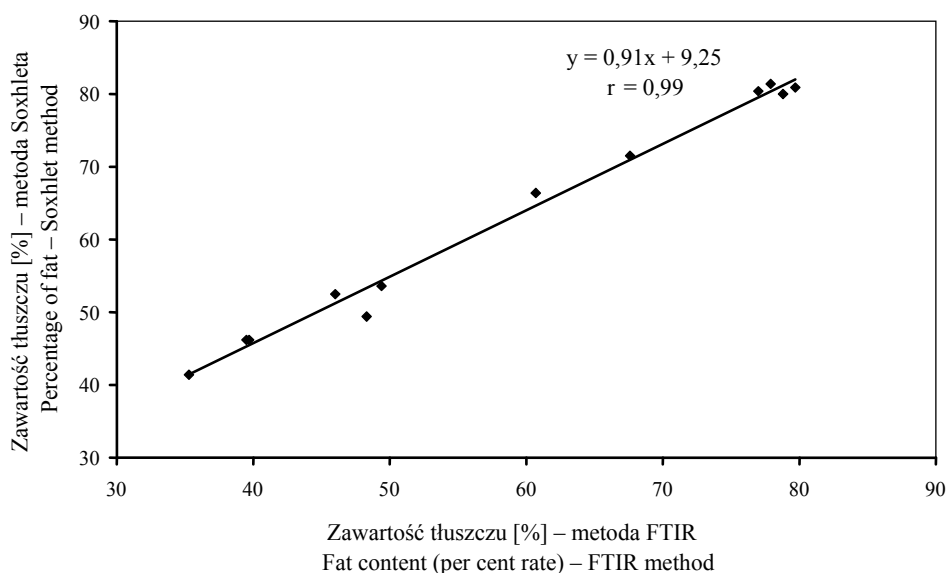
Chippie i wsp. uzyskali znacznie większą zgodność wyników oznaczeń tłuszczu i wody, zarówno w grupie majonezów niskotłuszczowych i stołowych, jak i w majonezach wysokotłuszczowych [2]. Badania van de Voorta i wsp. [14, 16] potwierdzają wysoką zgodność pomiędzy wynikami oznaczeń tłuszczu metodą Mojonnier'a i metodą FTIR, w grupie produktów wysokotłuszczowych. Wyniki oznaczeń wody metodą FTIR również nie różniły się znacząco od otrzymanych metodą standardową.

Tabela 2

Zawartość wody w badanych majonezach.
Water content in mayonnaises under investigation.

Grupa majonezów The group of mayonnaises	Symbol produktu Symbol of the product	Zawartość wody [%] Water content [%]		Różnica między metodą FTIR a metodą standardową [%] The difference between FTIR and standard methods [%]
		Oznaczona przez suszenie Determined by drying	Oznaczona metodą FTIR Determined by FTIR method	
Niskotłuszczowe Low fat	1.1	48,6	50,4	1,8
	1.2	43,2	48,5	5,3
	1.3	42,7	48,2	5,5
	1.4	44,6	45,8	1,2
Stołowe Regular	2.1	26,0	29,7	3,7
	2.2	40,7	47,7	7,0
	2.3	22,4	28,0	5,6
	2.4	38,8	40,5	1,7
Wysokotłuszczowe High fat	3.1	12,8	20,6	7,8
	3.2	11,2	19,5	8,3
	3.3	14,3	21,1	6,8
	3.4	16,0	22,0	6,0

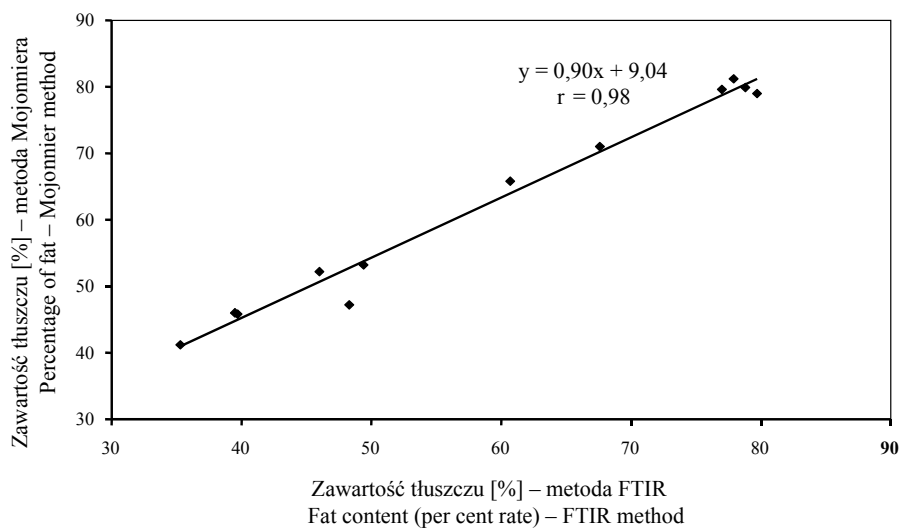
Istnieją liniowe zależności pomiędzy wynikami oznaczeń tłuszczu i wody metodami odwoławczymi oraz metodą FTIR. Wyniki oznaczeń tłuszczu metodą FTIR w większości badanych majonezów są niższe od wartości otrzymanych metodami ekstrakcyjnymi (rys. 5 i 6). Względne różnice wyników oznaczeń kształtują się na poziomie ok. 10%, jednak w przedziale 40–80% zawartości tłuszczu uzyskano zależności liniowe o bardzo wysokich współczynnikach korelacji. Wyznaczone zależności potwierdzają sformułowane wcześniej stwierdzenia o największej zgodności wyników oznaczeń tłuszczu w grupie majonezów wysokotłuszczowych. Zawartość wody oznaczona metodą standardową była o ok. 12% mniejsza w porównaniu z metodą FTIR (rys. 7). W zakresie 10–50% zawartości wody otrzymano zależność liniową o wysokim współczynniku korelacji ($r = 0,98$).



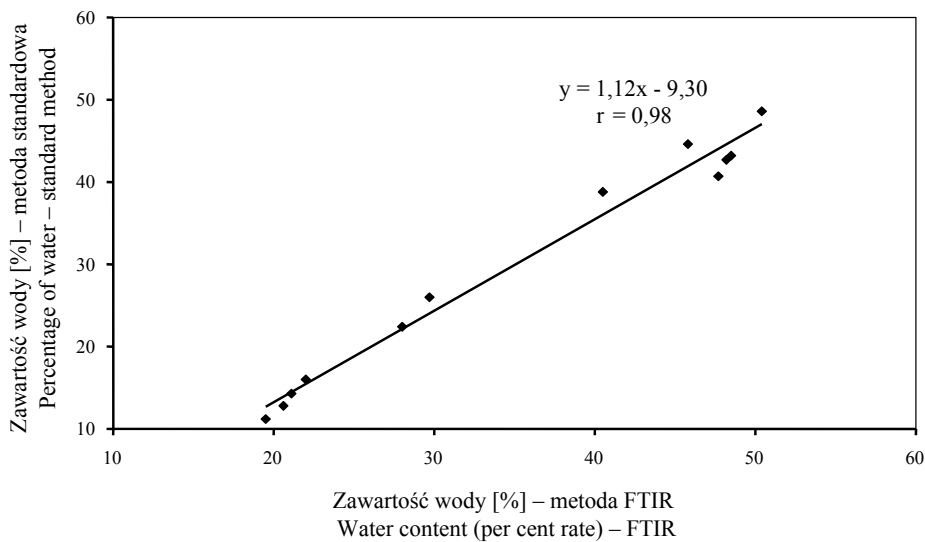
Rys. 5. Zależność pomiędzy wynikami zawartości tłuszczu oznaczonymi metodami: Soxhleta i FTIR.

Fig. 5. The relationship between the results of the percentage of fat determined by Soxhlet and FTIR methods.

Podsumowując można stwierdzić, że metoda FTIR jest znacznie szybsza, bardziej ekonomiczna w porównaniu ze standardowymi metodami oznaczania tłuszczu i wody w majonezach. Pomimo różnic ilościowych oznaczanych składników, występują liniowe zależności pomiędzy wynikami oznaczeń tłuszczu i wody metodami standardowymi i metodą FTIR, o wysokich współczynnikach korelacji. Podjęty temat badawczy wymaga kontynuacji, wyniki wykonanych badań wskazują jednak na potencjalne możliwości wykorzystania metody FTIR do rutynowych analiz majonezów. W literaturze krajowej nie podjęto tematyki zastosowania metody FTIR w badaniach majonezów. W literaturze obcojęzycznej wskazuje się jednak na duży potencjał metody FTIR w tego



Rys. 6. Zależność pomiędzy wynikami zawartości tłuszczu oznaczonymi metodami: Mojonnier i FTIR.
Fig. 6. The relationship between the results of the percentage of fat determined by Mojonnier and FTIR methods.



Rys. 7. Zależność pomiędzy wynikami zawartości wody oznaczonymi metodami: standardową i FTIR.
Fig. 7. The relationship between the results of the water content (per cent rate) determined by standard and FTIR methods.

typu badaniach, jak również w analizach innych produktów spożywczych. Szerokie zastosowanie analityczne FTIR do badania produktów spożywczych, w tym również emulsji tłuszczowych, polega na wykorzystaniu metody ATR, która w prosty powtarzalny sposób umożliwia posługiwanie się próbkami w postaci ciał stałych, cieczy i past. Ograniczeniem powszechnego stosowania tej metody jest jednak wysoki koszt spektroskopów IR oraz programów komputerowych, nieodzownych do analiz otrzymywanych widm.

Wnioski

1. Stwierdzono występowanie liniowych zależności pomiędzy wynikami oznaczeń tłuszczu i wody metodami odwoławczymi oraz metodą FTIR, charakteryzujące się bardzo wysokimi współczynnikami korelacji.
2. Zanotowano wpływ zawartości tłuszczu w majonezach na zgodność wyników oznaczeń pomiędzy metodami Soxhleta i Mojonnier'a a metodą instrumentalną. Stosując metodę FTIR uzyskano niższe wyniki w porównaniu z metodami ekstrakcyjnymi. Im większa była zawartość tłuszczu w analizowanych produktach, tym rezultaty osiągnięte metodą FTIR były bliższe uzyskanym metodami ekstrakcyjnymi.
3. Zawartość wody oznaczona metodą FTIR przyjmuje wartości wyższe od otrzymanych metodą standardową. Prawdopodobnym wytłumaczeniem zaniżonych wyników zawartości wody, uzyskanych metodą suszenia próbki, jest obecność jonów oraz związków polarnych, które ograniczają ruchliwość cząsteczek wody utrudniając jej parowanie.

Literatura

- [1] Association of Official Analytical Chemists: Fat in milk, method no. 989.05. Official Methods of Analysis, Washington 1990, D.C.
- [2] Chippie A. L., Jamieson P. R., Golt C. M., Hsu Ch. H., Lo Y. M.: Quantitative analysis of fat and moisture in mayonnaise using Fourier Transform Infrared Spectrometer. *Int. J. Food Proper.*, 2002, **5** (3), 655-665.
- [3] Depree J. A., Savage G. P.: Physical and flavour stability of mayonnaise. *Food Sci. Technol.*, 2001, **12**, 157-163.
- [4] Guillen M. D., Cabo N.: Fourier Transform Infrared Spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chem.*, 2002, **77**, 503-510.
- [5] Ismail A. A., van de Voort F. R., Emo G., Sedman J: Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1993, **70** (4), 335-341.
- [6] Kęcki Z.: Podstawy spektroskopii molekularnej. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1992.
- [7] Kowalski B.: Zastosowanie spektroskopii FTIR w analizie żywności. W: Gwarantowana jakość w przetwórstwie żywności. *Mat. Konf. SGGW*, Warszawa 16–18 maja 1995, s. 141-149.

- [8] Kuehl D., Crocombe R.: The quantitative analysis of a model fermentation broth. *Appl. Spectrosc.*, 1984, **38**, 907-909.
- [9] Niewiadomski H.: *Technologia tłuszczów jadalnych*. WNT, Warszawa 1979.
- [10] PN-A-86950: 1995. Majonez.
- [11] Świdorski F. (red.): *Żywność wygodna i żywność funkcjonalna*. WNT, Warszawa 1999.
- [12] Tay A., Singh R. K., Krishnan S. S., Gore J. P.: Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 2002, **35**, 99-103.
- [13] Van de Voort F. R.: Fourier Transform Infrared Spectroscopy applied to food analysis. *Food Res. Int.*, 1992, **25**, 397-403.
- [14] Van de Voort F. R., Sedman J., Emo G., Ismail A. A.: A rapid FTIR quality control method for fat and moisture determination in butter. *Food Res. Int.*, 1992, **25**, 193-198.
- [15] Van de Voort F. R., Sedman J., Emo G., Ismail A. A.: Rapid and direct iodine value and saponification number determination of fats and oils by attenuated total reflectance (ATR) / Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1992, **69** (11), 1118-1129.
- [16] Van de Voort F. R., Sedman J., Ismail A. A.: A rapid FTIR quality - control method for determining fat and moisture in high - fat products. *Food Chem.*, 1993, **48** (2), 213-221.
- [17] Van de Voort F. R., Sedman J., Russin T.: Lipid analysis by vibrational spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2001, **103**, 815-840.

DETERMINATION OF FAT AND WATER CONTENTS IN MAYONNAISE BY FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY

S u m m a r y

The objective of this research was to apply Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for quantitative determinations of fat and water in mayonnaise. The results of FTIR method were compared with those obtained by reference standard methods in order to verify whether or not they are correct. Low fat, regular and high fat mayonnaise varieties constituted the research material. Spectra of mayonnaise samples in 1-propanol were recorded using a total reflectance (ATR) technique. A FTIR spectrometer involved in this method was equipped with a horizontal zinc selenide (ZnSe) ATR sampling accessory or KRS crystal. On the basis of the spectra obtained, surfaces under two distinct bands: at 1748 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} were calculated. The sections of spectra taken for the calculations corresponded to the vibrations characteristic for the ester group of acylglycerols and the hydroxyl group of water, respectively. Next, using the calibration curves of the standard solutions, those surfaces were converted into contents of relevant mayonnaise components.

The determination results of the percentage rate of fat and water using a FTIR method are linearly correlated with those obtained by the reference standard methods. The group of high fat mayonnaises showed the best compatibility of their fat content levels as determined for the purpose of this study.

The best agreement in experimental measurements of the fat contents has been received for high fat mayonnaise.

Key words: FTIR, ATR, mayonnaise, determining the fat content, determining of water content. ☒

DOROTA MARTYSIAK-ŻUROWSKA, ANDRZEJ STOŁYHWO

SZKODLIWE DLA ZDROWIA IZOMERY TRIENOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MLEKU POCZĄTKOWYM I NASTĘPNYM DO ŻYWIENIA NIEMOWLĄT

Streszczenie

Kwasy tłuszczowe zawierające układ trzech sprzężonych wiązań podwójnych TCFA (trienoic conjugated fatty acids) są produktami oksydacji lipidów szkodliwymi dla zdrowia niemowląt i jako takie mogą stanowić znacznik stopnia zaawansowania utlenienia tłuszczu mleka początkowego (infant formulae IF) i następnego (follow-on formulae FF). Zbadano zawartość TCFA w tłuszczu wolnym i w tłuszczu związanym IF i FF. Liczbowo zawartość TCFA wyrażono umownie jako parametr K [%] będący stosunkiem absorbancji układu trzech sprzężonych wiązań podwójnych kwasów tłuszczowych (analityczna długość fali 268 nm) do absorbancji charakterystycznej dla grup karbonylowych triacylogliceroli (218 nm). Próbkę odniesienia stanowił tłuszcz dojrzałego mleka ludzkiego. Parametr K tłuszczu mleka ludzkiego wynosił maksymalnie $0,60 \pm 0,03\%$ (N=9), podczas gdy rozpiętość K tłuszczu badanych IF i FF zawierała się w granicach: minimalnie $4,49 \pm 0,27\%$, maksymalnie $12,40 \pm 0,73\%$ w zależności od producenta IF i FF (5 różnych producentów, łącznie 17 produktów). Rozbieżności w zaawansowaniu stopnia utlenienia lipidów mają związek z jakością i ilością dodawanych olejów roślinnych oraz z zastosowaną technologią produkcji IF i FF. Mając na uwadze szkodliwość dla zdrowia produktów oksydacji lipidów, zwłaszcza dla niemowląt i małych dzieci, zasugerowano wprowadzenie limitu parametru K tłuszczu IF i FF na maksymalnie 6%. Spośród 17 badanych produktów 22% spełniało te wymagania.

Słowa kluczowe: mleko ludzkie, mleko początkowe, mleko następne, oksydacja lipidów, trienowe wiązania sprzężone, chromatografia cieczowa.

Wprowadzenie

Mleko początkowe (infant formulae IF) i następne (follow-on formulae FF) dla niemowląt produkowane jest najczęściej na bazie mleka krowiego. Skład tłuszczu mleka krowiego różni się znacząco od tłuszczu mleka ludzkiego. Różnice te dotyczą głównie udziału niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), proporcji

Mgr inż. D. Martysiak-Żurowska Zakład Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, prof. dr hab. A. Stolyhwo Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW ul. Nowoursynowska 159 c 02-776 Warszawa

kwasów tłuszczowych (KT) nasyconych, monoenowych i polienowych; zawartości i składu tokoferoli oraz struktury stereospecyficznej triacylogliceroli [13, 14, 15, 24, 29].

Dla rozwijającego się organizmu dziecka szczególnie ważne są długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe (LC PUFA). Kwasy te stanowią główny budulec tkanek układu nerwowego i mózgu dziecka [2, 10]. W ciągu pierwszych dwóch lat mózg dziecka praktycznie podwaja swoją masę, z około 600 g u niemowlęcia do około 1100 g u 2-letniego dziecka. Blisko 60% suchej masy mózgu stanowią składniki lipidowe, zwłaszcza fosfolipidy zawierające znaczne ilości LC PUFA [9, 25]. Stąd zwiększone zapotrzebowanie organizmu dziecka na prekursorzy tj. kwas linolowy C18:2 n-6 (LA) i kwas linolenowy C18:3 n-3 (ALA), które następnie są w organizmie dziecka metabolizowane do LC PUFA odpowiednio rodzin n-3 i n-6 [5, 10, 14].

Przy produkcji IF i FF niedostatek wielonienasyconych KT w mleku krowim uzupełniany jest przez dodatek olejów roślinnych np. kukurydzianego i słonecznikowego bogatych w kwas linolowy LA oraz oleju sojowego i rzepakowego zawierających oprócz LA kwas linolenowy ALA [23, 24]. Dodatek olejów w stosunku do końcowej zawartości tłuszczu w IF i FF wynosi od 40 do 100%, w zależności od producenta i stosowanej przez niego technologii. Modyfikowane mleko w proszku przeznaczone dla dzieci zawiera w 100 g od 21 do 27,7 g tłuszczu, w tym od 1,4 do 5,1g kwasu linolowego C18:2 (n-6) (tj. od 300 do 1200 mg /100 kcal mleka gotowego do spożycia) a w IF minimalnie 0,24 g kwasu linolenowego C18:3 (n-3) (50 mg /100 kcal mleka gotowego do spożycia) [6, 7, 23]. Tak więc IF i FF są to produkty wysokotłuszczowe, zawierające wielonienasycone KT podatne na utlenienie lipidów.

Tłuszcz mleka w proszku w 95% występuje w postaci kuleczek tłuszczowych z otoczkami białkowymi lub fosfolipidowo-białkowymi. Część tłuszczu występuje jako tłuszcz wolny, tj. dający się wyekstrahować bezpośrednio hydrofobowym rozpuszczalnikiem organicznym, np. heksanem [20, 29]. W modyfikowanym mleku dla niemowląt zawartość tłuszczu wolnego wynosi do 2–3% [29].

W procesie technologicznym produkcji IF i FF występuje kilka punktów krytycznych, w których dodane do mleka oleje zawierające wielonienasycone KT w sposób szczególnie narażone są na utlenienie. Należą do nich:

- homogenizacja prowadzona dwustopniowo, z dostępem powietrza, w temp. ok. 70°C;
- suszenie rozpyłowe ujednoliconego substratu, przebiegające w strumieniu gorącego powietrza. Temp. powietrza wlotowego wynosi $180 \pm 10^\circ\text{C}$, wylotowego $75 \pm 5^\circ\text{C}$. W końcowej fazie suszenia proszek mleczny osiąga temp. powietrza wylotowego, tj. 70–80°C.
- poprawiająca rozpuszczalność i zwilżalność aglomeracja wysokotłuszczowego proszku mlecznego, w trakcie której proszek nawilżany jest wilgotnym powietrzem, parą wodną lub rozpyloną w powietrzu wodą do 8–15% jej zawartości, aby cząstki uległy zlepianiu w większe, porowate aglomeraty;

- dosuszanie proszku mlecznego po aglomeracji. Temp. powietrza wylotowego w trakcie dosuszania wynosi ok. 55°C.
- pakowanie gotowego IF i FF w opakowania zbiorcze w atmosferze powietrza;
- długotrwałe przechowywanie gotowego produktu, bez usunięcia powietrza z wnętrza porowatych cząstek proszku mlecznego [20, 29].

Mając na uwadze powyższe punkty krytyczne istnieje racjonalne zagrożenie oksydacji lipidów w modyfikowanym mleku w proszku przeznaczonym dla niemowląt. Podczas utlenienia tworzą się wolne rodniki, nadtlenki, wodoronadtlenki a w następnej kolejności liczne aldehydy, ketony, związki karboksylowe, kwasy tłuszczowe z układem sprzężonych wiązań podwójnych i potrójnych, związki hydroksyepoksydowe, estry, alkohole, dimery i polimery [4, 5, 11, 12, 16, 30].

Jedną z grup produktów utleniania lipidów stanowią kwasy tłuszczowe zawierające układ trzech sprzężonych wiązań podwójnych (trienoic conjugated fatty acids TCFA). Każdy powstały TCFA może być jednocześnie izomerem położenia, jak i konfiguracji geometrycznej. Możliwość występowania tak różnorodnych izomerów TCFA ma wpływ na powinowactwo do nich enzymów ustrojowych. I tak niektóre z tych izomerów mogą zajmować miejsce ALA w szlaku metabolicznym i stanowić substrat do desaturacji i wydłużenia łańcucha węglowego. Prowadzi to do powstania wielu nietypowych LC PUFA, o zupełnie odmiennych właściwościach w stosunku do LC PUFA naturalnych. Wbudowanie w błony komórkowe nietypowych LC PUFA drastycznie zmienia ich właściwości i funkcjonowanie, co ma zasadnicze znaczenie dla rozwoju układu nerwowego dziecka [1, 17, 30].

TCFA są silnymi inhibitorami biosyntezy prostaglandyn [18]. U szczurów przyswajane z dietą KT zawierające sprzężone układy wiązań podwójnych powodują powstawanie morfologicznych zmian w wątrobie [28]. Izomery *trans* wielonienasyconych KT zmieniają właściwości fizjologiczne płytek krwi i redukują ich agregację [1].

Naturalnie TCFA wykryte zostały w nasionach nagietka, pestkach owocu granatu, w oleju z nasion chińskiego drzewa tungowego i surmii zwyczajnej [27]. W olejach roślinnych uważanych powszechnie za oleje spożywcze TCFA naturalnie nie występują.

Pewne ilości KT zawierających układ dwóch i trzech sprzężonych wiązań podwójnych powstają w olejach roślinnych w trakcie ich rafinacji, głównie na etapie bielienia i odwaniania oleju [26]. Norma PN-A-86908:2000 [22] dotycząca olejów roślinnych rafinowanych, które mogą stanowić substrat do produkcji mleka początkowego i następnego nie definiuje poziomu zawartości TCFA. Jedynym ograniczeniem w tym względzie jest dopuszczalna zawartość izomerów *trans* KT do 2% (m/m), bez rozróżnienia liczby wiązań podwójnych.

Wymagania w stosunku do IF i FF, zawarte w rozporządzeniu Ministra Zdrowia [23] i Dyrektywie UE [6, 7], nie limitują obecności ani poziomu występowania jakiegokolwiek substancji będącej produktem oksydacji lipidów i nie wyczerpują

kontroli jakości zdrowotnej produktu. Tym samym, niemowlęta są potencjalnie narażone na działanie szkodliwych dla zdrowia produktów oksydacji lipidów, które z powodu niedoskonałej technologii mogą być w IF i FF obecne.

Niniejsza praca ma na celu określenie obecności i poziomu występowania w dostępnych handlowo IF i FF dla niemowląt szkodliwych dla zdrowia kwasów tłuszczowych zawierających trzy sprzężone wiązania podwójne TCFA oraz zaproponowanie limitu zawartości tych izomerów KT w modyfikowanym mleku przeznaczonym dla niemowląt i małych dzieci.

Materiał i metody badań

Spośród kilkunastu dostępnych na polskim rynku rodzajów mleka początkowego i następnego dla niemowląt do badań wybrano te najczęściej kupowane. Pochodzące od 5 różnych producentów IF i FF oznaczono literami od A do E. Łączna liczba próbek wyniosła 17. Wszystkie IF i FF badano w okresie ich przydatności do spożycia, niezwłocznie po otwarciu opakowania. Próbkę odniesienia stanowiło dojrzałe mleko ludzkie uzyskane od 9 kobiet. Mleko ludzkie natychmiast po pobraniu zamrażano (-22°C). Izolację tłuszczu prowadzono nie później niż 24 godz. po pobraniu mleka.

Tłuszcz wolny ekstrahowano z proszku mlecznego i mleka kobiecego mieszaniną n-heksan: chlorek metylenu 7:3 (v:v) [21]. Ekstrakcję tłuszczu związanego (zemulgowanego) przeprowadzono metodą Roesse'go-Gottlieba [19].

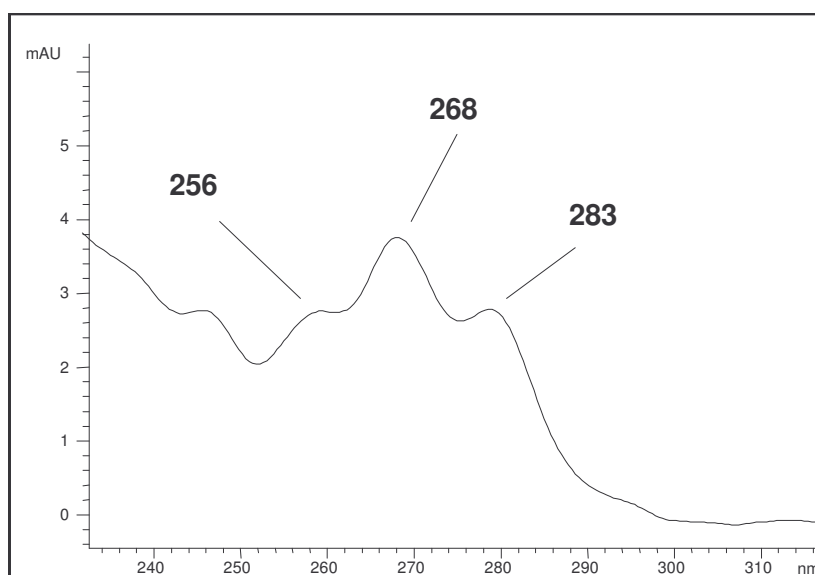
Separacje triacylogliceroli TAG, w formie 2% roztworu tłuszczu wydzielonego z IF i FF oraz z mleka ludzkiego w n-heksanie, prowadzono techniką HPLC [3, 26], z użyciem chromatografu cieczowego HP 1050 z matrycą fotodiodową (DAD), stosując fazę ruchomą n-heksan:propanol-2:acetonitryl 18:24:58 (v:v:v). Chromatogramy zapisywano jednocześnie w dwóch kanałach – 268 nm oraz 218 nm, wykorzystując program Chem Station. Szerokość wiązki w obu przypadkach wynosiła 5 nm. Wypełnienie kolumny: ODS-C₁₈, 250 × 4,6 mm, wielkość ziaren 5 μm. Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min.

Ze względu na znaczną różnorodność izomerów TCFA, które mogą powstać w wyniku procesów technologicznych stosowanych przy produkcji IF i FF ich izolacja, analiza i identyfikacja jest stosunkowo trudna. Z tego względu za najkorzystniejszą uznano metodę bezpośredniego oznaczania zawartości TCFA w tłuszczu.

Nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe występujące w olejach roślinnych i tłuszczach zwierzęcych oraz natywne triacyloglicerole nie absorbują promieniowania UV powyżej 220 nm. Natomiast niektóre produkty oksydacji lipidów wykazują maksimum absorpcji przy długości fali powyżej tej wartości, np. wodoronadtlenki – 240 nm, aldehydy – 235–240 nm, układ dwóch sprzężonych wiązań podwójnych w łańcuchu węglowodorowym – 233 nm. Również układ trzech sprzężonych wiązań podwójnych wykazuje silną absorpcję w zakresie UV z maksimum absorpcji przy 256 nm, 268 nm (analityczna długość fali) i 283 nm (rys. 1). W niniejszej pracy

właśnie tę cechę izomerów TCFA wykorzystano do ich bezpośredniego oznaczenia w badanych próbkach lipidów.

W celu scharakteryzowania zawartości TCFA w tłuszczu mleka początkowego i następnego w niniejszej pracy zastosowano pomiar instrumentalny. Istota pomiaru polega na określeniu stosunku sumy absorbancji triacylogliceroli zawartych w próbce przy 268 nm do absorbancji przy 218 nm [8].



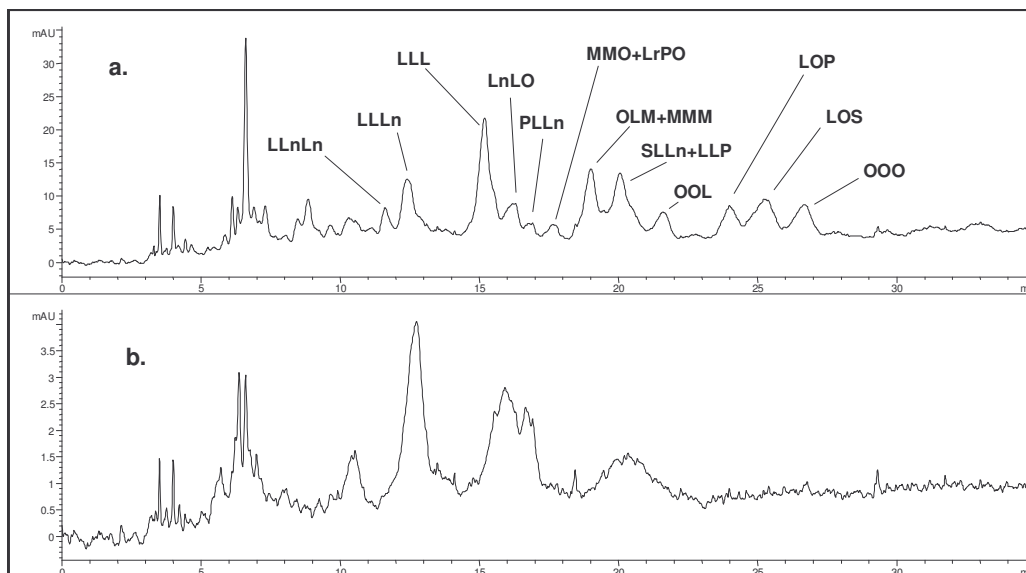
Rys. 1. Widmo UV kwasu oktadekatrienowego C18:3 all *cis*-9,11,13 (z układem trzech sprzężonych wiązań podwójnych).

Fig. 1. UV spectrum of oktadecatrienoic acid C18:3 all *cis*-9,11,13 (with trienoic conjugated double bonds).

Wyniki i dyskusja

Kwasy tłuszczowe KT zawierające układ dwóch i trzech sprzężonych wiązań podwójnych stanowią jedne z pierwszych wtórnych produktów autooksydacji lipidów [4]. Zawartość w tłuszczu TCFA może stanowić znacznik (marker) stopnia zaawansowania oksydacji lipidów bogatych w wielonienasycone KT w IF i FF.

Przykładowe chromatogramy TAG zarejestrowane przy długości fali światła 268 i 218 nm przedstawiono na rys. 2. Użyta przy detekcji wąska wiązka spektralna (5 nm) umożliwia selektywny wybór tylko takich TAG rozdzielonych techniką HPLC, które absorbują w określonym obszarze widma. Natomiast na podstawie chromatogramów zarejestrowanych przy $\lambda=218$ nm określono skład TAG próbek tłuszczu mleka (rys. 2a).



Rys. 2. Chromatogramy HPLC-DAD TAG tłuszczu mleka początkowego dla niemowląt (A.IF).

Fig. 2. A HPLC-DAD chromatograms of TAG of fat in infant formulae (A.IF).

Objaśnienia: / Explanatory notes:

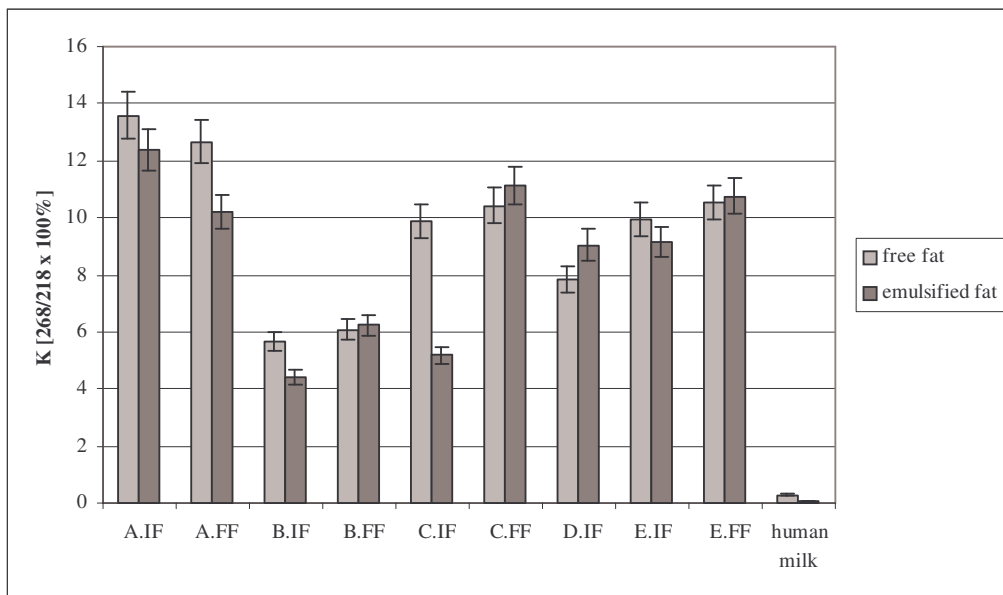
zapisany przy długości fali 218 nm i szerokości wiązki spektralnej 5 nm; wiązka odniesienia 550 nm, szerokość wiązki 10 nm / UV detection at 218 nm, bandwidth (BW) 5 nm; reference wavelenght at 550 nm, BW 10 nm.

zapisany przy długości fali 268 nm i szerokości wiązki spektralnej 5 nm; wiązka odniesienia 550 nm, szerokość wiązki 10 nm / UV detection at 268 nm, BW 5 nm; reference wavelenght at 550 nm, BW 10 nm.

Symbole kwasów tłuszczowych: L – kwas linolowy, Ln – kwas linolenowy, O – kwas oleinowy, P – palmitynowy, S – stearynowy, M – mirystynowy, Lr – laurynowy. Kolejność liter nie oznacza kolejności rozmieszczenia KT w poszczególnych pozycjach *sn-1*, *sn-2* i *sn-3* glicerolu. / Symbols of fatty acids: L – linoleic acid, Ln – linolenic acid, O – oleic acid, P – palmitic acid, S – stearic acid, M - myristic acid, Lr – lauric acid. The letter sequence does not represent stereospecific distribution of fatty acids in position *sn-1*, *sn-2* and *sn-3* of glycerols.

Liczbowo stosunek absorpcji wyrażano w procentach jako parametr K stanowiący stosunek sumy pól powierzchni pików TAG zarejestrowanych przy 268 nm do sumy pól powierzchni pików TAG zarejestrowanych przy 218 nm (1).

$$K = \frac{\text{suma pól powierzchni pików TAG zarejestrowanych przy 268 nm}}{\text{suma pól powierzchni pików TAG zarejestrowanych przy 218 nm}} \cdot 100, [\%] \quad (1)$$



Rys. 3. Wartości parametru K tłuszczu mleka początkowego IF, następnego FF i tłuszczu mleka ludzkiego ($P = 95\%$, $\Delta x = 5,87\%$).

Fig. 3. 'K' parameter values of fats in infant formulae IF, follow-on formulae FF, and of the human milk fat ($P = 95\%$, $\Delta x = 5,87\%$).

Pomimo występowania w mleku kobiecym naturalnych, fizjologicznych procesów oksydacji lipidów pod wpływem m.in. cyklooksygenazy i lipooksygenazy, w badanych próbkach tłuszczu mleka ludzkiego stwierdzono tylko śladową obecność TCFA. W przypadku mleka ludzkiego średnia wartość K tłuszczu wolnego wynosiła 0,29% (zakres: od <0,05% do 1,40%), tłuszczu związanego 0,09% (zakres: od <0,05% do 0,59%), podczas gdy tłuszczu IF i FF od 4,43% (tłuszcz związany, B.IF) do 13,59% (tłuszcz wolny, A.IF), w zależności od producenta (rys. 3)

Na podstawie przeprowadzonego testu t-Studenta obliczono, że wartości parametru K tłuszczu wolnego statystycznie nie odbiegały od wartości K tłuszczu związanego. Występowanie TCFA nie zależy więc od formy w jakiej triacyloglicerole występują w badanym mleku IF i FF.

Spośród badanego mleka w proszku najniższą wartość parametru K stwierdzono w tłuszczu mleka początkowego i następnego producenta B. Średnia ważona wynosiła odpowiednio $4,49 \pm 0,27\%$ i $6,22 \pm 0,37\%$. Najwyższą średnią ważoną wartość stosunku absorpcji K wykazywał tłuszcz mleka początkowego wytworzonego przez producenta A – $12,40 \pm 0,73\%$.

Pozostałe średnie ważone wartości parametru K wynosiły: produkt A.FF – $10,33 \pm 0,61\%$; produkt C.IF – $6,47 \pm 0,32\%$; produkt C.FF – $10,47 \pm 0,65\%$; produkt D.IF – $8,99 \pm 0,52\%$; produkt E.IF – $9,19 \pm 0,55$; produkt E.FF – $10,74 \pm 0,63$.

W olejach roślinnych w trakcie ich rafinacji powstają pewne ilości KT zawierających układy dwóch i trzech sprzężonych wiązań podwójnych. Głównym „źródłem” TCFA jest etap bielienia oleju w temp. 175–225°C oraz odwaniania w temp. 240–270°C. Niemniej zasadnicza ilość TCFA powstaje podczas produkcji IF i FF, m.in. w trakcie suszenia rozpyłowego produktu wzbogaconego w wysoko nienasycony olej sojowy i rzepakowy. Skutkiem bardzo rozwiniętej powierzchni i kontaktu z tlenem następują przyspieszone procesy oksydacji, które trwają również podczas przechowywania mleka modyfikowanego w dużych opakowaniach zbiorczych, aż do momentu przepakowania gotowego produktu w atmosferze azotu w opakowania jednostkowe. Tym samym normowanie jakości oleju dodawanego do preparatów do żywienia niemowląt byłoby tylko półśrodkiem niezapewniającym jakości produktu końcowego.

W przekonaniu autorów tolerancje zawartości TCFA powinny dotyczyć gotowych produktów przeznaczonych dla niemowląt i stanowić kompromis pomiędzy tym, co jest wymagane teoretycznie (brak), a tym co jest praktycznie osiągalne (wartość K od 4,49 do 12,40%).

Wnioski

1. W tłuszczu mleka ludzkiego stwierdzono tylko śladową obecność TCFA. Na 9 badanych próbek maksymalna średnia ważona wartość parametru K wynosiła $0,60 \pm 0,03\%$.
2. Parametr K tłuszczu ogólnego mleka początkowego i mleka następnego do żywienia niemowląt wynosił od 4,49 do 12,40 %, w zależności od producenta preparatu.
3. Mając na uwadze szkodliwość produktów autooksydacji lipidów należałoby uzupełnić normy jakościowe dotyczące mleka początkowego i mleka następnego o tolerancje zawartości tego typu substancji.
4. Autorzy sugerują wprowadzenie limitu wartości stosunku absorpcji K tłuszczu mleka początkowego i następnego dla niemowląt na maksymalnie 6% dla sumy TAG tłuszczu ogólnego izolowanego metodą Roesse’go-Gattlieba. Taki poziom stosunku absorpcji K stwierdzono w przypadku 22% analizowanych produktów.

Praca wykonana w ramach PB 3 P06T 032 234

Literatura

- [1] Chardigny J.-M., Sebedio J.-L., Juaneda P., Vatele J.-M., Grandgirard A.: Effects of trans n-3 polyunsaturated fatty acids on human platelet aggregation. *Nutr. Res.*, 1993, **15** (10), 1463-1471.

- [2] Das U.N.: Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. *Nutr.*, 2003, **19**, 62-65.
- [3] Dotson K.D., Jerrell J.P., Picciano M.F., Perkins E.G.: High-performance liquid chromatography of human milk triacylglycerols and gas chromatography of component fatty acids. *Lipids*, 1992, **27(11)**, 933-939.
- [4] Drozdowski B.: *Lipidy*. W: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności – pod red. Z.E. Sikorskiego*, WNT. Warszawa 1994.
- [5] Esterbauer H.: Cytotoxicity and genotoxicity of lipids – oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, **57** (suppl), 779S-86S.
- [6] European Commission. Commission Directive of 14 May 1991 on infant formulae and follow-on formulae (91/321/EEC).
- [7] European Commission. Directive of the European Commission of 16 February 1996 (96/4/EC).
- [8] *Farmakopea Polska*. Tom V. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 1999, s. 466-470
- [9] Górnicki B., Dębiec B., Baszczyński J.: *Pediatrics*. Tom 1. PWL. Warszawa 1995.
- [10] Guestry P.: The role of nutrition in brain development. *Preventive Medicine* 1998, **27**, 189-194.
- [11] Guichardant M., Bernoud-Hubac N., Chantegrel B., Deshayes C., Lagarde M.: Aldehydes from n-6 fatty acid peroxidation. Effect on aminophospholipids. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2002, **67**, 147-149.
- [12] Halliwell H., Chirico S.: Lipids peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, **57** (suppl.), 715s-25s.
- [13] Jensen R.G., Clark R.M., Ferris A.M.: Composition of the Lipids in Human Milk: A Review. *Lipids*, 1980, **15** (5), 345-355.
- [14] Jensen R.G., Ferris A.M., Lammi-Keefe C.J.: Lipids in human milk and infant formulas. *An. Rev. Nutr.*, 1992, **12**, 417-441.
- [15] Jensen R.G., Jensen G.L.: Specialty lipids for infant nutrition. I. Milk and formulas. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1992, **15**, 232-245.
- [16] Kinter M.: Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. *J. Chromatogr. B*, 1995, **671**, 223-236.
- [17] Larqué E., Zamora S., Gil A.: Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. *Early Hum. Dev.* 2001, **65** (Suppl.), S31-S41.
- [18] Nugteren D.H., Christ-Hazelhof E.: Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* 1987, **33(3)**, 403-417.
- [19] Official Method of Analysis of the AOAC 19th Ed. 1990, Method No 905.02, p. 811;
- [20] Pijanowski E.: *Zarys chemii i technologii mleczarstwa*. Tom 1. PWRiL. Warszawa 1984.
- [21] PN-78/A-86030. Mleko i przetwory mlecarskie. Mleko w proszku. Metody badań.
- [22] PN-A-86908:2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Rafinowane oleje roślinne
- [23] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 26 kwietnia 2004 roku w sprawie środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego. *Dz. U.* 2004. Nr 104, poz. 1094.
- [24] Sawatzki G., Georgi G., Kohn G.: Pitfalls in the design and manufacture of infant formulae. *Acta Paediatrica Suppl.*, 1994, **402**, 40.
- [25] Słomko Z.: *Medycyna perinatalna*. Tom 1. PZWL. Warszawa 1990.
- [26] Stołyhwo A.: Metody HPLC i HR-GC w badaniach składu tłuszczów naturalnych, modyfikowanych chemicznie, margaryn i mleka kobiet. Konferencja „Dni MERCKA w Polsce” pt. „Metody analizy żywności w perspektywie wymagań Unii Europejskiej” Warszawa, listopad 1995, s. 23-38;
- [27] Suzuki R., Noguchi R., Ota T., Abe M., Miyashita K., Kawada T. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. *Lipids* 2001, **36(5)**, 477-482.

- [28] Yamasaki M., Mansho K., Mishima H., Kimura G., Sasaki M., Kasai M., Tachibana H., Ymada K.: Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48(12)**, 6367-6371.
- [29] Ziajka S.: *Mleczarstwo – zagadnienia wybrane*. Tom 1 i Tom 2. Wydawnictwo ART. Olsztyn 1997.
- [30] Ziemiański Ś., Budzyńska-Topolowska J.: *Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe*. PWN. Warszawa 1991.

HEALTH IMPAIRING TRI-UNSATURATED FATTY ACIDS IN THE INFANT FORMULAS

S u m m a r y

Fatty acids containing a system of three conjugated double bonds in their structure (TCFA, i.e. trienoic conjugated fatty acids) are products of lipid oxidation and appear harmful to infant health; as such, they can be used as determinants to determine a degree of acid oxidation and its progress in the infant formula IF and FF (follow-on formula). The TCFA content was determined in a free and bonded acid contained in IF and FF, and expressed numerically as a 'K' parameter [%]. The 'K' parameter is a ratio between the absorbance of the system of three conjugated double bonds in fatty acids (the analytical wave length is 256 nm) and the absorbance characteristic for carbonyl groups of triacylglycerols (218 nm). A reference sample was acid contained in the mature human milk. The maximum 'K' parameter value of human milk was $0.60 \pm 0.03\%$ (N=9) whereas its range in the case of IF and FF studied was between $4.49 \pm 0.27\%$ (minimum) and $12.40 \pm 0.73\%$ (maximum) and depended on the manufacturer of IF and FF (there were 5 manufacturers who supplied 17 products in total). Discrepancies in the progress of lipid oxidation degree are to be attributed to the quality and quantity of plant oils added to the formulas, and to the manufacturing technology applied to produce IF and FF. Because of the harmfulness of lipid oxidation products, especially to infants and little children, it was suggested that the 'K' parameter of fat as contained in IF and FF should be limited to 6% at the most. From among all 17 studied samples, 22% met this requirement.

Key words: human milk, infant formulae, follow-on formulae, lipid oxidation, conjugated trienoic double bonds, liquid chromatography 

MONIKA RADZYMIŃSKA, ZBIGNIEW BOREJSZO, STEFAN S. SMOCZYŃSKI,
MAŁGORZATA KURZYŃSKA

SKŁAD KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W CAŁODZIENNYCH POSIŁKACH DZIECI, UCZNIÓW I STUDENTÓW

Streszczenie

W pracy określono udział poszczególnych grup kwasów tłuszczowych w tłuszczu całodziennych posiłków dzieci (wiek 10–12 lat), uczniów (wiek 13–15 lat) i studentów (wiek 19–25 lat), w zależności od diety wiosennej i jesiennej. Badany materiał pobierano metodą podwójnej porcji, która polega na odkładaniu takiej samej, co skonsumowana porcji jedzenia i napojów.

Wykazano, że okres pobrania próbek nie był czynnikiem decydującym o strukturze całodziennego spożycia tłuszczu. Zarówno w diecie wiosennej, jak i jesiennej dominującym wśród kwasów nasyconych był kwas palmitynowy (średnio 27,20 i 24,72 g/100 g tłuszczu), kwasów monoenowych – kwas oleinowy (37,80 i 41,72 g/100 g tłuszczu), natomiast kwasów polienowych – kwas linolowy (9,12 i 7,95 g/100 g tłuszczu). Udział kwasów nasyconych i monoenowych we wszystkich badanych całodziennych posiłkach był zbliżony, przy czym wiosną stosunek tych kwasów wynosił 1,1, natomiast jesienią 0,9. Całodziennie spożycie polienowych kwasów tłuszczowych przez wszystkie objęte badaniem grupy ludności było niezadowolające. Stosunek kwasów polienowych do nasyconych w całodziennych posiłkach zarówno wiosennych, jak i jesiennych wynosił 0,2. Taka struktura spożycia kwasów tłuszczowych przez młodzież może przyczynić się do rozwoju w przyszłości chorób układu krążenia.

Słowa kluczowe: kwasy tłuszczowe, młodzież szkolna, całodziennie spożycie, całodzienny posiłek.

Wprowadzenie

Badania nad wpływem tłuszczu, a w szczególności jego składowych – kwasów tłuszczowych, na procesy przebiegające w organizmie wykazały, że nie ilość, ale jego jakość ma decydujący wpływ na rozwój chorób takich, jak: miażdżyca, nadciśnienie tętnicze krwi, zmiany nowotworowe. W Polsce umieralność z powodu tych chorób jest znacznie wyższa od przeciętnej europejskiej [3, 23, 24].

Najsilniejsze działanie aterogenne wykazują tłuszcze zwierzęce, bogate w kwasy nasycone. Istnieje ścisły związek między poziomem kwasów nasyconych w racji

pokarmowej a poziomem cholesterolu we krwi i występowaniem niedokrwiennej choroby serca [2, 11, 15].

Bardzo ważne stało się stwierdzenie pozytywnego wpływu na organizm człowieka niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) z rodziny n-6 oraz n-3. NNKT z rodziny n-3 nawet przy niewielkich dawkach (około 1g/dzień) działają pozytywnie na gospodarkę lipidową, hamują rozwój miażdżycy, powodują zmniejszenie skłonności do zakrzepów, obniżają stężenie triacylogliceroli i cholesterolu LDL, a podwyższają poziom HDL [1, 8, 13, 19, 21]. NNKT z rodziny n-6 również zapobiegają rozwojowi miażdżycy, obniżają ciśnienie tętnicze krwi, wspomagają leczenie otyłości i cukrzycy u osób dorosłych. Korzystny wpływ zwiększonego spożywania tych kwasów stwierdzono także w profilaktyce choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy [6, 19].

Skład kwasów tłuszczowych różnych produktów spożywczych jest przedmiotem zainteresowania wielu naukowców [4, 5, 16, 18]. Natomiast badania struktury spożycia tłuszczów przeprowadzane są głównie na podstawie danych uzyskanych z wywiadu [3, 9, 14, 15, 20], co wymaga wiarygodnych informacji o spożyciu tłuszczu, jak i jego występowaniu w spożywanych produktach. Jednym z najdokładniejszych sposobów oceny pobrania składników z pożywieniem, polecanym przez WHO [22], jest metoda podwójnej porcji. Polega ona na odkładaniu takiej samej, co skonsumowana, porcji jedzenia i napojów. Jednak wysoki koszt tej metody oraz pracochłonność przy gromadzeniu racji często zniechęcają do przeprowadzania tego typu badań.

Celem niniejszej pracy była ocena struktury spożycia tłuszczu w całodziennych posiłkach dzieci, uczniów i studentów oraz ustalenie, czy skład poszczególnych kwasów tłuszczowych zależy od okresu żywienia.

Materiał i metody badań

Przedmiotem badań były całodziennie posiłki pobierane w Olsztynie w 2000 roku, w miesiącach maj/czerwiec oraz wrzesień/ październik, przez trzy kolejne dni tygodnia, od następujących grup ludności: dzieci w wieku 10–12 lat, zamieszkałych i żywiących się w olsztyńskim domu dziecka, uczniów w wieku 13–15 lat, zamieszkałych i korzystających z całodziennego wyżywienia w internacie przy liceum ogólnokształcącym oraz studentów w wieku 19–25 lat, żywiących się w stołówce akademickiej oraz posiłkami przygotowanymi samodzielnie. Próbkę gromadzono w ciągu dnia do plastikowych pojemników, mających atest do kontaktu z żywnością. Pobrane posiłki homogenizowano w melakserze (Zelmer typ 175,5), a później w homogenizatorze laboratoryjnym (Universal Laboratory AD typ MPW-309). Ogółem przebadano 54 całodziennie posiłki w trzech powtórzeniach.

Tłuszcz z badanego materiału ekstrahowano za pomocą mieszaniny eterowej (eter naftowy i etylowy), według metody Schmidta-Bondzyńskiego-Ratzlaffa [10, 12].

Do oznaczenia składu kwasów tłuszczowych przygotowano ekstrakty metylowe kwasów tłuszczowych według metody Peiskera [26]. Rozdziału estrów metylowych

kwasów tłuszczowych dokonywano przy użyciu chromatografu gazowego Pye Unicam-4600 z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym.

Wyniki i dyskusja

Zawartość kwasów tłuszczowych w tłuszczu wydzielonym z całodziennych posiłków badanych grup ludności, pobieranych w różnych porach roku, przedstawiono w tab. 1 i 2.

Tabela 1

Skład kwasów tłuszczowych w tłuszczu całodziennych posiłków dzieci, uczniów i studentów, pobieranych w miesiącach maj/czerwiec [g/100 g tłuszczu].

Fatty acid composition in fat from daily meals consumed by children, pupils and students in May/June [g/100 g fat].

KT FA	Populacje / Populations					
	Dzieci / Children		Uczniowie / Pupils		Studenci / Students	
	wartość średnia mean value	zakres range	wartość średnia mean value	zakres range	wartość średnia mean value	zakres range
C _{12:0}	2,06	0,98–2,87	1,88	1,12–2,80	1,51	0,66–3,00
C _{14:0}	6,83	4,09–9,26	6,44	4,48–9,01	4,54	2,85–7,76
C _{14:1}	1,20	0,69–1,69	1,14	0,73–1,60	0,70	0,40–1,33
C _{15:0}	0,87	0,46–1,22	0,81	0,49–1,11	0,46	0,16–0,85
C _{16:0}	26,82	22,50–30,03	26,14	20,38–31,40	28,63	25,62–36,43
C _{16:1}	3,17	2,63–3,63	3,06	2,33–3,54	2,95	1,51–4,95
C _{17:0}	0,66	0,36–0,81	0,66	0,53–0,77	0,46	0,35–0,63
C _{17:1}	0,39	0,25–0,44	0,41	0,35–0,47	0,31	0,18–0,48
C _{18:0}	9,96	9,20–10,82	9,34	7,52–10,67	10,20	6,65–13,54
C _{18:1}	36,45	30,97–45,11	38,28	31,46–43,43	38,66	30,45–45,96
C _{18:2}	8,87	7,64–9,74	8,87	8,70–11,92	9,63	8,15–13,81
C _{18:3}	1,29	0,76–1,66	1,80	0,78–3,61	0,91	0,38–1,54
C _{20:0}	0,52	0,38–0,75	0,41	0,31–0,56	0,40	0,27–0,56
C _{20:1}	0,91	0,53–2,64	0,76	0,51–0,99	0,64	0,41–0,95

We wszystkich badanych całodziennych posiłkach dominującym spośród kwasów nasyconych był kwas palmitynowy (16:0), wśród kwasów monoenowych kwas oleinowy (18:1), natomiast spośród polienowych kwas linolowy (18:2).

Największą zawartością kwasu palmitynowego, wynoszącą średnio 30,48 g/100 g (w zakresie od 23,70 do 34,42) cechowały się całodziennie posiłki uczniów pobierane jesienią (tab. 2). Natomiast wiosną (tab. 1) koncentracja tego kwasu była niższa i wynosiła średnio 26,14 g/100 g tłuszczu (w zakresie od 20,38 do 31,40). Wiosną i jesienią udział omawianego kwasu w pozostałych badanych grupach kształtował się

na zbliżonych poziomach wynoszących średnio: 26,82 i 22,60 g/100 g tłuszczu w przypadku dzieci oraz 28,63 i 21,07 g/100 g tłuszczu w przypadku studentów. Pora roku, z której pochodziły próbki nieznacznie tylko wpłynęła na różnice w stężeniach kwasu oleinowego.

Tabela 2

Skład kwasów tłuszczowych w tłuszczu całodziennych posiłków dzieci, uczniów i studentów, pobieranych w miesiącach wrzesień/październik [g/100 g tłuszczu].

Fatty acid composition in fat from daily meals consumed by children, pupils and students in September/October [g/100 g fat].

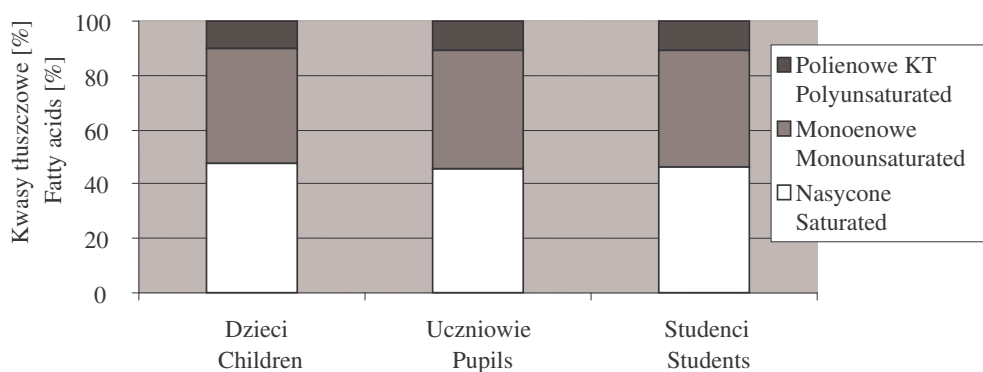
KT FA	Populacje / Populations					
	Dzieci / Children		Uczniowie / Pupils		Studenci / Students	
	wartość średnia mean value	zakres range	wartość średnia mean value	zakres range	wartość średnia mean value	zakres range
C _{12:0}	1,63	0,50–2,30	2,27	1,81–3,00	1,22	0,09–5,73
C _{14:0}	5,53	2,30–7,34	7,87	5,79–9,80	2,89	1,07–6,00
C _{14:1}	0,94	0,30–1,44	1,39	1,19–1,80	0,46	0,14–0,83
C _{15:0}	0,67	0,17–0,90	1,00	0,63–1,21	0,63	0,40–2,00
C _{16:0}	22,60	15,30–29,11	30,48	23,70–34,42	21,07	15,30–26,52
C _{16:1}	2,48	1,61–3,00	2,31	2,51–3,54	2,63	1,70–3,61
C _{17:0}	0,64	0,31–0,93	0,72	0,50–1,00	0,44	0,20–0,83
C _{17:1}	0,52	0,15–1,00	0,39	0,16–0,70	0,34	0,16–0,52
C _{18:0}	9,84	5,60–11,31	11,84	9,60–13,80	9,33	7,23–11,50
C _{18:1}	40,03	36,60–47,60	36,99	31,34–40,12	48,15	41,60–59,44
C _{18:2}	11,52	7,90–17,30	2,82	0,18–9,40	9,51	5,61–13,00
C _{18:3}	2,00	0,11–4,80	0,50	0,01–2,70	1,72	0,22–4,21
C _{20:0}	0,62	0,40–0,81	0,49	0,37–0,71	0,56	0,30–0,81
C _{20:1}	0,98	0,74–1,30	0,93	0,60–1,25	1,05	0,80–1,40

Wiosną (tab. 1) i jesienią (tab. 2) w całodziennych posiłkach wszystkich badanych grup odnotowano zbliżone wielkości tego kwasu wynoszące odpowiednio: 37,80 g/100 g tłuszczu (w zakresie od 30,45 do 45,96) oraz 41,72 g/100 g tłuszczu (w zakresie od 31,34 do 59,44).

Analizując zawartość kwasu linolowego, najmniejsze jego stężenia wynoszące średnio 2,82 g/100 g tłuszczu (w zakresie od 0,18 do 9,40) odnotowano w całodziennych posiłkach uczniów, pobieranych jesienią. Wartość ta była około 3-krotnie niższa od udziału tego kwasu w posiłkach z wiosny (tab. 1) oraz około 4-krotnie niższa od jego ilości w jesiennych posiłkach dzieci i studentów (tab. 2).

Stosunek kwasów linolowego do linolenowego w posiłkach wiosennych i jesiennych dzieci, uczniów i studentów kształtował się na poziomach wynoszących odpowiednio 6,9; 4,9 i 10,6 oraz 5,8; 5,6 i 5,5. W większości przypadków by on nieprawidłowy. W literaturze podaje się, że stosunek kwasów z rodziny n-6 (18:2) do n-3 (18:3), w dietach dzieci i młodzieży, powinien wynosić od czterech do pięciu [24, 25]. Podobnych spostrzeżeń dostarcza przegląd pracy dotyczącej oceny struktury spożycia kwasów tłuszczowych przez dzieci i młodzież w Stanach Zjednoczonych. Jonnalagadda i wsp. [7] stwierdzili, adekwatnie do prezentowanych badań, że największy udział spośród kwasów nasyconych wnosi kwas palmitynowy, monoenowych – kwas oleinowy, natomiast polienowych – kwas linolowy.

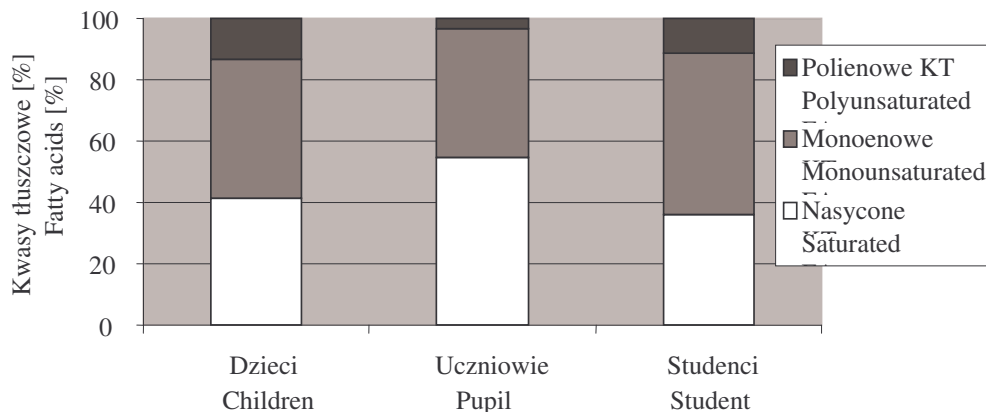
Udział poszczególnych grup kwasów tłuszczowych w tłuszczu analizowanych posiłków wiosennych i jesiennych przedstawiono odpowiednio na rys. 1 i 2.



Rys. 1. Udział nasyconych, monoenowych i polienowych kwasów tłuszczowych w tłuszczu całodziennych posiłków dzieci, uczniów i studentów pobieranych w miesiącach maj/czerwiec, [%].

Fig. 1. The percentage rates of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the total fat quantity consumed by children, pupils and students with their daily meals collected in May/June, [%].

Wiosną (rys. 1) zawartość kwasów nasyconych (średnio 46,53%) i kwasów monoenowych (średnio 43,01%), w przypadku wszystkich badanych grup ludności, była zbliżona. Stosunek kwasów monoenowych do nasyconych wynosił 0,9. Zdecydowanie niższy wynoszący średnio 10,46% był udział kwasów polienowych. Stosunek kwasów polienowych do nasyconych wynosił 0,2.



Rys. 2. Udział nasyconych, monoenowych i polienowych kwasów tłuszczowych w tłuszczu całodziennych posiłków dzieci, uczniów i studentów pobieranych w miesiącach wrzesień/październik, [%]

Fig. 2. The percentage rates of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the total fat quantity consumed by children, pupils and students with their daily meals collected in September/October, [%]

Niską podaż polienowych kwasów tłuszczowych (rys. 2) odnotowano również jesienią. Średni udział tych kwasów wynosił 9,36%. Całodzienne posiłki spożywane jesienią przez dzieci i studentów cechowały się przewagą kwasów monoenowych (odpowiednio: 44,95 i 52,63%) nad nasyconymi (41,53 i 36,14%). Natomiast w przypadku uczniów stwierdzono niewielką przewagę kwasów nasyconych (54,67%) nad monoenowymi (42,01%). Stosunek kwasów nasyconych do monoenowych wynosił średnio 0,9, natomiast kwasów polienowych do nasyconych średnio 0,2.

Z przeprowadzonych badań wynika, że jakość żywieniowa spożywanego tłuszczu w aspekcie wzajemnych relacji między kwasami nasyconymi, monoenowymi i polienowymi, była niezadowolająca. W literaturze podaje się, że stosunek tych kwasów powinien wynosić 1:1:1. Stwierdzoną w pracy niekorzystną proporcję kwasów polienowych do nasyconych należy wiązać z czynnikami ekonomicznymi, zwłaszcza w przypadku wychowanków domu dziecka. Taka struktura spożycia kwasów tłuszczowych zwłaszcza przez młodzież może przyczynić się do rozwoju hipercholesterolemii i stanowić ryzyko rozwoju chorób układu krążenia w wieku późniejszym [20].

Wysokie spożycie nasyconych kwasów tłuszczowych, przy jednocześnie niskiej podaży kwasów polienowych, to podstawowy błąd żywieniowy, na który od lat zwracają uwagę żywieniowcy w Polsce [3].

Uzyskane w prezentowanych badaniach wyniki są potwierdzeniem badań przeprowadzonych przez innych autorów. Daniewski i wsp. [3], Ostrowska i Szewczyński [15], Przysławski [17], Rogalska-Niedźwiedz i wsp. [20] w racjach

pokarmowych różnych grup ludności, stwierdzili także przewagę kwasów nasyconych i monoenowych nad polienowymi.

Niniejsze badania wskazują na konieczność promowania zasad prawidłowego żywienia wśród dzieci i młodzieży. W szczególności należałoby objąć opieką osoby pochodzące z rodzin dotkniętych występowaniem schorzeń o podłożu miażdżycowym.

Wnioski

1. Niezależnie od pory roku (wiosna/jesień) oraz od objętej badaniem grupy, w całodziennych posiłkach dominującym spośród kwasów nasyconych był kwas palmitynowy, wśród kwasów monoenowych kwas oleinowy, natomiast spośród polienowych kwas linolowy. Stwierdzony nieprawidłowy stosunek kwasów z rodziny n-6 (18:2) do n-3 (18:3) może przyczynić się do powstawania schorzeń zdrowotnych. Konieczne jest więc wzbogacenie całodziennych posiłków dzieci i młodzieży w ryby morskie, będące niemal jedynym źródłem kwasów z rodziny n-3, oraz zielone warzywa, które wpływają na ich wchłanianie.
2. Zarówno w przypadku wychowanków domu dziecka, jak i dzieci żywiących się w internacie oraz studentów, struktura spożycia tłuszczu budzi zastrzeżenia ze względu na niezadawalający stosunek kwasów polienowych do nasyconych. Celowe jest więc rozszerzenie badań na większą populację i podjęcie programów prewencyjnych.

Literatura

- [1] Buttriss J.: n-3 fatty acids and health. *BNF Nutr. Bull.*, 1999, **24** (87), 71-73.
- [2] Cichocka A.: Dieta śródziemnomorska w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. *Przegl. Piek. Cuk.*, 2004, **52** (3), 8-10.
- [3] Daniewski M., Mielniczuk E., Jacórzyński B., Pawlicka M., Balas J., Filipek A., Cierpikowska M.: Oszacowanie dziennego spożycia kwasów tłuszczowych w przeciętnej polskiej racji pokarmowej. *Żyw. Człow. Metab.*, 1999, **26** (1), 23-33.
- [4] Daniewski M., Mielniczuk E., Jacórzyński B., Pawlicka M., Balas J., Filipek A., Górnicka M.: Kwasy tłuszczowe w czekoladach i wyrobach czekoladowych. *Rocz. PZH.*, 1999, **50**, 369-383.
- [5] Daniewski M., Mielniczuk E., Jacórzyński B., Pawlicka M., Balas J., Filipek A., Górnicka M.: Kwasy tłuszczowe w produktach cukierniczych. *Rocz. PZH.*, 2000, **51** (4), 361-377.
- [6] Gertig H., Przysławski J.: Rola tłuszczu w żywieniu człowieka. *Żyw. Człow. Metab.*, 1994, **21** (4), 375-388.
- [7] Jonnalagadda S.S., Egan S. K., Heimbach J. T., Harris S. S., Kris-Etherton P. M.: Fatty acid consumption pattern of Americans: 1987-1988 USDA Nationwide Food Consumption Survey. *Nutr. Res.*, 1995, **15** (12), 1767-1781.
- [8] Kolanowski W.: Olej rybi jako źródło kwasów tłuszczowych omega-3 - znaczenie zdrowotne i wzbogacanie żywności. *Przem. Spoż.*, 2000, **54** (9), 56-58.
- [9] Kolanowski W., Uchman Z., Świdorski F.: Oszacowanie poziomu długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie dorosłych mieszkańców Warszawy. *Brom. Chem. Toks.*, 2004, **37** (2), 137-144.
- [10] Krełowska-Kułas M.: Badanie jakości produktów spożywczych. Wyd. PWE. Warszawa 1993.

- [11] Lui K., Stamler J., Trevisan M., Moss D.: Dietary lipids, sugar, fiber and mortality from coronary heart disease. Bivariate analyses of international data. *Arteriosclerosis*, 1982, **2** (3), 221-227.
- [12] Ładoński W., Gospodarek T.: Podstawowe metody analityczne produktów żywnościowych. Wyd. PWN. Warszawa 1986.
- [13] Moszczyński P.: Jak zmniejszyć ryzyko zachorowania na miażdżycę. Cz. II. *Wiad. Zielar.*, 1996, **38** (3), 10-11.
- [14] Omar Aref Omar K.: Meal planning and its relation to nutritional status of pre-school children [2-4 years old] in Egypt. *Rocz. PZH*, 2000, **51** (2), 163-166.
- [15] Ostrowska A., Szewczyński J.: Charakterystyka kwasów tłuszczowych i cholesterolu w racjach pokarmowych młodzieży szkolnej z woj. mazowieckiego. *Brom. Chem. Toks.*, 2002, **35** (4), 323-327.
- [16] Przybojewska B., Rafalski H.: Kwasy tłuszczowe występujące w mleku a zdrowie człowieka [cz.5] - Skład izomerów pozycyjnych i geometrycznych nienasyconych kwasów tłuszczowych występujących w tłuszczu mlekowym. *Przeł. Mlecz.*, 2004, **1**, 30-34.
- [17] Przysławski J.: Analiza porównawcza wybranych parametrów żywieniowych tłuszczu występującego w racjach pokarmowych różnych grup ludności. Cz.II. Skład kwasów tłuszczowych. *Rocz. PZH.*, 1994, **45** (3), 191-198.
- [18] Przysławski J., Gertig H., Nowak J.: Analiza składu kwasów tłuszczowych wybranych margaryn. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1996, **29**, 109-116.
- [19] Przysławski J., Nowak J.: Wartość żywieniowa tłuszczów występujących w całodziennych racjach pokarmowych grup kobiet i mężczyzn w okresie meno- i andropauzy. *Żyw. Człow. Metab.*, 2000, **27** (1), 43-54.
- [20] Rogalska-Niedźwiedz M., Charzewska J., Wajszczyk B., Chabros E., Lachowicz A.: Zmiany spożycia tłuszczu przez młodzież w latach 1982-1996. *Żyw. Człow. Metab.*, 1999, **26** (3), 195-206.
- [21] Szytk A.: Dobroczynny wpływ tłuszczów?. *Żywn. Żyw. Życie*, 2002, **2**, 26-27.
- [22] World Health Organization: Guidelines for the Study of Dietary Intakes of Chemicals Contaminations. WHO Offset Publication. Geneva 1985, **87**, pp. 102.
- [23] Wojtyniak B., Seroka W., Chojecka E.: Umieralność. Sytuacja zdrowotna ludności w Polsce w 1994 roku. Wyd. PZH. Warszawa 1996.
- [24] Ziemiański Ś.: Tłuszcze w żywieniu człowieka- nowe koncepcje i zalecenia. *Przem. Spoż.*, 1996, **50** (10), 10-12.
- [25] Ziemiański Ś.: Tłuszcze w żywieniu człowieka. *Żyw. Człow. Metab.*, 1997, **24** (2), 35-48.
- [26] Żegarska Z., Jaworski J., Borejszo Z.: Ocena zmodyfikowanej metody Peiskera otrzymania estrów metylowych kwasów tłuszczowych. *Acta Acad. Agricult. Technol. Aliment.*, 1991, **24**, 25-33.

THE COMPOSITION OF FATTY ACIDS IN DAILY MEALS EATEN BY CHILDREN, PUPILS AND STUDENTS

S u m m a r y

In this study, we determined levels of individual fatty acid groups in season-dependent daily meals as eaten by children (10–12 years of age), teenagers (13–15 years of age), and students (19–25 years of age). The experiment was carried out in spring and autumn. Samples for analyses were collected using a double meal portion method, i.e. each meal consisting of food and drink was divided in two exactly the same portions: one to be eaten by children, and the second portion was taken for analysis.

It was proved that the year season, when portions were collected, was not a factor deciding on the structure of daily fat consumption. Both in spring and autumn, the palmitic acid was dominant if compared to other saturated acids (its mean value was 27.20 and 27.20 g per 100g of fat), among the monounsaturated acids - the oleic acid (its mean value was 37.80 and 41.72 g per 100 g of fat), and among the polyunsaturated acids – the linoleic acid (9.12 and 7.95 g per 100 g of fat). Levels of saturated and monounsaturated acids in all the daily meals examined were comparable, although their ratio was respectively: 1.1 in spring, and 0.9 in autumn. The daily consumption level of polyunsaturated fatty acids as eaten by all the children polled was not satisfactory. A proportion of polyunsaturated to saturated acids in daily meals, both in the spring and autumn period, was 0.2. This type of a fatty acids consumption structure may affect the development of cardiovascular system diseases in the future.

Key words: fatty acids, adolescents, daily consumption, daily meal ☒

HANNA HABEROWA, ANNA RACZYŃSKA-CABAJ, KLAUDIUSZ GRAJCAR

WPLYW WZBOGACENIA DROŹDŹY PIWOWARSKICH W MAGNEZ NA ICH AKTYWNOŚĆ FERMENTACYJNĄ

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu dodatku magnezu w postaci soli $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ do podłoża hodowlanych, na wzrost *inoculum* i właściwości fermentacyjne drożdży piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae*, szczep nr 1 pochodzący z kolekcji własnej. Do hodowli *inoculum* zastosowano dwa podłoża: YPG jako kontrolne i brzeczkę słodową, które wzbogacono w $1,25 \text{ g Mg/dm}^3$. Hodowle prowadzono metodami: a) stacjonarną - 48 h b) z napowietrzaniem przez 24 i 48 h; c) z napowietrzaniem przez 24 h i następnie 24 h bez napowietrzania; w temp. 28°C i pH 5,0 (YPG) oraz 5,5 (brzeczka).

Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, metodą stacjonarną uzyskiwano bardzo dobre wyniki wiązania magnezu przez komórki, przy jednoczesnym niskim przyroście biomasy drożdży. Stwierdzono, że niezależnie od rodzaju podłoża, wzbogacenie w magnez stymulowało wzrost i produkcję biomasy drożdży, przy czym plon biomasy był wyższy na podłożu YPG w porównaniu z brzeczką. Ponadto magnez był lepiej wiązany przez komórki w hodowli *inoculum* na podłożu YPG. Użycie do fermentacji *inoculum* hodowlanego na brzeczce pozwoliło na uzyskanie wyższego odfermentowania, przy czym wzbogacenie w magnez nie miało istotnego znaczenia.

Słowa kluczowe: drożdże piwowarskie, fermentacja piwowarska, wzbogacanie drożdży.

Wprowadzenie

Wzrost drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, ich podziały oraz wielkość komórek w dużym stopniu są uzależnione od warunków hodowli oraz składu chemicznego podłoża. Jednym z ważniejszych składników podłoża wpływającym w istotny sposób na morfologię i fizjologię drożdży jest magnez [5, 13, 19]. Pierwiastek ten jest wewnątrzkomórkowym aktywatorem około 300 enzymów [10, 14]. Warunkuje przebieg podstawowych procesów życiowych.

W katabolizmie glukozy (glikolizie) do pirogronianu magnez jest niezbędny do aktywacji enzymów takich, jak: heksokinaza, fosfofruktokinaza, kinaza fosfoglicery-

nianowa, hydrataza fosfopirogronianowa i kinaza pirogronianowa [13]. Dalszy metabolizm pirogronianu, zarówno tlenowy przy udziale dehydrogenazy, jak i beztlenowy przy udziale dekarboksylazy wymaga również obecności magnezu [17].

Szlak beztlenowy prowadzi do fermentacji glukozy przez dekarboksylację pirogronianu i redukcję powstałego aldehydu octowego do etanolu. Szlak tlenowy prowadzi do spalania glukozy [16]. Magnez, obok tlenu, odgrywa zasadniczą rolę w tym, który z tych kierunków będzie dominował.

Kluczowe enzymy metabolizmu pirogronianu: dekarboksylaza pirogronianowa i dehydrogenaza pirogronianowa wykazują różne powinowactwo do wewnątrzkomórkowych wolnych jonów magnezu [13, 17]. Dehydrogenaza pirogronianowa wykazuje większe powinowactwo do jonów Mg^{2+} , dlatego proces oddychania zachodzi już przy bardzo niskim ich stężeniu. Natomiast dekarboksylaza pirogronianowa wykazuje znacznie mniejsze powinowactwo do jonów Mg^{2+} , dlatego reakcja przez nią katalizowana wymaga obecności wyższego stężenia jonów magnezu. Enzymy biorące udział w fermentacji wykazują większą zależność od stężenia jonów Mg^{2+} niż enzymy oddechowe [17]. Zważywszy na to, proces fermentacji nie zdominuje kierunku metabolizmu pirogronianu poniżej ustalonego poziomu wolnych jonów magnezu w komórce. Stąd ważne jest, aby w trakcie hodowli zwiększać poziom magnezu w celu zainicjowania procesu fermentacji i zapewnienia prawidłowego jego przebiegu. Im większe jest stężenie jonów Mg^{2+} w komórce, tym większa wydajność etanolu w fermentacji [3]. Propagacja drożdży w warunkach zwiększonego poziomu jonów magnezu wzmacnia wzrost drożdży i kinetykę fermentacji [6, 10, 18, 19]. Niedobór magnezu powoduje spadek aktywności fermentacyjnej i tempa wzrostu drożdży, szczególnie w przypadku fermentacji stężonych brzeczki ze względu na wysokie ciśnienie osmotyczne [4, 6, 9, 12].

Korzystny wpływ magnezu na efektywność fermentacyjną występuje również przy otrzymywaniu piwa górnej fermentacji, która przebiega w wyższej temperaturze [15, 17].

W niniejszej pracy założono określenie wpływu magnezu związanego przez komórki drożdży piwowarskich na przebieg i efektywność fermentacji brzeczki. Na podstawie wyników wcześniejszych badań [7] jako źródło jonów magnezu wykorzystano $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

Material i metody badań

Badania przeprowadzono z udziałem szczepu drożdży piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae* nr 1 pochodzącym z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW. Czystą kulturę przechowywano na skosach brzeczkowo-agarowych (8°Blg) w temp. 4°C i co 3–4 tygodnie przeszczepiano na świeże skosy.

Podłoża mikrobiologiczne

Jako podłoża kontrolne do hodowli drożdży zastosowano płynne podłoże YPD [1] oraz brzeczke słodową pochodzącą z Browarów Warszawskich „Królewskich” S.A., która również, w postaci skosów służyła do przechowywania szczepów.

Jako podłoża doświadczalne zastosowano:

- podłoże płynne YPD wzbogacone w jony magnezu pochodzące z soli $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ w dawce $1,25 \text{ g Mg/dm}^3$ podłoża,
- brzeczke słodową wzbogaconą w jony magnezu, jw. ,
- brzeczke chmieloną pochodzącą z Browarów Warszawskich „Królewskich” S.A. o zawartości ekstraktu 12%.

Podłoża kontrolne bez dodatku magnezu i podłoża wzbogacone w magnez szczepiono drożdżami wykonując zmyw ze skosu. Hodowlę *inoculum* prowadzono w temp. 28°C następującymi metodami:

- a) stacjonarną – w kolbkach stożkowych o poj. 250 cm^3 , zawierających 80 cm^3 podłoża, czas hodowli 48 h. Hodowlę prowadzono równolegle na podłożu kontrolnym i podłożu wzbogaconym w magnez;
- b) z napowietrzaniem w kolbach okrągłych z płaskim dnem o poj. 500 cm^3 , zawierających 80 cm^3 podłoża, czas hodowli 24 i 48 h, kolby umieszczano w wytrząsarce rotacyjnej (200 obr./min). Hodowlę prowadzono równolegle na podłożu kontrolnym i podłożu wzbogaconym w magnez przed rozpoczęciem hodowli;
- c) z napowietrzaniem/stacjonarną („mieszana”) w kolbach okrągłych z płaskim dnem o poj. 500 cm^3 , zawierających 80 cm^3 podłoża. Przez pierwsze 24 h kolby były umieszczone w wytrząsarce rotacyjnej (200 obr./min), a przez kolejne 24 h hodowlę prowadzono w warunkach stacjonarnych. Hodowlę prowadzono na podłożu kontrolnym i podłożu wzbogaconym w magnez – stosując dodatek magnezu przed rozpoczęciem hodowli i w 24. h hodowli w wytrząsarce, dalsze 24 h prowadzono hodowlę stacjonarną.

Proces fermentacji prowadzono w temp. $8,5^\circ\text{C}$ na słodowej brzeczce chmielonej o zawartości ekstraktu 12%, którą zaszczepiano drożdżami w ilości 0,5% *inoculum* w stosunku do objętości brzeczki. Fermentację prowadzono w 2 wariantach przez 8 dni, w kolbach okrągłych z płaskim dnem o poj. 500 cm^3 , zawierających 300 cm^3 brzeczki:

wariant 1: *inoculum* hodowane na podłożu YPD bez i z dodatkiem magnezu,

wariant 2: *inoculum* hodowane na brzeczce słodowej, bez i z dodatkiem magnezu.

W odstępach 24-godzinnych dokonywano kontroli spadku ekstraktu przy użyciu areometru Ballinga oraz oceniano przebieg fermentacji po zmianach występujących na powierzchni (pojawienie się kręgów). Zawartość biomasy komórkowej w *inoculum* określano w momencie zakończenia hodowli. Biomase otrzymaną z odwirowania 8

cm³ każdej dobrze wymieszanej hodowli ważono, a następnie suszono w temp. 60°C przez 2 h i w temp. 105°C do ustalenia stałej masy [11]. Zawartość magnezu w dwukrotnie przemytej biomacie komórkowej drożdży i podłożach oznaczano metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej ASA [2]. Oznaczanie ekstraktu pozornego dokonywano areometrem Ballinga [8]. Oznaczanie zawartości alkoholu, ekstraktu rzeczywistego i ekstraktu brzezki podstawowej wykonywano piknometrycznie wg PN [12], pobierając do oznaczenia 100 g odgazowanej próby.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu Statgraphics Plus 4.0. Istotność różnic między wartościami średnimi określano metodą wieloczynnikowej analizy wariancji przy $\alpha=0,05$, a NIR obliczano testem Tukey'a (jako HSD).

Wyniki prezentowane w pracy są średnią z trzech serii badań, przy czym każde jednostkowe doświadczenie (np. hodowla próby kontrolnej) wykonano w trzech równoległych powtórzeniach. Ta sama liczebność dotyczy oznaczeń fizykochemicznych.

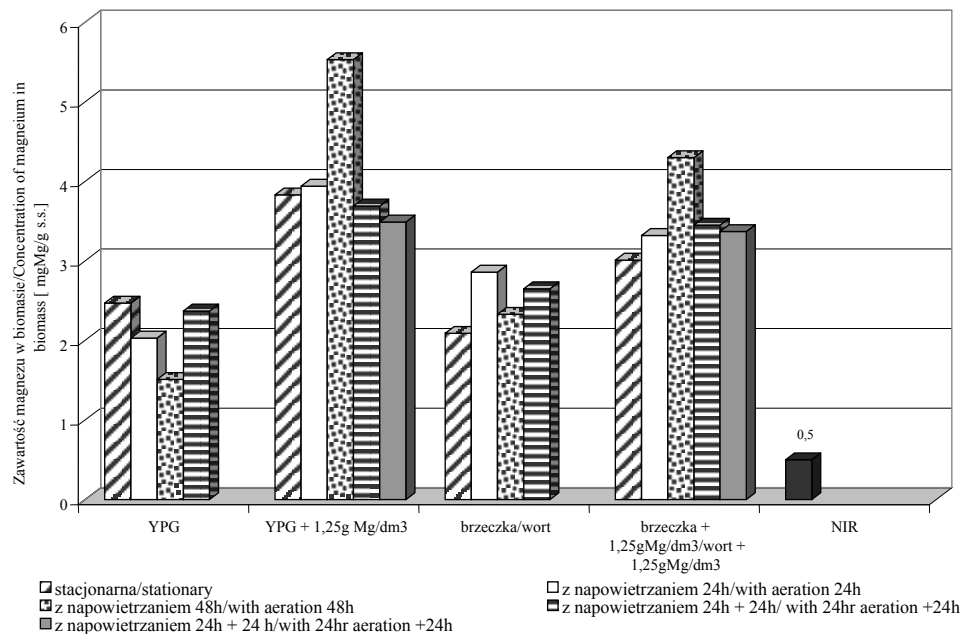
Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania są kontynuacją prac wykonanych w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności [m.in. 7] dotyczących wiązania biopierwiastków przez drożdże.

Pierwszy etap pracy stanowiły badania nad wiązaniem magnezu przez użyty do hodowli *inoculum* szczep drożdży piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae* nr 1. Oznaczona na wstępie zawartość magnezu w podłożach niewzbogaconych wynosiła: w podłożu YPG – 0,024 g Mg/dm³ (ok. 2% zastosowanej dawki magnezu), a w brzezce słodowej 0,061 g Mg/dm³ (ok. 5% dawki magnezu). Zawartość magnezu w drożdżach hodowanych różnymi metodami na podłożu YPD i brzezce, przedstawiono na rys. 1.

Stwierdzono, że na podłożach kontrolnych w hodowlach z napowietrzaniem następował wyraźny spadek ilości magnezu w biomacie drożdży między 24. a 48. h hodowli. Należy zaznaczyć, że magnezu było zdecydowanie więcej w hodowlach kontrolnych na brzezce.

Wyniki dotyczące plonu biomasy jako średnie przedstawiono na rys. 2. Plon biomasy w *inoculum* kontrolnym hodowanym na podłożu YPD metodą stacjonarną był niższy w porównaniu z wynikami uzyskanymi w analogicznych warunkach na brzezce i to zarówno w próbach kontrolnych, jak i z dodatkiem magnezu. Największy plon biomasy uzyskano na podłożu YPD z magnezem po 48 h hodowli z napowietrzaniem. W hodowli bez magnezu (kontrolnej) plon biomasy w analogicznych warunkach był o ok. 10% mniejszy, ale była to różnica statystycznie nieistotna.



Rys. 1. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej *inoculum* drożdży piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae* hodowanych na podłożu YPD i brzezce słodowej w zależności od metody i czasu hodowli.

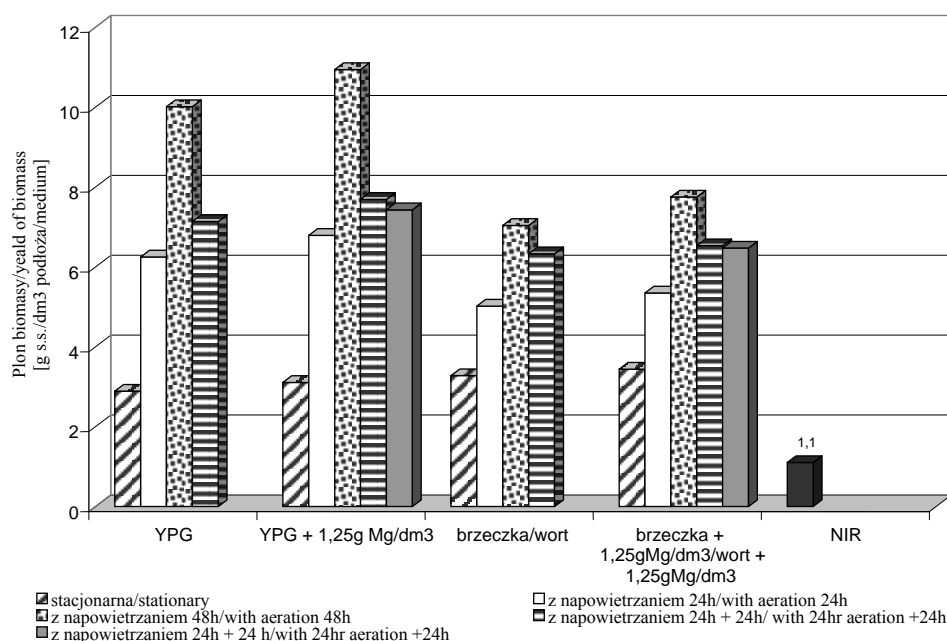
Fig. 1. The content of magnesium in the biomass of the of brewer's yeast culture type *inoculum* grown on an YPG medium and on a brewer's wort depending on the method and time of growing the culture.

W doświadczeniach, gdzie przez pierwsze 24 h hodowla była napowietrzana, a kolejne 24 h prowadzono ją metodą stacjonarną (wariant c) plon biomasy na podłożu YPD był zdecydowanie wyższy w porównaniu z plonem biomasy uzyskanym na brzezce. Największe i statystycznie istotne różnice uzyskiwano w hodowlach z napowietrzaniem po 24 h (25% więcej biomasy w porównaniu z hodowlą na brzezce) i po 48 h (40% więcej).

Stwierdzono, że na podłożach kontrolnych w hodowlach z napowietrzaniem następował wyraźny spadek ilości magnezu w biomacie drożdży między 24. a 48. h hodowli. Należy zaznaczyć, że zdecydowanie więcej magnezu było w hodowlach kontrolnych na brzezce (rys. 1).

Biomasa drożdży hodowanych na podłożach wzbogaconych w magnez zawierała więcej tego pierwiastka w stosunku do prób kontrolnych, przy czym jego ilość w biomacie hodowanej na podłożu YPD była większa od analogicznych prób kontrolnych o 94% po 24 h hodowli i 266% (3,6 razy więcej) po 48 h hodowli. Wzrost zawartości magnezu w biomacie hodowanej na brzezce wzbogaconej był znacznie mniejszy,

ale również wyraźny – analogicznie 15 i 84% w stosunku do próby kontrolnej (hodowla z napowietrzaniem przez 48 h, przy czym magnez dodawany był po 24 h hodowli (wersja c).



Rys. 2. Wpływ dodatku magnezu na plon biomasy drożdży piwarskich *Saccharomyces cerevisiae* w hodowli *inoculum* na podłożu YPD i brzezce słodowej w zależności od metody i czasu hodowli.

Fig. 2. Effect of magnesium added on the biomass yield of the brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the culture type *inoculum* grown on an YPD medium and on a brewer's wort depending on the method and time of growing the culture.

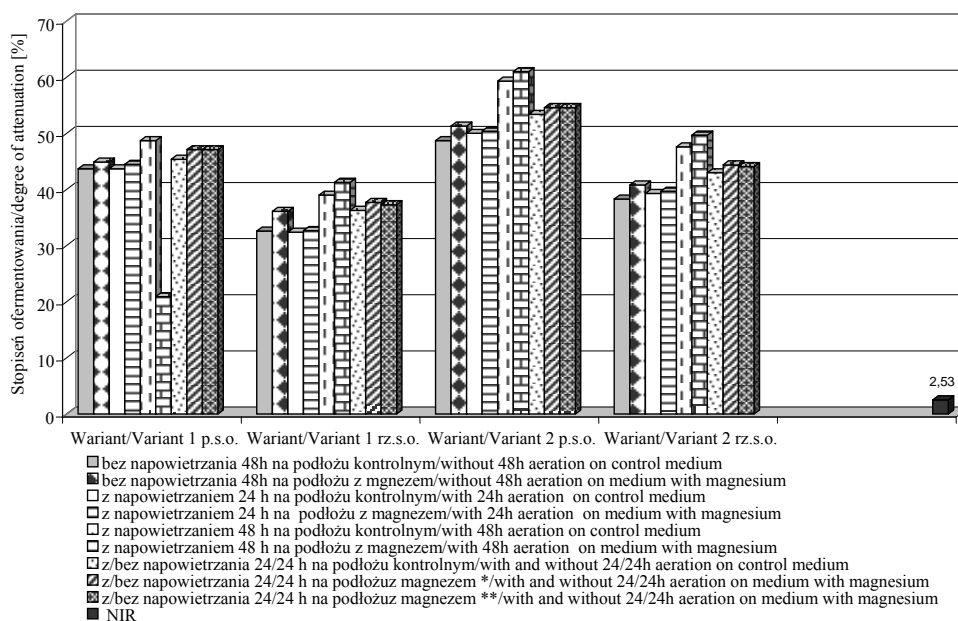
W hodowlach „mieszanych” zawartość magnezu w biomacie drożdży była podobna bez względu na rodzaj podłoża, a różnice okazały się statystycznie nieistotne.

W hodowlach *inoculum* metodami z napowietrzaniem na podłożu YPD kontrolnym i z dodatkiem magnezu zaobserwowano wyższy plon biomasy w porównaniu z analogicznymi hodowlami na brzezce. Największe różnice występowały w hodowlach *inoculum* z napowietrzaniem po 24 i 48 h odpowiednio 25 i 40% więcej w porównaniu z analogicznymi hodowlami na brzezce.

W drugim etapie pracy zbadano wpływ dodatku soli magnezu do podłoża hodowlanego, rodzaju podłoża hodowlanego i metody prowadzenia hodowli *inoculum* na przebieg i efektywność fermentacji. Zastosowano dwa warianty fermentacji, w których

zróznicowano podstawowe podłoże hodowlane przy zachowaniu tych samych warunków prowadzenia hodowli (czas, temp., napowietrzanie i dodatek magnezu).

Analiza wyników (rys. 3) wskazuje, że dynamika fermentacji, wyrażona spadkiem ekstraktu pozornego, zależała przede wszystkim od podłoża, na którym hodowano *inoculum* i od napowietrzania. Wydaje się, że wzbogacenie *inoculum* w magnez nie miało praktycznego znaczenia.



Rys. 3. Porównanie pozornego i rzeczywistego stopnia odfermentowania w 2 wariantach fermentacji brzeczki, w zależności od metody hodowli *inoculum*.

Fig. 3. A comparison of the apparent and real attenuation degree in two variants of hopped wort fermentation depending on the method of growing an *inoculum* culture.

W nastawach szczepionych *inoculum* hodowanym na brzeczce fermentacja zaczynała się o dobę wcześniej, przy czym użycie 48-godzinnego *inoculum* hodowanego na brzeczce z napowietrzaniem (tab. 1, poz. 5 i 6) umożliwiło uzyskanie najlepszej dynamiki fermentacji, wyrażającej się największym spadkiem ekstraktu pozornego. Odfermentowanie było o ok. 21% większe przy użyciu *inoculum* „brzeczkowego” (wariant 2) w porównaniu z wynikami uzyskanymi przy użyciu *inoculum* „YPD” (wariant 1). W tym przypadku wzbogacenie drożdży w magnez nie miało praktycznie znaczenia, gdyż odfermentowanie było wyższe tylko o ok. 5%.

Tabela 1

Porównanie wpływu wzbogacenia drożdży w magnez na zmiany zawartości ekstraktu pozornego podczas fermentacji w zależności od podłoża użytego do hodowli *inoculum* – YPD i brzezka słodowa.

A comparison of effects obtained by enriching yeast with magnesium on changes in the apparent extract content during the fermentation process depending on the type of medium used to grow culture type *inoculum* i.e. YPD and brewer's wort.

Metoda hodowli <i>inoculum</i> Method of growing the <i>inoculum</i> culture	Zawartość ekstraktu pozornego [%] (m/m) Apparent extract content [%] (w/w)																							
	1 doba 1 day		2 doba 2 days		3 doba 3 days		4 doba 4 days		5 doba 5 days		6 doba 6 days		7 doba 7 days		8 doba 8 days									
	YPD	Brz. Wort	YPD	Brz. Wort	YPD	Brz. Wort	YPD	Brz. Wort	YPD	Brz. Wort	YPD	Brz. Wort	YPD	Brz. Wort	YPD	Brz. Wort								
1 Stacjonarna 48 h (kontrola) Stationary 48 h (control)	12	12	12	12	12	12	11,9	11,9	11,9	11,6	10,7	9,0	8,7	7,8	7,1	6,7	6,0							
2 Stacjonarna 48 h + magnez Stationary 48 h + magnesium	12	12	12	12	12	12	11,9	11,9	11,6	10,8	10,6	8,9	8,6	7,7	6,95	6,5	5,8							
3 Z napowietrzaniem 24 h With 24 h aeration	12	12	12	12	12	12	11,9	11,9	11,4	10,8	10,3	9,0	8,5	7,8	7,0	6,7	5,9							
4 Z napowietrzaniem 24 h + magnez With 24 h aeration 24 h + magnesium	12	12	12	12	12	12	11,9	11,9	11,4	10,8	10,2	9,0	8,4	7,8	6,9	6,6	5,8							
5 Z napowietrzaniem 48 h (kontrolna) With 48 h aeration (control)	12	12	12	12	12	12	11,8	11,7	11,2	10,1	9,8	8,4	8,0	7,2	6,3	6,1	4,8							
6 Z napowietrzaniem 48 h + magnez With 48 h aeration + magnesium	12	12	12	12	12	12	11,8	11,7	11,2	10,1	9,6	8,3	8,0	7,0	6,2	5,8	4,6							
7 Z i bez napowietrzania 24/24 h (kontrolna) With and without aeration 24/24 h (control)	12	12	12	12	12	12	11,8	11,8	11,3	10,5	10,1	8,8	8,4	7,6	6,7	6,5	5,5							
8 Z i bez napowietrzania 24/24 h + magnez* With and without aeration 24/24 h + magnesium*	12	12	12	12	12	12	11,8	11,8	11,3	10,5	10,0	8,8	8,2	7,5	6,6	6,3	5,4							
9 Z i bez napowietrzania 24/24 h + magnez** With and without aeration 24/24 h + magnesium**	12	12	12	12	12	12	11,8	11,8	11,3	10,5	10,0	8,8	8,2	7,5	6,6	6,3	5,4							

Objasnienia: / Explanatory notes: * dodatek magnezu na początku hodowli / magnesium was added right after the growing process of *inoculum* culture started;

** dodatek magnezu w 24. h hodowli / magnesium was added during the 24th hour of the growing process of *inoculum* culture

Tabela 2

Wyniki oznaczeń wykonanych po zakończonej fermentacji brzezki chmielonej *inoculum* hodowanym na podłożu YPD kontrolnym i z dodatkiem soli magnezu $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

A comparison of results obtained after the fermentation process of hopped wort was accomplished; the hopped wort was inoculated with *inoculum* grown on a control medium YPG, and on a medium YPG with magnesium $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ added.

	Metoda hodowli <i>inoculum</i> Method of growing the <i>inoculum</i> culture	Zawartość ekstraktu [%] (m/m) Extract content [%] (w/w)		Zawartość alkoholu [%] (m/m) Alcohol content [%] (w/w)	Stopień odfermentowania [%] Attenuation degree of wort [%]		
		Pozorny apparent	Rzeczywisty Real		brzezki podstawowej basic wort	Pozorny apparent	Rzeczywisty real
1	Bez napowietrzania 48 h na podłożu kontrolnym Without aeration, 48 h on the control medium	6,70	8,02	11,9	2,0	43,7	32,6
	Bez napowietrzania 48 h na podłożu z dodatkiem magnezu Without aeration, 48 h on the medium with magnesium added	6,50	7,54	11,8	2,2	44,9	36,1
2	Z napowietrzaniem 24 h na podłożu kontrolnym With aeration, 24 h on the control medium	6,70	8,04	11,9	2,0	43,7	32,4
	Z napowietrzaniem 24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With aeration, 24 h on the medium with magnesium added	6,60	8,01	11,9	2,0	44,5	32,7
3	Z napowietrzaniem 48 h na podłożu kontrolnym With aeration, 48 h on the control medium	6,10	7,26	11,9	2,4	48,7	39,0
	Z napowietrzaniem 48 h na podłożu z dodatkiem magnezu With aeration, 48 h on the medium with magnesium added	5,80	6,93	11,8	2,5	50,9	41,3
	Z/bez napowietrzania 24/24 h na podłożu kontrolnym With/ without aeration, 24/24 h on the control medium	6,50	7,58	11,9	2,2	45,4	36,3
4	Z/bez napowietrzania 24/24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With/ without aeration, 24/24 h on the medium with magnesium added*	6,30	7,42	11,9	2,3	47,1	37,7
	Z/bez napowietrzania 24/24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With/ without aeration, 24/24 h on the medium with magnesium added**	6,30	7,46	11,9	2,3	47,1	37,3

Objasnienia: / Explanatory notes: * dodatek magnezu na początku hodowli / magnesium was added at the beginning of inoculation;

** dodatek magnezu w 24. h hodowli/ magnesium was added during the 24th hour of the growing process of inoculum culture

Tabela 3

Wyniki oznaczeń wykonanych po zakończonej fermentacji brzezki chmielonej zaszczonej *inoculum* hodowanym na podłożu brzezczkowym kontrolnym i z dodatkiem soli magnezu $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.
Results of determining procedures performed after the fermentation process of hopped wort was accomplished; the hopped wort was inoculated with an *inoculum* grown on a brewer's wort, as well as on a brewer's wort with magnesium $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ added.

	Metoda hodowli <i>inoculum</i> Method of growing the <i>inoculum</i> culture	Zawartość ekstraktu [%] (m/m) Extract content [%] (w/w)			Zawartość alkoholu [%] (m/m) Alcohol content [%] (w/w)		Stopień odfermentowania [%] Attenuation degree of wort [%]	
		pozorny apparent	rzeczywisty Real	brzezki podstawowej wort	pozorny apparent	rzeczywisty real		
1	Bez napowietrzania 48 h na podłożu kontrolnym without aeration 48 h on the control medium Bez napowietrzania 48 h na podłożu z dodatkiem magnezu with aeration 48 h on the medium with addition of magnesium	6,00	7,22	11,7	2,3	48,7	38,3	
2	Z napowietrzaniem 24 h na podłożu kontrolnym With aeration 24 h on the control medium Z napowietrzaniem 24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With aeration 24 h on the medium with addition of magnesium	5,80	7,04	11,9	2,5	51,3	40,8	
3	Z napowietrzaniem 48 h na podłożu kontrolnym With aeration 48 h on the control medium Z napowietrzaniem 48 h na podłożu z dodatkiem magnezu With aeration 48 h on the medium with addition of magnesium	5,90	7,16	11,8	2,4	50,0	39,3	
4	Z bez napowietrzania 24/24 h na podłożu kontrolnym With/ without aeration 24/24 h on the control medium Z bez napowietrzania 24/24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With/ without aeration 24/24 h on the medium with addition of magnesium*	4,80	6,18	11,8	2,9	59,3	47,6	
	Z bez napowietrzania 24/24 h na podłożu kontrolnym With/ without aeration 24/24 h on the control medium Z bez napowietrzania 24/24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With/ without aeration 24/24 h on the medium with addition of magnesium**	4,60	5,94	11,8	3,0	61,0	49,7	
	Z bez napowietrzania 24/24 h na podłożu kontrolnym With/ without aeration 24/24 h on the control medium Z bez napowietrzania 24/24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With/ without aeration 24/24 h on the medium with addition of magnesium**	5,50	6,73	11,8	2,6	53,4	43,0	
	Z bez napowietrzania 24/24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With/ without aeration 24/24 h on the medium with addition of magnesium*	5,40	6,62	11,9	2,7	54,6	44,4	
	Z bez napowietrzania 24/24 h na podłożu z dodatkiem magnezu With/ without aeration 24/24 h on the medium with addition of magnesium**	5,40	6,65	11,9	2,7	54,6	44,1	

Objaśnienia: / Explanatory notes: * dodatek magnezu na początku hodowli/ magnesium was added at the beginning of growing the *inoculum* culture

** dodatek magnezu w 24 godzinie hodowli/ magnesium was added in the 24th hour of the *inoculum* culture growing process

Skrócenie czasu zafermentowania i lepsza dynamika fermentacji przy zastosowaniu *inoculum* hodowlanego na brzezce wynika najprawdopodobniej ze skrócenia lag fazy i lepszego przystosowania drożdży do tego podłoża. Drożdże hodowane na podłożu YPD miały wydłużoną lag fazę i mimo, że plon biomasy był większy na tym podłożu (rys. 2) to proces fermentacji przebiegał wolniej, a zawartość ekstraktu pozornego po 8 dobach była średnio o 15% wyższa w porównaniu z *inoculum* hodowanym na brzezce.

Zarówno pozorny, jak i rzeczywisty stopień odfermentowania nastawów był dość niski, przy czym odfermentowanie nastawów szczepionych *inoculum* hodowanym na podłożu YPD (tab. 2) było znacznie słabsze (średnio o 15%) w porównaniu z odfermentowaniem nastawów szczepionych *inoculum* hodowanym na brzezce (tab. 3). Wzbogacenie *inoculum* w magnez nie miało tu praktycznie znaczenia, chociaż zastosowanie *inoculum* wzbogaconego w magnez spowodowało wyższe odfermentowanie, ale różnica ta była statystycznie nieistotna (rys. 3). Jedyne nastaw szczepiony 48-godzinnym *inoculum* hodowanym na brzezce wykazał odfermentowanie rzeczywiste równe średnio 48%, czyli dolną granicę odfermentowania piw jasnych (tab. 3, poz. 3).

Wnioski

1. Niezależnie od zastosowanego podłoża hodowlanego – YPD czy brzezki słodowej – dodatek magnezu w ilości $1,25 \text{ g Mg/dm}^3$ w postaci $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ nie hamował wzrostu drożdży przy czym plon biomasy był wyższy na podłożu YPD.
2. Biomasa drożdży hodowanych na podłożu YPD zawierała więcej magnezu w porównaniu z biomasa hodowaną na brzezce w tych samych warunkach.
3. Szczepienie nastawów *inoculum* hodowanym na brzezce pozwoliło na szybsze (o dobę) i większe odfermentowanie (średnio o 15%) w porównaniu z wynikami uzyskanymi przy stosowaniu *inoculum* hodowanym na podłożu YPD.
4. Wzbogacenie drożdży w magnez nie miało praktycznie wpływu na przebieg fermentacji i jej dynamikę. Jedyne w przypadku hodowli *inoculum* przez 48 h, na podłożu wzbogaconym w magnez, uzyskano nieznacznie większy stopień odfermentowania (o ok. 5%) bez względu na rodzaj podłoża hodowlanego.

Literatura

- [1] Blackwell K.J., Tobin J.M., Avery S.V.: Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, **47**, 180-184.
- [2] Bryłka J.: Eksperymentalna chemia fizyczna. Wyd. SGGW. Warszawa 1995, s. 317-328.
- [3] Chandrasena G., Walker G.M., Staines H.J.: Use of response surfaces to investigate metal interactions in yeasts fermentations. J. Amer. Soc. Brewing Chem., 1997, **55** (1), 24-29.

- [4] D'Amore T., Panchal C.J., Russell I., Stewart G.G.: Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. *J. Industr. Microbiol.*, 1988, **2**, 365-372.
- [5] Dedyukhina E.G., Eroshin V.K.: Essential metal ions in the control of microbial metabolism. *Proc. Biochemistry*, 1991, **26** (1), 31-37.
- [6] Dombek K.M., Ingram L.O.: Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Environm. Microbiol.*, 1986, **52**, 975-981.
- [7] Duszkievicz-Reinhard W., Gniewosz M., Błażej S., Bugajewska A., Pelikańska-Rek K.: Próby wzbogacenia w magnez drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach hodowli stacjonarnej. Materiały XXXII Sesji Naukowej KTChŻ PAN, Warszawa, 2001, płyta CD.
- [8] Jarczyk A.: Ćwiczenia z technologii żywności. Technologie kierunkowe. Wyd. SGGW. Warszawa 1980, s. 153-156.
- [9] Jones R.P., Greenfield P.F.: A review of yeast ionic nutrition. I. Growth and fermentation requirements. *Proc. Biochemistry.*, 1984, **19** (2), 48-60.
- [10] Mochaba F., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C.: Metal ion concentration and release by a brewing yeast: characterization and implications. *J. Amer. Soc. Brewing Chem.*, 1996, **54** (3), 155-163.
- [11] Pasternakiewicz A., Tuszyński T.: Effect of calcium, magnesium, cobalt (II), and zinc cations on the *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1997, **6/47** (4), 61-70.
- [12] PN-A-79093-2: 2000. Piwo.
- [13] Rees E.M.R., Stewart G.G.: The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *J. Instit. Brewing*, 1997, **103**, 287-299.
- [14] Saltukoglu A., Slaughter J.C.: The effect of magnesium and calcium on yeast growth. *J. Industr. Brewing*, 1983, **89**, 81-83.
- [15] Stewart G.G., D'Amore T., Panchal C.J., Russell I.: Factors that influence ethanol tolerance of brewer's yeast strains during high-gravity wort fermentations. *Master Brewer's Assoc. Amer. Tech. Quart.*, 1988, **25**, 47-53.
- [16] Stryer L.: *Biochemia*. PWN. Warszawa 1997, s. 515-531.
- [17] Walker G.M.: The roles of magnesium in biotechnology. *Critic. Rev. Biotechnol.*, 1994, **14**, 311-354.
- [18] Walker G.M., Birch R.M., Chandrasena G., Maynard A. I.: Magnesium, calcium, and fermentative metabolism in industrial yeasts. *J. Amer. Soc. Brewing Chem.*, 1996, **54**, 13-18.
- [19] Walker G.M., Maynard A. I.: Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzym. Microbiol. Technol.*, 1996, **18**, 455-459.
- [20] Walker G.M., Maynard A. I.: Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, **18** (1), 1-3.

THE EFFECT OF ENRICHING BREWER'S YEAST WITH MAGNESIUM ON ITS FERMENTATION ACTIVITY

S u m m a r y

The objective of this study was to investigate an effect of magnesium ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) added to the culture medium on the growth of *inoculum* and the fermentation properties of brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain N^o 1 (originating from the authors' own collection).

Two culture media were used to grow *inoculum*: YPG, which was a control medium, and a brewer's wort. The two media were enriched with magnesium by adding 1.25 g Mg/dm^3 to them.

The yeast cultures were developed using the following methods: a) a stationary method - 48 hrs; b) a method with the aeration during a period of 24 hrs and 48 hrs; c) a method with the aeration during the 24 hrs, the next 24 hr period without aeration; at 28⁰C, and with a pH value equaling 5,0 in the case of the YPG, and 5.5 in the case of the wort.

According to what has already been proved in previous experiments, the rate of magnesium being absorbed by cells was very high, and, at the same time, the biomass yield of yeast was low. It was stated that regardless of the type of medium, the enrichment with magnesium stimulated the growth and biomass of the yeast; the biomass yield was higher on the YPG medium than on the brewer's wort. Furthermore, the magnesium was better absorbed by cells in the YPG medium. When *inoculum* grown on the brewery wort was used, the level of the brewery fermentation was higher, although the increase in the content of magnesium in the yeast was of no significant effect.

Key words: brewer's yeasts, brewery fermentation, enrichment of yeast. ☒