

ŻYWNOSĆ

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 1 (46)

Kraków 2006

Rok 13

SPIS TREŚCI

Od Redakcji	3
DOMINIK SZWAJGIER, ZDZISŁAW TARGOŃSKI: Charakterystyka enzymów pochodzenia mikrobiologicznego biorących udział w degradacji arabinoksylianów i ich rola w pozyskiwaniu kwasu ferulowego z wysłodzin piwowych	5
ALICJA STACHELSKA: Obecność mutagenów i kancerogenów w żywności oraz ich wpływ na organizm człowieka	21
MAŁGORZATA NEUMANN, KAMILA GODERSKA, KATARZYNA GRAJEK, WŁODZIMIERZ GRAJEK: Modele przewodu pokarmowego <i>in vitro</i> do badań nad biodostępnością składników odżywczych	30
ANNA OLEJNIK, MARCIN SCHMIDT, KATARZYNA WOJNAROWSKA, WŁODZIMIERZ GRAJEK: Wpływ toksycznych metabolitów trawienia na proliferację i uszkodzenia DNA nabłonkowych komórek jelitowych <i>in vitro</i>	46
GRAŻYNA CICHOSZ, JERZY SZPENDOWSKI, ANDRZEJ J. CICHOSZ, MARIUSZ KORNACKI: Degradacja parakazeiny w serach Gouda wyprodukowanych z dodatkiem kultur <i>Lactobacillus</i>	58
GRAŻYNA CICHOSZ, MARIUSZ KORNACKI, MARTA GICZEWSKA, ANETA KONOPKA: Aktywność peptydazowa wybranych szczepów <i>Lactobacillus</i>	66
PAWEŁ GLIBOWSKI, ANNA KRĘPACKA: Wpływ dodatku preparatów serwatki na właściwości reologiczne jogurtów	74
JOLANTA KOWALSKA, ANDRZEJ LENART, JUSTYNA DOBROWOLSKA: Wpływ czasu przechowywania na właściwości fizyczne i stabilność kakao z dodatkiem kwasu L-askorbinowego	83
MARIA BALCEREK, JÓZEF S. SZOPA: Zawartość karbaminianu etylu w destylatach owocowych	91
MIROSŁAW PYSZ, PAWEŁ M. PISULEWSKI, TERESA LESZCZYŃSKA: Wpływ oddziaływania impulsowego i ciągłego pola mikrofalowego na wartość żywieniową i właściwości przeciwutleniające kiełkowanych nasion soi	102
ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, EWA CZARNIECKA-SKUBINA: Wpływ sposobu gotowania i przechowywania po ugotowaniu na temperaturę, wydajność i jakość sensoryczną brokułów	117
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie krajowym	133
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA, DAGMARA MIERZEJEWSKA: Współczesny leksykon wiedzy o żywności	136
STANISŁAW POPEK: Nowe książki	138
BOGUSŁAW KRÓL, MACIEJ WACHOWICZ: Wspomnienie w 100-lecie urodzin – prof. dr Stanisław Zagrodzki (1906–1980)	143
Technolog Żywności	149

Zamieszczone artykuły są recenzowane

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

FOOD

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

No 1 (46)

Kraków 2006

Vol. 13

CONTENTS

From the Editor	3
DOMINIK SZWAJGIER, ZDZISŁAW TARGOŃSKI: Characterization of arabinoxylan – degrading microbial enzymes and their role in release of ferulic acid from barley spent grain	5
ALICJA STACHELSKA: Presence of mutagens and carcinogens in food and its influence on consumers health	21
MAŁGORZATA NEUMANN, KAMILA GODERSKA, KATARZYNA GRAJEK, WŁODZIMIERZ GRAJEK: The in vitro models of gastrointestinal tract to study bioavailability of nutriments	30
ANNA OLEJNIK, MARCIN SCHMIDT, KATARZYNA WOJNAROWSKA, WŁODZIMIERZ GRAJEK: The influence of toxic digestive metabolites on the proliferation and DNA damage of epithelial intestinal cells <i>in vitro</i>	46
GRAŻYNA CICHOSZ, JERZY SZPENDOWSKI, ANDRZEJ J. CICHOSZ, MARIUSZ KORNACKI: Paracasein degradation in Gouda cheeses produced with <i>Lactobacillus</i> culture	58
GRAŻYNA CICHOSZ, MARIUSZ KORNACKI, MARTA GICZEWSKA, ANETA KONOPKA: Peptidase activity of some <i>Lactobacillus</i> strains	66
PAWEŁ GLIBOWSKI, ANNA KRĘPACKA: Effect of whey preparations addition on rheological properties of yoghurts	74
JOLANTA KOWALSKA, ANDRZEJ LENART, JUSTYNA DOBROWOLSKA: Influence of storage time on general properties and stability of cacao powder with L-ascorbic acid added	83
MARIA BALCEREK, JÓZEF S. SZOPA: Ethyl carbamate content in fruit distillates.....	91
MIROŚLAW PYSZ, PAWEŁ M. PISULEWSKI, TERESA LESZCZYŃSKA: The influence of pulse and continuous microwave field affecting on nutrition value and antioxidant properties of germinated soybean seeds	102
ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, EWA CZARNIECKA-SKUBINA: Effect of cooking methods and storage after cooking on temperature, yield and sensory quality of broccoli	117
GRAŻYNA MORKIS: Food Problems in Polish Legislation.....	133
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA, DAGMARA MIERZEJEWSKA: Food Science Lexicon – Contemporary Terms.....	136
STANISŁAW POPEK: Book Reviews	138
BOGUSŁAW KRÓL, MACIEJ WACHOWICZ: 100 Birth Anniversary Memoir – prof. dr Stanisław Zagrodzki (1906–1980)	143
The Food Technologist.	149

Only reviewed papers are published

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

DOMINIK SZWAJGIER, ZDZISŁAW TARGOŃSKI

CHARAKTERYSTYKA ENZYMÓW POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO BIORĄCYCH UDZIAŁ W DEGRADACJI ARABINOKSYLANÓW I ICH ROLA W POZYSKIWANIU KWASU FERULOWEGO Z WYSŁODZIN PIWOWARSKICH

Streszczenie

Celem pracy było scharakteryzowanie enzymów pochodzenia bakteryjnego i grzybowego biorących udział w degradacji arabinoksylianów. W szczególności scharakteryzowano esterazy kwasu ferulowego, ksylanazy i acetyloesterazy. Przedstawiono stan badań nad pozyskiwaniem kwasu ferulowego z wysłodzin piwowskich i innych materiałów roślinnych, po zastosowaniu oczyszczonych enzymów lub preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego. Wysłodziny piwowskie są najcenniejszym produktem odpadowym przemysłu piwowarskiego, bogatym w cenne składniki żywieniowe, np. białko, błonnik pokarmowy i kwasy tłuszczowe. Kwas ferulowy jest naturalnym, silnym przeciwutleniaczem występującym pospolicie w ziarniakach roślin *Graminaceae* i w produktach ubocznych przemysłu piwowarskiego – w wysłodzinach piwowskich. Może być on przekształcany na drodze mikrobiologicznej do innych związków wykorzystywanych przemysłowo, np. przeciwutleniacza kwasu kawowego lub waniliny, cenionego związku aromatycznego żywności.

Słowa kluczowe: kwas ferulowy, esteraza kwasu ferulowego, ksylanaza, acetyloesteraza, wysłodziny, piwo

Wstęp

Wysłodziny powstające w czasie zacierania słoju są najcenniejszym ubocznym produktem przemysłu piwowarskiego. Od wielu lat trwają prace nad ich przemysłowym wykorzystaniem. Materiał ten zawiera cenne składniki żywieniowe, takie jak białko, błonnik pokarmowy i kwasy tłuszczowe. Przeciętny skład wysłodzin, w odniesieniu do suchej masy, jest następujący: 20–30% arabinoksylianów, ok. 44% innych polisacharydów nieskrobiowych i ok. 24% białka. Inne składniki wysłodzin występujące w mniejszych ilościach to: celuloza (17%), lipidy (6%), ligniny (4%), związki mineralne i niewielkie ilości skrobi (< 2%) [1]. Podany przeciętny skład wysłodzin jest zmienny i zależny m.in. od przebiegu procesu zacierania słoju i od

gatunku s ładu [53]. Arabinoksylany występujące w wysłodzinach występują w formie łańcuchów β -1,4-ksylanopiranozowych, w których reszty ksylozowe podstawione są przez reszty arabinozowe w pozycji C2 (około 17% reszt ksylopiranozowych), C3 (7% reszt ksylopiranozowych) lub też w obu pozycjach (około 16% reszt ksylopiranozowych). Większość reszt α -L-arabinofuranozowych występuje w formie monomerowych łańcuchów bocznych, podczas gdy niewielka ich liczba tworzy krótkie łańcuchy boczne według schematu Araf-Araf-Xylp-Araf [52]. Reszty kwasu ferulowego tworzą wiązanie estrowe z grupą arabinofuranozydową w pozycji 5-O [46]. Przeciętna zawartość kwasu ferulowego w wysłodzinach wynosi około 0,32% suchej masy. Od wielu lat poszukuje się jak najlepszych i najwydajniejszych sposobów na zagospodarowanie przemysłowe wysłodzin. Wynikiem tych prac jest duża liczba patentów dotyczących tej problematyki. Ważnym sposobem zagospodarowania wysłodzin jest wykorzystywanie ich jako paszy [44]. Inne kierunki zagospodarowania to wytwarzanie z wysłodzin preparatów odżywczych o dużej zawartości przyswajalnego białka [31, 32, 33] oraz wytwarzanie biogazu [16].

Celem przeglądu było przedstawienie stanu badań nad pozyskiwaniem kwasu ferulowego z wysłodzin piwowarskich po zastosowaniu oczyszczonych enzymów lub preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego, jak również scharakteryzowanie enzymów grzybowych i bakteryjnych wykazujących aktywność hydrolityczną w stosunku do polisacharydów nieskrobiowych.

Charakterystyka enzymów pochodzenia mikrobiologicznego biorących udział w degradacji polisacharydów nieskrobiowych

W wielu pracach badawczych, w ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat, scharakteryzowano aktywność esterazy kwasu ferulowego, acetyloesterazy i ksylanazy produkowanych przez szczepy różnych drobnoustrojów. Wymienione enzymy są wytwarzane przez drobnoustroje w celu degradacji hemiceluloz wchodzących w skład ścian komórkowych roślin wyższych. Esterazy pochodzenia mikrobiologicznego zwiększają stopień degradacji głównych łańcuchów polisacharydowych ściany komórkowej poprzez usuwanie bocznych grup, które chronią dostęp do łańcucha głównego.

Zastosowanie oczyszczonej ksylanazy lub esterazy kwasu ferulowego w czasie przerobu wysłodzin wiąże się ze znacznie podwyższonymi kosztami. Wykorzystanie mikrobiologicznych preparatów enzymatycznych o wielokierunkowej aktywności w stosunku do frakcji hemicelulozowych umożliwia obniżenie kosztów ich użycia i uzyskiwania cennych półproduktów wykorzystywanych przemysłowo, takich jak kwas ferulowy [6]. Przykładowo, badano zdolność preparatów enzymatycznych Ultraflo, Viscozyme, Termamyl i Lallzyme do uwalniania kwasu ferulowego i kumarowego z wysłodzin piwowarskich [8]. Spośród czterech wymienionych preparatów enzymatycznych, jedynie preparat Termamyl nie wykazywał aktywności esterazy kwasu ferulowego. Preparat Ultraflo najskuteczniej uwalniał wolny kwas

ferulowy i kumarowy w stężeniu wynoszącym odpowiednio 70% wolnego kwasu ferulowego i 8% p-kumarowego w odniesieniu do całkowitej zawartości tych kwasów w wysłodzinach poddanych doświadczeniu. Preparaty Viscozyme i Lallzyme uwolniły w tych samych warunkach odpowiednio 33 i 55% kwasu ferulowego. Preparat Ultraflo L, przejawiający głównie aktywność β -glukanazy oraz wiele pobocznych aktywności hemicelulaz produkowanych przez *Humicola insolens* wykazywał aktywność esterazy kwasu ferulowego w stosunku do metylowych pochodnych kwasu cynamonowego i miał zdolność uwalniania 65% kwasu ferulowego obecnego w formie monomeru oraz trzech form kwasu dehydrodiferulowego z wysłodzin browarniczych [23]. Zastosowanie preparatu Ultraflo L nie wykazującego aktywności esterazy kwasu ferulowego znacznie podnosiło zdolność (z 23 do 47%) oczyszczonej esterazy kwasu ferulowego wyprodukowanej przez grzyby *Aspergillus niger* do uwalniania kwasu ferulowego z młóta browarniczego, zwłaszcza w formie 8,5'-benzofuranowej. Współdziałanie preparatu Ultraflo L i esterazy kwasu ferulowego nie powodowało uwolnienia całej zawartości kwasu ferulowego z wiązań estrowych, co sugeruje, że do uwolnienia dimerowych form kwasu ferulowego w arabinoksylianach z wysłodzin piwowarskich niezbędny jest kompleks enzymatyczny o bogatej aktywności hydrolaz. Możliwe także, że należy zwiększyć dostępność enzymów do reszt kwasu ferulowego, rozmieszczonych w łańcuchu polisacharydów nieskrobiowych. W innych badaniach wykorzystywano 9 handlowych preparatów enzymatycznych firmy Novo Nordisk w celu uwalniania kwasu ferulowego, ramnozy, arabinozy i kwasu galakturonowego z wysłodków buraczanych [38]. Preparaty enzymatyczne, wytworzone przy użyciu szczepów z gatunków *Aspergillus: aculeatus, niger, oryzae* oraz rodzaju *Trichoderma*, wykazywały aktywności hydrolityczne w stosunku do frakcji pektyn, ksylanów, celulozy, β -glukanów, hemiceluloz i arabinanów zawartych w wysłodkach buraczanych. Preparat enzymatyczny SP 342 uwalniał kwas ferulowy w formie wolnej w pierwszych etapach procesu, podczas gdy w następnych godzinach procesu uwalniał kwas ferulowy w formie estrów z sacharydami. Dwa inne preparaty enzymatyczne o nazwach Glucanex i SP 506 uwalniały wolny kwas ferulowy, zaś pozostałe 6 preparatów enzymatycznych nie uwalniało kwasu ferulowego w formie wolnej. Wszystkie preparaty enzymatyczne były zdolne do zwiększenia stężenia w roztworze kwasu ferulowego związanego z sacharydami, przy czym najwyższą aktywnością charakteryzowały się preparaty SP 584, SP 585 i SP 342, przy czym preparat SP 584 uwalniał w formie wolnej około 43% całkowitej zawartości kwasu ferulowego. Preparat Pektolase LM uwalniał najpierw związany estrowo kwas ferulowy, a następnie wolny kwas ferulowy. Preparat SP 342 powodował jednoczesny wzrost stężenia wolnego i związanego kwasu ferulowego w mieszaninie inkubacyjnej, co świadczyło o zdolności enzymów zawartych w tym preparacie do degradacji łańcuchów pektynowych w formie natywnej. Preparat enzymatyczny SP 342 nie był jednak zdolny do uwalniania kwasu ferulowego z niskocząsteczkowych substratów powstałych po działaniu preparatów SP 584 i SP 585. Preparat enzymatyczny SP 584 wykazał ponadto zdolność do uwalniania dehydrodimerów kwasu fenolowego. Wyniki przedstawionych

doświadczeń świadczą o możliwości wykorzystania opisanych grzybowych preparatów enzymatycznych w celu uwalniania kwasu ferulowego w formie połączeń z estrami z wysłodzin piwowarskich.

W badaniach nad uwalnianiem kwasu ferulowego z wysłodzin [14] uzyskano wysokie stężenie kwasu ferulowego w roztworze, sięgające 1,712 g w 1 kg s.m. wysłodzin, co stanowiło 80% całkowitej zawartości kwasu ferulowego w wysłodzinach użytych do badań. Autorzy podkreślili, że najlepsze rezultaty osiągnięto przy użyciu preparatu enzymatycznego Ultraflo L. Maceracja wysłodzin za pomocą wodnych roztworów etanolu nie zwiększała stopnia uwalniania kwasu ferulowego z wysłodzin, zaś autorzy stwierdzili, że możliwe jest uwolnienie nawet do 80% całkowitej zawartości kwasu ferulowego z wysłodzin bez stosowania etapów przygotowawczych młóta. W innych pracach także szczegółowo opisano współpracę ksyłanazy z grzyba rodzaju *Trichoderma* i esterazy kwasu ferulowego ze szczepu *A. niger* w uwalnianiu kwasu ferulowego w formie wolnej z otrąb zbożowych i odpadów buraka cukrowego bogatych w hemicelulozy [22]. Podatność arabinoksyłanów na degradację pod wpływem egzogennej, oczyszczonej endo- β -1,4-ksyłanazy (E.C 3.2.1.8) z *Aspergillus awamori* jest ściśle uzależniona od stosunku zawartości arabinozy do ksylozy w cząsteczce. Jeśli stosunek ten wynosi około 0,4, cząsteczki arabinoksyłanów ulegają łatwo hydrolizie, jeśli natomiast wynosi 0,9 zachodzi bardzo ograniczona degradacja. Należy podkreślić, że w obu przypadkach, niezależnie od omawianego stosunku arabinoza : ksyloza, powstają podobne krótkołańcuchowe fragmenty oligoarabinoksyłanów. Wyniki metylacji krótkołańcuchowych fragmentów oligoarabinoksyłanów wskazują, że 55% reszt ksylopiranozowych w jęczmieniu oraz 65% reszt ksylopiranozowych w słodzie występuje w połączeniach z resztami arabinofuranozowymi [54]. W porównaniu z arabinoksyłanami jęczmienia i słodu, które nie zostały poddane działaniu endoksyłanazy, uzyskane oligoarabinoksyłany charakteryzowały się wyższym stopniem podstawienia reszt ksylopiranozowych przez arabinofuranozę w pozycji O-2 i O-2,3. Powtórna inkubacja otrzymanych oligoarabinoksyłanów z endoksyłaną wyprodukowaną przez grzyby *Aspergillus awamori* nie wywoływała dalszej hydrolizy cząsteczek. Może to wskazywać na fakt odcinania dostępu do łańcuchów oligoksylopiranozowych przez obecność dużej liczby przyłączonych reszt arabinofuranozowych i możliwej obecności reszt kwasu ferulowego. Ograniczona hydroliza oligoarabinoksyłanów przez endo- β -1,4-ksyłanazę wyprodukowaną przez szczep *Aspergillus awamori* może być wyjaśniona przez zdolność wymienionego enzymu do rozszczepiania wiązania między resztami ksylopiranozowymi tylko w sytuacji, gdy co najmniej dwie kolejne reszty ksylopiranozowe w łańcuchu ksylopiranozowym nie są połączone z resztą arabinofuranozy. Z tego też względu sekwencje dwóch niepodstawionych reszt ksylopiranozowych muszą być nieobecne lub rzadkie w przypadku opisywanych oligoarabinoksyłanów. Analogicznie, natywne arabinoksyłany pochodzące z jęczmienia i słodu muszą zawierać fragmenty złożone z co najmniej czterech

niepodstawionych przez arabinofuranozę reszt ksylopiranozowych, ponieważ jako produkty inkubacji występują: ksyloza, ksylobioza i ksylotrioza [54].

Zastosowanie oczyszczonego preparatu enzymatycznego o aktywności endo- β -1,4-ksylanazy (E.C. 3.2.1.8) z hodowli *Aspergillus awamori* w celu degradacji arabinoksylianów jęczmienia i słodu powodowało wytworzenie oligomerów o stopniu polimeryzacji poniżej DP 6, zaś oligomery o DP powyżej 6 występowały w niskich stężeniach [51]. Największy udział miały oligoarabinoksyliany mające od 3 do 6 reszt ksylopiranozowych. Podobnie, jak w przypadku arabinoksylianów z jęczmienia i słodu niepoddanych hydrolizie za pomocą endo- β -1,4-ksylanazy, również po hydrolizie arabinoksylianów występowały niewielkie różnice w budowie uzyskanych oligomerów. Na podstawie analizy miejsca podstawienia reszty ksylopiranozowej przez arabinofuranozę w uzyskanych oligomerach można stwierdzić, że substytucja ksylozy w pozycji O-2 o wiele silniej hamuje degradację arabinoksylianów w porównaniu z substytucją w pozycji O-3. Może to częściowo wyjaśniać ograniczoną degradację arabinoksylianów w czasie słodowania, a nawet w czasie zacierania słodu. W związku z tym, dodatek samej endo- β -1,4-ksylanazy może być niewystarczający do uzyskania odpowiedniej degradacji arabinoksylianów w wysłodzinach.

W hodowlach prowadzonych przy użyciu szczepu *A. niger* CBS 120.49 w obecności wyizolowanego ksylanu owsianego, grzyb wytwarzał esterazę kwasu ferulowego o masie cząsteczkowej wynoszącej $36 \cdot 10^3$ Da [18]. Opisywana esteraza kwasu ferulowego wykazywała aktywność enzymatyczną wobec metylowych pochodnych kwasu cyjanonowego charakteryzujących się obecnością grupy metoksylowej w pozycji C3 pierścienia fenolowego, lecz nie powodowała hydrolizy wiązania estrowego w połączeniach metanolu i pochodnych kwasu benzoowego. Obecność grupy metoksylowej w pozycji C3 pierścienia cząsteczki kwasu fenolowego i nienasyconego łańcucha alifatycznego wydaje się być koniecznym warunkiem działania omawianej esterazy. Enzym wykazywał także aktywność wobec octanu p-nitrofenolu. Optymalna wartość pH działania esterazy wynosiła 5,0 zaś optimum temp. 55–60°C. *Aspergillus niger* produkował esterazę kwasu ferulowego w hodowlach prowadzonych na wysłodkach z buraka cukrowego. Enzym wykazywał aktywność w stosunku do ferulowanych arabinoksylianów o różnej masie molowej i budowie [34].

Esterazy kwasu ferulowego produkowane przez różne szczepy *A. niger* mogą wykazywać zróżnicowaną zdolność odszczepiania wolnego kwasu ferulowego z polisacharydów ścian komórkowych określonych substratów. Np. aktywność esterazy kwasu ferulowego występowała w hodowlach *A. niger* prowadzonych na wytlókach z buraka cukrowego, arabanie z wysłodków buraczanych, otrębach pszennych, lecz aktywności tej nie stwierdzono, gdy źródłem węgla była pektyna z buraka cukrowego pozbawiona reszt kwasu ferulowego w formie estrowej [13].

Esteraza kwasu ferulowego może degradować diferulowe połączenia między polisacharydami ścian komórkowych. Szczegółowe badania nad esterazą kwasu ferulowego produkowaną przez grzyby *A. niger* wykazały, że enzym ten był zdolny do hydrolizy trzech podstawowych wiązań dehydrodiferulowych obecnych w ścianach

komórkowych roślin. Enzym specyficznie działał na wiązania diferulowe występujące w modelowych etylowych estrach dehydrodimerowych zawierających wiązania 5-5, 8-5 i 8-O-4-benzofuranowe. Hydroliza połączeń dehydrodiferulowych przebiegała przy udziale enzymu w dwóch etapach: pierwszy etap to odhydrolizowanie wolnego kwasu ferulowego z formy dimeru, zaś drugi etap to rozpuszczenie monoestrowej pochodnej kwasu ferulowego o ładunku ujemnym. Esteraza nie była zdolna do hydrolizy drugiego wiązania estrowego w monoestrze 8-5-benzofuranowym, dlatego opisywany enzym mógł brać udział w degradacji polisacharydów ściany komórkowej roślin bez uwalniania wolnego kwasu ferulowego [27].

W celu dokładniejszego zbadania esterazy kwasu ferulowego zidentyfikowano fragmenty DNA odpowiedzialne za ekspresję genów kodujących esterazę kwasu ferulowego i arabinofuranazydazę bakterii *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* [25]. Uzyskane białko enzymatyczne miało masę cząsteczkową wynoszącą $58,5 \cdot 10^3$ Da. W obecności endo-1,4- β -D-ksylanazy enzym uwalniał reszty octanowe z acetyloksylanu i kwas ferulowy z otrąb pszennych pozbawionych skrobi, nie powodował jednak hydrolizy wiązań estrowych przy braku aktywności ksylanolitycznej w preparacie. Arabinofuranazydaza, esteraza kwasu ferulowego i endoksylnaza produkowane przez omawiany szczep bakteryjny miały identyczny niekatalityczny obszar wiązania celulozy, a co za tym idzie, zdolność do adsorpcji na celulozie. Prawdopodobnym substratem działania omawianych enzymów były acetylowane ksylooligosacharydy połączone w pozycjach O-2, O-3 lub w obu pozycjach z resztami arabinofuranazydowymi, które były z kolei połączone wiązaniem estrowym z kwasem ferulowym.

Inny gatunek wskazywany jako producent esterazy kwasu ferulowego to *Penicillium funiculosum* [35]. Wyprodukowana przez jeden ze szczepów ww. gatunku esteraza wykazywała aktywność wobec zestryfikowanych pochodnych kwasu cynamonowego oraz zdolność wiązania się do mikrokrystalicznej celulozy, co sugeruje, że substraty działania enzymu były zlokalizowane w ścianie komórkowej.

Bakterie jelitowe, obok wielu enzymów hydrolitycznych, wytwarzają esterazy kwasu ferulowego, zdolne do uwalniania kwasu ferulowego z połączeń estrowych, jednak konieczne jest bliższe scharakteryzowanie właściwości tych enzymów, jak również szczepów drobnoustrojów je wytwarzających [21]. Bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Lactobacillus* są wskazywane jako potencjalne źródło esterazy kwasu ferulowego [15]. Spośród 80 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* i 50 szczepów bakterii z rodzajów *Enterococcus* i *Lactobacillus* najwyższą zdolność produkcji esterazy kwasu ferulowego, w podłożu z ferulanem etylowym jako głównym źródłem węgla, wykazały bakterie *Bacillus subtilis* oraz *Lactobacillus fermentum* NCFB 1751. Niektóre szczepy z rodzaju *Streptomyces*, np. szczep *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 produkował zewnątrzkomórkową esterazę kwasu ferulowego przy wykorzystaniu różnych źródeł lignocelulozowych [26]. Zdolność uwalniania kwasu ferulowego przez enzym była około 100 razy wyższa w obecności preparatu enzymatycznego Celluclast, będącego kompleksowym preparatem o wysokiej aktywności celulazy i wielu pobocznych

aktywnościach enzymatycznych hemicelulaz, lecz niewykazującym aktywności esterazy kwasu ferulowego. Enzym wykazywał optimum pH przy wartości około 6,0 i był termostabilny do temp. 60°C, możliwe jest więc jego wykorzystanie w wielu dziedzinach przemysłu, np. w przemyśle browarniczym lub też w przerobieniu produktów ubocznych, takich jak młóto browarnicze.

Innym źródłem esterazy kwasu ferulowego o potencjalnym zastosowaniu przemysłowym okazał się anaerobowy szczep grzyba *Neocallimastix MC-2* [12]. Szczep ten wykazywał zdolność do produkcji dwóch zewnątrzkomórkowych esteraz kwasu ferulowego, mających masy cząsteczkowe $69 \cdot 10^3$ Da i $24 \cdot 10^3$ Da. Optymalne wartości pH działania obu enzymów zawierały się w zakresie odpowiednio 5,5–6,2 oraz 6,4–7,6, zaś optymalna temp. działania obu enzymów to 40°C. Obok enzymów hydrolizujących wiązanie estrowe kwasu ferulowego, ww. szczep grzyba wytwarzał zewnątrzkomórkową esterazę kwasu p-kumarowego o masie cząsteczkowej $11 \cdot 10^3$ Da. Optymalna wartość pH działania enzymu wynosiła 7,2 zaś optymalna temp. działania 40°C. [11]. Zarówno obie esterazy kwasu ferulowego, jak i esteraza kwasu p-kumarowego wykazywały wysoką aktywność w stosunku do oligomerów arabinoksylozowych zbudowanych z dwóch reszt ksylozowych i reszty arabinofuranozowej zestryfikowanej przez kwas fenolowy. Wysoki poziom aktywności enzymów degradujących arabinoksylany, wytwarzanych przez grzyb z rodzaju *Neocallimastix*, może w znacznym stopniu przyczynić się do biodegradacji odpadów pochodzenia roślinnego. Hydroliza wiązań estrowych z jednej strony uwalnia kwasy fenolowe, które mogą być następnie dalej przemysłowo przetwarzane, z drugiej zaś strony materiał biologiczny jest bardziej podatny na działanie bakterii przez wyższą biodostępność polisacharydów.

Współdziałanie endo-1,4- β -ksylanazy, esterazy kwasu ferulowego i acetyloesterazy w czasie degradacji arabinoksylianów

W wielu pracach badawczych szczegółowo omawiana jest współpraca ksylanaz i esteraz kwasu ferulowego w degradacji materiałów o wysokiej zawartości polisacharydów budulcowych ściany komórkowej roślin wyższych. Esteraza produkowana przez szczep *A. niger* AnFaeA wydajnie uwalniała kwas ferulowy z otrąb pszennych i wysłodzin piwowarskich; w obecności ksylanazy produkowanej przez *Bacillus subtilis* stopień uwolnienia kwasu ferulowego wyniósł ponad 50% całkowitej zawartości tego kwasu w wysłodzinach; scharakteryzowano 11 ksylanaz współdziałających z różnymi esterazami kwasu ferulowego w uwalnianiu kwasu ferulowego, przy czym 10 ksylanaz miało zdolność do uwalniania form dimerowych kwasu ferulowego. Spośród przebadanych esteraz kwasu ferulowego, jedynie wcześniej wymieniony enzym AnFaeA produkowany przez szczep *A. niger* wykazywał zdolność do uwalniania 5-5' dimerów kwasu ferulowego bez współdziałania z ksylanazą [24]. Zastosowanie tej esterazy w czasie uwalniania kwasu ferulowego z wysłodzin może mieć znaczenie w czasie uwalniania kwasu ferulowego w celu jego przemysłowego wykorzystania. Zaobserwowano synergizm pomiędzy

licznymi esterazami kwasu ferulowego produkowanymi przez drobnoustroje *Neurospora crassa*, *A. niger* i *Talaromyces stipitatus* oraz endo-1,4- β -ksylanazą produkowaną przez *A. niger*, *A. oryzae*, *Fibrobacter succinogenes* i *A. aceulatus* [24].

W innych badaniach [5] określono stopień uwalniania kwasu ferulowego z wysłodzin piwowarskich przez esterazę kwasu ferulowego zawartą w ekstrakcie ze słodu. Enzym uwalniał 1,5% całkowitej zawartości kwasu ferulowego, jednak obecność ksylanazy wyprodukowanej przez *Trichoderma reesei* zwiększała stopień uwolnienia kwasu ferulowego do 15%. Najwyższy stopień uwalniania kwasu ferulowego z wysłodzin uzyskano w przypadku, gdy wysłodziny inkubowano początkowo z preparatem ksylanolitycznym, zaś później dodawano ekstrakt słodowy zawierający esterazę kwasu ferulowego. Nie stwierdzono obecności wolnego kwasu ferulowego w czasie inkubacji grzybowej ksylanazy bez dodatku ekstraktu ze słodu. Wskazuje to na występowanie synergizmu pomiędzy dwoma wymienionymi enzymami.

W przypadku, gdy stężenie endo- β -1,4-ksylanazy jest zbyt niskie, następuje zbyt mała modyfikacja polisacharydów nieskrobiowych, co utrudnia i zmniejsza uwalnianie kwasu ferulowego. Synergizm działania esterazy kwasu ferulowego i endo- β -1,4-ksylanazy jest widoczny także w stopniu uwalniania cukrów neutralnych, gdyż stężenie ksylozy i ksylobiozy uwalnianej w czasie jednoczesnego działania obu enzymów było wyższe niż w przypadku, gdy każdy z enzymów działał oddzielnie. Esteraza kwasu ferulowego FAE III produkowana przez *A. niger* była wskazywana jako przyczyna uwalniania β -glukanów ze ściany komórkowej jęczmienia [40]. Opisany proces można wyjaśnić hydrolizą wiązania estrowego kwasu ferulowego z arabinoksylianami, co może przyczyniać się do częściowej dekompozycji uporządkowanej struktury ściany komórkowej i prowadzić następnie do uwalniania β -glukanów do roztworu, gdyż są one fizycznie związane z pentozanami.

Badania prowadzone z wykorzystaniem esterazy kwasu ferulowego FAE-III, wytwarzanej przez grzyby *A. niger*, dowiodły, że enzym uwalniał jedynie około 3,3% kwasu ferulowego zawartego w wysłodzinach. Jednakże w obecności endo-1,4- β -ksylanazy, produkowanej przez grzyb *Trichoderma viride*, stopień uwolnienia kwasu ferulowego z wiązań estrowych w arabinoksylianach sięgał około 30% ogólnej zawartości kwasu ferulowego [7]. Badania nad uwalnianiem kwasu ferulowego z otrąb pszennych w obecności endo-1,4- β -ksylanazy produkowanej przez grzyb *Trichoderma viride* oraz esterazy kwasu ferulowego z *Aspergillus niger* w skali laboratoryjnej wykazały opłacalność tego procesu [22]. Należy podkreślić, że endo-1,4- β -ksylanaza produkowana przez grzyb *Trichoderma viride* nie uwalniała kwasu ferulowego, lecz jedynie niskocząsteczkowe oligoarabinoksyliany połączone wiązaniem estrowym z kwasem ferulowym [20].

Opisana została esteraza kwasu ferulowego produkowana przez *Streptomyces olivochromogenes* [17]. Enzym ten ma masę cząsteczkową $29 \cdot 10^3$ Da, charakteryzuje

się optymalną wartością pH działania wynoszącą około 5,5 oraz optymalną temp. działania wynoszącą 30°C. Enzym wykazuje także aktywność acetyloesterazy. Charakterystyczną właściwością omawianego enzymu jest niezdolność do uwalniania kwasu ferulowego z oczyszczonych otrąb pszennych w przypadku braku aktywności endo-1,4- β -ksylanazy. Ponadto, obecność samej endo-1,4- β -ksylanazy nie jest wystarczająca do uwalniania kwasu ferulowego. Istnieje konieczność obecności obu enzymów w celu degradacji arabinoksylianów, gdyż esteraza kwasu ferulowego produkowana przez szczep *Streptomyces olivochromogenes* wymaga obecności drobnocząsteczkowych oligoarabinoksylianów, powstających dzięki aktywności endo-1,4- β -ksylanazy.

W hodowlach innych grzybów z rodzaju *Aspergillus*, np. *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. terreus* prowadzonych w obecności słomy pszennej, wysłodzin, wyłoków buraczanych lub otrąb pszennych stwierdzono występowanie aktywności zewnątrzkomórkowej esterazy kwasu ferulowego, esterazy acetyloksylanu oraz acetyloesterazy, przy czym aktywność enzymatyczna znacznie wzrastała w obecności endo- β -1,4-ksylanazy pochodzącej z *Trichoderma reesei* [47].

W innych badaniach z wykorzystaniem szczepu *Aspergillus niger* i rekombinowanego szczepu *Pseudomonas fluorescens* wykazano, że esterazy kwasu ferulowego wytwarzane przez oba szczepy współdziałały z endo- β -1,4-ksylanazami wyprodukowanymi przez grzyby *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* lub bakterie *Pseudomonas fluorescens*, w uwalnianiu specyficznego estru, dimeru 5-5'diFa (kwas (E,E-4-4'-dihydroksy-5,5'-dimetoksy-3,3'bicynamonowy). Dimer ten był tworzony niezależnie od tego, czy oczyszczone frakcje polisacharydów ścian komórkowych wyizolowane z jęczmienia i pszenicy poddane były wcześniejszej degradacji pod wpływem endo- β -1,4-ksylanazy lub też enzymu tego wcześniej nie zastosowano. Stężenie uwolnionych dimerów kwasu ferulowego zależne było od źródła zastosowanej ksylanazy [7].

Esteraza kwasu ferulowego produkowana przez grzyb *Sporotrichum thermophile* wykazywała wysoką aktywność w stosunku do metylowej pochodnej kwasu p-kumarowego. Aktywność esterazy wobec p-kumaranu metylowego była odpowiednio 2,5 i 12 razy wyższa w porównaniu z aktywnością enzymu wobec estru metylowego kwasu kawowego i ferulanu metylowego [49]. Enzym wykazywał aktywność wobec substratów zawierających kwas ferulowy połączony estrowo z węglem C-5 i C-2 arabinofuranozy i hydrolizował także wiązanie estrowe w 4-nitrofenylo-5-O- α -L-arabinofuranozydzie 2 razy efektywniej niż wiązanie estrowe w 4-nitrofenylo-5-O- α -L-arabinofuranozydzie. Kwas ferulowy był uwalniany z 47 razy wyższą wydajnością z otrąb pszennych, jeśli w układzie badawczym obecna była jednocześnie endo-1,4- β -ksylanaza produkowana przez *Sporotrichum thermophile*.

W hodowlach grzyba *Aspergillus awamori* prowadzonych w obecności oczyszczonych frakcji ścian komórkowych ryżu stwierdzono obecność esterazy kwasu ferulowego o masie molowej $112 \cdot 10^3$ Da, a także esterazy kwasu p-kumarowego o

masie cząsteczkowej $75 \cdot 10^3$ Da [36]. Zidentyfikowana aktywność esterazy kwasu ferulowego wykazywała uzdolnienia do hydrolizy metylowej pochodnej kwasu ferulowego oraz estrów kwasu ferulowego występujących w oczyszczonych frakcjach rozpuszczalnego w wodzie ksylanu wyodrębnionego ze słomy pszennej. Esteraza kwasu p-kumarowego, obecna w płynie pochodowym w mniejszym stężeniu niż esteraza kwasu ferulowego, wykazywała aktywność względem analogicznych substratów. W przypadku obu esteraz produkowanych przez szczep *Aspergillus awamori* występował silny synergizm działania z oczyszczoną endo- β -1,4-ksylanazą. Oba enzymy charakteryzowały się wyższą aktywnością względem krótkich fragmentów ksyloligosacharydowych zestryfikowanych resztami kwasu ferulowego, które powstawały po degradacji arabinoksylianów przez ksylanazę z *Trichoderma reesei* [29]. Synergizm ten był silnie uzależniony od źródła z jakiego pochodziła endo- β -1,4-ksylanaza, gdyż profil powstających oligoarabinoksylianów był różny [4].

Szczepy grzyba *Aspergillus niger* i *Aspergillus terreus* są wskazywane jako źródło endo-1,4- β -ksylanazy (EC3.2.1.8) [28]. W hodowlach grzybów w podłożu zawierającym różnorodne odpadowe materiały przemysłowe, takie jak: otręby pszenne, słoma ryżowa, otręby sojowe uzyskano wysoką aktywność endo-1,4- β -ksylanazy, przy czym najlepszym induktorem do produkcji ksylanazy były otręby pszenne.

Synergizm działania ksylanazy i esterazy kwasu ferulowego można zaobserwować w przypadku enzymów produkowanych przez grzyba *Trichoderma viride* oraz bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Endo-1,4- β -ksylanaza wyprodukowana przez szczep *Trichoderma viride* zwiększała stopień uwalniania kwasu ferulowego z oczyszczonych otręb pszennych w obecności esterazy kwasu ferulowego wytworzonej przez szczep *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* skuteczniej niż endo-1,4- β -ksylanaza wyprodukowana przez *P. fluorescens*. Uwalnianie kwasu ferulowego z oczyszczonych otręb pszennych było ściśle uzależnione od zastosowanej endo-1,4- β -ksylanazy, przy czym wpływ na aktywność esterazy kwasu ferulowego miała wielkość oligosacharydów powstających w wyniku działania ksylanazy. Esteraza kwasu ferulowego produkowana przez *Pseudomonas fluorescens* wykazywała najwyższą aktywność wobec substratów złożonych z co najmniej czterech reszt cukrowych połączonych z resztą kwasu ferulowego [19].

Silny synergizm działania zaobserwowano także w przypadku acetyloesterazy produkowanej przez *Schizophyllum commune* oraz endo-1,4- β -ksylanazy produkowanej przez *Trichoderma reesei* [10]. Obecność reszt octanowych w acetyloksylanie obniżała aktywność endo-1,4- β -ksylanazy. Jednocześnie w przypadku braku endo-1,4- β -ksylanazy, aktywność acetyloesterazy w stosunku do acetyloksylanu była znacznie ograniczona. Aktywność ksylanazy w stosunku do acetyloksylanu w obecności acetyloesterazy była równa aktywności ksylanolitycznej wobec tego substratu pozbawionego zestryfikowanych reszt octanowych w łańcuchu ksylanowym.

Inne opisane źródło acetyloesterazy to szczep *Candida guilliermondii* NRRL Y-17257 [9]. Synergizm działania między α -L-arabinofuranozydazą, endo-1,4- β -

ksylanazą i β -ksylanazą w czasie degradacji arabinoksylianów stwierdzono w przypadku hodowli grzyba *Aspergillus oryzae* HL15 prowadzonych na podłożu zawierającym ziarno sojowe [30].

Charakterystyka drobnoustrojów uzdolnionych do transformacji kwasu ferulowego do waniliny

Kwas ferulowy od dawna wskazywany jest jako prekursor waniliny, cennego składnika aromatycznego szeroko wykorzystywanego w produkcji żywności. Wanilina (aldehyd 4-hydroksy-3-metoksycynamonowy) pochodzenia naturalnego jest wielokrotnie droższa niż produkowana na drodze syntetycznej z ligniny lub gwajakolu. Wysoka cena waniliny pochodzenia naturalnego jest spowodowana ograniczeniami upraw wanilii. Różnica w cenie naturalnej i syntetycznej waniliny oraz rosnące wymagania konsumentów dotyczące naturalnych składników żywności wymuszają potrzebę poszukiwania nowych źródeł tego dodatku do żywności [45]. Z tego też względu prowadzone są intensywne badania mające na celu opracowanie technologii pozwalających na uzyskiwanie waniliny z naturalnych źródeł na drodze biotechnologicznej. Poszukiwane są szczepy drobnoustrojów wykazujących zdolność do konwersji kwasu ferulowego w podłożu hodowlanym do waniliny. Kwas ferulowy jest obiecującym substratem do produkcji waniliny, gdyż może być obecny w stosunkowo wysokich stężeniach w pożywce hodowlanej, nie działając toksycznie na drobnoustroje przetwarzające go do waniliny.

Drobnoustroje z rodzaju *Pseudomonas* są wskazywane jako uzdolnione do transformacji kwasu ferulowego w wanilinę, np. szczep *P. fluorescens* BF13 okazał się szczepem wysoce uzdolnionym do biotransformacji kwasu ferulowego do kwasu waniliowego. Intensywność procesu transformacji uzależniona była od stężenia biomasy i zawartości kwasu ferulowego w płynie hodowlanym [2]. W warunkach, gdy kwas ferulowy był jedynym źródłem węgla, wydajność biotransformacji do kwasu waniliowego wynosiła 95% w ciągu 5-godzinnej hodowli [3].

Wanilinę wytwarza także grzyb *Pycnoporus cinnabarius*. Drobnoustrój ten hodowany w obecności glukozy i fosfolipidów jako źródła węgla, jest zdolny do wydajnej biotransformacji kwasu ferulowego do waniliny [43].

W hodowlach z użyciem wyizolowanego drobnoustroju *Pseudomonas putida*, zastosowanie wysokiego stężenia kwasu ferulowego w ilości ponad 1 g/l pożywki nie wywoływało zahamowania wzrostu drobnoustrojów. W tych warunkach kwas ferulowy był przetwarzany do waniliny, a następnie do kwasu waniliowego w pożywce glukozowej w ciągu 4,5 godz. [41]. Podobny wynik uzyskuje się w hodowlach grzybów *Streptomyces setoni*, przy czym w tym przypadku wanilina nie jest przetwarzana do kwasu waniliowego, lecz kumulowana po uzyskaniu granicznego stężenia kwasu w pożywce. Przy zastosowaniu pożywki zawierającej 8 g kwasu ferulowego stężenie kwasu waniliowego osiągało poziom 200 mg/l, podczas gdy zawartość waniliny dochodziła do 3,8 g/l. Zahamowanie przetwarzania waniliny do kwasu waniliowego i gromadzenie waniliny w pożywce uzyskiwano w przypadku

zastosowania stężenia kwasu ferulowego od 4 do 10 g/l pożywki. Możliwą drogą maksymalnego gromadzenia waniliny poprzez hamowanie jej przetwarzania do kwasu waniliowego jest inhibicja dehydrogenazy waniliny. Reasumując, można stwierdzić, że niektóre drobnoustroje, np. *S. setonii* dysponują wyjątkowymi zdolnościami metabolicznymi, dzięki czemu można uzyskać wysoką nadprodukcję waniliny z kwasu ferulowego [41]. Wyniki tych badań jednoznacznie wskazują na przydatność kwasu ferulowego do wytwarzania waniliny na drodze biotechnologicznej.

Grzyb *Sporotrichum thermophile* jest zdolny do transformacji kwasu ferulowego do kwasu waniliowego. Proces zachodzi poprzez degradację łańcucha propionowego i tworzenie 4-hydrokso-3-metoksystyrenu, który w następnej kolejności jest przetwarzany do kwasu waniliowego. Ponadto następuje nieoksydatywna dekarboksylacja kwasu waniliowego i powstaje gwajakol. Biokonwersja kwasu ferulowego do waniliowego jest uzależniona od stężenia kwasu ferulowego jako głównego źródła węgla w środowisku [48].

Wolne i immobilizowane hodowle bakterii *Haematococcus pluvialis* wykazują zdolność do biotransformacji kwasu ferulowego, aldehydu koniferylowego i kwasu p-kumarowego do metabolitów wywołujących aromat waniliowy – waniliny, kwasu waniliowego, alkoholu waniliowego, ponadto kwasu protokatechowego, p-hydroksobenzoesowego i aldehydu p-hydroksobenzoesowego. Wyższą biotransformację uzyskuje się w przypadku szczepu immobilizowanego, wskazując na przydatność drobnoustroju do wytwarzania aromatów spożywczych na drodze naturalnych procesów [50].

Kwas ferulowy może podlegać O-demetylacji pod wpływem wewnątrzkomórkowej O-demetylazy produkowanej przez niektóre szczepy bakterii, np. *Clostridium methoxybenzovorans* SR3 i *Enterobacter cloacae* DG6, w wyniku czego powstaje kwas kawowy [37]. Powstający kwas kawowy ma wyższą aktywność przeciwutleniającą od kwasu ferulowego w wielu układach badawczych prowadzonych *in vitro*, ze względu na obecność dwóch grup hydroksylowych. W badaniach *in vivo* wskazuje się na podwyższenie aktywności antyoksydacyjnej plazmy krwi oraz ochronne działanie kwasu kawowego w stosunku do α -tokoferolu oraz frakcji LDL [42]. W badaniach *in vitro* kwas kawowy i dihydrokawowy skutecznie hamują utlenianie kwasów tłuszczowych zawartych w tłuszczu zwierzęcym i utlenianie frakcji LDL wyizolowanych z plazmy krwi. Oba kwasy fenolowe skutecznie wiążą wolne rodniki DPPH^{*} [39]. Opisany proces biokonwersji kwasu ferulowego do kawowego może być interesujący ze względu na pozyskiwanie silnego przeciwutleniacza ze stosunkowo tanich źródeł, takich jak: otręby pszenne, wysłodki buraka cukrowego lub wysłodziny browarnicze. Enzym O-demetylaza nie ma zdolności O-demetylacji kwasu ferulowego połączonego z długimi łańcuchami arabinoksylianów, więc proces konwersji kwasu ferulowego do kwasu kawowego musi być poprzedzony wcześniejszym jednoczesnym działaniem esterazy kwasu ferulowego i endo-1,4- β -ksylanazy [38].

Podsumowanie

Prace badawcze dotyczące pozyskiwania kwasu ferulowego na drodze enzymatycznej obróbki wysłodzin, będących głównym produktem ubocznym przy produkcji piwa, są liczne, zaś temat badawczy jest dobrze opracowany. Wysłodziny są bogatym źródłem kwasu ferulowego, naturalnego przeciwutleniacza, który może być przekształcany do innych produktów mających zastosowanie w produkcji żywności. Preparaty uzyskane po enzymatycznej obróbce wysłodzin, charakteryzujące się wysoką zawartością kwasu ferulowego w formie wolnej, jak i estrowej, mogą natomiast stanowić dodatek do wybranych napojów, podnosząc w sposób naturalny potencjał przeciwutleniający produktu.

Literatura

- [1] Adrjanowicz E., Janczar M., Pietkiewicz J.: Kierunki zagospodarowania odpadów przemysłu piwowarskiego. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 1999, **11**, 13-16.
- [2] Andreoni V., Bernasconi S., Bestetti G.: Biotransformation of ferulic acid and related compounds by mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **42** (6), 830-835.
- [3] Barghini P., Montebove F., Ruzzi M., Schiesser A.: Optimal conditions for bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by *Pseudomonas fluorescens BF13* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **49**, 309-314.
- [4] Bartolome B., Faulds C.B., Tuohy M., Hazlewood G., Gilbert H.J., Williamson G.: Influence of different xylanases on the activity of ferulic acid esterase on wheat bran. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1995, **22**, 65-73.
- [5] Bartolome B., Garcia-Conesa M., Williamson G.: Release of bioactive compound, ferulic acid from malt extracts. *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, **24**, 379S.
- [6] Bartolome B., Faulds C.B., Williamson G.: Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain. *J. Cereal Sci.*, 1997, **25**, 285-288.
- [7] Bartolome B., Faulds C.B., Kroon P.A., Gilbert H.J., Hazlewood G., Williamson G.: An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa esterase (XylD) release a 5,5' ferulic dehydromer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63** (1), 208-212.
- [8] Bartolome B., Gomes-Cordoves C.: Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 435-439.
- [9] Basaran P., Hang D.: Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida guilliermondii*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2000, **30** (2), 167.
- [10] Biely, P., Vrsanska M., Kratky, Z.: Xylan degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.*, 1980, **108**, 313-321.
- [11] Borneman W.S., Ljungdahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E.: Purification and characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57** (8), 2337-2344.
- [12] Borneman W.S., Ljungdahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E.: Purification and partial characterization of two feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58** (11), 3762-3766.
- [13] Brezillon C., Kroon P.A., Faulds C.B., Brett G.M., Williamson G.: Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, **45**, 371-376.

- [14] Diaz Plaza E., Bartolome B., Gomez Cordoves C.: Phenolic antioxidants from barley spent grain. 2nd Intern. Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2), <http://www.mdpi.org/ecsoc/>, 1998, September 1-30.
- [15] Donaghy J., Kelly P.F., McKay A.M.: Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus ssp.* and *Lactobacilli*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, **50**, 257-260.
- [16] Ezeonu F.C. Okaka A.N.C.: Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG). Process Biochem., 1996, **31** (1), 7-12.
- [17] Faulds C.B., Williamson G.: The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. J. Gen. Microbiol., 1991, **137**, 2339-2345.
- [18] Faulds C.B., Williamson G.: Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. Microbiol., 1994, **140**, 779-787.
- [19] Faulds C.B. Ralet M.C., Williamson G., Hazlewood G.P., Gilbert H.J.: Specificity of an esterase (XYLD) from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa*. Biochim. Biophys. Acta., 1995, **1243**, 265-269.
- [20] Faulds C.B., Williamson G.: Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE III) from *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995, **43**, 1082-1087.
- [21] Faulds C.B., Williamson G.: Release of the antioxidant, ferulic acid, from plant material by specific esterases. Biochem. Soc. Trans., 1995, **23**, 253S.
- [22] Faulds C.B., Bartolome B., Williamson G.: Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases. Indust. Crops Prod., 1997, **6**, 367-374.
- [23] Faulds C.B., Sancho A.I., Bartolome B.: Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **60**, 489-493.
- [24] Faulds C.B., Zanichelli D., Crepin V.F., Connerton I.F., Juge N., Bhat M.K., Waldron K.W.: Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase. J. Cereal Sci., 2003, **38**, 281-288.
- [25] Ferreira M.A., Wood T.M. Williamson G., Faulds C., Hazlewood G.P., Black G.W.: A modular esterase from *Pseudomonas fluoorescens subsp. cellulosa* contains a non-catalytic cellulose binding domain. Biochem. J., 1993, **294**, 349-355.
- [26] Garcia B.L., Ball A.S., Rodriguez J., Perez- Leblic M.I., Arias M.E., Copa-Patino J.L.: Production and characterization of ferulic acid esterase activity in crude extracts by *Streptomyces avermitillis* CECT 3339. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, **50**, 213-218.
- [27] Garcia-Conesa M.T., Kroon P.A., Ralph J., Mellon F.A., Colquhoun I.J., Thibault J.F., Williamson G., A.: cinnamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of free diferulic acids. Eur. J. Biochem., 1999, **266** (2), 644.
- [28] Gawande P.BV., Kamat M.Y.: Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. J. Appl. Microbiol., 1999, **87** (4), 511.
- [29] Haapala R., Parkkinen E., Suominen P., Linko S.: Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free *Trichoderma reesei*. Enzyme Microb. Technol., 1996, **18**, 495-501.
- [30] Hashimoto T., Nakata Y.: Synergistic degradation of arabinoksy lan with α -L-Arabinofuranosidase, xylanase and β -ksylanosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition. J. Biosci. Bioeng., 2003, **95** (2), 164-169.
- [31] Kishi S., Kimura T., Minami T., Kobayashi H.: Process for producing protein-rich product, fibrous product and/or vegetable oil from brewer's spent grain. United States Patent. Patent Number 5135765, Aug. 4, 1992.
- [32] Kishi S., Kimura T., Minami T., Kobayashi H.: Protein-rich products of brewer's spent grain origin. United States Patent Number 5156877, Oct. 20, 1992.

- [33] Kishi S., Shiba Y., Miyake H., Kuenzel W.: Method of wet peeling for brewer's spent grain. United States Patent 5702748, Dec.30, 1997.
- [34] Kroon P.A., Williamson G. P.: Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Appl. Biochem. 1996, **23**, 263-267.
- [35] Kroon P.A., Williamson G., Fish N.M., Archer D.B., Belshaw N.J.: A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. Eur. J. Biochem., 2000, **267** (23), 6740.
- [36] McCrae S.I., Leith K.M., Gordon A.H., Wood T.M.: Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus *Aspergillus awamori*: isolation and characterisation of a feruloyl esterase and a p-cumaroyl esterase. Enzyme Microb. Technol., 1994, **16**, 826-834.
- [37] Micard V., Landazuri T., Surget A., Moukha S., Labat M., Rouau X.: Demethylation of ferulic acid and Feruloyl-Arabinoxylan by Microbial Cell Extracts. Lebensm.-Wiss. u Technol., 2002, **35**, 272-276.
- [38] Micard V., Renard C.M.G.C., Thibault J.-F.: Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. Enzyme Microb. Technol., 1996, **19**, 162-170.
- [39] Moon J.H., Terao J.: Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. J. Agric. Food Chem., 1998, **46**, 5062-5065.
- [40] Moore J., Bamforth C.W. Kroon P.A., Bartolome B., Williamson G.: Ferulic acid esterase catalyses the solubilisation of β -glucans and pentosans from the starchy endosperm cell walls of barley. Biotechnol. Lett., 1996, **18** (12), 1423-1426.
- [41] Muheim A., Lerch K.: Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, **51**, 456-461.
- [42] Nardini M., Natella F., Gentili V., DiFelice M., Scaccini C.: Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: An *in vivo* study. Arch. Biochem. Biophys., 1997, **342** (1), 157-160.
- [43] Oddou J., Stentelaire C., Lesage-Meessen L., Asther M., Ceccaldi B.C.: Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarius*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, **53** (1), 1-6.
- [44] Penrose J.D.F. Spent grain-based animal feed material and method for its production. UK Patent Application GB 2220 124 A.
- [45] Priefert H., Rabenhorst J., Steinbuchel A.: Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, **56**, 296-314.
- [46] Smith M.M., Hartley R.D.: Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in Gramineous plants. Carbohydr. Res., 1983, **118**, 65-80.
- [47] Tenkanen M., Schuseil J., Puls J., Poutanen K.: Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. J. Biotechnol., 1991, **18**, 69-84.
- [48] Topakas E., Kalogeris E., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.: Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* Lebensm. -Wiss. u.-Technol., 2003, **36**, 561-565.
- [49] Topakas E., Stamatis H., Biely P., Christakopoulos P.: Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. Appl. Microb. Biotechnol., Published Online: Springer-Verlag 10.1007/s00253-003-1481-6, 2003.
- [50] Tripathi U., Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A.: Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor metabolites in cultures of *Haematococcus pluvialis*. Process Biochem., 2002, **38**, 419-426.
- [51] Viřtor R.J., Angelino S.A.G.F., Voragen A.G.J.: Arabinoxylans barley, malt and wort". Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., 1991, **23**, 139-146.
- [52] Viřtor R.J., Angelino S.A.G.F., Voragen A.G.J.: Structural features of arabinoxylans from barley and malt cell wall material. J.Cereal Sci., 1992, **15**, 213-222.

- [53] Viëtor R.J., Voragen A.G.J.: Composition of non-starch polysaccharides in wort and spent grain from brewing trials with malt from a good malting quality barley and a feed barley. *J. Inst. Brew.*, 1993, **99**, 243-248.
- [54] Viëtor R.J., Kormelink F.J.M., Angelino S.A.G.F., Voragen A.G.J.: Substitution patterns of water-unextractable arabinoxylans from barley and malt". *Carbohydr. Polym.*, 1994, **24**, 113-118.
- [55] Wackerbauer, K., Kramer P., Siepert J.: Phenolische Aromastoffe in Bier. *Brauwelt*. 1982, **15**, 618-620.

CHARACTERIZATION OF ARABINOXYLAN- DEGRADING MICROBIAL ENZYMES AND THEIR ROLE IN RELEASE OF FERULIC ACID FROM BARLEY SPENT GRAIN

S u m m a r y

The aim of this review was to characterise of bacterial and fungal enzymes taking part in the degradation of arabinoxylans. This study especially describes ferulic acid esterase, xylanase and acetyl esterase. This paper presents the sum of results concerning the possibility of ferulic acid production from barley spent grain using purified enzymes or commercial enzyme preparations of microbial origin. Barley spent grain is the most valuable by-product of brewing industry, rich in precious dietary components like proteins, dietary fiber, fatty acids and others. Ferulic acid is a natural, strong antioxidant commonly present in *Graminaceae* family plants and in a number of by-products of brewing industry – barley spent grain. Ferulic acid can be also microbiologically transformed into other compounds used in food industry, like antioxidant caffeic acid or vanillin, precious flavoring agent.

Key words: ferulic acid, ferulic acid esterase, xylanase, acetyl esterase, barley spent grain, beer ☒

ALICJA STACHELSKA

OBECNOŚĆ MUTAGENÓW I KANCEROGENÓW W ŻYWNOŚCI ORAZ ICH WPŁYW NA ORGANIZM CZŁOWIEKA

Streszczenie

Artykuły żywnościowe, oprócz składników odżywczych, mogą zawierać potencjalne mutageny i kancerogeny. Przyczyną obecności tych związków w pożywieniu może być także niewłaściwie przeprowadzony proces technologiczny bądź kulinarna obróbka termiczna, jak również nieodpowiednie warunki przechowywania żywności.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu literatury dotyczącej obecności mutagenów i kancerogenów naturalnie występujących w żywności roślinnej, zwierzęcej oraz powstających podczas procesów technologicznych. Ponadto przedstawiono krótki opis procesu mutagenyzy i kancerogenyzy. Podano również przykłady wpływu potencjalnych mutagenów i kancerogenów na zdrowie człowieka.

Słowa kluczowe: mutageny, kancerogeny, mutageneza, kancerogeneza

Wprowadzenie

Stosowanie nieodpowiedniej diety zwiększa ryzyko powstawania chorób, w tym wielu odmian nowotworów [1, 7, 13]. Wśród składników żywności mogą występować także związki mutagenne lub kancerogenne [3, 6, 42, 46]. Niektóre z nich, np. heterocykliczne aminy aromatyczne, powstają podczas obróbki termicznej ryb i mięsa innych zwierząt, szczególnie wówczas, gdy temperatura smażenia lub pieczenia jest bardzo wysoka [8, 23, 26].

Inne, np. mikotoksyny, tworzą się podczas niewłaściwego przechowywania produktów żywnościowych, m.in. kukurydzy i orzechów [15, 20].

Mutageny, rozprzestrzeniając się w organizmach człowieka, powodują degradację kwasów nukleinowych oraz powstawanie nowych związków mutagennych i kancerogennych [42, 50]. W efekcie wielu kolejnych mutacji w tej samej komórce,

zmieniających komórkę normalną w nowotworową, może dochodzić do powstawania raka [2].

Celem niniejszego opracowania był przegląd informacji na temat występowania w żywności potencjalnych mutagenów i kancerogenów i ich wpływu na organizm człowieka. W skrócie przedstawiono opis procesu mutagenezy oraz możliwości ewentualnego tworzenia komórek nowotworowych w organizmie człowieka.

Mutageneza i kancerogeneza

Większość mutagenów chemicznych powstających w czasie pieczenia czy smażenia mięsa nad otwartym ogniem jest kancerogenna (np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne – WWA, czy heterocykliczne aminy – HCA) i powoduje powstawanie nowotworów [35]. Jednak wiele substancji genotoksycznych występujących w żywności nie ma właściwości mutagennych czy kancerogennych. Do ujawnienia tych cech w organizmie człowieka niezbędna jest aktywacja metaboliczna. Występujące w żywności mutageny ulegają aktywacji i detoksykacji dzięki enzymom endogenicznym [17], których rola polega na szybkim pozbywaniu się obcych związków z komórek. Niekiedy elektrofilowe pochodne związków mutagennych wiążą się z DNA, wiązanie to może zakończyć się błędnym kodowaniem w czasie replikacji DNA. Uszkodzony DNA może być źródłem przyszłych mutacji, o ile nie zostanie on naprawiony przez odpowiednie enzymy reperujące. Jeśli addukty DNA nie zostaną naprawione, proces ten może zakończyć się punktową mutacją, delecją, insercją czy anormalnym wzrostem chromosomów. Jeżeli rezultatem tego procesu jest nienormalny wzrost chromosomów, DNA może być naprawiany przez enzymy dostarczone przez białka, które opóźniają cykl komórkowy. Śmierć komórki następuje, jeśli uszkodzenia DNA się utrzymują. Oprócz efektów letalnych niezreperowane uszkodzenia DNA w komórkach powodują także różnego rodzaju mutacje genowe, chromosomalne, prowadzące do powstawania komórek nowotworowych i raka [16, 17].

Jakakolwiek grupa chorób, powstających w wyniku niekontrolowanego wzrostu i namnażania nienormalnych odmian komórek organizmu nosi nazwę nowotworu. Genetycznymi inicjatorami powstawania komórek kancerogennych są czynniki środowiskowe, szczególnie skażenie środowiska naturalnego, nieodpowiednia dieta, palenie papierosów i infekcja [11, 21]. Utajone geny nowotworowe, które są normalnie funkcjonującymi genami, mogą przekształcić się w efekcie mutacji w komórki nowotworowe, co prowadzi do niekontrolowanej ekspresji genów i ich namnażania. Wpływ mutagenów występujących w żywności na deformacje genów, powodujących tworzenie się komórek rakowych, może teoretycznie być modulowany przez enzymy łączące się z uszkodzonym DNA, różniące się funkcjami (metaboliczna aktywacja, detoksykacja, naprawa DNA, apoptoza, itp.) [18, 19]. Aktywacja metaboliczna i tworzenie adduktów z DNA zostały opisane przez Goldmana i Shieldsa [14]. Na

uwagę zasługuje fakt, że aktywowane głównie przez cytochrom P450 metabolity aflatoksyny B₁, WWA oraz HCA tworzą addukty z DNA oraz albuminą, ponadto metabolity aflatoksyny B₁ oraz WWA tworzą addukty z hemoglobiną oraz metabolitami urydyny, podczas gdy metabolity N-nitrozoamin tworzą addukty z O⁶-metyloguaniną i 7-metyloguaniną.

Kategorie mutagenów i kancerogenów w żywności

Żywność zawierająca substancje premutagenne, w zależności od spożytej ilości, może powodować wzrost ryzyka powstawania nowotworów [14, 30]. Mutageny te są szkodliwymi czynnikami mogącymi zmieniać strukturę molekularną genów lub odpowiednio jednego chromosomu w stosunku do drugiego. Promotorami kancerogenów są związki, które pobudzają rozprzestrzenianie komórek kancerogenów lub innych złośliwych komórek. Związki te stają się szkodliwe tylko wówczas, gdy ulegną chemicznym zmianom w procesie metabolizmu, wywołanym przez enzymy obecne w organach zwierząt. Szkodliwość wielu produktów pośrednich tych reakcji jest ograniczona, ale niektóre z nich wiążą się z DNA i stają się potencjalnymi związkami uszkadzającymi geny [20].

Potencjalne mutageny i kancerogeny występujące w żywności można podzielić na trzy grupy [46]: związki występujące naturalnie (toksyny roślinne), związki formowane w czasie smażenia lub pieczenia żywności (WWA, HCA) oraz związki tworzące się podczas przechowywania produktów spożywczych.

Mutageny i kancerogeny występujące naturalnie

Piacek-Lianes i Tannebaum [34] jako pierwsi odnotowali obecność azotowych prekursorów mutagenów w nasionach fasoli *Vicia fava*. Postulowali oni istnienie zależności pomiędzy zapadalnością na raka żołądka ludności Środkowej i Południowej Ameryki a spożyciem nasion fasoli zawierającej związki azotowe. Niektóre wyniki badań wskazują na możliwość ujawnienia aktywności mutagennej produktów z fermentowanych nasion [32, 48]. Diazotowe związki mutagenne zostały także wykryte w sosie sojowym i grzybach [32].

Naturalnie występujące prekursory mutagenów zostały wyizolowane z ziaren kawy [25, 29, 40, 43] i z kapusty chińskiej [49]. W 1994 IARC odnotowało obecność w świeżych ziemniakach akryloamidów, należących prawdopodobnie do karcenogenów ludzkich [19]. Natomiast w czerwonym mięsie, warzywach, produktach mlecznych oraz mięsie przetworzonym stwierdzono występowanie kwasu α -linolenowego, jednego z głównych nienasyconych kwasów tłuszczowych, mogącego powodować wzrost ryzyka występowania raka prostaty [7].

Mutageny tworzone podczas technologicznej obróbki i przechowywania żywności

Niektórzy badacze sugerują, że spożywanie pieczonej lub smażonej żywności wpływa na wzrost ryzyka zachorowalności na raka krtani [4]. Szczególnie żywność smażona zawiera substancje premutagenne, które mogą być metabolizowane przez enzymy naturalnie występujące w tkankach. W czasie procesów kulinarnych, smażenia, grilowania i pieczenia na ruszcie oraz innego rodzaju długotrwałej obróbki w wysokiej temperaturze, mogą powstawać w dużym stężeniu aminy heterocykliczne [10, 38, 40, 45] oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [14, 31, 32, 33]. Natomiast krótki czas obróbki kulinarnej nie sprzyja powstawaniu amin w produktach [24, 27]. Aminy heterocykliczne powstają w temp. powyżej 125°C [9]. Wzrost temperatury efektywnego pieczenia mięsa wołowego z 200 do 250°C powoduje około 6–7 krotny wzrost aktywności mutagennej związków [3, 41]. Zmiany kancerogenne i mutagenne wywołane przez te związki chemiczne są potencjalną przyczyną powstawania nowotworów u ludzi i zwierząt [12, 45, 47]. Bosetti i wsp. [4] zasugerowali, że konsumpcja pieczonej żywności (np. mięsa wołowego, ryb oraz jaj), niezależnie od jej obróbki termicznej, zwiększa ryzyko zachorowalności na raka krtani. Zaobserwowano także związek pomiędzy bogatą w białka smażoną żywnością a powstawaniem raka układu trawiennego, wywołanego obecnością genotoksycznych, mutagennych HCA powstających w czasie pieczenia żywności w wysokiej temperaturze [10, 37]. Sugimura [45] zauważył, że specyficzna aktywność mutagenna MeIQx (2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina) oraz IQx (2-amino-3-metylimidazo[4,5-f]chinoksalina) izolowanych z sardynek i świeżej wołowiny, pieczonych nad otwartym ogniem, jest większa niż w przypadku wędzenia mięsa. Natomiast Gunter i wsp. [16] stwierdzili, że pieczone czerwone mięso jest głównym źródłem HCA, podczas gdy mięso grilowane lub opiekane na rożnie zawiera znaczne ilości benzo[a]pirenu [BP], przy czym BP powoduje większe ryzyko powstawania komórek nowotworowych niż HCA. Bosetti i wsp [5] stwierdzili, że szczególnie wpływ na powstawanie raka krtani ma kilkakrotne używanie tych samych olejów do smażenia. Ponadto, oleje bogate w kwasy polienowe n-6 mogą być bezpośrednio włączone w aktywność mutageną heterocyklicznych amin (HCA), co może spotęgować efekt promowania powstawania nowotworów [52] bardziej niż w przypadku monoenuowych kwasów występujących w oliwie z oliwek [51].

Spleśniała żywność, np. orzechy, ziarna zbóż lub kukurydzy, może zawierać mikotoksyny. Na przykład aflatoksyna B₁, mająca właściwości mutagenne i kancerogenne [15], wytwarzana jest przez pleśnie: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* [36]. Spożywanie aflatoksyn może powodować wzrost ryzyka powstawania raka żołądka, wątroby lub nerek.

Podczas peklowania mięsa, wędzenia ryb oraz produkcji sosu sojowego i wywaru piwowskiego powstają N-nitrozoaminy. Doniesienia wskazują na związek

występujących w diecie N-nitrozoamin z powstawaniem raka jelita grubego [28]. Odnotowano zmniejszanie ilości kancerogennych N-nitrozoamin podczas obróbki żywności prowadzonej z dodatkiem przeciwutleniaczy (witamin C i E) [2, 44]. Nagano i wsp. [29] zaobserwowali, że wyciąg z prażonych nasion kawy jest genotoksyczny (badania *in vitro*), jednak badania prowadzone na zwierzętach *in vivo* nie potwierdziły tego spostrzeżenia [39, 43].

Podsumowanie

Żywność stanowi istotny element środowiska człowieka. Oprócz substancji odżywczych może zawierać ona wiele potencjalnych premutagenów i kancerogenów, promotorów komórek nowotworowych. Promotorami kancerogenów są związki, które ulegają chemicznym zmianom w procesie metabolizmu zwierząt i pobudzają rozprzestrzenianie komórek nowotworowych. Źródłem wielu kancerogenów występujących w żywności jest obróbka termiczna żywności bogatej w białko (np. mięsa czerwonego czy ryb, o dużej zawartości tłuszczów) oraz niewłaściwe przechowywanie artykułów żywnościowych.

Literatura

- [1] American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research (eds.). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC 1997.
- [2] Ames B.N.: Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. In: Genetic Toxicology of the diet. Alan R. Liss Inc., New York 1986, pp. 3-32.
- [3] Bieldanes L.F., Morris M.M., Timourian H., Hatch F.T.: Effects of meat composition and cooking conditions on mutagen formation in fried ground beef. *J. Agr. Food. Chem.*, 1983, **31**, 18-21.
- [4] Bosetti C., La Vecchia C., Talamini R., Negri E., Levi F., Dal Maso L., Franceschi S.: Food groups and laryngeal cancer risk: A case-control study from Italy Switzerland. *Int. J. Cancer*, 2002, **100**, 355-360.
- [5] Bosetti C., Talamini R., Levi F., Negri E., Franceschi S., Airoldi L., La Vecchia C.: Fried foods: a risk factor for laryngeal cancer? *British J. Cancer*, 2002, **87**, 1230-1233.
- [6] De Serres F.J., Zeiger E., Hatch F.T. Future directions and research priorities for food mutagens. *Environmental Health Perspectives*, 1986, **67**, 153-157.
- [7] De Stéfani E., Denco-Pellegrini H., Boffetta P., Ronco A., Mendilaharsu M.: α -Linolenic acid and risk of prostate cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2000, **9**, 335-338.
- [8] Dolara P., Commoner B., Vithayathil A., Cuca G., Tuley E., Madyastha P., Nair S., Kriebel D.: The effect of temperature on the formation of mutagens in heated beef stock and cooked beef. *Mutant Res.*, 1979, **60**, 231-237.
- [9] Felton J., Knize M.G.: Food mutagens: the role of cooked food in genetic changes. *Sci. Technol. Rev.*, 1995, **7**, 6-25.

- [10] Felton J.S., Knize M.G., Shen N.H., Anderson B.D., Bjeldanes L.F., Hatch F.: Identification of the mutagens in cooked beef. *Environmental Health Perspectives*, 1986, **67**, 17-24.
- [11] Finn Holm FoodGroup Denmark (eds.). *New functional food ingredients cancers and oxidative degradations*. INRA. Paris 2003.
- [12] *Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Washington 1997.
- [13] Giovannucci E., Rimm E.B., Colditz G.A., Stampfer M.J., Chute C.C., Willett W.C.: A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993, **86**, 1571-1579.
- [14] Goldman R. and Shields P.G.: Food mutagens. *J. Nutr. Suppl.*, 2003, 965S-973S.
- [15] Gropman J.D. and Kensler T.W.: The light at the end of the tunnel for chemical-specific biomarkers: daylight headlight? *Carcinogenesis*, 1999, **20**, 1-11.
- [16] Gunter J.M., Probst-Hensch M.P., Cortessis V.K., Kulldorff M., Haile R., Sinha R.: Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis*, 2005, **26**, 637-2005.
- [17] Harris C.C.: Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis*, 1989, **10**, 1563-1566.
- [18] Hayes K.C.: Medium – chain triacylglycerols may not raise cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **72**, 1583-1593.
- [19] IARC. *Some industrial chemicals*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 60. IARC. Lyon 1994.
- [20] IARC. *Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56. IARC. Lyon 1993.
- [21] IARC. *Tobacco smoking*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 38. IARC. Lyon 1986.
- [22] Kasai H., Yamaizumi Z., Nishimura S., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T., Springarn N.E., Weisburger J.H., Yokoyama S., Miyazawa T.: A potent mutagen in broiled fish. Part 1. 2-Amino-3methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1981, 2290-2293.
- [23] Kasai H., Yamaizumi Z., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T., Yokoyama S., Miyazawa T., Springarn N.E., Weisburger J.H., Nishimura S.: Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditions. *Proc. Japan. Acad.*, 1980, **56B**, 278-283.
- [24] Knize M.G., Sinha R., Brown E.D., Salomon C.P., Levander O.A., Felton J.S., Rothman N.: Heterocyclic amine content in restaurant-cooked hamburgers, steaks, ribs and chicken. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4648-4651.
- [25] Kosugi A., Nagano M., Suwa Y., Wakabayashi K., Sugimura T.: Roasting coffee beans produces compounds that induce prophage γ in *E. coli* and are mutagenic in *E. coli* and *S. typhimurium*. *Mutant. Res.*, 1983, **116**, 179-184.
- [26] Layton D.W., Bogen K.T., Knize M.G., Hatch F.T., Johnson V.M., Felton J.S.: Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis*, 1995, **16**, 39-52.
- [27] Machowska, S., Skibniewska K.A., Mozolewski W., Smoczyński S.S.: Wartość zdrowotna produktów typu „fast-food”. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2003, **1 (34)**S, 114-126.
- [28] Mirvish S.S.: Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.*, 1995, **93**, 17-48.

- [29] Nagao M., Fujita Y., Wakabayashi K., Nukaya H., Kosuge T., Sugimura T.: Mutagens in coffee and other beverages. *Environmental Health Perspectives*, 1986, **67**, 89-91.
- [30] National Research Council. Diet, nutrition, and cancer. National Academy Press. Washington, DC 1982.
- [31] Nishimura S.: Chemistry of mutagens and cancirogens in broiled food. *Environmental Health Perspectives*, 1986, **67**, 11-16.
- [32] Ochiai M., Wakabayashi K., Nagano M., Sugimura T.: Tyramine is a major mutagen by nitrite. *Gann*, 1984, **75**, 1-3.
- [33] Peto J.: Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 2001, **411**, 390-395.
- [34] Piacek-Lianes B.G., Tannenbaum S.R.: Formation of an activated N-nitroso compound in nitrite-treated fava beans (*Vicia faba*). *Carcinogenesis*, 1982, **3**, 1379-1384.
- [35] Robbana-Barnat S, Rabache M., Riolland E., Fradin J.: Heterocyclic amines: occurrence and prevention in cooked food. *Environ. Health Perspect.*, 1996, **104**, 280-288.
- [36] A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists' Expert Panel Safety and Nutrition: The risk/benefit concept as applied to food. *Food Technol.*, 1988, **42**, 119
- [37] Sinha R.: An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutant Res.*, 2002, **506-507**, 197-204.
- [38] Sinha R., Chow W.H., Kulldorff M. Denobile J., Butler J., Garcia-Closas M., Weil R., Hoover R.N., Rothman N.: Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas. *Cancer Research*, 1999, **59**, 4320-4324.
- [39] Sivak A.: Chronic experimental animal studies with coffee. *Banbury Report*, 1984, **17**, 231-240.
- [40] Skog K., Eneroth A., Svanberg M.: Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *International J. Food Sci. Technol.*, 2003, **38**, 313-323.
- [41] Skog K.I., Johansson M.A.E., Jägerstad M.I.: Carcinogenic heterocyclic amines in model system and cooked foods: a review on formation, occurrence, and intake. *Food. Chem. Toxicol.*, 1998, **36**, 879-896.
- [42] Stachelska A., Wiczorek Z., Bednarski W.: Technologiczne i żywieniowe aspekty obecności kwasów nukleinowych w żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2003, **1 (34)S**, 72-83.
- [43] Stalder R., Luginbühl H., Bexter A., Würzer H.-P.: Preliminary findings of carcinogen bioassay of coffee in mice. *Banbury Report*, 1984, **17**, 79-1984.
- [44] Steineck G., Hagman U., Gerhardsson M., Norell S.E.: Vitamin A supplements, fried foods, fat and urothelial cancer. A case-referent study in Stockholm, 1985-87. *Int. J. Cancer*, 1990, **45**, 1006-1011.
- [45] Sugimura T.: Past, present, and future of mutagens in cooked foods. *Environmental Health Perspectives*, 1986, **67**, 5-10.
- [46] Sugimura T., Sato S.: Mutagens – cancirogens in foods. *Cancer Res. Suppl.*, 1983, **43**, 2415-2421.
- [47] Sugimura T., Sato S., Nagano M., Yahagi T., Matsushima T., Seino Y., Takeuchi M., Kawachi T.: Overlapping of carcinogens and mutagens. In: *Fundamentals in Cancer Prevention*. P.N. Magee, S. Takayama, T. Sugimura, and T. Matsushima, Eds., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1983, pp. 191-215
- [48] Wakabayashi K., Ochiai M., Saitö H., Tsuda M., Suwa Y., Nagao M., Sugimura T.: Presence of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid, a precursor of mutagenic nitroso compound, in soy sauce. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)*, 1983, **80**, 2912-2916.
- [49] Wakabayashi K., Nagano M., Ochiai M., Tahira T., Yamaizumi Z., Sugimura T.: A mutagen precursor in Chinese cabbage, indole-3-acetonitrile, which becomes mutagenic on nitrite treatment. *Mutat. Res. Letters*, 1985, **143**, 17-21.
- [50] Wakabayashi K., Sugimura T., Nagano M.: Mutagens in foods. In: *Genetic toxicology*, pp. 303-308. Londyn. Caldwell: The Telford Press 1991.

- [51] Weisburger J.H.: Approaches for chronic disease prevention based on current understanding and underlying mechanisms. *Am. J. Nutr.*, 2000, **71**, 1710S-1714S.
- [52] Wu A. H., Shibata D., Yu M.C., Lai M.-Y., Ross R. K.: Dietary heterocyclic amines and microsatellite instability in colon adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 2001, **22**, 1681-1684.

PRESENCE OF MUTAGENS AND CARCINOGENS IN FOOD AND ITS INFLUENCE ON CONSUMERS HEALTH

S u m m a r y

Food products except nutritive components may contain potential mutagens and carcinogens. Main reasons for presence of those components in foods are improper technological and thermal process as well as bad storage of foods. A review of papers concerning informations about mutagens and carcinogens naturally existents in plants foods, animals foods, and formed during technological processes. The short description of mutagenesis and carcinogenesis processes is also reviewed. The examples of influence of potential mutagens and carcinogens on the health of people are also showed.

Key words: mutagens, carcinogens, mutagenesis, carcinogenesis ☒

MAŁGORZATA NEUMANN, KAMIŁA GODERSKA, KATARZYNA GRAJEK,
WŁODZIMIERZ GRAJEK

MODELE PRZEWODU POKARMOWEGO *IN VITRO* DO BADAŃ NAD BIODOSTĘPNOŚCIĄ SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH

Streszczenie

Biodostępność składników pokarmowych jest ważnym wskaźnikiem przy ocenie wpływu żywienia człowieka na jego zdrowie. Z uwagi na trudności w dostępie do treści jelitowych *in vivo* rozwinięto modele umożliwiające badanie trawienia i wchłaniania składników pokarmowych w warunkach *in vitro*.

W pracy opisano budowę przewodu pokarmowego i jego fizjologię. Przedstawiono dane dotyczące stężenia aktywnych składników płynów w układzie pokarmowym, kinetykę zmian kwasowości płynów jelitowych oraz szybkość pasażu i trawienie pokarmu przez układ. Omówiono także podstawowe modele *in vitro* do badania trawienia jelitowego i wchłaniania.

Większość stosowanych modeli jest dwu- lub trójstopniowa i obejmuje układy: żołądek – jelito cienkie, jama ustna – żołądek – jelito cienkie lub żołądek – jelito cienkie – jelito grube. W modelach przewodu pokarmowego *in vitro* można zalecać następujące proporcje objętościowe (wagowe) między płynami jelitowymi: pokarm/ślina/płyn żołądkowy/żółć/sok trzustkowy, jak 1,5/1/2/1/2. Jako modele do badania wchłaniania składników pokarmowych wykorzystuje się bądź układy dializacyjne lub ultrafiltracyjne, bądź modele kultur komórek nabłonka jelitowego *in vitro*. Najpopularniejszą linią komórkową wykorzystywaną do badania wchłaniania pokarmów jest Caco-2. Jej morfologia i fizjologia jest bardzo zbliżona do naturalnych ludzkich enterocytów *in vivo*. Model Caco-2 został zastosowany do badania wchłaniania białek, lipidów, cukrów, jonów metali, witamin, przeciwutleniaczy, mikotoksyn i innych składników żywności.

Słowa kluczowe: przewód pokarmowy, trawienie *in vitro*, biodostępność, modele

Wprowadzenie

Badaniu biodostępności składników pokarmowych, mineralnych, witamin, a także przeciwutleniaczy roślinnych poświęcono wiele publikacji [6, 7, 10, 17, 18].

Mgr inż. M. Neumann, mgr inż. K. Grajek, prof. dr hab. W. Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, 60-627 Poznań, ul. Wojska Polskiego 48, dr inż. K. Goderska, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, 60-624 Poznań, ul. Wojska Polskiego 31

Pojęcie to jest różnie definiowane w literaturze, niemniej wyraża ono stopień, w jakim dany składnik odżywczy może zostać uwolniony i wchłonięty z przewodu pokarmowego oraz wykorzystany przez organizm. Biodostępność (ang. oral bioavailability) można więc rozpatrywać jako sumę trzech następujących po sobie procesów:

- uwalniania składnika z matrycy organicznej w przewodzie pokarmowym (biodostępność),
- transportu przez ścianę jelit w głąb organizmu (wchłanianie),
- rozkładu danego składnika w organizmie, w tym w jelitach i wątrobie, oraz wprowadzenie go do centralnego krwioobiegu (metabolizm).

Należy podkreślić, że badanie biodostępności składników odżywczych jest zagadnieniem jeszcze mało poznanym, dlatego wymaga dużo większej uwagi.

Produkty spożywcze występują w dwóch postaciach: ciekłej i stałej. Szczególnie skomplikowaną strukturę mają produkty stałe zbudowane ze złożonej matrycy organicznej, w której rozmieszczone są różne składniki pokarmowe. Dostępność danego składnika będzie więc funkcją jego właściwości dyfuzyjnych i podatności matrycy na trawienie jelitowe. Biodostępność składników podanych doustnie w czystej formie jest zwykle dużo większa niż biodostępność tego samego składnika znajdującego się w matrycy produktu spożywczego, gdyż do jego wchłonięcia potrzebne jest najpierw uwolnienie z matrycy. W wielu przypadkach poszczególne składniki pokarmowe są chemicznie związane z innymi składnikami, co znacznie ogranicza ich uwalnianie w jelitach.

Z biodostępnością związane jest także pojęcie strawności, czyli podatności produktów lub składników odżywczych na działanie enzymów trawiennych. Określa się strawność poszczególnych składników żywności, np. strawność białek, tłuszczów, węglowodanów, a także pokarmu jako całości. Wielkocząsteczkowe związki przed przeniknięciem przez ścianę przewodu pokarmowego muszą ulec depolimeryzacji do odpowiednio małych cząsteczek. Możliwe jest to w procesie trawienia, które przebiega z udziałem wielu różnych enzymów wydzielanych z sokami trawiennymi do przewodu pokarmowego. Strawność produktów żywnościowych można ocenić określając współczynniki strawności organizmu ludzkiego lub zwierzęcego (strawność *in vivo*) oraz badając stopień hydrolizy enzymatycznej tych produktów w warunkach laboratoryjnych (strawność *in vitro*).

W przypadku oznaczenia strawności *in vitro* buduje się tzw. sztuczny model przewodu pokarmowego. Dlatego też głównym celem niniejszej pracy było przedstawienie różnych modeli *in vitro* imitujących w miarę możliwości procesy zachodzące w warunkach *in vivo*. Modele te są dużo szybszym i tańszym sposobem w porównaniu z badaniami prowadzonymi na zwierzętach. W publikacjach naukowych opisano badania, w których wykorzystano mniej lub bardziej zautomatyzowane

modele przewodu pokarmowego *in vitro*. Najbardziej zaawansowanym modelem przewodu pokarmowego jest holenderski model TNO, monitorowany komputerowo, w którym oprócz regulacji pH i dodatku odpowiednich enzymów, imitowane są ruchy perystaltyczne i wchłanianie przez ścianę jelit [19, 20]. Znane też są badania, w których trawienie w przewodzie pokarmowym próbowano symulować poprzez stworzenie odpowiednich warunków w prostych naczyniach laboratoryjnych [6, 18, 30].

Przewód pokarmowy człowieka w warunkach *in vivo*

Przewód pokarmowy człowieka ma długość około 5,5–6 m. Głównymi częściami układu pokarmowego są: jama ustna, gardło, przełyk, żołądek, jelito cienkie, jelito grube i gruczoły trawienne (ślinianki, wątroba, trzustka). Podstawową funkcją przewodu pokarmowego jest przede wszystkim zaopatrywanie ustroju w składniki odżywcze i wodę.

Pierwszym odcinkiem układu pokarmowego człowieka jest jama ustna. W niej dochodzi do pierwszej modyfikacji pokarmu poprzez żucie, miażdżenie, mieszanie ze śliną oraz jego nawilżanie i częściowe trawienie. Żucie ma duże znaczenie dla procesów trawienia, gdyż rozdrobnienie pokarmu w jamie ustnej ułatwia jego rozpad enzymatyczny w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Poza tym zapewnia także mieszanie kęsa pokarmowego ze śliną i częściowe trawienie węglowodanów przez zawartą w ślinie ptialinę (tab. 1). Ilość wydzielanej śliny w warunkach spoczynkowych wynosi ok. 0,5 ml/min, natomiast po silnym pobudzeniu wydzielniczym pokarmem może się zwiększyć nawet do 10 ml/min [12]. Przy zwiększonej produkcji śliny zwiększa się też ilość wydzielanych jonów wapnia, sodu, chloru i amylazy.

Z jamy ustnej pokarm przedostaje się do gardła, gdzie jest formowany w kęs i zostaje połknięty, tzn. za pomocą mięśni gardła i języka wtłoczony do przełyku na zasadzie odruchu. W przełyku ruch kęsów zachodzi dzięki przechodzącej fali perystaltycznej (tzw. ruch robaczkowy). Długość tej trasy wynosi około 23–25 cm (tab. 2). Ujście przełyku do żołądka zamyka pierścień mięśni gładkich, zwany zwieraczem. Podczas gdy fala skurczów perystaltycznych przemieszcza się wzdłuż przełyku, mięśnie zwieracza odruchowo rozluźniają się i kęs pokarmu dostaje się do żołądka [16].

Żołądek jest najszerszym odcinkiem przewodu pokarmowego. Ma kształt grubego, umięśnionego worka. Błona śluzowa w pustym żołądku jest silnie pofałdowana. W miarę wypełniania żołądka pokarmem fałdy śluzówki ulegają wygładzeniu, a ściany żołądka rozciągają się, ściśle obejmując jego zawartość. Pojemność żołądka wynosi przeciętnie 1,5 litra, ale może wzrosnąć nawet do 6 litrów [16]. Powierzchnię błony śluzowej żołądka wyściela jednowarstwowy nabłonek

walcowaty, który wydziela duże ilości śluzu. Na powierzchni tej widoczne są liczne punktowe ujścia gruczołów żołądkowych, tzw. dołączki żołądkowe, których jest ok. 4 mln.

W żołądku gromadzi się, wyjąławia, miesza i częściowo trawi spożyty pokarm. Tutaj wydzielany jest sok żołądkowy o pH $1,2 \pm 0,3$ i gęstości 1,006–1,009 g/ml. Sok żołądkowy to mieszanina enzymów, mucyny, czyli śluzu, wodnego roztworu HCl i innych związków organicznych i nieorganicznych (tab. 1). Występujący w żołądku kwas solny wydzielany jest przez komórki okładzinowe gruczołów żołądkowych w stężeniu ok. 0,5%. Wydzielina komórek okładzinowych zawiera ok. 90–170 mM HCl/l, a jej pH wynosi ok. 0,9. W żołądku część kwasu solnego ulega rozcieńczeniu treścią żołądkową, a pozostała zbuforowaniu przez białka, których zjonizowane grupy karboksylowe jako zasady (akceptory protonów) przyłączają jony wodorowe. W efekcie tego w żołądku występuje wysokie stężenie wolnych jonów wodorowych (kwasowość wolna) i pewna część jonów H^+ związanych z białkami czy innymi związkami kwasowymi (kwasowość związana).

Kwas solny ulega w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego zobojętnieniu pod wpływem słabo zasadowych soków trzustkowego i jelitowego. Czynnikiem zobojętniającym jest ten sam jon HCO_3^- , który powstaje podczas tworzenia HCl. Wydzielający się CO_2 powoduje burzenie się i mieszanie treści pokarmowej, co w efekcie wzmagą ruchy perystaltyczne jelit i ułatwia trawienie.

Czas zalegania pokarmu w żołądku zależy w dużym stopniu od kaloryczności posiłku. Opróżnianie żołądka jest regulowane w taki sposób, aby w tym samym czasie utrzymać dopływ do dwunastnicy jednakowej ilości kalorii, zwykle 2 kcal/min [15]. Po 2–4 godz. zalegania w żołądku miazga pokarmowa, która powstaje z treści pokarmowej w wyniku wymieszania jej z sokami żołądkowymi, przesuwa się powoli w stronę ujścia żołądka (tzw. odźwiernika) do dwunastnicy, stanowiącej pierwszy odcinek jelita cienkiego. Czas przebywania miazgi pokarmowej w żołądku zależy od rodzaju spożytego produktu. Posiłki bogate w tłuszcze i białka mogą opóźnić opróżnianie żołądka [5]. W skrajnych przypadkach, przy bardzo obfitym i tłustym posiłku, zaleganie pokarmu w żołądku może wynosić nawet 16 godz.

Tougas i wsp. [27] w swoich badaniach wykazali, że godzinę po spożyciu posiłku zawierającego mało tłuszczu, w żołądku pozostaje 69% treści pokarmowej, po 120 min 24%, a po 240 min zaledwie 1,2%. W innych badaniach wykazano, że opróżnienie połowy żołądka po spożyciu posiłku bogatego w tłuszcz zajmuje 108 min, natomiast posiłku bogatego w węglowodany ok. 84 min [23].

Jelito cienkie składa się z trzech części: dwunastnicy, jelita czczego i jelita krętego. Całkowitą długość jelita cienkiego trudno jest jednoznacznie określić. Dane literaturowe podają różne długości tego odcinka przewodu pokarmowego, mieszczące się w przedziale 3–7 m. Różnice w poszczególnych długościach są związane ze

sposobem i różnym czasem ich mierzenia (np. przyżyciowo i pośmiertnie). Długość jelita mierzona pośmiertnie jest większa (6–8 m) z powodu zaniku napięcia mięśniowego [3, 16]. Długości poszczególnych części jelita cienkiego podano w tab. 1.

Jelito cienkie jest specjalnie przystosowane do wchłaniania strawionego pokarmu dzięki dużej powierzchni wewnętrznej wyścielonej błoną śluzową. Tak duża powierzchnia wymiany jest związana z obecnością fałdów śluzówki jelita, dużą gęstością kosmków jelitowych pokrywających całą powierzchnię śluzówki oraz mikrokosmków pokrywających powierzchnię komórki nabłonka jelit. Kosmki jelitowe zwiększają powierzchnię chłonną jelita 8-krotnie. Ogólnie w jelicie jest ich około 90 mln. Generalnie czas przebywania pokarmu w jelicie cienkim szacuje się średnio na 3 godz. (1–6 godz.).

W dwunastnicy, czyli pierwszym odcinku jelita cienkiego, zachodzi większość chemicznych i enzymatycznych procesów trawiących węglowodany, białka i tłuszcze. Do dwunastnicy uwalniane są enzymy trzustki i żółć z wątroby (tab. 1). Natomiast enzymy produkowane w komórkach nabłonka wyścielającego dwunastnicę katalizują etap trawienia papki pokarmowej głównie w jelicie cienkim.

Narządami pomocniczymi wspomagającymi trawienie i wchłanianie jelitowe są trzustka, wątroba i pęcherzyk żółciowy. Trzustka jest długim i wąskim gruczołem, ułożonym w pętli dwunastnicy poprzecznie za żołądkiem. Wydziela ona sok trzustkowy w ilości 1–1,5 l na dobę. Sok jest cieczą klarowną, bezbarwną o gęstości 1,007–1,014 g/ml; ma odczyn zasadowy (pH 8,0–8,3) uwarunkowany głównie dużą zawartością NaHCO_3 , którego stężenie wynosi około 100 mM/l. Ze składników nieorganicznych występują w nim przede wszystkim chlorki i wodorowęglany sodu. Te ostatnie zubożniają kwas solny treści żołądkowej, co jest ważne dla procesów trawienia w jelicie. Ze związków organicznych najważniejsze są enzymy, dzięki którym odbywa się w jelitach trawienie trzech podstawowych składników pokarmowych: białek, tłuszczów i cukrów [16].

Żółć wytwarzana przez wątrobę gromadzi się w woreczku żółciowym, który pod wpływem bodźca, jakim jest kontakt dwunastnicy z tłuszczami, kurczy się i wydziela żółć do jelita. Zwykle w pierwszych 30 min trawienia objętość woreczka żółciowego zmniejsza się o połowę. W dwunastnicy w stanie na czczo stężenie żółci wynosi ok. 1–5 g/l treści pokarmowej (chymy). Po spożyciu tłustego posiłku wzrasta nawet do 30–

Tabela 1

Biologiczne i fizyczne parametry przewodu pokarmowego człowieka [6, 11, 12, 14, 16, 17].

Biological and physical properties of human alimentary tract [6, 11, 12, 14, 16, 17].

Odcinek przewodu pokarmowego Part of alimentary tract	Długość odcinka Length [cm]	Powierzchnia Surface	pH	Czas zalegania pokarmu Food residence time	Wydzielina trawienna Secretion fluids	Dziennie wydzielanie Daily secretion [dm ³]	Miejsce wytworzenia Place of production	Enzym trawienny Digestive enzymes	Optimum pH (aktywator) pH optimum (activator)	Substrat Substrate
Jama ustna Mouth	-	100 cm ²	6,5	s; min	Ślina Saliva	1,0–1,5	Gruczoły ślinowe Saliva glands	α-amylaza ślinowa (ptialina) Saliva α-amylase	6,6–6,8 (Cl ⁻)	Skrobia, Glikogen Starch, Glycogen
								Lipaza ślinowa Saliva lipase	4,0–4,5	Triacylo-glicerole Triacylglycerols
Żołądek Stomach	0,25	3,5 m ²	1,0–2,0	1,5-4 h	Sok żołądkowy Gastric fluid	1,5–2,5	Gruczoły żołądkowe Gastric glands	Pepsyna Pepsin	1,0–2,0 (HCl)	Białka Protein
								Lipaza żołądkowa Gastric lipase		Acyloglicerole Acylglycerols
								Renina Renin	4,0 (Ca ⁺⁺)	Kazeina Casein
Dwunastnica Duodenum	20-35	1,9 m ²	4,0–5,5	0,5-0,75 h	Sok trzustkowy Pancreatic fluids	1,0–1,5	Trzustka Pancreas	Amylaza trzustkowa Pancreatic amylase	~ 7,1 (Cl ⁻)	Skrobia, Glikogen Starch, Glycogen
								Lipaza trzustkowa Pancreatic lipase	~ 8,0 (żółć, fosfolipidy) (bile, phospholipids)	Acyloglicerole Acylglycerols
								Trypsyna (trypsinogen) Trypsin (trypsinogen)	~ 7,9 Enterokinaza Enterokinase	Białka, polipeptydy Protein, polypeptides
								Chymotrypsyna (chymotrypsinogen) Chymotrypsin (chymotrypsinogen)	~ 8,0 Trypsyna Trypsin	Białka, polipeptydy Protein, polypeptides

								Elastaza (proelastaza)	Trypsyna Trypsin	Białka (elastyna), polipeptydy Protein (elastin), polypeptides
								Karboksy- peptydaza (Prokarboksy- peptydaza) Carboxypeptidase (Procarboxy- peptidase)	Trypsyna Trypsin	Polipeptydy, oligopeptydy Poly- and oligopeptides
								Rybonukleaza Ribonuclease		RNA
								Deoksyrybo-nukleaza Deoxyribonuclease		DNA
					Żółć Bile	0,5–1,0	Wątroba Liver	Sole żółciowe Bile salts	7,0–8,0	Tłuszcze Fats
Jelito czcze Jejunum	250-280	184 m ²	5,5–70	1,5-2,0 h	Sok jelitowy Intestinal fluids	~1,0	Gruczoły jelitowe Intestinal glands	Lipaza jelitowa Intestinal lipase	Żółć, fosfolipidy Bile, phospho- lipids	Acyloglicerole Acylo-glycerols
Jelito kręte Ileum	350-420	276 m ²	7,0– 7,5	5,0 -7,0 h				Fosfataza alkaliczna Alkaline phosphatase		Fosfolipidy Phospholipids
Okreźnica i odbytnica Colon and rectum	148-150	1,3 m ²	7,0– 7,5	1-60 h	Śluz Mucus	~0,2	Komórki kubkowe nabłonka jelitowego Globlet cells	–	7,5–8,0	–

60 g/l chymy (15–30 mM). Średnie stężenie żółci po posiłku wynosi 7–15 mM. Na tak wysokim poziomie utrzymuje się aż do opróżnienia żołądka. Szczególnie silnym bodźcem powodującym wydzielanie żółci są długołańcuchowe triacyloglicerole. Jej stężenie w dwunastnicy i jelicie czczym jest podobne, natomiast szybko zmniejsza się w jelicie krętym, gdzie następuje wchłanianie soli żółciowych z wykorzystaniem mechanizmu transportu aktywnego. Część soli żółciowych spływa do jelita grubego.

Gruzoły śluzówki jelita cienkiego wydzielają do światła przewodu sok jelitowy. Jest to bezbarwna, klarowna ciecz o gęstości ok. 1,010 g/ml, o odczynie lekko zasadowym (pH 7–8). Sok jelitowy zawiera ok. 0,5% NaCl, 0,3% NaHCO₃ i 1% białka. Występują w nim wszystkie rodzaje enzymów, które potrzebne są do przekształcania składników pokarmowych w substancje przyswajalne dla organizmu [16].

Końcowym odcinkiem przewodu pokarmowego jest jelito grube, które ciągnie się od zastawki krętniczo-kątniczej aż do odbytu. Podstawowymi funkcjami jelita grubego są: wchłanianie wody i elektrolitów, formowanie, gromadzenie i okresowe wydalanie kału oraz utrzymywanie wzrostu bogatej flory bakteryjnej. Jelito grube dzieli się na jelito ślepe wraz z wyrostkiem robaczkowym, okrężnicę i odbytnicę razem z kanałem odbytowym (tab. 1). Okrężnica z kolei dzieli się na część wstępującą, poprzeczną, zstępującą i esowatą. Według Snyder i wsp. [25], pierwszy odcinek okrężnicy ma długość 18 cm, a kolejne 50, 30 i 40 cm. Uwzględniając pozostałe części, czyli jelito ślepe (7 cm) i odbytnicę (15 cm), całkowita długość jelita grubego wynosi 160 cm. Szacuje się, że człowiek wypija dziennie średnio 2–3 l płynów, jelita wydzielają 7–8 l soków oraz wchłaniają i wydalają ok. 8–10 l wody. Proporcje objętościowe między spożytymi pokarmami a wydzielinami w poszczególnych odcinkach jelit kształtują się następująco: 1,5 (pobranego pokarmu) : 1 (śliny) : 2 (płynów żołądkowych) : 2 (soków trzustkowych) : 1 (żółci) [24, 26, 29]. Proporcje te mogą być zalecane w sztucznych modelach przewodu pokarmowego.

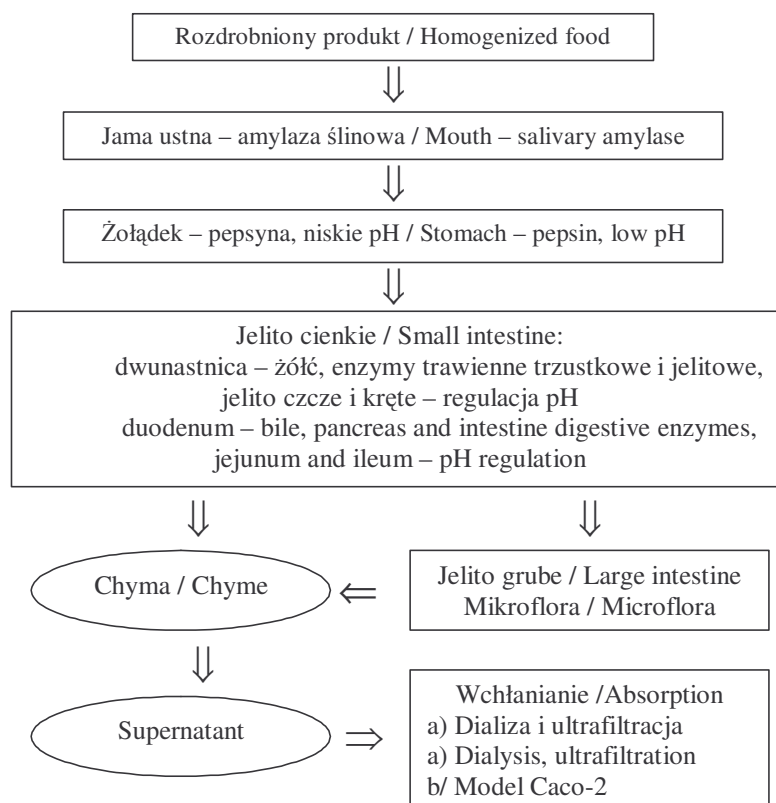
Enzymy trawienne i inne wydzieliny jelitowe są niszczące dla nabłonka jelitowego. W warunkach naturalnych jest on chroniony warstwą śluzu jelitowego wytwarzanego przez gruczoły Brunnera i krypty Liberkuehna występujące na całej powierzchni jelita cienkiego. Ilość produkowanego śluzu sięga dziennie do 1–1,8 l. Śluz ten ma odczyn lekko alkaliczny (pH 7,5–8,0). Przeważająca część śluzu jest szybko wchłaniana przez kosmki nabłonka jelitowego. Śluz cyrkulujący między kryptami a kosmkami ułatwia absorpcję składników pokarmowych. Do jelita grubego trafia dziennie ok. 1,5 l chymy. Tutaj następuje wchłanianie wody i elektrolitów, co powoduje, że z kałem organizm ludzki opuszcza zaledwie ok. 0,1 l wody.

Modele przewodu pokarmowego *in vitro*

Badanie biodostępności składników pokarmowych i leków w warunkach naturalnych jest bardzo utrudnione, na co decydujący wpływ ma trudny dostęp do światła przewodu pokarmowego człowieka, szczególnie na odcinku jelita cienkiego. Wpłynęło to na szybki rozwój badań prowadzonych na układach modelowych *in vitro*, symulujących mniej lub bardziej dokładnie układ pokarmowy człowieka. Większość opisanych modeli *in vitro* składa się z systemu dwu- lub trójczłonowego: żołądek –

jelito cienkie, jama ustna – żołądek – jelito cienkie lub żołądek – jelito cienkie – jelito grube (rys. 1).

Jednym z pierwszych modeli przewodu pokarmowego *in vitro* był model stworzony przez Millera i wsp. [18]. Imitacja procesów zachodzących w czasie trawienia przebiegała w prostych szklanych naczyniach laboratoryjnych. W modelu uwzględniono dwa etapy trawienia: żołądek i jelito cienkie. W celu stworzenia warunków odzwierciedlających procesy zachodzące w organizmie *in vivo* stosowano enzymy charakterystyczne dla poszczególnych etapów trawienia (pepsyna, sole żółciowe, ekstrakt trzustkowy) odpowiednie pH, w którym enzymy mogły być aktywne (2,0–7,4), właściwą temperaturę (37°C) oraz regulację kwasowości środowiska poprzez dodanie odpowiednio kwasu lub zasady (HCl, NaHCO₃) (tab. 2.) Układ ten stworzono do badania biodostępności żelaza z wybranych produktów spożywczych.



Rys. 1. Schemat typowego modelu *in vitro* przewodu pokarmowego.

Fig. 1. Scheme of typical model of alimentary tract *in vitro*.

Według danych literaturowych [1, 14], ponad 90% wchłaniania produktów trawienia zachodzi właśnie w jelicie cienkim. Większość powstałych modeli przewodu pokarmowego *in vitro* składa się tylko z żołądka i jelita cienkiego. Produkt poddawany trawieniu odpowiednio wcześniej musi być zhomogenizowany. W ten sposób imituje

się etap gryzienia i rozdrabniania pokarmu w jamie ustnej. Niektóre modele uwzględniają trawienie enzymatyczne, jakie zachodzi w jamie ustnej *in vivo*, poprzez wprowadzenie do układu amylazy ślinowej.

Trawienie w żołądku symulowane jest przez dodanie pepsyny do zhomogenizowanego i rozpuszczonego w wodzie produktu. W większości badań nad biodostępnością, za minimalną dawkę pepsyny konieczną do optymalnego strawienia białek stosuje się minimum od 4000–5000 IU w ciągu 15 min w przeliczeniu na osobę w średnim wieku [5]. Czas trawienia w żołądku zależy od składu pożywienia. W większości prowadzonych badań proces ten prowadzono przez około 2 godz. (tab. 2). W jelicie cienkim imitacja trawienia zachodzi głównie przez dodatek ekstraktu trzustkowego i soli żółciowych. W skład ekstraktu trzustkowego wchodzi takie enzymy, jak: amylaza, trypsyna, rybonukleaza, proteaza i lipaza trzustkowa.

W żołądku pH ma wartość od 1,0 do 3,5, a w większości modeli utrzymywane jest na poziomie 2,0 (tab. 2). Przed posiłkiem pH soków jelitowych jest niższe i wynosi 4,9–6,4 w dwunastnicy, 4,4–6,5 w jelicie czczym i około 6,5–7,4 w jelicie krętym [5]. Po posiłku pH nieznacznie wzrasta i kształtuje się odpowiednio w poszczególnych odcinkach jelita cienkiego: 5,2–5,4 w dwunastnicy, 5,2–6,2 w jelicie czczym i 6,8–7,5 (a nawet 8,0) w jelicie krętym. Regulacja pH odbywa się przez dodatek kwasu solnego lub kwaśnego węgla sodu o różnym stężeniu (tab. 2). Temperatura we wszystkich modelach jest jednakowa i wynosi 37°C. Utrzymywana jest za pomocą łaźni wodnej. W większości badań *in vitro* mieszanie odbywa się za pomocą mieszadła magnetycznego lub wytrząsarek połączonych z łaźnią wodną. Tylko w niektórych publikacjach podano, z jaką częstotliwością wytrząsana jest zawartość treści żołądkowej [1, 7, 21, 22, 28]. Częstotliwość skurczów w żołądku wynosi średnio 3 cykle na min, a w jelicie cienkim w zależności od odcinka: w dwunastnicy 11,7/min, w jelicie krętym 8,9–9,8/ min.

W bardziej złożonych modelach uwzględnia się obecność soków: żołądkowego, jelitowego oraz żółci [17, 28]. W tym celu składa się je sztucznie poprzez dodatek odpowiednich soli organicznych i nieorganicznych. Na ogół przyjmuje się, że stężenie żółci powinno wynosić 7–15 mM. W modelach przewodu pokarmowego *in vitro* można zalecać następujące proporcje objętościowe (wagowe) między płynami jelitowymi: pokarm/ślina/płyn żołądkowy/żółć/sok trzustkowy, jak 1,5/1/2/1/2.

Należy podkreślić, że 90% spożytego pokarmu jest wchłaniana w dwunastnicy i jelicie czczym, a tylko 10% w żołądku i jelicie grubym. Symulacja wchłaniania w modelach *in vitro* strawionych wcześniej produktów odbywa się za pomocą membran dializacyjnych. W prostych układach są to najczęściej woreczki dializacyjne o średnicy porów zależnej od trawionych produktów 6000–8000 Da [30], lub 12000–15000 Da [7, 10]. W bardziej złożonych modelach stosuje się membrany typu hollow-fibre [19, 20]. Oba rozwiązania polegają na zjawisku transportu pasywnego, w którym zasadniczą rolę odgrywa zjawisko dyfuzji. System taki jest jednak bardzo daleki od warunków naturalnych, w których ściana jelitowa, a szczególnie nabłonek

Tabela 2

Parametry trawienia żołądka i jelita cienkiego w wybranych modelach *in vitro*.
Parameters of digestion process in different *in vitro* models.

Żołądek Stomach	pH, (regulacja pH) pH regulation	Temp. [°C]	Czas trawienia [godz.] Digestion time [h]	Jelito cienkie Small intestine	pH, (regulacja pH) pH regulation	Czas trawienia [godz.] Digestion time [h]	Lit. Ref.
0,5 g (16 g pepsyny rozpuszczono w 100 ml 0,1 N HCl) 0.5 g (16 g pepsin dissolved in 100 ml 1.1N HCl)	2,0 (6 N HCl)	37	2	5 ml mieszaniny ekstraktu trzustkowego (4g/l) i soli żółciowych (25g/l) rozpuszczono w 0,1 M NaHCO ₃ 5 ml pancreatic extract (4g/l) and bile salts (25 g/l) dissolved in 0.1M NaHCO ₃	7,0 (NaHCO ₃ lub/or NaOH)	2,5	[18]
0,5 ml roztworu pepsyny (40 mg/ml 0,1 M HCl) 0.5 ml pepsin solution (40 mg/ml 0.1 M HCl)	2,0 (1 M HCl)	37	2	2,5 ml(2 mg ekstraktu trzustkowego i 12 mg soli żółciowych/ml 0,1 M NaHCO ₃) 2.5 ml (2 mg pancreatic extract and 12 mg bile salts/ml 0.1 M NaHCO ₃)	7,0	2	[6]
0,6-2,0 mg pepsyny rozpuszczono w 1 ml 20 mM HCl 0.6-2.0 mg pepsin dissolved in 1 ml 20mM HCl	2,5 (20 mM HCl)	37	2	0,4-0,7 g soli żółciowych rozpuszczono w 4 ml 150 mM NaHCO ₃ , 10-75 mg ekstraktu trzustkowego rozpuszczono w 4 ml 150 mM NaHCO ₃ 0.4-0.7 g bile salts dissolved in 4 ml 150 mM NaHCO ₃ , 10-75 mg pancreatic extract dissolved in 4 ml 150 mM NaHCO ₃	6,9 (150 mM NaHCO ₃)	3	[1]
0,2 g pepsyny rozpuszczono w 5 ml 0,1 M HCl 0.2 g pepsin dissolved in 5 ml 0.1 M HCL	2,0	37	1	0,05 g ekstraktu trzustkowego i 0,3 g soli żółciowych w 25 ml 0,1 M NaHCO ₃ 0.05 g pancreatic extract and 0.3 g bile salts in 25 ml 0.1 M NaHCO ₃	6,0 (1 M NaHCO ₃)	1	[10]

cd. tab. 2

31.500 U pepsyny 31,500 U pepsin	2,0 (stęż. HCl) (concentrated HCl)	37	2	5 ml mieszaniny ekstraktu trzustkowego (4g/l) i soli żółciowych (25g/l) 5 ml pancreatic extract (4 g/l) and bile salts (25 g/l)	7,5 (0,5 N NaHCO ₃)	2,5	[9]
1,6 ml roztworu pepsyny (16 g pepsyny rozpuszczono w 100 ml 0,1 N HCl 1.6 ml pepsin (16 g pepsin dissolved in 100 ml 0.1 N HCl)	2 (6 N HCl)	37	2	0,4 g ekstraktu trzustkowego i 2,5 g soli żółciowych rozpuszczono w 100 ml 0,1 M NaHCO ₃ 0.4 g pancreatic extract and 2.5 g bile salts dissolved in 100 ml 0.1 M NaHCO ₃		2	[30]
3 g pepsyny (73.000 Anson J/g produktu) wprowadzono do buforu fosforanowego 3 g pepsin (73,000 Anson units/g) dissolved in phosphate buffer.	1,7 (0,2 N HCl)	37°C	4 h	brak jelita intestine defect (absence)			[14]
6% pepsyny w 0,15 M NaCl 6% pepsin in 0.15 M NaCl	3,0 (6 M HCl)	37°C	5 h	1,5% ekstrakt trzustkowy, 0,5% amylaza, 0,15% sole żółciowe rozpuszczone w 0,15 M NaCl 1.5% pancreatic extract, 0.5% amylase, 0.15% bile salts dissolved in 0.15 M NaCl	6,8	4 h	[2]
2,5 g pepsyny/l soku żołądkowego 2.5 g pepsin/l gastric juice	2-3	37°C	2 h	9 g pankreatyny i 1,5 g lipazy na litr sztucznego soku jelitowego; 30 g żółci na litr soku żołądkowego 9 g pancreatin and 1.5 g lipase/l artificial intestinal juice; 30 g bile/ g gastric juice	6,5 -7		[28, 29]

jelitowy, aktywnie kontroluje transport poszczególnych składników i uczestniczy w ich metabolizmie.

Poważne niedogodności, które występują w prostych modelach *in vitro* spowodowały, że do badań nad transportem produktów trawienia ze światła przewodu pokarmowego do krwi lub limfy wykorzystuje się coraz szerzej modele kultur komórek nabłonka jelitowego. Kultury takie, rosnąc w formie spójnej monowarstwy komórkowej, doskonale imitują morfologię i fizjologię jelitowych enterocytów. Do najpopularniejszych tego typu linii komórkowych należy linia Caco-2 [6, 7, 8, 21, 28]. Jest to ustalona linia nowotworowa, która wykazuje zdolność do wzrostu adherentnego na powierzchniach stałych i mikroporowatych membranach. W czasie hodowli przechodzi ona proces różnicowania, a po trzech tygodniach hodowli, przy pełnej konfluencji, tworzy monowarstwę wysoko spolaryzowanych komórek, o budowie typowej dla enterocytów, z jądrem w części podstawnej, gęstymi mitochondriami i rąbkem szczoteczkowym w części szczytowej. Komórki Caco-2 wytwarzają enzymy (disacharazy i peptydazy) oraz białka transportowe, charakterystyczne dla komórek absorbujących nabłonek [13]. W badaniach nad transportem transnabłonkowym stosowana jest niekiedy linia komórkowa HT-29, jednak należy zaznaczyć, że linia ta jest typowa dla komórek nabłonka jelita grubego, gdzie wchłanianiu ulegają już tylko nieliczne składniki pokarmowe. Zdecydowana większość publikacji dotyczących wchłaniania składników pokarmowych przy użyciu kultur Caco-2 opisuje transport transnabłonkowy czystych chemicznie składników żywności. Tymczasem w normalnych warunkach składniki pokarmowe wprowadzane są w formie matrycy produktu spożywczego. Aby właściwie ocenić biodostępność poszczególnych składników i szybkość ich wchłaniania matryce organiczne, czyli produkty spożywcze, muszą być wstępnie poddane procesom trawienia w jednym z modeli sztucznego przewodu pokarmowego, które opisano powyżej. Uzyskana treść pokarmowa, o pH ok. 7,0, zawiera zarówno części rozpuszczone w płynie jelitowym, jak i niestrawione części stałe. Przed podaniem treści pokarmowej na powierzchnię nabłonka utworzonego przez monowarstwę komórek Caco-2 należy odwirować części stałe i wprowadzić supernatant na warstwę komórek Caco-2. Zaleca się delikatne wirowanie (2750 obr./min przez 5 min), aby ograniczyć niszczenie miceli utworzonych przez lipidy i żółc [29]. Model Caco-2 został zastosowany do badania wchłaniania białek, lipidów, cukrów, jonów metali, witamin, przeciwutleniaczy, mikotoksyn i innych składników żywności.

Podsumowanie

Procesy zachodzące w układzie pokarmowym *in vivo* są bardzo złożone, dlatego też badania prowadzone nad skonstruowaniem sztucznego układu pokarmowego oraz odtworzenie jego działania jest bardzo skomplikowane. W ostatnim czasie zauważalny

jest znaczny postęp w tych badaniach. Do największych osiągnięć należy sztuczny przewód pokarmowy opracowany przez holenderskich naukowców (The Netherlands Organization for Applied Scientific Research, TNO), imitujący doskonale procesy trawienia różnych produktów. Model ten sterowany komputerowo odtwarza sekrecję soków żołądkowych i jelitowych, wydzielin gruczołów związanych z przewodem pokarmowym (sok trzustkowy, żółć), systematyczne wchłanianie strawionych składników przez ściany jelit oraz ruchy perystaltyczne w żołądku i jelicie.

Badania nad biodostępnością różnych składników odżywczych są niezbędne w pracy żywieniowców, farmaceutów opracowujących nowe leki i toksykologów do badania szkodliwości niektórych związków na organizm człowieka. Badania z użyciem modeli przewodu pokarmowego *in vitro* są alternatywą dla badań prowadzonych z udziałem ludzi i zwierząt. Są dużo tańsze i szybsze, a przy tym powtarzalne. Wykorzystując tego rodzaju modele bada się między innymi strawność i biodostępność surowców bogatych w przeciwutleniacze i ich wchłanianie do płynów ustrojowych, czy też określa się dawkę i sposób działania składników mineralnych i witamin na organizm człowieka.

Pracę zrealizowano w ramach projektu badawczego zamawianego KBN- PBZ-KBN-094/P06/2003.

Literatura

- [1] Aura A. M., Harkonen H., Fabritius M., Poutanen K.: Development of *in vitro* enzymatic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *J. Cereal Sci.*, 1999, **29**, 139-152.
- [2] Cabanero A.I., Madrid Y., Camara C.: Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an *in vitro* digestion method. *Anal. Chim. Acta*, 2004, **526**, 51-61.
- [3] Daugherty A., Mrsny R.: Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier. Part 1. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1999, **2**, 144-151.
- [4] DeSesso J.M., Jacobson C.F.: Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem. Toxicol.*, 2001, **39**, 209-228.
- [5] Ekmekcioglu C.: A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chem.*, 2002, **76**, 225-230.
- [6] Gangloff M.B., Glahn R.P., Miller D.D., van Campen D.R.: Assessment of iron availability using combined *in vitro* digestion and Caco-2 cell culture. *Nutrition Research*, 1996, **16**, 479-487.
- [7] Garret D.A., Failla M.L., Sarama R.J. Development of an *in vitro* digestion method to access carotenoid bioavailability from meals. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4301-4309.
- [8] Garrett D.A., Failla M.L., Sarama R. J.: Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr. Biochem.*, 2000, **11**, 574-580.
- [9] Gil-Izquierdo A., Gil M. I., Ferreres F., Tomas-Barberan F.A.: *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 1035-1041.

- [10] Glahn R.P., Rassier M., Goldman M.I., Lee O. A. Cha J.: A comparison of iron availability from commercial iron preparations using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr. Biochem.*, 2000, **11**, 62-68.
- [11] Glahn R.P., Wien E.M., van Campen D.R., Miller D.D.: Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels *in vivo* studies: use of a novel *in vitro* method for rapid estimation of iron bioavailability. *J. Nutr.*, 1996, **126**, 332-339.
- [12] Guyton A.C.: Textbook of medical physiology. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1991.
- [13] Hidalgo I.J. Raub T.J, Borchardt R.T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterol.*, 1989, **96**,736-749.
- [14] Hoebler C., Lecannu G., Belleville C., Devaux M.F., Popineau Y., Barry J. L.: Development of an *in vitro* system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2002, **53**, 389-402.
- [15] Hunt J.N., Stubbs D.F.: The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying. *J. Physiol.*, 1975, **245**, 209-225.
- [16] Konturek St.: Fizjologia układu trawiennego. PZWL. Warszawa 1985.
- [17] Krul C., Luiten-Schuite A., Tenfelde A., Ommem B., Verhagen H., Havenaar R.: Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Mutation Res.*, 2001, **474**, 71-85.
- [18] Miller D.D., Schricker B.R., Rasmussen R.R., van Campen D.B.: An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *The Am. J. Clin. Nutr.*, 1981, **34**, 2248-2256.
- [19] Minekus M., Marteau P., Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. A multi compartmental dynamic computer controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA* 1995, **87**, 197-209.
- [20] Minekus M., Smeets-Peeters M., Bernalier A., Marol-Bonnin S., Havenaar R., Marteau A., Alric M., Fonty G., Huis in't Veld J.H. J.: A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **53**, 108-114.
- [21] Oomen A.G., Tolls J., Sips A.J., Groten J.P.: *In vitro* intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2003, **44**, 116-124.
- [22] Oomen A.G., Hack A., Minekus M., Zeijdner E., Cornelis C., Schoeters G., Verstraete W., Wiele T.V., Wragg J., Rempelberg C.J., Sips A.J., Wijnen J.V.: Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, **36**, 3326-3334.
- [23] Robertson M.D., Mathers J. C.: Gastric emptying rate of solids is reduced in a group of ileostomy patients. *Dig. Dis. Sci.*, 2000, **45**, 1285-1292.
- [24] Rotard W., Christmann W., Knoth W., Mailahn W.: Bestimmung der resorptionsverfügbaren PCDD/PCDF aus Kieselrot. Simulation der Digestion mit Böden. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.*, 1995, **7**, 3-9.
- [25] Snyder W. S., Cook M.J., Nasset E.S., Karhausen L.R., Howells G.P., Tipton I.H. (Eds.). Report of the Task Group on Reference Man. Pergamon, New York 1975.
- [26] Tortora G.J., Grabowski S.R.: Principles of anatomy and physiology. Eighth Edition. HarperCollins Publishers Inc., 1996.
- [27] Tougas G., Eaker E.Y., Abell T.L., Abrahamsson H., Boivin M., Chen J., Hocking M. P., Quigley E.M., Koch K.L., Tokayer A.Z., Stanghellini V., Chen Y., Huizinga J.D., Ryden J., Bourgeois I., McCallum R.W.: Assessment of gastric emptying using a low fat meal: establishment of international control values. *Am. J. Gastroenterol*, 2000, **95**, 1456-1462.

- [28] Versantvoort C.H., Oomen A.G., van de Kamp E., Rompelberg C.J., Sips A.J.: Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.*, 2005, 43, 31-40.
- [29] Versantvoort C.H., van de Kamp E., Rompelberg C.J.: Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. RIVM report 320102002/2004, Bilthoven 2004.
- [30] Wolfgor R., Drago S.R., Rodriguez V., Pellegrino N.R., Valencia M.E.: *In vitro* measurement of available iron in fortified foods. *Food Res. Int.*, 2002, 35, 85-90.

THE IN VITRO MODELS OF GASTROINTESTINAL TRACT TO STUDY BIOAVAILABILITY OF NUTRIMENTS

S u m m a r y

Bioavailability of alimentary components is an important indicator at the estimation of the influence of the nutrition on the human health. Taking into account the difficulty in accessing to intestinal contents *in vivo*, some artificial models enabling research on the intestinal digestion and absorption *in vitro* were elaborated. This paper also presents structure and physiology of gastrointestinal tract *in vivo*. Many detailed data on composition and concentration of active substances in alimentary canal, kinetics of pH changes of intestinal fluids as well as the rate of passage and digestion of food in gastrointestinal tract are discussed. Basic models of gastrointestinal tract *in vitro* used for the investigation of the intestinal digestion and the absorption are also described. The majority of GI models consist of two - or three-stage systems including: stomach - small intestine, mouth - stomach - small intestine or stomach - small intestine - large intestine. The optimal weight (volume) ratio between different components of intestinal fluids: food/saliva/gastric juice/bile/pancreatic juice is 1.5/1/2/1/2. To study the transport of food compound across intestinal epithelium, two types of *in vitro* models are used: dialysis or ultrafiltration membranes and cell cultures of intestinal epithelium *in vitro*. The most commonly used cell line to study intestinal absorption is human intestine cell line Caco-2. Its morphology and physiology is very similar to the human small intestine enterocyte cells *in vivo*. The Caco-2 model was applied to study absorption of protein, carbohydrates, lipids, vitamins, metal ions, antioxidants, mycotoxins and other food ingredients.

Key words: gastrointestinal tract, digestion *in vitro*, bioavailability, models ☒

ANNA OLEJNIK, MARCIN SCHMIDT, KATARZYNA WOJNAROWSKA,
WŁODZIMIERZ GRAJEK

**WPŁYW TOKSYCZNYCH METABOLITÓW TRAWIENIA NA
PROLIFERACJĘ I USZKODZENIA DNA NABŁONKOWYCH
KOMÓREK JELITOWYCH *IN VITRO***

Streszczenie

Przedmiotem prezentowanej pracy było określenie wpływu wybranych metabolitów (amoniaku, fenolu i krezolu), powstających w czasie procesu trawienia, na przeżywalność i proliferację ludzkich enterocytów *in vitro*. Do badań bezpośredniego oddziaływania wymienionych związków na komórki nabłonka jelitowego wykorzystano linię komórkową Caco-2, która w warunkach *in vitro* tworzy monowarstwę komórek funkcjonalnie i strukturalnie podobnych do ludzkich enterocytów.

W celu oceny cytotoksycznego i genotoksycznego efektu działania wybranych związków na komórki Caco-2 posłużono się następującymi metodami badawczymi: oznaczenie stężenia komórek metodą hemocytometryczną, oznaczenie przeżywalności komórek poprzez barwienie błękitem Trypanu, określenie stopnia uszkodzeń DNA za pomocą testu kometkowego.

Dowodzono, że ekspozycja komórek Caco-2 na stosunkowo niskie stężenia wszystkich testowanych związków powodowała znaczący spadek ich przeżywalności i proliferacji. Stwierdzono, że antyproliferacyjne oddziaływanie metabolitów procesu trawienia było związane z indukcją uszkodzeń DNA w komórkach nabłonka jelitowego.

Słowa kluczowe: Caco-2, cytotoksyczność, fenol, krezol, amoniak, test kometkowy

Wprowadzenie

Najbardziej rozpowszechnionym systemem komórkowym imitującym ludzki nabłonek jelitowy jest linia komórkowa Caco-2. W przeciwieństwie do wielu innych ustalonych linii komórkowych nowotworu jelit, linia Caco-2 zachowała zdolność do tworzenia monowarstwy komórek wykazującej morfologiczne, strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do nabłonka jelita cienkiego naturalnie występującego w

Dr inż. A. Olejnik, dr M. Schmidt, mgr inż. K. Wojnarowska, prof. dr hab. W. Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

warunkach *in vivo*. Do najistotniejszych cech charakterystycznych dla kultury komórkowej Caco-2 zalicza się: wykształcanie ścisłych połączeń międzykomórkowych, różnicowanie komórek enterocyto-podobnych mających na swojej powierzchni dobrze wykształcony rąbek szczoteczkowy, ekspresja charakterystycznych enzymów (alkaliczna fosfataza i in.) oraz systemów transportujących (glikoproteina P, cytochrom P-450 3A4 i in.) [17].

Ze względu na wysoki stopień podobieństwa kultury Caco-2 do normalnego nabłonka jelitowego stanowi ona model komórkowy stosowany w kilku kierunkach badawczych. W ostatnich latach udowodniono, że kultura Caco-2 jest bardzo dobrym systemem modelowym do badań farmaceutycznych i odgrywa istotną rolę przy opracowywaniu coraz bezpieczniejszych i aktywnych leków [1, 5, 9, 15]. Ponadto stwierdzono, że linia Caco-2 jest bardzo przydatna w badaniach adhezji bakterii probiotycznych [4, 14, 18, 21] i chorobotwórczych [2, 6, 18] do komórek nabłonka jelitowego. Kultura Caco-2 znalazła zastosowanie w badaniach nad wieloma innymi mechanizmami zachodzącymi w ludzkim przewodzie pokarmowym, np. odpowiedzią immunologiczną na obecność alergenów pokarmowych [8, 13], metabolizmem toksyn oraz działaniem związków mutagennych i kancerogennych [3, 11].

Celem przedstawionej pracy były badania nad cytotoksycznym oddziaływaniem związków chemicznych, takich jak: amoniak, fenol i krezol, będących wtórnymi metabolitami procesu trawienia, na jelitowe komórki nabłonkowe, przy zastosowaniu linii komórkowej Caco-2. Związki będące przedmiotem badań mogą być przyczyną biegunek, a także zaburzeń w funkcjonowaniu wątroby i układu krążenia. Szkodliwe substancje chemiczne pojawiają się jako efekt rozkładu białka zwierzęcego. Fenol i *p*-krezol są produktami rozkładu tyrozyny i jej pochodnych [20]. Część z nich zostaje wydalona z organizmu, a część wchłonięta przez tkankę, powodując ogniska chorobotwórcze [12].

Materiały i metody badań

Hodowla komórek Caco-2

Linia komórkowa Caco-2 pochodziła z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC). Hodowle komórek Caco-2 prowadzono w pożywce DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium, Sigma) z 20-procentowym dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej, 1-procentowym dodatkiem mieszaniny aminokwasów endogennych i w obecności gentamycyny (10 mg/dm³). Do hodowli użyto płytek 24-dołkowych (Nunc) o powierzchni wzrostu 1,9 cm². Hodowle przeznaczone do badania cytotoksyczności zakładano przy początkowej gęstości komórek wynoszącej 6,25 x 10⁴ komórek/cm². Hodowle prowadzono w temp. 37°C, w atmosferze o składzie 5% CO₂ i 95% powietrza i wilgotności 99%.

Stężenie komórek Caco-2 oznaczano metodą hemocytometryczną z wykorzystaniem komory Neubauera, a ich przeżywalność poprzez barwienie 0,04% błękitem Trypanu.

Oznaczanie cytotoksyczności związków chemicznych

Roztwory badanych związków (fenolu, amoniaku oraz *o*- i *p*-krezolu) w stężeniach 10^{-3} i 10^{-6} M rozpuszczano w kompletnej pożywce DMEM i poddawano filtracji przez filtry o porowatości 0,22 μm .

Do badania cytotoksycznego oddziaływania wybranych związków na komórki nabłonka jelitowego wykorzystano 7-dniową kulturę Caco-2 hodowaną na płytkach 24-dołkowych. Komórki Caco-2 poddawano ekspozycji na przygotowane roztwory badanych substancji przez 8, 24 i 48 godz., w temp. 37°C i w atmosferze o składzie 5% CO₂ i 95% powietrza. Ponadto, określano wpływ testowanych związków na proliferację komórek Caco-2 w ciągu pierwszych 10 dni hodowli. Każdego dnia hodowli oznaczano gęstość komórek i ich przeżywalność.

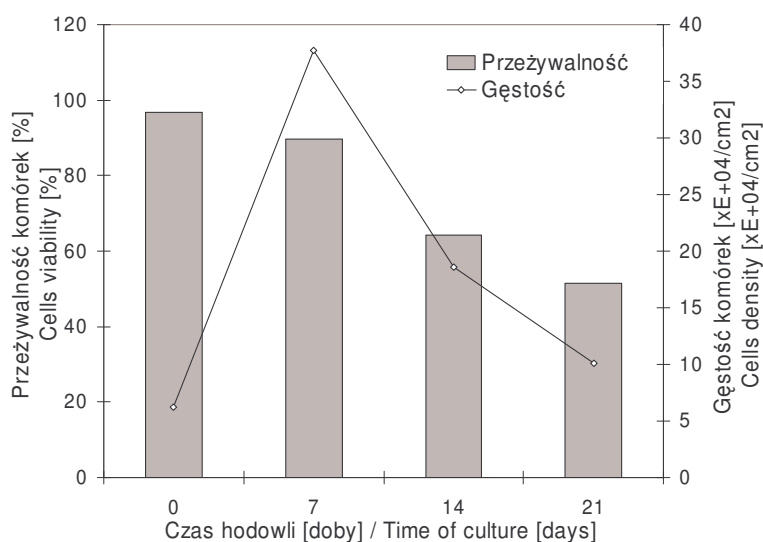
W celu określenia stopnia uszkodzeń DNA indukowanych w komórkach Caco-2 na skutek działania badanych związków zastosowano test kometkowy. Analizie kometkowej poddawano 7-dniową kulturę Caco-2 po 24-godzinnej ekspozycji na amoniak (10^{-6} M), fenol (10^{-6} M), *p*-krezol (10^{-6} M) oraz TPEN (10^{-5} M). Po inkubacji komórki Caco-2 przemywano buforem fosforanowym (PBS / pH 7,4) i poddawano procesowi trypsynizacji. Komórki przemyte zimnym roztworem PBS zawieszano w 1-procentowej agarozie o niskim punkcie topnienia i temp. 37°C. Zawiesinę komórek nakładano na szkiełka podstawowe pokryte 1-procentową agarozą o normalnym punkcie topnienia i przykrywano szkiełkami nakrywkowymi. Po zestaleniu szkiełka nakrywkowe usuwano, a szkiełka podstawowe z komórkami zanurzano w buforze lizującym (100 mM EDTA, 5,5 M NaCl, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100 / pH 10) i inkubowano przez 1 godz. w temp. 4°C. Po lizie szkiełka dwukrotnie płukano w roztworze do elektroforezy (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) przez 15 min w 4°C. Następnie prowadzono elektroforezę przy napięciu 230 V przez 30 min, w temp. 4°C. Po elektroforezie szkiełka płukano wodą, następnie buforem neutralizującym (0,4 M TRIS / pH 7,5), po czym odwadniano 70-procentowym etanolem. DNA uzyskane w preparatach barwiono barwnikiem fluorescencyjnym SYBRGold. Do określenia poziomu uszkodzeń DNA brano pod uwagę wszystkie komórki znajdujące się w polu widzenia, wśród których obecnych było co najmniej 100 kometek. Wyniki testu opracowano za pomocą programu komputerowego CometScoreTM. Analizę kometek prowadzono na podstawie parametru określającego procent DNA w ogonie i opisującego odsetek DNA, który wyemigrował z jądra komórkowego.

Doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawione na wykresach i tabelach stanowią wartości średnie, a obliczone odchylenia standardowe (\pm SD) zaznaczono w postaci słupków błędów. Ocenę istotności różnic przeprowadzono metodą analizy wariancji. Do określenia jednorodności wariancji stosowano test Levene'a. Celem oszacowania statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnimi zastosowano test Tukey'a.

Wyniki i dyskusja

Wpływ badanych związków na kulturę Caco-2

Doświadczenia nad wpływem związków cytotoksycznych na kulturę nabłonka jelitowego przeprowadzono z wykorzystaniem młodej 7-dniowej kultury Caco-2. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że komórki Caco-2 na tym etapie hodowli występują w pełnej konfluencji, charakteryzują się najwyższą przeżywalnością i aktywnością metaboliczną (rys. 1).



Rys. 1. Gęstość i przeżywalność komórek Caco-2 w różnych fazach wzrostu.

Fig. 1. Density and viability of Caco-2 cells in different growth phases.

Ponadto, we wcześniejszych pracach wykazano, że młoda kultura Caco-2 o dużym tempie proliferacji jest najbardziej odporna na działanie czynników toksycznych [11]. Dlatego do dalszych szczegółowych eksperymentów stosowano kulturę Caco-2 uzyskaną w ciągu 7 dni hodowli w pożywce DMEM wzbogaconej 20-procentowym

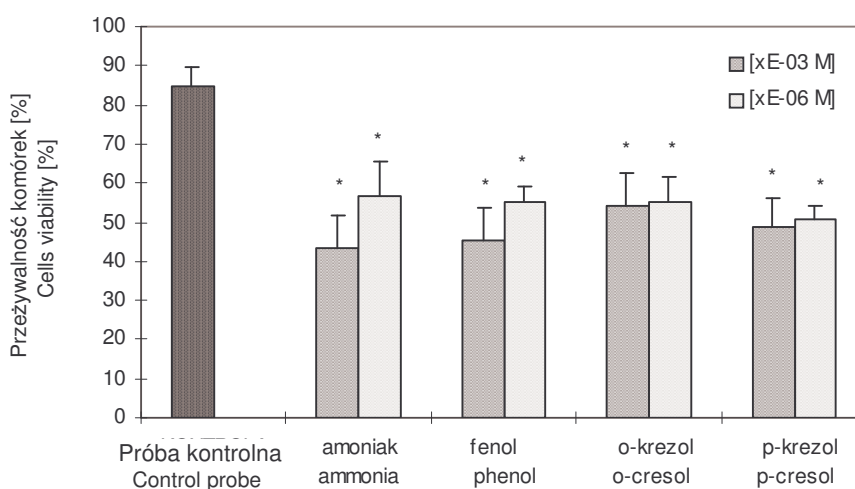
dotądkiem płodowej surowicy bydlęcej, założonej przy inokulum komórkowym wynoszącym $6,25 \times 10^4$ komórek/cm².

Monowarstwę komórek Caco-2 poddawano 8-, 24- i 48-godzinnemu działaniu amoniaku, fenolu, *o*- i *p*-krezolu w stężeniach 10^{-3} i 10^{-6} M. Wykazano brak statystycznie istotnego wpływu czasu ekspozycji kultury na przeżywalność komórek Caco-2. Poziomy istotności różnic pomiędzy żywotnością komórek oznaczoną po różnym czasie inkubacji przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Statystyczna istotność wpływu czasu ekspozycji (8, 24 i 48 h) na przeżywalność komórek Caco-2.
Statistical significance influence of induction time (8, 24 i 48 h) on Caco-2 cells viability.

Stężenie Concentration	Poziom istotności różnic (p<0,05) Statistical significance level (p<0,05)			
	Amoniak Ammonia	Fenol Phenol	<i>o</i> -krezol <i>o</i> -cresol	<i>p</i> -krezol <i>p</i> -cresol
10^{-3} M	0,417	0,457	0,157	0,070
10^{-6} M	0,106	0,858	0,094	0,851



* różnice statystycznie istotne na poziomie p<0,05 w stosunku do próby kontrolnej

* statistically significant differences on p<0,05 level in relation to control probe

Rys. 2. Wpływ wtórnych metabolitów trawienia na przeżywalność kultury Caco-2.

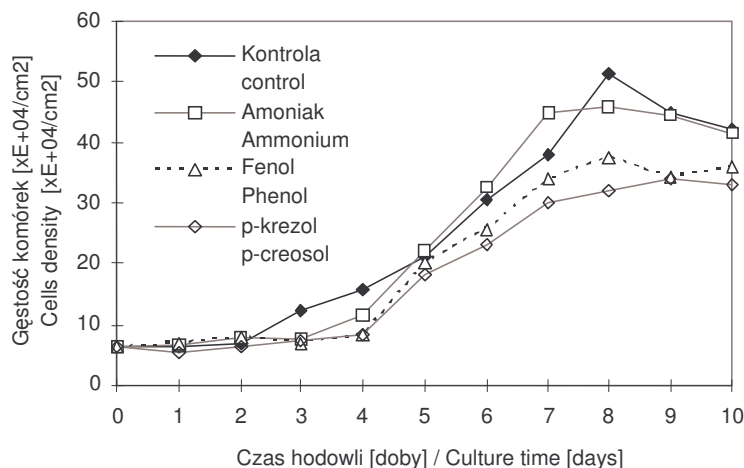
Fig. 2. The influence of digestive metabolites on Caco-2 cell culture viability.

W przeciwieństwie do czasu ekspozycji, stężenie fenolu i amoniaku miało istotne znaczenie dla przeżywalności komórek. Obecność tych związków w hodowli

komórkowej, nawet w niewielkiej ilości wynoszącej 10^{-6} M obniżała ich przeżywalność do poziomu 56%. Natomiast 1000-krotne zwiększenie zawartości amoniaku i fenolu w hodowli Caco-2 powodowało dalszą redukcję żywotności komórek odpowiednio o 13 i 10%. W przypadku *o*- i *p*-krezolu stwierdzono silne oddziaływanie obu badanych stężeń. Różnice statystyczne oszacowano na poziomie wynoszącym odpowiednio: 0,772 i 0,479. Dodatek *p*-krezolu do pożywki hodowlanej wywoływał spadek żywotności komórek do ok. 50%, w przypadku *o*-krezolu do wartości ok. 55%. Średnie przeżywalności kultury Caco-2 inkubowanej w obecności tych związków wskazują, że ich krótkotrwałe oddziaływanie na komórki jelitowe jest bardzo zbliżone (rys. 2). W ich obecności spadek żywotności komórek oszacowano na poziomie ok. 40% przy stężeniu 10^{-3} M i ok. 35% przy stężeniu 10^{-6} M.

Wpływ związków chemicznych na wzrost komórek Caco-2

Kolejnym celem prezentowanej pracy było zbadanie proliferacji komórek Caco-2 poddanych długoterminowemu permanentnemu działaniu związków cytotoksycznych. Hodowlę Caco-2 prowadzono w kompletnej pożywce DMEM, do której dodawano amoniak, fenol, *o*- i *p*-krezol w stężeniu 10^{-6} M. Hodowle Caco-2 zakładano przy inokulum $6,25 \times 10^4$ kom/cm². Krzywe obrazujące wzrost komórek Caco-2 w obecności badanych związków przedstawiono na rys. 3. Parametry hodowli komórkowych przedstawione w tab. 2. wskazują na hamowanie procesu proliferacji komórek przez wszystkie testowane substancje.



Rys. 3. Kinetyka wzrostu komórek Caco-2 w obecności wtórnych metabolitów trawienia.

Fig. 3. Kinetic growth of Caco-2 cells cultured in presence of secondary digestive metabolites.

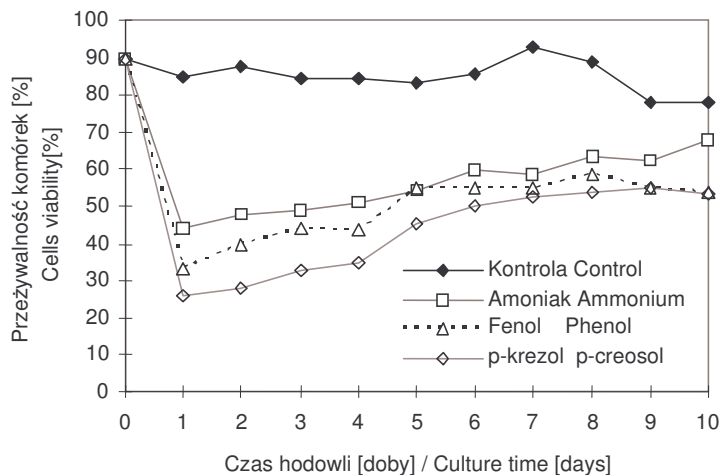
Tabela 2

Parametry wzrostu komórek Caco-2 w obecności badanych związków.
Growth parameters of Caco-2 cells cultured in presence of tested compounds.

Związek chemiczny Compound	Maksymalna gęstość komórek Maximal cell density (± SD)	Żywotność komórek w plateau hodowli Cells viability in culture plateau (± SD)	Czas generacji Generation time (± SD)
	[x10 ⁴ /cm ²]	[%]	[h]
Próba kontrolna Control probe	51,39 (±4,22)	82,5 (±10,45)	55,9 (±5,3)
Amoniak [10 ⁻⁶ M] Ammonia	45,69 (±5,34)	63,5 ±(8,89)	59,7 (±6,1)
Fenol [10 ⁻⁶ M] Phenol	37,63 (±4,20)	63,1 (±9,75)	68,6 (±6,3)
<i>p</i> -krezol [10 ⁻⁶ M] <i>p</i> -cresol	34,00 (±2,14)	55,0 (±7,72)	69,7 (±4,9)

Najbardziej inwazyjne oddziaływanie zaobserwowano w przypadku fenolu i krezoli, których obecność powodowała ograniczenie koncentracji komórek w plateau hodowli o ok. 30% oraz wydłużenie okresu generacji o 13–15 godz. w porównaniu z hodowlą kontrolną prowadzoną bez dodatku czynnika toksycznego. Relatywnie mały efekt przebiegu hodowli obserwowano w obecności amoniaku. W tej hodowli okres niezbędny do podwojenia populacji komórek w logarytmicznej fazie wzrostu był tylko o 4 godz. dłuższy niż w hodowli kontrolnej. Zaobserwowaną odporność kultury Caco-2 na niewielkie stężenie amoniaku (10⁻⁶ M) można tłumaczyć tym, że związek ten jest naturalnym produktem metabolizmu komórkowego, powstającym w erytrocytach na drodze przemian glutaminy [12]. Jego obecność w środowisku hodowlanym z jednej strony powodowała tylko nieznaczne obniżenie maksymalnej gęstości populacji komórkowej, z drugiej strony jednak indukowała 20-procentowy spadek przeżywalności komórek w momencie plateau w stosunku do hodowli kontrolnej. Zmiany żywotności komórek w kolejnych dobach hodowli prowadzonych z dodatkiem testowanych związków przedstawiono na rys. 4.

Badanie efektu działania testowanych związków na proliferację komórek Caco-2 pozwoliło uszeregować je pod względem cytotoxyczności w następującej kolejności: *o*- i *p*-krezol > fenol > amoniak.



Rys. 4. Przeżywalność komórek Caco-2 hodowanych w obecności wtórnych metabolitów trawienia.
Fig. 4. Viability of Caco-2 cells cultured in presence of secondary digestive metabolites.

Badane związki a uszkodzenia DNA komórek Caco-2

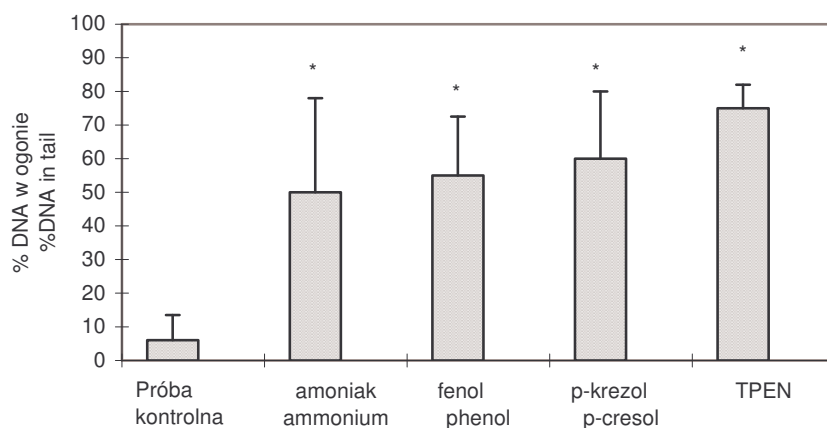
W celu oceny stopnia uszkodzeń DNA powstałych w komórkach pod wpływem badanych związków zastosowano test kometkowy. Metoda kometkowa polega przede wszystkim na analizie poziomu pęknięć jednej lub obu nici DNA oraz wszelkich modyfikacji możliwych do przekształcenia w pęknięcia na drodze chemicznej i enzymatycznej, w komórkach narażonych na działanie czynnika genotoksycznego [10]. Zaletą tej metody jest wysoka czułość i możliwość analizy pojedynczych komórek poprzez bezpośredni pomiar właściwości elektroforetycznych zmodyfikowanego DNA. Przy analizie kometek wzięto pod uwagę parametr opisujący procent DNA znajdujący się w ogonie kometki. Na rys. 5. przedstawiono ten parametr jako średnią arytmetyczną oraz odchylenia standardowe świadczące o stopniu zróżnicowania populacji komórek pod względem wystąpienia kometek.

Analizie kometkowej poddano 7-dniową kulturę Caco-2 po 24-godzinnej ekspozycji na amoniak, fenol i krezol w stężeniu 10^{-6} M oraz TPEN w stężeniu 10^{-5} M.

TPEN (N, N, N', N'-tetrakis (2-pyridylmetylo) etylenodiamina) jest błonowym chelatorem jonów metali, w szczególności jonów cynku, które biorą udział w wielu procesach metabolicznych komórek, regulując śmiertelność oraz częstość ich proliferacji [16]. Wykazano, że jony Zn^{2+} zapobiegają fragmentacji DNA w wielu liniach komórkowych poprzez inhibicję endonukleaz zależnych od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Udowodniono również, że chelatowanie jonów Zn^{2+} zwiększa częstotliwość

występowania apoptozy [7]. Na podstawie analizy kometkowej stwierdzono, że TPEN w stężeniu

10^{-5} M indukował w komórkach Caco-2 uszkodzenia DNA na poziomie 80% (rys. 5).



* różnice statystycznie istotne na poziomie $p < 0,05$ w stosunku do próby kontrolnej

* statistically significant differences on $p < 0,05$ level in relation to control probe

Rys. 5. Parametry kometek uzyskanych w teście SCGE po indukcji produktami trawienia.

Fig. 5. Parameters of comets obtained in single cell gel electrophoresis (SCGE) after induction of digestive metabolites.

Kultura Caco-2 poddawana działaniu tego związku stanowiła zarówno kontrolę pozytywną prawidłowo przeprowadzonego testu kometkowego, jak i punkt odniesienia do oszacowania stopnia dezintegracji DNA zachodzącej w komórkach pod wpływem testowanych substancji. Czystą kulturę Caco-2 niepoddawaną procesowi indukcji wykorzystano jako kontrolę negatywną.

Analiza statystyczna wyników testu kometkowego wykazała, że obliczone parametry kometek obarczone są dużym błędem statystycznym, co świadczy o wysokim stopniu różnorodności subpopulacji komórek w 7-dniowej kulturze Caco-2. Odmienną podatność komórek na działanie czynnika genotoksycznego można tłumaczyć różnym stopniem zróżnicowania komórek w tym etapie hodowli. Młoda 7-dniową kulturę Caco-2 stanowią zarówno komórki będące bezpośrednio po podziale, jak i komórki na dalszym etapie różnicowania w struktury enterocyto-podobne mające na swej powierzchni mikrokosmki jelitowe zorganizowane w rąbek szczoteczki.

Badania wpływu 24-godzinnej ekspozycji kultury Caco-2 na testowane związki, dowiodły, że mogą one uaktywnić procesy prowadzące do programowanej śmierci komórek nabłonka jelitowego. Wszystkie testowane substancje powodowały uszkodzenia DNA, lecz w stopniu niższym niż TPEN (rys. 5). W przypadku badanych

związków, częstość występowania kometek w stosunku do komórek nieuszkodzonych była zdecydowanie mniejsza. Fenol, amoniak oraz krezole były związkami o słabszym działaniu genotoksycznym niż TPEN i prawdopodobnie uszkadzały przede wszystkim te komórki, które poprzez wytworzenie na swojej powierzchni zaczątków mikrokosmków, zdolne są do szybszego wchłaniania. Duże wartości odchyień standardowych średnich wartości parametrów opisujących kometki, podobnie jak przy reakcji z TPEN-em, potwierdziły różny stopień wrażliwości subpopulacji komórek Caco-2 na działanie poszczególnych związków. Biorąc pod uwagę parametr określający procentową zawartość DNA w ogonie kometki uszeregowano badane związki pod względem ich genotoksyczności w następującej kolejności: TPEN > krezol > fenol > amoniak.

Mimo powszechnie znanego silnie toksycznego działania testowanych związków na organizm człowieka prezentowane badania mają charakter nowatorski. W literaturze światowej brak jest doniesień na temat bezpośredniego wpływu toksycznych metabolitów procesu trawienia na jelitowe komórki nabłonkowe. Badania jednostkowego i bezpośredniego oddziaływania tych substancji możliwe są jedynie z wykorzystaniem modeli komórkowych w systemie *in vitro*. Zastosowanie enterocyto-podobnych komórek Caco-2 pozwoliło na określenie stopnia cytotoxycznosci metabolitów trawienia w stężeniach mikromolowych dla ludzkiego nabłonka jelitowego.

Wnioski

1. Przeprowadzone badania wykazały silnie cytotoxyczne oddziaływanie fenolu, krezoli i amoniaku na kulturę komórkową Caco-2 imitującą ludzkie enterocyty.
2. Testowane związki obecne w hodowli w stężeniu mikromolowym znacząco hamowały proliferację komórek Caco-2.
3. Na podstawie analizy kometkowej stwierdzono, że fenol, krezol i amoniak generują uszkodzenia DNA w komórkach enterocyto-podobnych.
4. Badane metabolity trawienia uszeregowano pod względem ich cyto- i genotoksyczności w stosunku do modelowych komórek nabłonka jelitowego w następujący sposób: krezol > fenol > amoniak.

Literatura

- [1] Artursson P., Karlsson J.: Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys., Res. Commun.*, 1991, **175**, 880-885.

- [2] Bernet M.F., Brassart D., Nesser J.R., Servin A.L.: *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 1994, **35**, 483-489.
- [3] Bestwick C.S., Milne L.: Effects of β -carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within post confluent Caco-2 intestinal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1474**, 47-55.
- [4] Blum R., Reniero E.J., Schiffrin R., Crittenden T., Mattila-Salholm A.C., Ouwehand, S., Salminen A., von Wright M., Saarela M., Saxelin K., Collins L.: Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, **10**, 405-410.
- [5] Braun S., Hammerle K., Suda B., Rothen-Rutishauser M., Gunthert S.D., Kramer H., Wunderli-Allenspach H.: Cell cultures as tool in biopharmacy, *European J. Pharm. Sci.*, 2000, **11**, S51-S61.
- [6] Cerquetti M., Serafino A., Sebastianelli A., Mastrantonio P.: Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol. Medic. Microbiol.*, 2002, **32**, 211-218.
- [7] Chimienti F., Seve M., Richard S., Mathieu J., Favier A.: Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, **62**, 2001, 51-62.
- [8] Eckmann L., Kagnoff M.F., Fierer J.: Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends in Microbiology*, 1995, **3** (3), 118-120.
- [9] Hidalgo I., Raub T., Borchardt R.T.: Characterization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 1989, **98**, 736-749.
- [10] Jałoszyński P.: Analiza pęknięć nici DNA metodą elektroforezy pojedynczych komórek (comet assay). W: Przykłady analiz DNA-pod red. R. Słomskiego, Wyd. Akademii Rolniczej, Poznań 2001.
- [11] Karczewski J.M., Noordhoek J.: Toxicity of menadione in the differentiating human colon carcinoma cell line Caco-2. *Toxicology in Vitro*, 1999, **13**, 35-43.
- [12] Keller J.S.: Podstawy fizjologii żywienia człowieka. Wyd. SGGW. Warszawa 2000.
- [13] Kerneis S., Caliot E., Stubbe H., Bogdanova A., Kreehenbuhl J-P., Pringault E.: Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 1119-1124.
- [14] Lee Y.K., Lim C.Y., Teng W.L., Ouwehand A.C., Tuomola E.M., Salminen S.: Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria, *Appl. Environm. Microbiol.*, 2000, **66** (9), 3692-3697.
- [15] Meunier M., Bourrie Y., Berger G., Fabre G.: The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell. Biol. Toxicol.*, 1995, **11**, 187-194.
- [16] Nakatani T., Tawaramoto M., Kennedy D.O., Kojima A., Matsui-Yuasa I.: Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, **125**, 151-163.
- [17] Pinto S., Robine-Leon M.D., Appay M., Keding N., Triadou E., Dussaux B., Lacroix P., Simon-Assmann K., Hafen J., Fogh A., Zweibaum A.: Enterocyte-like differentiation and Polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, 1983, **47**, 323-330.
- [18] Tavelin J., Grasjo J., Taipalensuu G., Ocklind P., Artursson P.: Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport. *Methods in Molecular Biology W: Epithelial Cell Culture Protocols*, Vol.188 -pod red. C. Wise, Humana Press Inc., Totowa 2001, 233-272.
- [19] Todoriki K., Mukai T., Sato S., Toba T.: Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **91**, 1-6.

- [20] Tsuruta Y., Watanabe S., Inoue H.: Fluorimetric determination of phenol and p-cresol in urine by precolumn high-performance liquid chromatography using 4-(N-phthalimidinyl) benzenesulfonyl chloride. *Anal. Biochem.*, 1996, **243**, 86-91.
- [21] Tuomola E.M., Salminen S.J.: Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **41**, 45-51.

THE INFLUENCE OF TOXIC DIGESTIVE METABOLITES ON THE PROLIFERATION AND DNA DAMAGE OF EPITHELIAL INTESTINAL CELLS *IN VITRO*

S u m m a r y

The subject of presented paper was to describe the effect of selected digestive metabolites (ammonia, phenol and cresol), arising while digestive process, on viability and proliferation of human enterocytes *in vitro*. The structural as well as functional similarities to intestinal human enterocytes has resulted in Caco-2 cell line was used in our studies.

Based on determination of cell viability, cell concentration and evaluation of the DNA damages level in the cells exposed to the tested compounds, the cytotoxic and genotoxic effects were investigated. Cell concentration was determined using Neubauer hemocytometer and cell viability was evaluated by trypan blue exclusion dye. For the DNA damage determination, the comet assay was used.

It was proved that upon exposure of Caco-2 cells to relatively low concentrations of all tested metabolites, significant decrease in cell viability and proliferation was observed. According to the findings in this study, the growth inhibitory effect of digestive metabolites on the intestinal cells is due to DNA damages.

Key words: Caco-2, cytotoxicity, phenol, cresol, ammonia, comet assay ☒

GRAŻYNA CICHOSZ, JERZY SZPENDOWSKI, ANDRZEJ J. CICHOSZ,
MARIUSZ KORNACKI

DEGRADACJA PARAKAZEINY W SERACH GOUDA WYPRODUKOWANYCH Z DODATKIEM KULTUR *LACTOBACILLUS*

Streszczenie

Dostępne w dojrzewających serach różnorodne substraty umożliwiają wzrost mikroflory wtórnej, głównie pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*. Pałeczki mlekowe, nie pochodzące z zakwasu, przeżywają pasteryzację mleka dzięki ochronnemu działaniu białka i tłuszczu i dosyć szybko się namnażają, zwłaszcza w mleku poddanym kilkukrotnej obróbce termicznej (termizacja, baktofugacja, ultrafiltracja, pasteryzacja).

Przedmiotem badań były sery Gouda z zastosowaniem zakwasów roboczych, namnażanych w podłożu buforowym. W serach doświadczalnych, oprócz kultur starterowych, zastosowano dodatek pałeczek mlekowych (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*). Sery poddawano analizie chemicznej bezpośrednio po soleniu. Podczas dojrzewania badano zmiany kwasowości, a także stopień degradacji parakazeiny.

Degradacja parakazeiny w wyrobach kontrolnych zachodziła pod wpływem podpuszczki, enzymów syntetyzowanych przez kultury starterowe oraz nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe. Natomiast w doświadczalnych serach Gouda, oprócz pałeczek mlekowych nie pochodzących z zakwasu, aktywne były również szczepy *Lactobacillus* dodane do mleka kotłowego.

Stosowanie pałeczek *Lactobacillus* w technologii sera Gouda pozostaje bez wpływu na kwasowość serów bezpośrednio po wytworzeniu, a także podczas dojrzewania. Stwierdzono znaczne zróżnicowanie zawartości wody w badanych serach: 40,6–42,6%. Porównanie dynamiki degradacji parakazeiny w serach kontrolnych i doświadczalnych możliwe było dzięki odniesieniu zawartości poszczególnych form związków azotowych do zawartości N-ogółem. W doświadczalnych serach Gouda, wyprodukowanych z zastosowaniem pałeczek *Lactobacillus*, stwierdzono większe przyrosty zawartości związków azotowych peptydowych, aminokwasowych i rozpuszczalnych (o prawie 2%) niż w wyrobach kontrolnych. Większa – w porównaniu z pozostałymi wyrobami doświadczalnymi – zawartość związków azotowych aminokwasowych i peptydowych w serach z *L. acidophilus* była konsekwencją wyższej – średnio o 1% – zawartości wody.

Słowa kluczowe: ser Gouda, pałeczki *Lactobacillus*, proteoliza, związki azotowe

Wstęp

W dojrzewających serach dostępne są różnorodne substraty umożliwiające wzrost mikroflory wtórnej, głównie pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* [10, 14, 17]. Niektóre szczepy pałeczek mlekowych przeżywają pasteryzację mleka dzięki ochronnemu działaniu białka i tłuszczu, czym tłumaczy się ich obecność w serach dojrzewających. Pałeczki *Lactobacillus* dość szybko namnażają się w mleku przetrzymywanym w temp. ok. 50°C, tj. podczas baktofugacji, ultrafiltracji oraz dogrzewania gęstwy serowej [19].

Obserwowany podczas dojrzewania serów wzrost pH jest konsekwencją tzw. wtórnej fermentacji zachodzącej pod wpływem pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*. W serze Gouda bakterie mlekowe nie pochodzące z zakwasów (NSLAB) mają korzystniejsze warunki wzrostu niż w serze Cheddar, ze względu na płukanie ziarna, a w konsekwencji wyższą zawartość wody i wyższe pH [12, 16]. Z tego powodu hydroliza parakazeiny w serach typu holenderskiego jest dość intensywna mimo krótkiego czasu dojrzewania.

W uwalnianiu niskocząsteczkowych produktów degradacji parakazeiny – istotnych w kompleksie substancji smakowo-zapachowych – decydującą rolę odgrywają enzymy bakteryjne. Proteinyzy kultur zakwasu hydrolizują β -kazeinę, natomiast peptydazy są aktywne dopiero po autolizie komórek. W odróżnieniu od enzymów syntetyzowanych przez kultury starterowe proteinyzy pałeczek mlekowych w różnym stopniu hydrolizują poszczególne frakcje kazeiny [2, 8, 13]. Szczepy pałeczek mlekowych syntetyzują proteinyzy wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe oraz związane ze ścianą komórkową. Poza tym, pałeczki mlekowe syntetyzują peptydazy o odmiennej, w porównaniu z mezofilnymi paciorkowcami, specyficzności substratowej. Oprócz aminopeptydaz, niektóre pałeczki *Lactobacillus* syntetyzują karboksy-, a także di- i tripeptydazy [11].

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu pałeczek *Lactobacillus* na przyrosty zawartości niskocząsteczkowych produktów degradacji parakazeiny podczas dojrzewania sera Gouda.

Materiał i metody badań

Przedmiotem badań były sery Gouda wyprodukowane z zastosowaniem zakwasów roboczych, Probat 505, namnażanych w podłożu buforowym w temp. 24°C do pH 5,2. W serach doświadczalnych, oprócz kultur starterowych, zastosowano dodatek wybranych szczepów pałeczek mlekowych *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* w postaci głęboko mrożonych koncentratów bakterii. Poziomą inokulację mleka kotłowego pałeczkami *Lactobacillus* był dwukrotnie mniejszy niż mezofilnymi paciorkowcami mlekowymi. Wszystkie kultury pochodziły z firmy Danisco Ingredients Poland.

Będące przedmiotem badań sery produkowano w warunkach przemysłowych (SM „Mlepol” w Grajewie, Zakład „Kurpianka” w Kolnie). Zgodnie z zakładową instrukcją technologiczną sery produkowano na linii ciągłej Cassomatic z mleka klasy

I i extra poddanego termizacji, baktofugacji i pasteryzacji, stosowano dodatek CaCl_2 i KNO_3 oraz preparat koagulujący Chymax.

Bezpośrednio po soleniu sery poddawano analizie chemicznej, oznaczając: kwasowość (pH), zawartość wody, zawartość tłuszczu i zawartość NaCl.

W serach po soleniu oraz po 4 i 6 tygodniach dojrzewania analizowano stopień degradacji parakazeiny, oznaczając zawartość: związków azotowych ogółem [9], związków azotowych rozpuszczalnych w pH 4,6 wg Sode Morgensena [9], związków azotowych peptydowych wg Boulanger i wsp. w roztworze związków azotowych niebiałkowych przygotowanym wg metody Schobera i wsp. [9] oraz związków azotowych aminokwasowych metodą Sirksa [9].

Wyniki i dyskusja

Stwierdzono znaczne zróżnicowanie zawartości wody w badanych serach: od 40,6 do 42,6% (tab. 1). Najmniejsze zróżnicowanie stwierdzono w serach wyprodukowanych z udziałem *L. casei* (0,1%), największe natomiast w serach z dodatkiem *L. acidophilus* (1,7%). Konsekwencją zróżnicowanej zawartości wody były różnice w zawartości tłuszczu i NaCl. Z kolei, skutkiem zróżnicowanego składu chemicznego były zmiany kwasowości – odmienne w poszczególnych serach. Spadek kwasowości podczas dojrzewania wyrobów kontrolnych był porównywalny.

Tabela 1

Skład chemiczny i kwasowość (pH) serów Gouda podczas dojrzewania.
Chemical composition and acidity (pH) of Gouda cheeses during ripening.

Symbol wyrobu Product code	Skład chemiczny po soleniu Chemical composition after brining			Kwasowość / Acidity (pH)				
	Zawartość wody Water content [%]	Tłuszcz w s.m. Fat in d.m. [%]	NaCl [%]	Po prasowaniu After pressing	Po soleniu After brining	Po 4 tygodniach After 4 weeks	Po 6 tygodniach After 6 weeks	
kontrolne	A	40,90	45,60	1,49	5,22	5,25	5,36	5,49
	B	41,10	46,80	1,40	5,18	5,28	5,40	5,45
	C	40,70	47,10	1,25	5,24	5,36	5,4	5,47
<i>L. casei</i>	D	40,90	47,30	1,17	5,15	5,30	5,42	5,50
	E	40,80	47,90	1,12	5,43	5,43	5,48	5,51
	F	40,80	46,50	1,46	5,51	5,42	5,45	5,58

c.d. Tab. 1

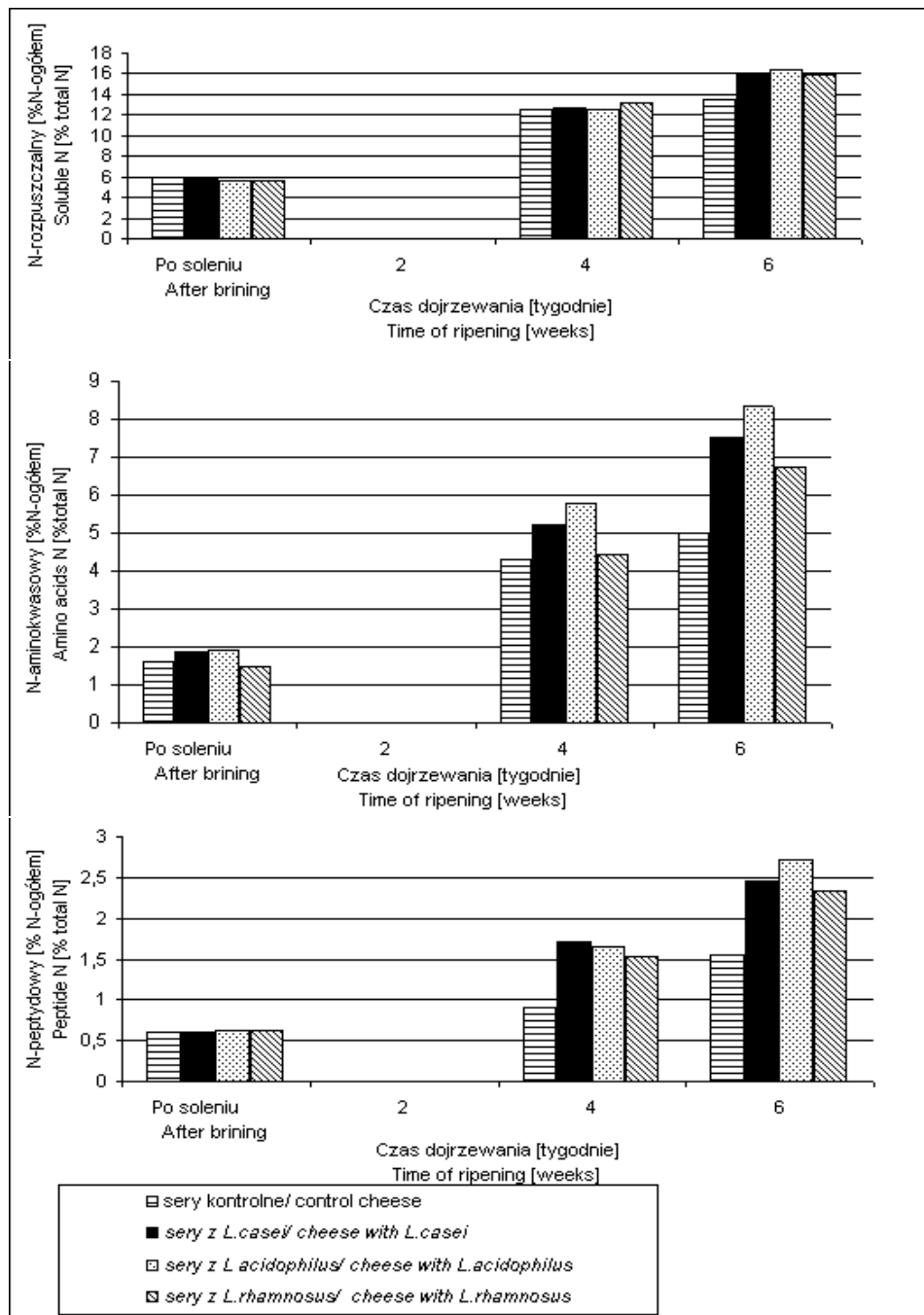
<i>L. acidophilus</i>	G	40,90	47,30	1,17	5,38	5,44	5,49	5,56
-----------------------	---	-------	-------	------	------	------	------	------

	H	42,00	45,70	1,31	5,38	5,42	5,43	5,45
	I	42,60	46,20	1,31	5,43	5,40	5,47	5,49
<i>L. rhamnosus</i>	J	41,40	46,30	1,46	5,44	5,39	5,46	5,52
	K	40,60	47,10	1,37	5,47	5,45	5,49	5,56
	L	40,80	46,40	1,22	5,53	5,33	5,38	5,42

Wyroby doświadczalne wyprodukowane z dodatkiem kultur *L. acidophilus* i *L. rhamnosus* charakteryzowały się podobną kwasowością po soleniu oraz po 6 tygodniach dojrzewania. Natomiast wyroby z udziałem *L. casei*, mimo znacznego zróżnicowania pH po prasowaniu, charakteryzowały się podobną kwasowością zarówno po 4, jak i po 6 tygodniach dojrzewania (tab. 1).

Porównanie dynamiki degradacji parakazeiny w serach kontrolnych i doświadczalnych możliwe było dzięki odniesieniu zawartości poszczególnych form związków azotowych do zawartości N-ogółem.

W serach kontrolnych bezpośrednio po soleniu związki azotowe rozpuszczalne stanowiły największy odsetek N-ogółem – średnio 5,93%. W wyrobach doświadczalnych z udziałem *L. casei*, *L. acidophilus* oraz *L. rhamnosus* N-rozpuszczalny stanowił odpowiednio: 5,74; 5,69 i 5,61% N-ogółem. Średnie przyrosty zawartości N-rozpuszczalnego po 4 tygodniach dojrzewania były najmniejsze w serach kontrolnych (212%), a największe w serach z dodatkiem *L. rhamnosus* (237,3%). Po 6 tygodniach dojrzewania w serach kontrolnych oraz doświadczalnych wyprodukowanych z udziałem *L. casei* i *L. rhamnosus* zawartość N-rozpuszczalnego wynosiła odpowiednio: 13,44; 16,07 oraz 15,84% N-ogółem. Najwyższą zawartość N-rozpuszczalnego: 16,37% N-ogółem stwierdzono w serach z *L. acidophilus* (rys. 1). Również zawartość N-aminokwasowego w odniesieniu do N-ogółem bezpośrednio po soleniu była wyższa w serach z *L. casei* i *L. acidophilus* niż w pozostałych. Po 4 tygodniach dojrzewania największą zawartość N-aminokwasowego stwierdzono w serach z *L. acidophilus* – 5,8% N-ogółem. W pozostałych wyrobach doświadczalnych zawartość N-aminokwasowego była znacznie niższa. Między 4. a 6. tygodniem dojrzewania stwierdzono większe tempo przyrostu zawartości N-aminokwasowego niż podczas pierwszych 4 tygodni. Największą zawartość związków azotowych aminokwasowych stwierdzono w serach wyprodukowanych z dodatkiem *L. acidophilus* (8,35% N-ogółem). W serach kontrolnych N-aminokwasowy stanowił 4,99% a w pozostałych doświadczalnych – 7,52 i 6,72% N-ogółem (rys. 1).



Rys. 1. Degradacja parakazeiny podczas dojrzewania sera Gouda (n = 3).

Fig. 1. Paracasein degradation during gouda cheese ripening (n = 3).

Bezpośrednio po wyrobie zawartość N-peptydowego była porównywalna we wszystkich serach (0,60-0,63% N-ogółem). Podczas dojrzewania stwierdzono jednak zróżnicowane przyrosty tej formy związków azotowych. W wyrobach kontrolnych

zawartość N-peptydowego po 4 tygodniach dojrzewania była najniższa (0,91% N-ogółem). Natomiast w wyrobach doświadczalnych wynosiła od 1,54 do 1,72% N-ogółem. Największe przyrosty zawartości N-peptydowego podczas 4 tygodni dojrzewania stwierdzono w serach z dodatkiem *L. casei* (285%) mniejsze (odpowiednio 260 i 246%) w serach z udziałem *L. acidophilus* i *L. rhamnosus*. Dynamika formowania N-peptydowego między 4. i 6. tygodniem dojrzewania badanych serów była większa niż w początkowym etapie. Między 4. i 6. tygodniem dojrzewania przyrost ilości związków azotowych peptydowych był nieznacznie mniejszy niż podczas pierwszych 4 tygodni dojrzewania. Największą zawartość N-peptydowego (2,72% N-ogółem) stwierdzono w serach wyprodukowanych z *L. acidophilus*. Najmniej N-peptydowego zawierały sery kontrolne (1,55% N-ogółem). Również procentowe przyrosty zawartości N-peptydowego podczas 6 tygodni dojrzewania były największe w serach z udziałem *L. acidophilus* (432,5%), najmniejsze w wyrobach kontrolnych (340%) (rys. 1).

Większa dynamika formowania N-aminokwasowego i N-peptydowego w ostatnim etapie dojrzewania sera Gouda była możliwa dzięki obecności wysokocząsteczkowych peptydów powstałych wskutek aktywności podpuszczki (N-rozpuszczalny) [15]. Analogiczne rezultaty uzyskiwali również inni autorzy, oceniając dynamikę dojrzewania sera Cheddar [7, 18]. Poza tym, w końcowych etapach dojrzewania miała miejsce autoliza zarówno kultur starterowych, jak też zastosowanych w wyrobie sera pałeczek *Lactobacillus*. Większy stopień autolizy stwierdzono w przypadku termofilnych pałeczek *L. acidophilus* niż pałeczek mezofilnych (*L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*) [4]. Jednocześnie z autolizą pałeczek *Lactobacillus* zastosowanych w technologii sera Gouda miał miejsce wzrost nie pochodzących z zakwasu bakterii mlekowych [NSLAB]. W serach wyprodukowanych z dodatkiem *L. acidophilus*, oprócz peptydaz uwolnionych po autolizie kultur zakwasu i pałeczek *Lactobacillus*, aktywne były także szczepy bakterii mlekowych nie pochodzących z zakwasu [NSLAB], co również miało wpływ na intensyfikację proteolizy podczas dojrzewania [4].

Konsekwencją zastosowania w wyrobie sera Gouda pałeczek *Lactobacillus* były zróżnicowane – praktycznie nieporównywalne – cechy sensoryczne sera [3]. Zatem stosując w technologii serów dojrzewających, oprócz kultur starterowych, dodatek wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus* można jednocześnie intensyfikować proteolizę oraz modyfikować cechy sensoryczne, zgodnie z preferencjami konsumentów [1, 5, 6].

Wnioski

1. Stosowanie pałeczek *Lactobacillus* w technologii sera Gouda pozostaje bez wpływu na kwasowość serów bezpośrednio po wyrobie, a także podczas dojrzewania.
2. W doświadczalnych serach Gouda wyprodukowanych z dodatkiem pałeczek *Lactobacillus* stwierdzono większe przyrosty zawartości związków azotowych

- peptydowych, aminokwasowych, a także rozpuszczalnych (o prawie 2%) niż w wyrobach kontrolnych.
3. Większa – w porównaniu z pozostałymi wyrobami doświadczalnymi – zawartość związków azotowych aminokwasowych i peptydowych w serach z udziałem *L. acidophilus* była konsekwencją wyższej zawartości wody – średnio o 1%.

Pracę zrealizowano w ramach grantu KBN 6P06T01321

Literatura

- [1] Beernink G., Northolt M.: Investigation of the proteolytic properties of *Lactobacilli* to obtain new cheese flavour. FEMS Microbiol., 1990, **B 19**.
- [2] Bromme M. C., Hickey M. W.: Proteinase activity of non – starter lactobacilli. Austr. J. Dairy Technol., 1990, **5**, 12-18.
- [3] Cichosz G., Tomera K., Kornacki M., Borejszo Z.: Wpływ kultur probiotycznych na jakość sensoryczną serów typu holenderskiego. Przegl. Mlecz., 2004, **1**, 10-15.
- [4] Cichosz G., Kłębukowska L., Cichosz A. J., Kornacki M.: The effect of *Lactobacillus* addition on proteolysis in Gouda cheese during ripening. Milchwiss. (w druku).
- [5] El Soda M.: The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. FEMS Microbiol. Rev., 1993, **12**, 239-252.
- [6] Exterkate F.A., Altig A. C.: The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acid in Gouda cheese. Int. Dairy J., 1995, **5**, 15-28.
- [7] Fox P.F., Law J., Sweeney P. Z. H., Wallace J.: Biochemistry of cheese ripening. Elsev. Appl. Sci., London, 1993, pp. 389-438.
- [8] Frey J. P., Marth E.H., Johnson E. M., Olson N. F.: Peptidases and proteases of *Lactobacilli* associated with cheese. Milchwiss., 1986, **41**, 622-624.
- [9] Heldrich K.: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Inc, Arlington, Virginia 1990.
- [10] Jordan K.N., T. Cogan M.: Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish cheddar cheese. Irish J. Agric. Food Res., 1993, **32**, 47-55.
- [11] Khalid N.M., Marth E.H.: *Lactobacilli* - Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A review. J.Dairy Sci., 1990, **73**, 2669-2684.
- [12] Lane C.N., Walsh E.M., Folkerstma B., Mc. Sweeney P.L., Fox P.F.: Effect of compositional and environmental factors on the growth of lactobacilli in Cheddar cheese. Bull. IDF, 1996, **317**, 34-43.
- [13] Lane C.N., Fox. P.F.: Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese during ripening. Int. Dairy J., 1996, **6**, 715-728.
- [14] Martley F.G., Crow V.L.: Interactions between Non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. Int. Dairy J., 1993, **3**, 461-483.
- [15] Mc Sweeney P.L.H., Olson N.F., Fox P.F.: Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. J. Dairy Sci., 1992, **75 Suppl.**, 121.
- [16] Olson N.F.: The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. FEMS Microbiol.Rev., 1990, **87**, 131-148.
- [17] Peterson S. D., Marshall R. T.: Nonstarter *Lactobacilli* in cheddar cheese a review. J. Dairy Sci., 1990, **73**, 1395-1410.
- [18] Puchades R., Lemieux L., Simard R.E.: Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. J. Food Sci., 1989, **54**, 885-888.
- [19] Van der Berg G., Exterkate F.A.: Technological parameters involved in cheese ripening. Int. Dairy J., 1993, **3**, 458-507.

**PARACASEIN DEGRADATION IN GOUDA CHEESES PRODUCED WITH
LACTOBACILLUS CULTURE**

S u m m a r y

Ready to be utilised various substrates in ripening cheeses make possible growing of secondary microflora, especially lactobacilli strains. Due to protection effect of fat and protein Non-starter lactic acid bacteria survive pasteurisation of milk and start growing up quite quickly, especially in milk heat treated several times (termisation, bactofugation, ultrafiltration, pasteurisation).

The subject of examination was Gouda cheese, that was produced from milk after all the above mentioned heat treatments with use of working leaven multiplied in buffer base. During this experiment besides starter cultures addition of selected lactobacilli (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*) was used for experimental cheese production. Cheeses were exposed to chemical analysis immediately after salting. Changes of acidity and extend of paracasein degradation (soluble N, amino acid N and peptide N) was determined during the cheese ripening.

Paracasein degradation in control cheese took place under the influence of rennet, enzymes synthesised by starter cultures and non-starter lactic acid bacteria. However in the experimental Gouda cheese except non-starter lactic acid bacteria, *Lactobacillus* strains added to cheese milk were also active. Addition of lactobacilli for Gouda cheese production had no influence on cheese acidity immediately after manufacturing and during ripening. Considerable differences in water content (40.6 – 42.6%) were found. Comparison of paracasein degradation dynamics in control and experimental cheese was possible due to referring separate forms of nitrogen compounds content to total N content. Higher increases (about 2%) of peptide N, amino acid N and soluble N compounds content were determined in experimental cheese produced with *Lactobacillus* strains addition than in control ones. Higher, in comparison to the rest experimental cheeses, content of amino acid N and peptide N compounds in cheeses with *L. acidophilus* resulted of the higher (on average of 1%) content of water.

Key words: Gouda cheese, *Lactobacillus*, proteolysis, nitrogen compounds ☒

GRAŻYNA CICHOSZ, MARIUSZ KORNACKI, MARTA GICZEWSKA,
ANETA KONOPKA

AKTYWNOŚĆ PEPTYDAZOWA WYBRANYCH SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS*

Streszczenie

W degradacji parakazeiny do niskocząsteczkowych związków azotowych oraz w generowaniu smaku i zapachu sera Gouda bardziej istotne od peptydaz, uwalnianych po autolizie kultur zakwasu, okazały się nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe. Zastosowanie w technologii serowarskiej wyselekcjonowanych szczepów pałeczek mlekowych ogranicza wzrost pałeczek nie pochodzących z zakwasu, a jednocześnie umożliwia intensyfikację i modyfikację cech sensorycznych sera. Warunkiem niezbędnym stosowania pałeczek *Lactobacillus* w technologii serów dojrzewających jest poznanie ich aktywności peptydazowej.

Celem podjętych badań była ocena aktywności amino- oraz dipeptydaz wybranych szczepów *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*).

Będąc przedmiotem badań szczepy *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy hydrolizujące preferencyjnie podobne substraty. Dominującą grupą peptydaz, w przypadku wszystkich szczepów, były aminopeptydazy. Aminopeptydazy syntetyzowane przez poszczególne szczepy pałeczek mlekowych hydrolizowały wszystkie zastosowane w doświadczeniu substraty. Jednak każdy szczep charakteryzował się różnym poziomem aktywności poszczególnych aminopeptydaz (od 3,00 do 13,75 JA). Porównując aktywność dipeptydaz syntetyzowanych przez badane szczepy *Lactobacillus* stwierdzono, że większość zastosowanych w doświadczeniu substratów, typowych dla bakterii fermentacji mlekowej, była hydrolizowana – jednak w różnym stopniu (od 1,08 do 7,25 JA).

Najwyższą aktywnością, zarówno amino- jak też dipeptydaz, charakteryzował się szczep *L. casei*. Oceniany szczep *L. acidophilus* syntetyzował aminopeptydazy o prawie 2-krotnie mniejszej aktywności w porównaniu z pozostałymi szczepami oraz dipeptydazy o aktywności mniejszej niż w przypadku *L. casei*, ale porównywalnej z *L. casei* ssp. *rhamnosus*.

Wysoka aktywność peptydazowa badanych szczepów *Lactobacillus* świadczy o ich potencjalnej przydatności w technologii serów dojrzewających.

Słowa kluczowe: aminopeptydazy, dipeptydazy, *Lactobacillus*

Wstęp

Dominującą mikroflorą serów dojrzewających są pałeczki *Lactobacillus* [2, 19]. Aktywność peptydaz syntetyzowanych przez nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe w większym stopniu niż aktywność wewnątrzkomórkowych peptydaz, uwalnianych po autolizie kultur zakwasu, determinuje cechy sensoryczne serów [18]. Znaczenie pałeczek *Lactobacillus* w generowaniu smaku i zapachu jest szczególnie istotne w serach otrzymywanych z mleka poddanego kilkukrotnej obróbce cieplnej [21].

Aktywność proteolityczna pałeczek jest większa niż mezofilnych paciorkowców mlekowych [11, 17]. Niezależnie od zakresu peptydolizy istotna jest również specyficzność substratowa peptydaz. Niskocząsteczkowe peptydy i wolne aminokwasy w zależności od masy cząsteczkowej i hydrofobowości mogą być przyczyną goryczki serów [13]. Wybrane szczepy pałeczek *Lactobacillus* mogą być przydatne do maskowania goryczki serów dojrzewających [7, 10], a także intensyfikacji smaku i zapachu serów o obniżonej zawartości tłuszczu [1, 3].

W degradacji parakazeiny do niskocząsteczkowych związków azotowych, a także w generowaniu smaku i zapachu sera Gouda, bardziej istotne od peptydaz uwalnianych po autolizie kultur zakwasu okazały się nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe [5, 6].

Jednak warunkiem niezbędnym stosowania wybranych szczepów pałeczek mlekowych w technologii serów dojrzewających jest poznanie specyficzności substratowej peptydaz przez nie syntetyzowanych. Podjęte badania miały na celu ocenę specyficzności substratowej amino- oraz dipeptydaz syntetyzowanych przez szczepy *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*.

Materiał i metody badań

Głęboko mrożone koncentraty bakterii *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus* (prod. Danisco Ingredients) poddano dezintegracji mechaniczno-ciśnieniowej (dezintegrator Biotex X-25, Sweden). W ekstrakcie enzymatycznym (otrzymanym po rozpuszczeniu zdeintegrowanej biomasy w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0 w stosunku 1:4 i odwirowanym przy 5500 g/15 min) oznaczano:

- aktywność specyficzną aminopeptydaz metodą Requena i wsp. [20] wobec substratów: δ -Glu-p-Na, Arg-p-NA, Leu-p-NA, Ala-p-NA, Glu-p-NA, Lys-p-NA, Pro-p-NA i Gly-p-NA;
- aktywność specyficzną dipeptydaz wg zmodyfikowanej metody Cd-ninhydrinowej [20, 12] wobec substratów: Ala-Ala, Ala-Pro, Leu-Leu, Pro-Ala, Gly-Tyr, Leu-Gly, Tyr-Phe, Ala-Phe, Phe-Ala, Tyr-Leu;
- Zawartość białka metodą Lowry'ego [15].

Jednostkę aktywności specyficznej definiowano jako zmianę ekstynkcji o 0,1 w czasie 1 min reakcji w temp. 30°C, w przeliczeniu na 1 mg białka enzymatycznego, przy długości fali 410 nm (aminopeptydazy) lub 570 nm (dipeptydazy).

Obliczano średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń, a także średnią aktywność amino- i dipeptydaz syntetyzowanych przez badane szczepy *Lactobacillus*.

Aktywność względną peptydaz [%] wyliczano w stosunku do najbardziej aktywnego enzymu syntetyzowanego przez badany szczep *Lactobacillus*.

Wyniki i dyskusja

Badając aktywność aminopeptydaz syntetyzowanych przez *L. acidophilus* stwierdzono, że żaden enzym nie wykazał średniej aktywności powyżej 10 J.A (rys. 1). Trzy enzymy charakteryzowały się średnią aktywnością mniejszą niż 5 J.A., pozostałe hydrolizowały odpowiednie substraty w zakresie: od 5,1 J.A. do 8,65 J.A. W największym stopniu hydrolizowany był Leu-p-Na oraz Glu-p-Na. Najmniejszą (ok.

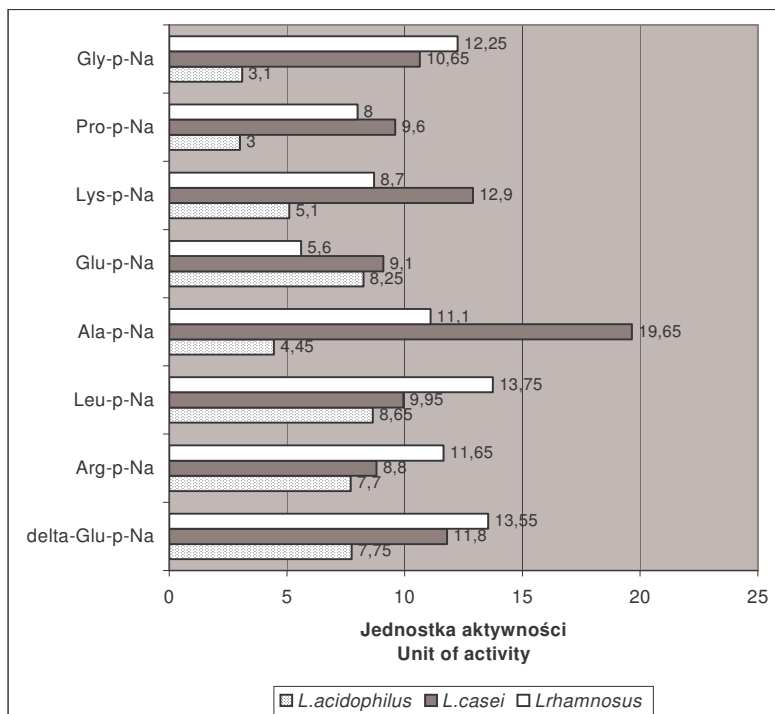
35% aktywności względnej) aktywność wykazały enzymy hydrolizujące Pro-p-Na i Gly-p-Na (tab. 1).

Tabela 1

Aktywność względna aminopeptydaz [%].
Relative activity of aminopeptidases [%].

Substrat Substrate	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>rhammosus</i>
Gly-p-Na	35,84	54,20	89,09
Pro-p-Na	34,68	48,85	58,18
Lys-p-Na	58,96	65,65	63,27
Glu-p-Na	95,37	46,31	40,73
Ala-p-Na	51,44	100	80,73
Leu-p-Na	100	50,64	100
Arg-p-Na	89,02	44,78	84,73
δ -Glu-p-Na	89,59	60,05	98,54

Aminopeptydazy syntetyzowane przez *L. casei* charakteryzowały się zdecydowanie większą aktywnością niż enzymy *L. acidophilus* (rys. 1). W przypadku peptydazy hydrolizującej: Ala-p-Na różnica była ponad czterokrotna, a w przypadku Gly-p-Na i Pro-p-Na około trzykrotna. Większą aktywność wykazały także aminopeptydazy hydrolizujące Leu-p-Na, δ -Glu-p-Na oraz Lys-p-Na, a zbliżoną Glu-p-Na oraz Arg-p-Na. W największym stopniu hydrolizowany był substrat Ala-p-Na (100% aktywności względnej). W przypadku Lys-p-Na oraz δ -Glu-p-Na stwierdzono aktywność względną powyżej 60%, w przypadku Gly-p-Na i Leu-p-Na powyżej 50%. Aktywność względna wobec pozostałych substratów była również wysoka – ok. 40% (tab. 1).



Rys. 1. Aktywność aminopeptydaz syntetyzowanych przez kultury *Lactobacillus*.

Fig. 1. Activity of aminopeptidases synthesised by *Lactobacillus* cultures.

Między aktywnością aminopeptydaz syntetyzowanych przez *L. casei* ssp. *rhamnosus* oraz *L. casei* różnicowanie było zdecydowanie mniejsze niż między *L. casei* i *L. acidophilus*. Największą aktywność w przypadku *L. casei* ssp. *rhamnosus* stwierdzono w przypadku enzymu hydrolizującego Leu-p-Na i δ -Glu-p-Na (rys. 1). Aktywność pozostałych aminopeptydaz była dość wysoka, ponad 80% w przypadku Arg-p-Na, Ala-p-Na i Gly-p-Na oraz 40 – 60% wobec pozostałych substratów (tab. 1).

Aminopeptydazy syntetyzowane przez badane szczepy pałeczek mlekowych hydrolizowały wszystkie zastosowane w doświadczeniu substraty. Jednakże każdy z badanych szczepów charakteryzował się zróżnicowaną aktywnością poszczególnych peptydaz. Największą aktywność (od 8,8 do 19,65 J.A.) stwierdzono w przypadku aminopeptydaz szczepu *L. casei*, natomiast najmniejszą (od 3,0 do 8,65 J.A.) w przypadku *L. acidophilus*. (rys. 1). Średnie aktywności aminopeptydaz syntetyzowanych przez *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus* wynosiły: 6,00; 11,56 i 10,57 J.A.

Aktywność dipeptydaz *L. acidophilus* zawierała się w zakresie od 2,5 (Leu-Leu) do 4,42 J.A. (Leu-Gly) (rys. 2). Konsekwencją tego było również niewielkie różnicowanie aktywności względnej. W stosunku do stopnia hydrolizy Leu-Gly (100% aktywności względnej) cztery enzymy wykazały aktywność względną powyżej 70%, trzy enzymy powyżej 60% i jeden powyżej 50%. Badany szczep *L. acidophilus* nie syntetyzował dipeptydazy hydrolizującej Ala-Ala (tab. 2).

Tabela 2

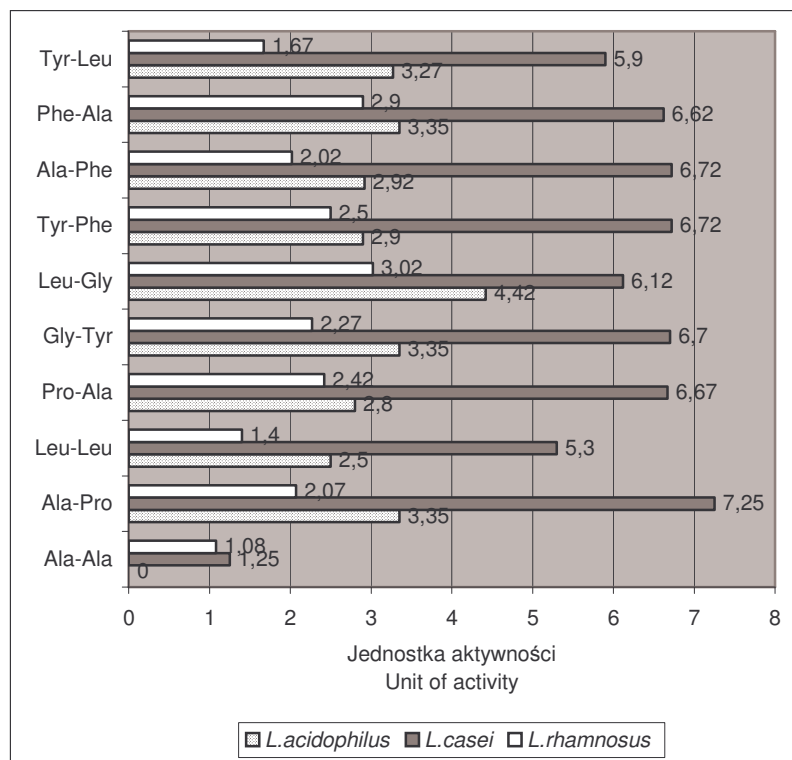
Aktywność względna dipeptydaz [%].
Relative activity of dipeptidases [%].

Substrat Substrate	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>
Tyr-Leu	73,98	81,38	55,30
Phe-Ala	75,79	91,31	96,03
Ala-Phe	66,06	92,69	66,88
Tyr-Phe	65,61	92,69	82,78
Leu-Gly	100	84,41	100
Gly-Tyr	75,79	92,41	75,16
Pro-Ala	63,35	92,00	80,13
Leu-Leu	56,56	73,10	46,36
Ala-Pro	75,79	100	68,54
Ala-Ala	0,00	17,24	35,76

Aktywność dipeptydaz *L. casei* (z wyjątkiem peptydazy hydrolizującej Ala-Ala) zawierała się w przedziale od 5,3 do 7,25 J.A. (rys. 2). W związku z tym także aktywność względna peptydaz różniła się nieznacznie (tab. 2).

Najmniejszą aktywnością dipeptydaz (średnio 2,13 J.A.) charakteryzował się szczep *L. casei* ssp. *rhamnosus*. Zróżnicowanie aktywności względnej dipeptydaz w przypadku *L. casei* ssp. *rhamnosus* było większe niż pozostałych szczepów *Lactobacillus* i wynosiło od 35,76% (Ala-Ala) do 96,03% (Phe-Ala). Większość peptydaz charakteryzowała się wysoką aktywnością względną: cztery enzymy powyżej 70% i dwa enzymy powyżej 60% (tab. 2).

Porównując aktywność dipeptydaz syntetyzowanych przez badane szczepy pałeczek mlekowych stwierdzono, że większość zastosowanych w doświadczeniu substratów, typowych dla bakterii fermentacji mlekowej, była hydrolizowana, jednak w różnym stopniu. Poszczególne enzymy syntetyzowane przez różne szczepy *Lactobacillus* charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością specyficzną. Najwyższą średnią aktywnością charakteryzowały się dipeptydazy syntetyzowane przez *L. casei*, najniższą natomiast dipeptydazy *L. casei* ssp. *rhamnosus*. Średnie aktywności dipeptydaz syntetyzowanych przez *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus* wynosiły: 3,21; 5,92 i 2,13 J.A.



Rys. 2. Aktywność dipeptydaz syntetyzowanych przez kultury *Lactobacillus*.

Fig. 2. Activity of dipeptidases synthesised by *Lactobacillus* cultures.

Spośród badanych szczepów pałeczek *Lactobacillus* największą aktywnością – zarówno amino- jak i dipeptydaz – charakteryzował się szczep *L. casei*. Średnia aktywność aminopeptydaz *L. casei* była ok. dwukrotnie większa od średniej aktywności aminopeptydaz *L. acidophilus* i porównywalna ze średnią aktywnością aminopeptydaz *L. casei* ssp. *rhamnosus* (tab. 1). Natomiast średnia aktywność dipeptydaz *L. casei* była większa od średniej aktywności dipeptydaz *L. acidophilus* (ok. 1,8-krotnie) oraz *L. casei* ssp. *rhamnosus* (2,8-krotnie) (tab. 2).

W odróżnieniu od mezofilnych paciorkowców mlekowych (stosowanych jako kultury starterowe) pałeczki mlekowe z rodzaju *Lactobacillus* charakteryzują się wysoką stabilnością biochemiczną. Podstawowe cechy tych kultur są kodowane w DNA chromosomalnym, a nie plazmidowym, jak w przypadku paciorkowców [14]. Dlatego też, stosując w wyrobie sera pałeczki *Lactobacillus*, których aktywność proteolityczna i peptydolityczna jest relatywnie wysoka, można spodziewać się intensyfikacji proteolizy [8, 9].

Należy jednak uwzględnić fakt, że oprócz kultur zakwasu i zastosowanych w procesie technologicznym szczepów *Lactobacillus*, w dojrzewającym serze są jednocześnie aktywne liczne szczepy tzw. mikroflory wtórnej (niepochodzące z zakwasu pałeczki *Lactobacillus*, enterokoki, bakterie propionowe), a także technologicznie szkodliwej (bakterie fermentacji masłowej oraz z grupy coli). Wprawdzie zastosowanie pałeczek *Lactobacillus*, oprócz kultur starterowych, ogranicza w pewnym stopniu wzrost mikroflory wtórnej, jednak nie eliminuje jej całkowicie [8, 10, 16].

Poza tym istotny w przebiegu peptydolizy jest zarówno dostęp do odpowiednich substratów, jak też stopień autolizy mikroflory obecnej w masie sera. Po autolizie, oprócz peptydaz zewnątrzkomórkowych i związanych z membraną cytoplazmatyczną, aktywne są również enzymy wewnątrzkomórkowe [4, 6, 11].

Wnioski

Będąc przedmiotem badań szczepy *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy o podobnej specyficzności substratowej, jednak o zróżnicowanej aktywności:

1. Dominującą grupą peptydaz, w przypadku wszystkich badanych szczepów *Lactobacillus*, były aminopeptydazy.
2. Najwyższą aktywnością zarówno amino- jak i dipeptydaz charakteryzował się szczep *L. casei*.
3. Oceniany szczep *L. acidophilus* syntetyzował aminopeptydazy o prawie dwukrotnie mniejszej aktywności w porównaniu z pozostałymi kulturami oraz dipeptydazy o aktywności mniejszej niż w przypadku *L. casei*, ale porównywalnej z *L. casei* ssp. *rhamnosus*.

Pracę zrealizowano w ramach grantu KBN 6PO6T01321

Literatura

- [1] Arora G., Lee B.H.: Comparative studies on peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. J. Dairy Sci., 1990, **73**, 274-279.
- [2] Bockelman W.: The proteolytic system of starter and non-starter bacteria: components and their importance for cheese ripening. Int. Dairy J., 1995, (5), 977-994.
- [3] Beernink G., Northolt M.: Investigation of the proteolytic properties of *Lactobacilli* to obtain new cheese flavour. FEMS Microbiol., 1990, **B 19**.
- [4] Christensen J. E., Dudley E. G., Pederson J. A., Steele J. L.: Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, **76**, 217-246.
- [5] Cichosz G., Zalecka A., Kornacki M.: The effect of paracasein degradation on sensory properties of Gouda cheese. Nahrung/Food, 2003, (47), 383-387.
- [6] Cichosz G., Zalecka A., Lenkiewicz M.: The influence of streptococci and lactobacilli on proteolysis in Gouda cheese. Milchwiss., 2003, (58), 297-300.
- [7] El Abboudi M., El-Soda M., Pandian S., Barreau M., Trepanier G., Simard R.E.: Peptidase activities in debittering and nondebittering strains of *Lactobacilli*. Int. Dairy J., 1991, **1**, 55-64.
- [8] El-Soda M.: The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. FEMS Microbiol. Rev., 1993, **12**, 239-252.
- [9] El-Soda M., Ezzat N.: Peptidase and esterase activities from mutant strains of *Lactobacillus casei*. Nahrung/Food, 1993, **37**, 321-327.
- [10] Gomez M.J., Gaya P., Nunez M., Medina M.: Debittering activity of peptidases from selected lactobacilli strains in model cheeses. Milchwiss., 1996, **51**, 315-319.
- [11] Khalid N.M., Marth E.H.: *Lactobacilli* – Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A review. J. Dairy Sci., 1990, **73**, 2669-2684.
- [12] Khalid N.M., El-Soda M., Marth E.H.: Peptide hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Dairy Sci., 1991, **74**, 29-45.
- [13] Lemieux L., Simard R.E.: Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification structure masking and inhibition. Le Lait., 1992, **72**, 335-382.

- [14] Libudzisz Z.: Genetyczne determinanty metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej. *Biotechnol.*, 1992, (2), 66-79.
- [15] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-265.
- [16] Martínez-Cuesta M. C., Fernández de Palencia P., Requena T., Peláez C.: Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese. *Int. Dairy J.*, 2001, (11), 577-585.
- [17] Norman M., Khalid N., El-Soda M., Marth E.: Peptide hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 29-45.
- [18] Olson N. F.: The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1990, **87**, 131-148.
- [19] Peterson S.D., Marshall R.T.: Nonstarter *Lactobacilli* in cheddar cheese a review. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 1395-1410.
- [20] Requena T., Peláez C., Fox P.F.: Peptidase and proteinase activity of *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1993, **193**, 351.-355.
- [21] Sasaki M., Bosman B.W., Tan P.S.T.: Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *J. Dairy Res.*, 1995, **62**, 601-610.

PEPTIDASE ACTIVITY OF SOME *LACTOBACILLUS* STRAINS

S u m m a r y

Non-starter lactic acid bacteria has been proved to be more potent in paracasein degradation into low molecular nitrogen compounds and in production of taste and aroma of Gouda cheese than peptidases liberated during autolysis of leaven cultures. In cheese technology application of selected strains of *Lactobacillus* leads to reduce non-starter lactic acid bacteria growth and, simultaneously, makes possible intensification and modification of sensorial features of cheese. The indispensable requirement to use the lactobacilli in ripening cheese production is to recognise their peptidase activity.

The aim of the paper was to evaluate activities of amino- and dipeptidases of some strains of *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei ssp. rhamnosus*).

The *Lactobacillus* strains synthesised peptidases hydrolysing preferential similar substrates. Amino peptidases composed the dominant group for all the strains under the study. Amino peptidases that were synthesised by the individual lactobacilli strains hydrolysed all the substrates utilised during the experiment. However, each strain was characterised by different activity level of individual amino peptidases (from 3.00 to 13.75 JA). Comparing activity of dipeptidases synthesised by the *Lactobacillus* strains it has been found that majority of the substrates utilised in the experiment, typical for lactobacilli, were hydrolysed, though in various extent (from 1.08 to 7.25 JA).

The *L. casei* strain was characterised by highest activity of both: amino- and dipeptidase, activity. The *L. acidophilus* synthesised amino peptidases of about 2 times lower activity in comparison to the rest of the strains of lactobacilli and dipeptidases of lower activity than those synthesised by *L. casei*, but comparable to dipeptidases activity of *L. casei ssp rhamnosus*.

High peptidase activity of the examined *Lactobacillus* strains proved their potential usefulness in ripening cheese technology.

Key words: aminopeptidase, dipeptidase, *Lactobacillus* ☒

PAWEŁ GLIBOWSKI, ANNA KRĘPACKA

WPLYW DODATKU PREPARATÓW SERWATKI NA WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNE JOGURTÓW

Streszczenie

Zbadano właściwości reologiczne jogurtów z 1-, 2- i 4-procentowym dodatkiem serwatki w proszku, serwatki w proszku demineralizowanej i trzech serwatek o obniżonej zawartości laktozy, jako alternatywy odtłuszczonego mleka w proszku. W tym celu dokonano oznaczeń lepkości pozornej, dynamicznej i twardości badanych jogurtów. W większości przypadków wraz ze wzrostem dodatku serwatek następował spadek lepkości pozornej. Jednak 1-procentowy dodatek preparatów serwatki umożliwił otrzymanie jogurtów o lepkości wyższej od lepkości jogurtu niewzbogaconego (próba kontrolna). Analiza kwasowości wykazała, że dodatek serwatek do jogurtów ograniczył obniżenie wartości pH gotowych wyrobów w stosunku do próby kontrolnej oraz jogurtów z dodatkiem mleka odtłuszczonego. W badaniach tekstury wzrost stężenia stosowanych proszków serwatkowych niemal we wszystkich przypadkach powodował zmniejszenie twardości gotowych wyrobów. Analizując lepkość dynamiczną wykazano, że najlepiej na właściwości lepkosprężyste jogurtu wpływał dodatek odtłuszczonego mleka w proszku, jednak przy 1-procentowym dodatku różnice pomiędzy końcowymi wartościami modułu zespolonego stosowanych preparatów były niewielkie. Bardziej widoczne różnice stwierdzono w jogurtach wzbogaconych 4-procentowym dodatkiem badanych preparatów. W tym przypadku taki dodatek serwatki demineralizowanej spowodował znaczący wzrost wartości modułu zespolonego w stosunku do próby kontrolnej. Chociaż najlepszym preparatem zwiększającym zawartość suchej masy okazało się odtłuszczone mleko w proszku, jednak 1-procentowy dodatek serwatki w proszku, serwatek o obniżonej zawartości laktozy, jak również 4-procentowy dodatek serwatki demineralizowanej spowodował wyraźną poprawę cech reologicznych jogurtów w stosunku do jogurtu niewzbogaconego.

Słowa kluczowe: jogurt, reologia, serwatka w proszku, tekstura

Wprowadzenie

Jogurt jest jednym z najpopularniejszych napojów mlecznych. Dostarcza wielu składników odżywczych w formie bardziej przyswajalnej dla organizmu niż mleko (np. wapnia), nie ma też przeciwwskazań do spożywania go przez osoby z

Dr inż. P. Glibowski, mgr inż. A. Krępacka, Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowywania, Akademia Rolnicza, ul. Skromna 8, 20-950 Lublin, tel. 444-63-13, e-mail: glibowskipawel@wp.pl

nietolerancją laktozy, gdyż podczas fermentacji cukier ten jest częściowo wykorzystywany przez bakterie [5]. Wg definicji przyjętej przez FAO/WHO, jogurt jest fermentowanym produktem mlecznym, który uzyskuje się przez ukwaszenie mleka bakteriami jogurtowymi, tj. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* i *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. Powinien zawierać co najmniej 10^7 żywych bakterii w 1 cm^3 . Jego popularność niewątpliwie wynika z właściwości, dzięki którym ma korzystny wpływ na zdrowie człowieka np. redukując poziom cholesterolu, ułatwiając trawienie, itp. [4].

Jogurt produkuje się z mleka o podwyższonej zawartości suchej masy. Uzyskuje się ją poprzez odparowanie części wody lub dodanie proszku mlecznego, są to jednak metody kosztowne, dlatego poszukuje się tańszych sposobów zwiększania zawartości suchej masy w mleku. Rozwiązaniem może być zastąpienie części lub nawet całości proszku mlecznego białkami serwatkowymi. Zamiana taka jest korzystna także ze względów żywieniowych, gdyż białka serwatkowe zawierają aminokwasy siarkowe, lizynę i tryptofan oraz wszystkie aminokwasy egzogenne [1].

Celem pracy było zbadanie wpływu dodatku do jogurtów wybranych preparatów serwatkowych, jako taniej alternatywy odtłuszczonego mleka w proszku, na właściwości reologiczne jogurtów.

Materiał i metody badań

Do produkcji jogurtów użyto: pełnego mleka w proszku (OSM Krasnystaw); odtłuszczonego mleka w proszku (MO) (Biomlek, Chełm); serwatki w proszku (SP) (SM Spomlek, Radzyń Podlaski); serwatki w proszku demineralizowanej (SD) (Euroserum, Francja); trzech serwatek w proszku o obniżonej zawartości laktozy (Foremous Baraboo, WI, USA) oznaczonych numerami: 8402011701 (dalej nazywaną serwatką 1 lub S1), 8401121401 (dalej nazywaną serwatką 2 lub S2) oraz 8401111201 (dalej nazywaną serwatką 3 lub S3); szczepionki YC-X11 Yo-Flex Thermophilic Lactic Culture type Yogurt CHR (Chr. Hansen, Polska).

Jogurty otrzymano z mleka regenerowanego uzyskanego poprzez mieszanie 130 g mleka pełnego w proszku z 1000 ml wody destylowanej za pomocą mieszadła magnetycznego aż do całkowitego rozpuszczenia. Następnie dodawano, z wyjątkiem próby kontrolnej, mleko odtłuszczone w proszku lub serwatkę w ilości 1, 2 i 4% w stosunku do mleka regenerowanego i całość poddawano pasteryzacji w temp. 85°C przez 30 min. Po tym czasie mieszaninę studzono do temp. 40°C i szczepiono bakteriami jogurtowymi w ilości 0,015%. Zaszczepioną mieszaninę rozlewano do zlewek o pojemności 50 cm^3 w ilości 40 cm^3 , przykrywano folią aluminiową i wstawiano do łaźni wodnej o temp. 45°C na 4 h. Otrzymany jogurt chłodzono i przechowywano w temp. 4°C przez 24 h.

Oznaczenie zawartości białka i laktozy (tab. 1) w zastosowanych dodatkach wykonano zgodnie z PN [6, 7].

Badania reologiczne obejmowały:

- analizę twardości przy użyciu TA-XT2i texture analyser (Stable Microsystems, Galdmington, Wielka Brytania) przez dwa sekwencyjne zanurzenia na głębokość 15 mm wypełnionego walca o średnicy 1 cm z szybkością 1 mm/s z siłą 0,98 N przedzielone fazą relaksacyjną trwającą 30 s. Badania przeprowadzono w 6 powtórzeniach w temp. 20°C;
- oznaczenie lepkości pozornej przy użyciu wiskozymetru Brookfielda, stosując przystawkę Helipath, wrzeczono D (Brookfield Engineering, Stoughton, MA, USA). Prędkość obrotów określono na $V=10$ obr./min. Badania przeprowadzono w 3 powtórzeniach;
- badanie lepkości dynamicznej przez monitorowanie procesu fermentacji zachodzącego w 45°C w ciągu 4 h oraz następującego po nim procesu chłodzenia i przetrzymywania w temp. 5°C. Pomiarów dokonywano przy użyciu reometru oscylacyjnego RS 300 (Haake, Karlsruhe, Niemcy) w układzie cylindrów współosiowych (rotor Z 31, cylinder Z 43). Zmiany wartości modułu zespolonego (G^*) określano przy częstotliwości drgań oscylacyjnych 0,1 Hz i amplitudzie drgań 0,01.

Tabela 1

Zawartość białka i laktozy w stosowanych preparatach mlecznych.

Protein and lactose content in an applied milk preparations.

Preparaty mleczne Milk preparations	Zawartość białka [%] (m/m) Protein content [%] (w/w)	Zawartość laktozy [%] (m/m) Lactose content [%] (w/w)
Pełne mleko w proszku Whole milk powder	26,32	38,12
Odtłuszczone mleko w proszku (MO) Skim milk powder (MO)	35,13	50,66
Serwatka w proszku (SP) Whey powder (SP)	11,92	75,72
Serwatka demineralizowana (SD) Demineralised whey powder (SD)	12,75	81,64
Serwatka 1 (S1) Whey 1 (S1)	21,32	55,95
Serwatka 2 (S2) Whey 2 (S2)	22,32	56,48
Serwatka 3 (S3) Whey 3 (S3)	22,62	45,46

Pomiaru pH dokonywano przy użyciu pH-metru CP-215 (Elmetron, Zabrze, Polska).

Wartości odchyłeń standardowych obliczono przy użyciu programu Microsoft Excel 5.0 (Microsoft Corporation, USA).

Wyniki i dyskusja

W tab. 2. przedstawiono wyniki pomiaru lepkości pozornej jogurtów wzbogaconych różną wielkością poszczególnych dodatków. Produktem odniesienia jest próba kontrolna, czyli jogurt wykonany jedynie z mleka pełnego. Spośród próbek zawierających 1-procentowy dodatek suchej masy największą lepkość miała próbka z odtłuszczonym mlekiem w proszku, mniejszą zaś jogurt zawierający serwatkę 1. Dodatek pozostałych preparatów serwatki umożliwił otrzymanie jogurtów o lepkości większej niż próba kontrolna.

Tabela 2

Lepkość pozorna i pH jogurtów o zwiększonej zawartości suchej masy.
Apparent viscosity and pH of yogurts with increased dry mass content.

Preparaty mleczne Milk preparations	Lepkość [Pa•s] / Apparent viscosity [Pa•s]			pH		
	Dodatek preparatu mlecznego [%] / Addition of milk preparation [%]					
	1	2	4	1	2	4
0	170,3 ± 6,5			4,58		
MO	412,6 ^c ± 21,6	357,9 ^c ± 27,4	433,2 ^c ± 17,6	4,49	4,50	4,63
SP	250,3 ^a ± 7,5	211,2 ^c ± 8,0	175,6 ^b ± 22,6	4,80	4,77	4,82
SD	317,8 ^{ab} ± 18,3	264,6 ^d ± 25,1	447,1 ^c ± 71,0	4,81	4,84	4,77
S1	394,3 ^{bc} ± 21,0	164,3 ^b ± 2,9	85,7 ^a ± 12,8	4,97	4,86	4,80
S2	258,9 ^a ± 30,5	140,3 ^{ab} ± 24,0	169,1 ^b ± 43,7	4,86	4,90	4,93
S3	323,5 ^{ab} ± 111,1	113,2 ^a ± 9,3	118,6 ^{ab} ± 5,3	4,88	4,91	5,02

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a-d – wartości średnie oznaczone różnymi literami, przy tej samej wielkości dodatku preparatu mlecznego, różnią się w sposób statystycznie istotny przy $p \leq 0,05$ / mean values designated by different letters for the same quantity of milk preparation additive are statistically significantly different at a level of $p \leq 0,05$.

Dwukrotne zwiększenie ilości dodatków skutkowało ogólnym spadkiem lepkości. Także w tym przypadku największą lepkość wykazywał jogurt zawierający odtłuszczone mleko w proszku. Spośród próbek wzbogaconych serwatkami najwyższą lepkością charakteryzował się jogurt z serwatką demineralizowaną. Mniejszą lepkość, ale ciągle większą od próby kontrolnej, miał jogurt ze zwykłą serwatką. Dodatek serwatek o zmniejszonej zawartości laktozy spowodował zmniejszenie lepkości poniżej lepkości próby odniesienia.

Dodatek serwatki demineralizowanej w ilości 4% umożliwił otrzymanie jogurtu o lepkości porównywalnej z lepkością, jaką powoduje identyczne stężenie odtłuszczonego mleka w proszku. Pozostałe spośród badanych serwatek w użytym stężeniu nie spowodowały wzrostu lepkości.

Analizując wyniki oznaczeń lepkości pod względem narastających stężeń, można zauważyć, że w większości przypadków wraz ze wzrostem dodatku serwatek następował spadek lepkości jogurtu. Podobne wyniki otrzymano, gdy preparaty serwatkowe tylko częściowo zastępowały mleko w proszku [3]. Puvanenthrian i wsp. [8] badali właściwości reologiczne jogurtów z mleka o zmienionym stosunku kazeiny do białek serwatkowych. Otrzymane żele jogurtowe były tym słabsze im mniejszy był stosunek kazeiny do białek serwatkowych. Podobnie, jak serwatki w proszku, zmniejszenie lepkości jogurtu, w porównaniu z odtłuszczonym mlekiem w proszku, powodują koncentraty białek serwatkowych [2], które są częściej wykorzystywane w produkcji jogurtów.

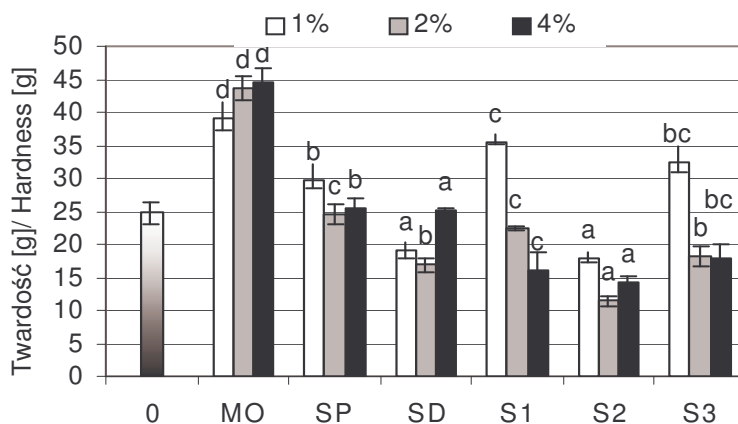
W celu lepszej interpretacji wyników dokonano pomiaru pH gotowych jogurtów (tab. 2), przypuszczając, że różnice w lepkości mogą wynikać z różnic kwasowości gotowego produktu. Nie stwierdzono tu jednak ścisłej korelacji. Zauważono, że dodatek serwatek do jogurtów ograniczył zmniejszenie wartości pH w stosunku do próby kontrolnej, jak również jogurtów wzbogaconych mlekiem odtłuszczonym. Podobną tendencję wykazał również Hugunin [3].

Jogurty poddano również badaniom określającym ich twardość (rys. 1). Większość z zależności ukazanych podczas analizy lepkości pozornej pokrywa się z wynikami oznaczeń twardości, jakkolwiek nie jest tak we wszystkich przypadkach. W jogurtach wzbogaconych dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku twardość wzrastała wraz ze wzrostem tego dodatku, co jest oczywistą zależnością z punktu widzenia praktyki mleczarskiej. Spośród preparatów serwatkowych wzrost stężenia niemal we wszystkich przypadkach powodował spadek twardości gotowych wyrobów, co pokrywa się z analizami lepkości pozornej. Wyniki te odpowiadają wcześniejszym doniesieniom [9].

Na uwagę zasługuje jednak 1-procentowy dodatek serwatki w proszku, jak i serwatek o obniżonej zawartości laktozy 1 i 3. Zarówno analiza lepkości, jak i twardości, dowodzą poprawy właściwości reologicznych jogurtów z tymi dodatkami w stosunku do jogurtu niewzbogaconego.

Oznaczanie lepkości pozornej czy twardości są metodami silnie inwazyjnymi. Pozwalają na określenie właściwości reologicznych gotowego wyrobu, jednak uniemożliwiają obserwację zmian właściwości reologicznych jogurtu w trakcie jego powstawania. Zastosowanie reometrii dynamicznej umożliwi obserwację procesu żelowania bez jednoczesnego niszczenia powstającej sieci żelu. Dzieje się tak,

ponieważ rotor reometru ulega niewidocznym dla ludzkiego oka, niewielkim odkształceniom o określonej częstotliwości, ustalonym w sposób doświadczalny.

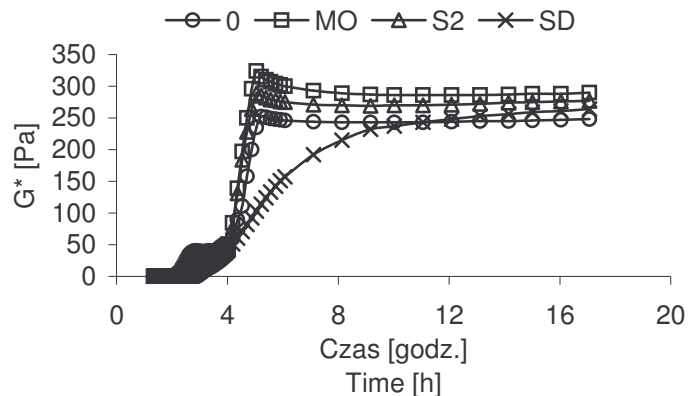


Rys. 1. Wpływ dodatku preparatów mlecznych, zwiększających zawartość suchej masy, na twardość jogurtów (a-h – wartości średnie oznaczone różnymi literami, przy tej samej wielkości dodatku preparatu, różnią się w sposób statystycznie istotny przy $p \leq 0,05$).

Fig. 1. Effect of milk preparation additives enriching dry mass content on hardness of the yogurts (a-h – mean values designated by different letters for the same quantity of preparation additive are statistically significantly different at a level of $p \leq 0,05$).

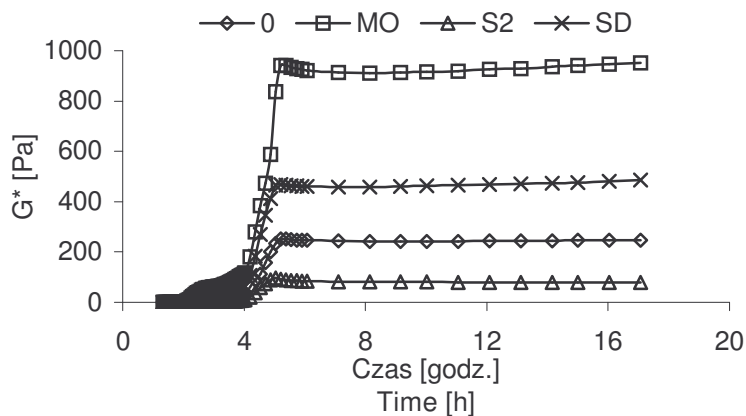
Na rys. 2. i 3. przedstawiono zmiany modułu zespolonego w czasie fermentacji i następującego po nim chłodzenia jogurtów zawierających odtłuszczone mleko w proszku, serwatkę demineralizowaną oraz serwatkę 2. Wzrosty wartości tego modułu widoczne na rysunkach świadczą o przejściu roztworu ze stanu płynnego w żel. Wartość G^* powoli zaczęła wzrastać w połowie trwania procesu fermentacji. Zmiany te zachodziły w podobny sposób we wszystkich próbkach niezależnie od rodzaju i stężenia dodatku. Gwałtowny wzrost wartości modułu zespolonego nastąpił po rozpoczęciu chłodzenia.

Podobnie, jak w przypadku poprzednich analiz, najlepiej na teksturę jogurtu wpływał dodatek mleka odtłuszczonego (rys. 2, 3). Przy 1-procentowym dodatku (rys. 2) różnice pomiędzy końcowymi wartościami modułu zespolonego stosowanych dodatków były jednak niewielkie. Wyraźniejsze różnice można było obserwować w jogurtach wzbogaconych 4-procentowym dodatkiem badanych preparatów (rys. 3). W tym przypadku dodatek serwatki demineralizowanej spowodował wyraźny wzrost wartości modułu zespolonego w stosunku do próby kontrolnej, jednak dodatek mleka odtłuszczonego wpływał najlepiej na teksturę jogurtu.



Rys. 2. Zmiany wartości modułu zespolonego podczas fermentacji i chłodzenia jogurtów zawierających 1-procentowy dodatek preparatów mlecznych.

Fig. 2. Complex modulus changes during fermentation and cooling yogurts contained of 1% milk preparations additives.



Rys. 3. Zmiany wartości modułu zespolonego podczas fermentacji i chłodzenia jogurtów zawierających 4-procentowy dodatek preparatów mlecznych.

Fig. 3. Complex modulus changes during fermentation and cooling yogurts contained of 4% milk preparations additives.

Wnioski

1. Na teksturę jogurtów najlepiej wpływał dodatek mleka odtłuszczonego w proszku.
2. Wzrost stężenia dodawanych preparatów serwatkowych w większości przypadków powodował pogorszenie właściwości reologicznych jogurtów.
3. Wyraźną poprawę właściwości reologicznych jogurtów uzyskano przy 1-procentowym dodatku serwatki w proszku, serwatek o obniżonej zawartości laktozy 1- i 3-, jak również 4-procentowym dodatku serwatki demineralizowanej.

4. Wzbogacanie jogurtów serwatkami w proszku powodowało ograniczony spadek kwasowości podczas ich dojrzewania.

Literatura

- [1] Glibowski P.: Zastosowanie białek serwatkowych w przemyśle spożywczym. *Przegl. Mlecz.*, 2004, **9**, 10-13.
- [2] Guzmán-González M., Morais F., Ramos M., Amigo L.: Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *J. Sci. Food and Agric.*, 1999, **79**, 1117-1122.
- [3] Hugunin A.: Whey products in yogurt and fermented dairy products. U.S. Dairy Export Council, 1999, 1-8.
- [4] Lourens-Hattingh A., Viljoen B.C.: Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 1-17.
- [5] McKinley M.C.: The nutrition and health benefits of yogurt. *Int. J. Dairy Techn.*, 2005, **58**, 1-13.
- [6] PN-A-79011-5: 1998. Koncentraty spożywcze. Metody badań. Oznaczanie zawartości cukrów.
- [7] PN-EN ISO 9868-1: 2004. Mleko. Oznaczanie zawartości azotu. Część 1: Metoda Kjeldahla.
- [8] Puvanenthiran A., Williams R.P.W., Augustin M.A.: Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *Int. Dairy J.*, 2002, **12**, 383-391.
- [9] Yazici F., Akoun A.: Effect of some protein based fat replacers on physical, chemical, textural and sensory properties of strained yoghurt. *J. Food Engin.*, 2004, **62**, 245-254.

EFFECT OF WHEY PREPARATIONS ADDITION ON RHEOLOGICAL PROPERTIES OF YOGHURTS

Summary

Rheological properties of yoghurts with 1, 2 and 4% addition of powdered whey, demineralised whey and three lactose reduced whey as an alternative for skim milk powder were studied. The dynamic, apparent viscosity and the hardness of the yoghurts were determined for this purpose. In most cases the decrease of apparent viscosity was occurred in conjunction of increasing whey powders addition. However 1% addition of whey preparations let to obtain yoghurts with higher viscosity than the non-enriched yoghurt (control check). Acidity analysis demonstrated that yoghurts whey powders addition limited the pH decrease in the final product in relation to the control check and yoghurts enriched with skim milk. In a texture examination increasing concentration of applied whey powder additives caused the decrease in hardness in almost all final products. Dynamic viscosity analysis showed that addition of skim milk powder had the best influence on the yoghurt viscoelastic properties, however with 1% additives the differences between the final complex modulus values for applied preparations were slight. Much definite differences were seen in yoghurts enriched by 4% addition of examined preparations. In this case such an addition of demineralised whey powder caused remarkable complex modulus increase in relation to control check.

Although the best preparation increasing dry mass content turned out a skim milk powder, however 1% addition of powdered whey, lactose reduced whey as well as 4% addition of demineralised whey caused evident rheological qualities improvement of yoghurts in relation to the non-enriched yoghurt.

Key words: yoghurt, rheology, whey powder, texture ☒

JOLANTA KOWALSKA, ANDRZEJ LENART, JUSTYNA DOBROWOLSKA

**WPLYW CZASU PRZECHOWYWANIA NA WŁAŚCIWOŚCI
FIZYCZNE I STABILNOŚĆ KAKAO Z DODATKIEM KWASU
L-ASKORBINOWEGO**

Streszczenie

Kakao instant wzbogacone w witaminę C łączy w sobie cechy produktu pożądanego przez konsumenta, jest źródłem witamin i składników mineralnych, charakteryzuje się unikalnym aromatem i barwą, a także jest szybkie i łatwe w przygotowaniu. Znajomość zmian zawartości witaminy C, w zależności od czasu składowania badanego produktu w określonych warunkach, umożliwia przewidywanie jej stabilności przechowalniczej w kakao instant.

Kwas askorbinowy odgrywa bardzo ważną rolę w technologii żywności, zarówno jako czynnik witaminowy, jak i czynnik chroniący inne składniki żywności, które w trakcie procesu technologicznego czy przechowywania mogą ulegać niekorzystnym zmianom, głównie procesom utleniania.

Celem pracy była analiza wpływu czasu przechowywania na właściwości fizyczne i stabilność kakao instant z dodatkiem kwasu L-askorbinowego. Zakres pracy obejmował również analizę wpływu składu surowcowego, aglomeracji oraz sposobu wprowadzenia kwasu L-askorbinowego do kakao na właściwości fizyczne badanych produktów.

Materiał badawczy stanowiły produkty w proszku: cukier instant – cukier puder, kakao alkalizowane, maltodekstryna, mleko w proszku odtłuszczone, lecytyna sojowa, kwas L-askorbinowy. Przechowywanie wpłynęło na pogorszenie właściwości mieszanin i aglomeratów, bez względu na sposób wprowadzania kwasu L-askorbinowego. Największe różnice otrzymano podczas analizy sypkości i zwilżalności badanych produktów spożywczych w proszku.

Słowa kluczowe: aglomeracja, sypkosc, zwilzalnosc, granulacja, kakao, kwas L-askorbinowy

Wprowadzenie

Żywność w proszku stanowi formę produktów prostych w przygotowaniu, niejednokrotnie gotowych do spożycia, o stosunkowo dużej trwałości, wygodnych i łatwych w dalszych operacjach technologicznych oraz w obrocie i transporcie, które po odtworzeniu w cieczy (wodzie lub mleku) są gotowe do spożycia. Właściwości

fizyczne proszków bardzo często decydują o jakości gotowego produktu, stąd też sypka forma żywności w proszku i wszystkie cechy związane z tym stanem (wielkość cząstek, gęstość nasypowa, sypkość, higroskopijność, właściwości rekonstytucyjne) są przedmiotem zainteresowania technologów żywności [4]. Proszek kakaowy bez dodatków tylko częściowo rozpuszcza się w wodzie. Lepszą rozpuszczalność, jak i zwilżalność, np. w mleku, można osiągnąć przez zmianę hydrofobowego charakteru proszku na bardziej hydrofilowy, np. po dodaniu emulgatorów w rodzaju lecytyny albo destylowanych mono- lub diacylogliceroli [9]. Lepszą odtwarzalność wykazują proszki kakaowe z dodatkami, oferowane w formie napojów, poddawane procesowi aglomeracji, który umożliwia nadanie produktom w proszku cech korzystnych z punktu widzenia jakości żywności – poprawę zdolności do płynięcia oraz odtwarzania. Aglomeracja stwarza również możliwość kreowania nowego produktu atrakcyjnego dla konsumenta [3].

Prawidłowe odżywianie w znacznym stopniu warunkuje dobry stan zdrowia, natomiast złe nawyki żywieniowe mogą prowadzić do niedoborów składników odżywczych. Wzbogacanie żywności w te składniki daje możliwość likwidacji ich niedoboru, a także podnosi wartość odżywczą produktów [8].

Najbardziej popularną wśród konsumentów żywnością wzbogaconą jest żywność z dodatkiem witamin, spośród których najczęściej stosowana jest witamina C oraz witaminy z grupy B [7]. Kwas askorbinowy odgrywa bardzo ważną rolę w technologii żywności, zarówno jako czynnik witaminowy, jak i czynnik ochronny innych składników żywności, które w trakcie procesu technologicznego czy przechowywania mogą ulegać niekorzystnym zmianom, głównie poprzez utlenianie [1].

Kakao instant wzbogacone w witaminę C łączy w sobie cechy produktu pożądanego przez konsumenta, jest źródłem witamin i składników mineralnych, charakteryzuje się unikalnym aromatem i barwą, a także jest szybkie i łatwe w przygotowaniu. Znajomość zmian zawartości witaminy C w czasie pozwala na przewidywanie jej stabilności podczas przechowywania kakao instant w określonych warunkach.

Celem pracy była analiza wpływu czasu przechowywania na właściwości fizyczne i stabilność kakao instant z dodatkiem kwasu L-askorbinowego. Zakres pracy obejmował również analizę wpływu składu surowcowego, aglomeracji oraz sposobu wprowadzenia kwasu L-askorbinowego na właściwości fizyczne badanych produktów.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły następujące produkty spożywcze w proszku o nazwach handlowych: cukier instant – cukier puder, kakao alkalizowane, maltodekstryna średnioscukrzona, mleko w proszku odtłuszczone, lecytyna sojowa, kwas L-askorbinowy. Wszystkie surowce przechowywano w szczelnie zamkniętych opakowaniach, w suchym, zaciemnionym pomieszczeniu, w temp. 15–20°C.

Metody technologiczne obejmowały dwa procesy: mieszanie i aglomerację, które zostały przeprowadzone w aglomeratorze fluidyzacyjnym typu STREA 1 firmy Niro Atomizer A/S. Technologia otrzymywania aglomeratów polegała na wymieszaniu składników o masie 0,2 kg w zbiorniku urządzenia przez 2 min po wprowadzeniu ich w stan fluidalny, a następnie nawilżaniu wodą przez 15 min, przy natężeniu przepływu cieczy $6 \cdot 10^{-3}$ kg/s oraz ciśnieniu sprężonego powietrza w dyszy rozpylającej 0,2 MPa. Po zakończeniu nawilżania otrzymany aglomerat dosuszano przez 15 min w temp. 68°C.

Badano produkty o następującym składzie surowcowym: A – 20% kakao + 80% cukru, B – 20% kakao + 40% cukru + 40% maltodekstryny, C – 20% kakao + 40% cukru + 40% mleka w proszku, D – 20% kakao + 40% maltodekstryny + 40% mleka w proszku.

Do każdego produktu dodawano lecytynę w ilości 0,1% oraz kwas L-askorbinowy w ilości 80 mg/100 g produktu, który wprowadzano dwoma sposobami. Pierwszy polegał na dodaniu kwasu L-askorbinowego w postaci proszku do mieszaniny, którą aglomerowano wodą. Druga metoda polegała na aglomerowaniu mieszaniny wodnym roztworem kwasu L-askorbinowego.

Metody analityczne obejmowały oznaczanie: składu granulometrycznego [2], gęstości nasypowej luźnej i utrząsionej [6], sypkości [2], zwilżalności [2], rozpuszczalności ogólnej [5]. Wszystkie analizy wykonywano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

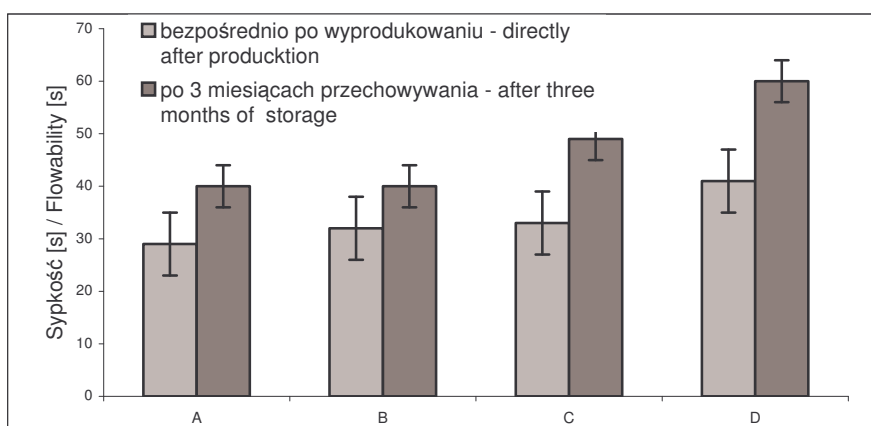
Wpływ czasu przechowywania na właściwości ogólne mieszanin

Analiza składu granulometrycznego badanych mieszanin po upływie trzech miesięcy przechowywania wykazała wzrost wielkości cząstek większości produktów w porównaniu z mieszaninami badanymi bezpośrednio po ich wyprodukowaniu. Wartość mediany wzrosła od około 3% w przypadku mieszaniny o podstawowym składzie (A) do około 9% w odniesieniu do produktów zawierających w składzie mleko w proszku (produkty C i D).

Właściwości płynięcia mieszanin po upływie trzech miesięcy znacznie się pogorszyły (rys. 1). Czas wysypu mieszanin zawierających w składzie mleko w proszku (C i D) z obracającego się naczynka był najdłuższy i wzrósł o około 34% w porównaniu z wartościami początkowymi. Czas wysypu mieszaniny o standardowym składzie A był dłuższy o około 38%, natomiast częściowe zastąpienie cukru maltodekstryną (B) skróciło ten czas o około 25%.

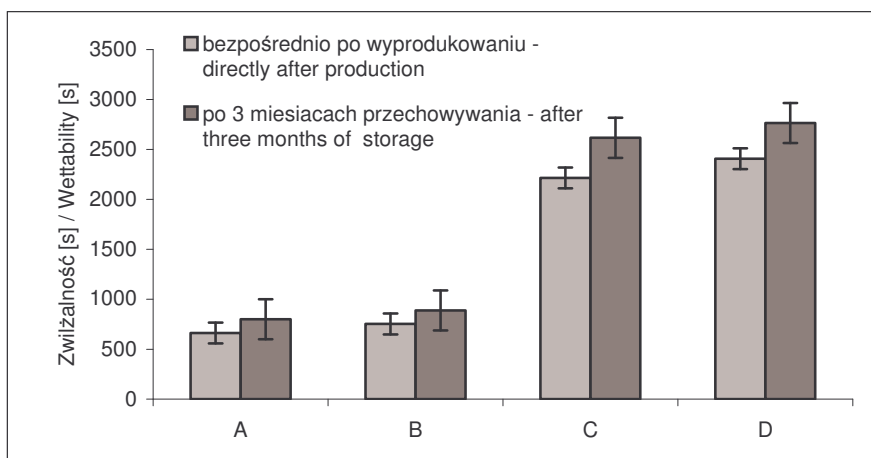
Analiza właściwości rekonstrykcyjnych wykazała pogorszenie zwilżalności produktów po trzech miesiącach przechowywania (rys. 2). Czas zwilżania mieszaniny o standardowym składzie (A) wydłużył się o około 21%, zaś produktów B i C o około 18%, natomiast produktu D o około 15% w porównaniu z wartościami uzyskanymi

bezpośrednio po wyprodukowaniu mieszanki. Natomiast nie uzyskano istotnego wpływu przechowywania na rozpuszczalność, która obniżyła się o około 3–4% we wszystkich badanych produktach.



Rys. 1. Wpływ czasu przechowywania na sypkość mieszanin kakao w proszku.

Fig. 1. The influence of storage time on flowability of mixed cacao powder.



Rys. 2. Wpływ czasu przechowywania na zwilżalność mieszanin kakao w proszku.

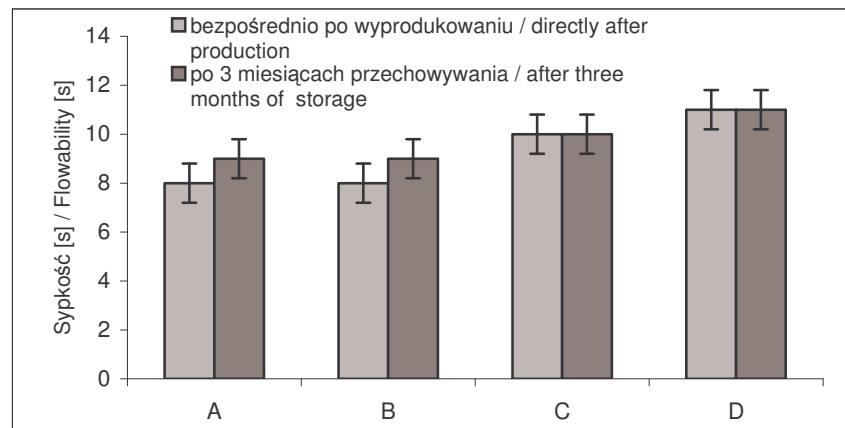
Fig. 2. The influence of storage time on wettability of mixed cacao powder.

Wpływ czasu przechowywania na właściwości ogólne aglomeratów

Analiza składu granulometrycznego wszystkich aglomeratów, które wytworzono z dodatkiem kwasu L-askorbinowego w proszku, przechowywanych przez trzy miesiące, wykazała zmniejszenie wielkości cząstek. Wartość średnicy dominującej frakcji aglomeratu o podstawowym składzie - A zmniejszyła się o około 15%,

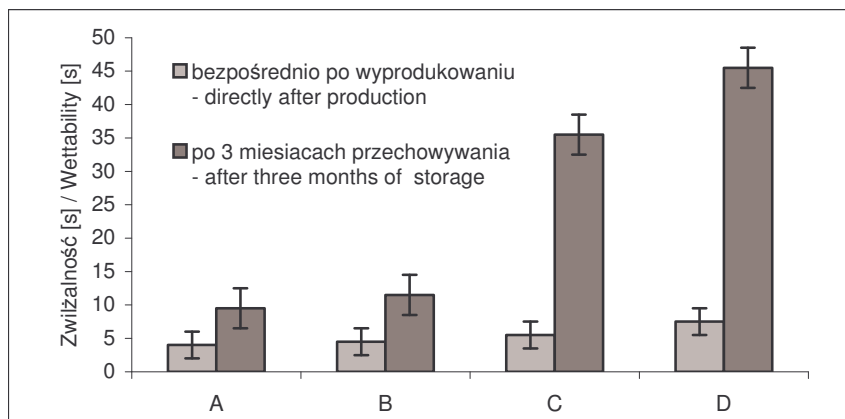
natomiast produktu B o około 3%. Aglomerat C i D wykazał obniżenie udziału dominującej frakcji o około 32%.

Po trzech miesiącach przechowywania czas wysypu aglomeratów A i B wydłużył się o około 12%. Natomiast sypkość pozostałych produktów nie uległa istotnym zmianom (rys. 3).



Rys. 3. Wpływ czasu przechowywania na sypkość aglomeratu kakao w proszku z dodatkiem kwasu L-askorbinowego (dodanego do mieszaniny w postaci proszku).

Fig. 3. The influence of storage time on flowability of agglomerated cacao powder with L-ascorbic acid added to powder mix.



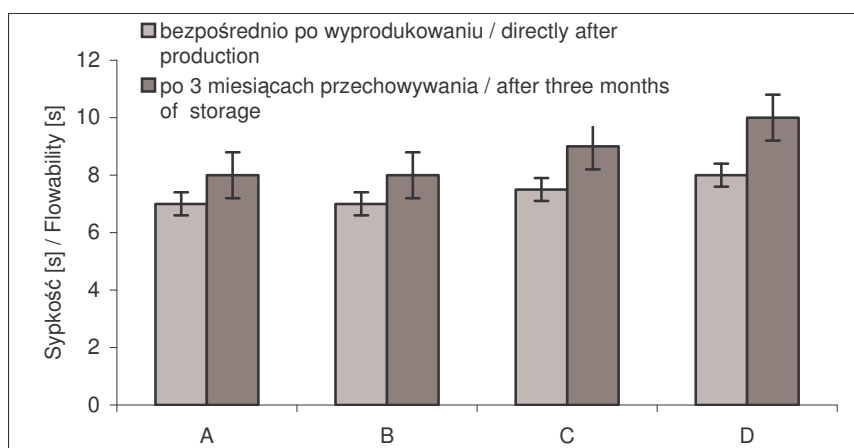
Rys. 4. Wpływ czasu przechowywania na zwilżalność aglomeratu kakao w proszku z dodatkiem kwasu L-askorbinowego (dodanego do mieszaniny w postaci proszku).

Fig. 4. The influence of storage time on wettability of agglomerated cacao powder with L-ascorbic acid added to powder mix.

Analiza właściwości rekonstrykcyjnych wykazała dłuższy czas zwilżania wszystkich aglomeratów przechowywanych przez trzy miesiące. Największe zmiany stwierdzono w aglomeratach C i D, zawierających w swoim składzie mleko w proszku,

których czas zwilżania wydłużył się prawie pięciokrotnie w porównaniu z wartościami początkowymi (rys. 4). W pozostałych produktach badana wielkość była około dwukrotnie wyższa po trzech miesiącach przechowywania. Zmiany te nie spowodowały jednak utraty cech instant przez produkty.

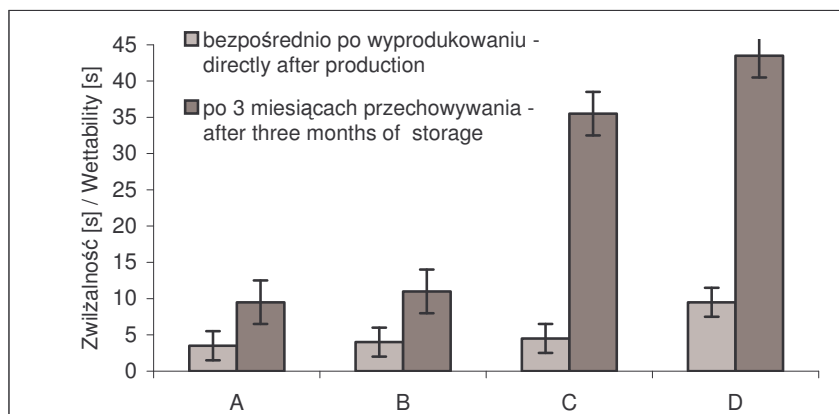
Analiza składu granulometrycznego wszystkich aglomeratów po upływie trzech miesięcy przechowywania wykazała zmniejszenie wielkości cząstek w porównaniu z wartościami początkowymi. Wartość średnicy dominującej frakcji aglomeratu A o podstawowym składzie zmniejszyła się o około 27%, natomiast produktu B o około 56% w porównaniu z wartością początkową. Natomiast aglomerat C wykazał wartość średnicy dominującej frakcji niższą o około 46% w odniesieniu do wartości otrzymanej bezpośrednio po wyprodukowaniu aglomeratu. Sypkość aglomeratów po upływie trzech miesięcy przechowywania obniżyła się w zależności od mieszaniny: o około 25% – produkt D, 20% – produkt C oraz o około 14% – pozostałe badane materiały (rys. 5).



Rys. 5. Wpływ czasu przechowywania na sypkość aglomeratu w proszku z dodatkiem kwasu L-askorbinowego (wprowadzonego do produktu w wodnym roztworze aglomerującym).

Fig. 5. The influence of storage time on flowability of agglomerated cacao powder with water solution of L-ascorbic acid added.

Analiza właściwości rekonstrykcyjnych wykazała istotny wzrost czasu zwilżania wszystkich aglomeratów po trzech miesiącach przechowywania. Prawie siedmiokrotnie dłuższy czas zwilżania otrzymano w przypadku aglomeratu C (rys. 6), natomiast w produkcie nie zawierającym cukru (D) czas zwilżania wzrósł prawie czterokrotnie. Czas zwilżania pozostałych aglomeratów był około dwukrotnie dłuższy w porównaniu z wartościami otrzymanymi bezpośrednio po wyprodukowaniu aglomeratów.



Rys. 6. Wpływ czasu przechowywania na zwilżalność aglomeratu kakao w proszku z dodatkiem kwasu L-askorbinowego (wprowadzonego do produktu w wodnym roztworze aglomerującym).

Fig. 6. The influence of storage time on wettability of agglomerated cacao powder with water solution of L-ascorbic acid added.

Wnioski

1. Przechowywanie wpłynęło na pogorszenie badanych właściwości mieszanin i aglomeratów kakao w proszku bez względu na sposób wprowadzania kwasu L-askorbinowego. Większe różnice stwierdzono w produktach nieaglomerowanych.
2. Największe zmiany odnotowano w odniesieniu do sypkości i zwilżalności. Najmniejszą sypkość miały mieszaniny zawierające mleko w proszku, natomiast najdłuższy czas zwilżania stwierdzono w odniesieniu do produktu o podstawowym składzie. Pomimo tych zmian sypkości i zwilżalności aglomeraty nie utraciły cech produktów instant.

Literatura

- [1] Borenstein B., La Roche H.: The role of ascorbic acid in food. *Food Technol.*, 1987, **41(11)**, 98-99.
- [2] Domian E.: Studia nad właściwościami sorpcyjnymi mieszanin proszków spożywczych, praca doktorska. Katedra Inżynierii i Maszynoznawstwa Przem. Spoż. SGGW. Warszawa, 1997.
- [3] Domian E.: Aglomeracja w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 2002, **8**, 80-88.
- [4] Domian E. Lenart A.: Adsorpcja pary wodnej przez żywność w proszku. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **4 (25)**, 27-35.
- [5] PN-92-A-86024. Mleko i przetwory mleczarskie. Mleko w proszku.
- [6] PN ISO 8460/99. Kawa rozpuszczalna. Oznaczenie gęstości nasypowej swobodnej i gęstości nasypowej ubitej.
- [7] Sikorski Z.: Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT. Warszawa 1996, s. 394-396.

- [8] Waszkiewicz–Robak B.: Rynkowe produkty spożywcze o wzbogaconej wartości odżywczej. *Przem. Spoż.*, 2002, **8**, 74-78.
- [9] Zaki H.: Sukces suchych mieszanek. *Przem. Spoż.*, 2003, **10**, 38-40.

INFLUENCE OF STORAGE TIME ON GENERAL PROPERTIES AND STABILITY OF CACAO POWDER WITH L-ASCORBIC ACID ADDED

S u m m a r y

Cacao instant enriched in vitamin C has desired properties by consumer, constitutes source of vitamins, minerals and is characterized by selected aroma and colour and is quick and easy to prepare. The knowledge of vitamin C content changes in time permits to expect vitamin C stability in cocoa instant during storage time in specified conditions.

The ascorbic acid is very important in food technology as vitamin factor and as a factor which protects different food components. The oxidation process of food components can cause unfavourable changes during the technological process and storage.

The aim of this research was to analyse the storage time influence on physical properties and the stability of instant cacao with L-ascorbic acid added. The range of the research assumed also the influence of the raw material composition, agglomeration, as well as the way of L-ascorbic acid insertion to cacao on physical properties of the analyzed products. Investigated materials consists powders products like: instant sugar – powdered sugar, alkalized cacao, maltodextrin, non-fat milk powder, soy lecithin and L-ascorbic acid. The storage process deteriorated the mixtures and agglomerate properties, without regard on the way of L-ascorbic acid insert. The largest differences of the powder products were received during flowability and wettability analysis.

Key words: agglomeration, flowability, wettability, granulation, cacao, L-ascorbic acid ☒

MARIA BALCEREK, JÓZEF S. SZOPA

ZAWARTOŚĆ KARBAMINIANU ETYLU W DESTYLATACH OWOCOWYCH

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu rodzaju owoców oraz warunków fermentacji (pH, temperatury) zacierów owocowych na zawartość karbaminianu etylu w uzyskanych destylatach.

Przeprowadzono również badania modelowe dotyczące wpływu warunków przechowywania spirytusów oraz stężenia etanolu i cyjanowodoru na zmiany zawartości karbaminianu etylu.

Największe stężenia cyjanowodoru (4,42 mg/l spirytusu 40% obj.) oraz karbaminianu etylu (2,41 mg/l spirytusu 40% obj.) oznaczono w surowym spirytusie wiśniowym, zaś najniższe w destylacie jabłkowym (1,07 mg HCN i 0,20 mg EC/ l spirytusu 40% obj.). Podwyższenie temperatury fermentacji zacierów śliwkowych od 18 do 36°C wpłynęło na 2-krotny wzrost zawartości cyjanowodoru od 2,65 do 5,77 mg/l spirytusu 40% obj. i 3-krotny wzrost stężenia karbaminianu etylu od 0,42 do 1,37 mg/l spirytusu 40% obj. Regulacja pH miazgi owocowej od wartości 3,5 do 5,0 nie wpłynęła w istotny sposób na zawartość karbaminianu w destylatach; jego stężenie wynosiło od 0,54 do 0,65 mg/l spirytusu 40% obj. Z przeprowadzonych badań wynika, że światło, temperatura, podwyższone stężenie etanolu i cyjanowodoru mogą sprzyjać syntezie karbaminianu etylu.

Słowa kluczowe: cyjanowódór, karbaminian etylu (uretan), destylaty owocowe, fermentacja

Wstęp

Obecność karbaminianu etylu (EC), zwanego uretanem, w napojach alkoholowych, bezalkoholowych i innych produktach spożywczych, wytwarzanych z udziałem drożdżów (chleb, sery, jogurty, kiszona kapusta) stwierdzono już w latach 70. XX w. [8].

Przeprowadzone badania dowiodły kancerogennego działania karbaminianu etylu na zwierzęta doświadczalne. Został on sklasyfikowany przez International Agency for Research on Cancer, jako czynnik prawdopodobnie rakotwórczy dla człowieka [13, 15].

Prekursorem karbaminianu etylu może być karbamylofosforan wytwarzany przez niektóre szczepy drożdży i pleśni z jonów amonowych, dwutlenku węgla, przy udziale

ATP. W cyklu mocznikowym karbamylfosforan reaguje z L-ornityną, tworząc L-cytrulinę [3]. W warunkach fermentacji alkoholowej dochodzi do zaburzenia tej reakcji, powstaje wówczas karbaminian etylu [9]. Szczególnie szybkiej przemianie do karbaminianu etylu ulega mocznik, który może powstawać podczas fermentacji z dwutlenku węgla i innych związków azotowych. Pozostałości mocznika po fermentacji można usuwać preparatem kwaśnej ureazy, pochodzącej z *Lactobacillus fermentum* [5].

Christoph i wsp. [3] uważają, że podczas fermentacji zacierów z owoców pestkowych, karbaminian etylu może powstawać głównie w wyniku reakcji między alkoholem etylowym a uwalnianym kwasem cyjanowodorowym lub jego solami.

Zasadniczy wpływ na wzrost zawartości EC w napojach alkoholowych mają warunki ich przechowywania. Szczególnie mocno przyspiesza powstawanie karbaminianu etylu światło słoneczne. Szybkość jego syntezy zwiększa się wraz z podwyższeniem temperatury magazynowania. Przechowywanie prób destylatów owocowych w ciemności zabezpiecza produkt przed wzrostem stężenia EC.

Na tworzenie karbaminianu etylu wpływa również koncentracja etanolu w produktach. Doświadczenia wykazały, że wysokie stężenie etanolu sprzyja reakcjom powstawania tego związku. Zauważono, że najwięcej tworzy się go w końcowej fazie fermentacji, kiedy stężenie alkoholu etylowego jest najwyższe [6].

Celem badań była ocena wpływu rodzaju owoców oraz warunków fermentacji (pH, temperatury) zacierów owocowych na zawartość karbaminianu etylu w uzyskanych destylatach. Przeprowadzono również badania modelowe odnośnie wpływu warunków przechowywania spirytusów oraz stężenia etanolu i cyjanowodoru na zmiany stężenia EC.

Materiał i metody badań

Materiałem doświadczalnym były śliwki (Węgierka zwykła), wiśnie, jabłka oraz aronia. Ocenę przydatności technologicznej owoców przeprowadzono zgodnie z zalecanymi wymaganiami normatywnymi, powszechnie stosowanymi w przemyśle owocowo-warzywnym [11].

Do fermentacji zacierów stosowano suszone drożdże winiarskie *Saccharomyces bayanus*, w ilości 0,3 g s.s./kg miazgi owocowej. Jako pożywkę dodawano fosforan diamonu (0,2 g/kg). W celu przygotowania zacierów do fermentacji, rozmrożone i pozbawione pestek owoce (śliwki, wiśnie) poddawano rozdrobieniu. Do miazgi owocowej dodawano 10% (m/m) pestek rozdrobnionych, pochodzących z danej porcji owoców. Zacierzy były różnicowane: rodzajem owoców, pH miazgi (3,5; 4,0; 5,0), temp. fermentacji (18–20°C, 26°C, 35°C). Fermentację zacierów owocowych prowadzono w kolbach płaskodennych, zaopatrzonych w rurki fermentacyjne, do momentu aż masa kolb mierzona w odstępach kilku godzin nie ulegała zmianie, co świadczyło o zakończeniu wydzielania dwutlenku węgla.

Ocenę wskaźników fermentacji prowadzono według metod przyjętych w gorzelnictwie.

W wyniku destylacji zacierów odfermentowanych otrzymano destylaty o mocy 23–29% obj., które następnie poddawano wzmocnieniu do mocy ok. 43% obj. w zestawie destylacyjnym z birektyfikatorem.

Skład chemiczny destylatów, z uwzględnieniem zawartości cyjanowodoru, oznaczano według metod obowiązujących w przemyśle spirytusowym [10, 12].

Zawartość karbaminianu etylu w spirytusach owocowych oznaczano metodą chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią masową [4]. Próbkę badanego spirytusu pobierano w takiej ilości, aby po uzupełnieniu do objętości 50 ml stężenie etanolu nie przekraczało 10% obj. Następnie poddawano ją 2-krotnej ekstrakcji z udziałem 75 ml chlorku metylenu. Uzyskany ekstrakt poddawano filtracji przez sączek z bibuły Watman 1 i osuszano, przepuszczając przez kolumnkę szklaną wypełnioną 40 g bezwodnego Na_2SO_4 (wysokość wypełnienia 0,2 m; średnica 0,015 m). Następnie dodawano do niego 5 ml octanu etylu i zateżano w wyparce w temp. 28°C do objętości ok. 2 ml. Pozostałość po odparowaniu przenoszono ilościowo do próbówki i popłukując 3-krotnie kolbę wyparki 1 ml octanu etylu, uzupełniano do objętości 5 ml. Ekstrakt karbaminianu etylu w octanie etylu dozowano w ilości 2 μl do kolumny chromatografu. Używano chromatografu gazowego firmy Agilent, typ 6890N, z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID i dozownikiem SSL. Do rozdziału składników zastosowano kolumnę kapilarną wypełnioną fazą stacjonarną DB-WAX 123-7032 o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,32 mm i grubości filmu 0,50 μm . Warunki analizy GC: programowanie temperatury – 50°C (25 min) > 5°C / min > 250°C (10 min), temp. dozownika 260°C, temp. detektora 250°C, przepływ gazu nośnego – helu – 1ml/min, splitless.

Potwierdzenia tożsamości karbaminianu etylu dokonywano na podstawie obecności jonów m/z 62, 74 i 89, stosując chromatograf gazowy firmy Fisons, typ GC 8000, sprzężony ze spektrometrem masowym MD 800. Stosowano kolumnę kapilarną i warunki analizy jw.; energia jonizacji 70 eV.

Stężenie karbaminianu etylu w badanych spirytusach określano na podstawie krzywej kalibracji.

Analizę statystyczną (odchylenie standardowe, korelację, test t-Studenta na poziomie istotności $\alpha = 0,05$) przeprowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego Origin 6.0. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Grupą surowców stosowanych w gorzelnictwie są owoce pestkowe, takie jak: wiśnie, śliwki oraz ziarnkowe: jabłka, aronia. Otrzymane z nich destylaty charakteryzują się bogatym smakiem i zapachem, pochodzącym z pierwotnych

i wtórnych składników aromatu owoców oraz metabolitów fermentacji [7]. Destylaty owocowe mogą jednak zawierać również związki niekorzystne dla zdrowia, m.in.: cyjanowodór oraz karbaminianu etylu.

Celem uzyskania destylatów owocowych, stanowiących materiał badawczy, przeprowadzono próby fermentacji zacierów: śliwkowych, wiśniowych, aroniowych i jabłkowych. Skład chemiczny przerabianych owoców przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Skład chemiczny owoców.
Chemical composition of fruits.

Parametr Parameter	Jednostka Unit	Śliwki Plum	Wiśnie Cherry	Aronia Black chokeberry	Jabłka Apple
Sucha substancja Dry matter	[g/100g]	16,50± 0,20	15,20± 0,15	19,60± 0,35	13,10±0,11
Ekstrakt Extract	[°Błg]	13,50± 0,20	12,40± 0,15	13,90± 0,25	11,50±0,12
Kwasowość Total acidity	[g kw. jabł./100 g] [g apple acid/100 g]	1,12± 0,05	1,88± 0,05	0,80± 0,03	0,33±0,02
Cukry redukujące Reducing sugar	[g glukozy/ 100 g] [g glucose/100 g]	6,33± 0,20	6,50± 0,25	6,40± 0,20	5,95±0,03
Cukry ogółem Total sugar	[g inwertu / 100 g] [g inverted sugar/100 g]	8,27± 0,30	8,41± 0,35	7,67± 0,10	6,98±0,05
Białko ogółem Total protein	[% s.m.] [% d.s.]	4,82± 0,04	5,85± 0,05	3,11± 0,02	1,20±0,01
Popiół Ash	[%s.m.] [% d.s.]	0,48± 0,01	0,80±0,03	2,24± 0,06	1,32±0,04
pH	-	3,50± 0,05	3,22± 0,03	3,67± 0,06	3,74±0,06
Cyjanowodór Prussic acid	[mg/100g]	6,12± 0,05	8,55±0,09	4,49±0,06	2,50±0,03

Zawartość suchej substancji oraz ekstraktu wynosiła, odpowiednio od 13,10 g/100 g i 11,50°Błg w jabłkach do 19,60 g/100 g i 13,90°Błg w aronii.

Istotnym składnikiem owoców, z punktu widzenia wydajności fermentacji, są cukry. Najwyższym stężeniem cukrów ogółem, na poziomie 8,27–8,41 g inwertu/100 g, przy zawartości cukrów redukujących 6,33–6,50 g glukozy/100 g, odznaczały się śliwki i wiśnie.

Najuboższym surowcem, zarówno pod względem zawartości cukrów (6,98 g inwertu/100 g), jak i związków azotowych, w przeliczeniu na białko ogółem (1,20% s.m.), były jabłka. Odznaczały się one również stosunkowo niską kwasowością, która wynosiła 0,33 g kwasu jabłkowego/100 g.

Zawartość cyjanowodoru w owocach ziarnkowych wynosiła od 2,50 mg/100 g jabłek do 4,49 mg/100 g aronii, natomiast w owocach pestkowych wynosiła odpowiednio: 6,12 mg/100 g śliwek i 8,55 mg/100 g wiśni.

Oceniano wpływ rodzaju owoców oraz warunków ich fermentacji na zawartość cyjanokwów i karbaminianu etylu w uzyskanych spirytusach. Najwyższe stężenie cyjanowodoru stwierdzono w spirytusach: śliwkowym i wiśniowym (4,28–4,42 mg/l spirytusu 40% obj.), najniższe zaś w jabłkowym (1,07 mg/l spirytusu 40% obj.) (tab. 2). Wyższe stężenia cyjanokwów w przypadku spirytusów z owoców pestkowych były konsekwencją dodania do zacierów rozdrobnionych pestek. Potwierdzeniem tej obserwacji są wyniki badań Voldřicha i Kyzlinka [13], którzy dokonując oceny cyjanowodoru w przetworach owocowych, stwierdzili, że decydującymi czynnikami wpływającymi na jego stężenie były: poziom glikozydów cyjanogennych w surowych owocach oraz warunki obróbki cieplnej. Zdaniem autorów owoce pestkowe należy poddawać drylowaniu lub rozdrobnieniu bez uszkodzenia pestek.

Tabela 2

Zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w surowych spirytusach (destylatach) owocowych, determinowana rodzajem owoców.

Content of prussic acid and ethyl carbamate in raw fruit spirits (distillates) determined by fruit type.

Parametr Parameter	Jednostka Unit	Spirytusy surowe Raw spirits			
		Śliwkowy Plum	Wiśniowy Cherry	Jabłkowy Apple	Aroniowy Black chokeberry
Cyjanowódor Prussic acid	[mg/l spirytusu 40% obj.] [mg/l spirit 40% v/v]	4,28±0,04	4,42±0,04	1,07±0,01	3,20±0,03
Karbaminian etylu Ethyl carbamate		0,58±0,04	2,41±0,16	0,20±0,01	0,54±0,04

Najniższą zawartość karbaminianu etylu oznaczono w destylacie jabłkowym (0,20 mg/l spirytusu 40% obj.); w aroniowym i śliwkowym była zbliżona i wynosiła 0,54–0,58 mg/l spirytusu 40% obj. Destylat wiśniowy odznaczał się kilkakrotnie wyższym stężeniem karbaminianu etylu (2,41 mg/l spirytusu 40% obj.). Przyczyną mogło być relatywnie wysokie stężenie cyjanowodoru w surowych owocach (8,88 mg/100 g) (tab. 1), który reagując z powstającym podczas fermentacji etanolem, uległ przemianom do karbaminianu.

Oceniano wpływ warunków fermentacji (temperatury, pH,) na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu, na przykładzie spirytusów śliwkowych. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 3–4. Wraz z podwyższeniem temperatury fermentacji od

18 do 36°C odnotowano ponad 2-krotny wzrost zawartości cyjanowodoru, od 2,65 do 5,77 mg/l spirytusu 40% obj. w destylatach śliwkowych. Natomiast zawartość karbaminianu etylu wzrosła ponad 3-krotnie, od 0,42 do 1,37 mg/l spirytusu 40% obj. (tab. 3). Uzyskane wyniki badań są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy wykazali, że podwyższona temperatura katalizuje proces syntezy cyjanowodoru i karbaminianu etylu [5].

Tabela 3

Zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w surowych spirytusach (destylatach) śliwkowych, determinowana temperaturą fermentacji zacierów.

Content of prussic acid and ethyl carbamate in raw plum spirits (distillates) determined by fermentation temperature of mashes.

Parametr Parameter	Jednostka Unit	Temperatura fermentacji Temperature of fermentation [°C]		
		18	28	36
Cyjanowódor Prussic acid	[mg/l spirytusu 40% obj.] [mg/l spirit 40% v/v]	2,65±0,04	4,28±0,06	5,77±0,07
Karbaminian etylu Ethyl carbamate		0,42±0,03	0,58±0,04	1,37±0,12

Badając wpływ pH zacierów śliwkowych na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w spirytusach surowych stwierdzono, że destylat z brzeczeki odfermentowanej o pH 5,0 charakteryzował się, średnio o 54%, wyższym stężeniem cyjanowodoru (6,86 mg/l spirytusu 40% obj.) wobec uzyskanych z zacierów o pH 3,5 i 4,0 (4,28 i 4,65 mg/l spirytusu 40% obj.) (tab. 4). Zakwaszenie zacierów prowadzi do obniżenia aktywności enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę glikozydów cyjanogennych zawartych w pestkach [1], co w konsekwencji może prowadzić do obniżenia stężenia wolnego cyjanowodoru w spirytusach surowych ($r = 0,9800$). Nie stwierdzono statystycznie istotnej korelacji pomiędzy pH środowiska fermentującego a zawartością karbaminianu etylu ($r = -0,5291$).

Tabela 4

Zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w surowych spirytusach (destylatach) śliwkowych, determinowana wartością pH zacierów.

Content of prussic acid and ethyl carbamate in raw fruit spirits (distillates) determined by pH of mashes.

Parametr Parameter	Jednostka Unit	pH zacierów pH of mashes		
		3,5	4,0	5,0
Cyjanowódór Prussic acid	[mg/l spirytusu 40% obj.] [mg/l spirit 40% v/v]	4,28±0,06	4,65±0,06	6,86±0,08
Karbaminian etylu Ethyl carbamate		0,58±0,04	0,65±0,05	0,54±0,04

Czynniki wpływające na zmiany zawartości karbaminianu etylu w destylatach owocowych (badania modelowe)

Badano wpływ warunków przechowywania spirytusów oraz stężenia etanolu i cyjanowodoru na zawartość karbaminianu etylu. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 5–7.

Tabela 5

Zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu determinowana warunkami przechowywania spirytusu.
Content of prussic acid and ethyl carbamate determined by spirit storage conditions.

Warunki przechowywania Storage conditions		Cyjanowódór Prussic acid			Karbaminian etylu Ethyl carbamate		
		[mg/l spirytusu 40% obj.] / [mg/l spirit 40% v/v]					
Temperatura Temperature	Naświetlenie Light exposition	Tygodnie / Weeks			Tygodnie / Weeks		
		0	1	2	0	1	2
4 °C	ciemność/dark	10,00	9,95	9,90	0,00	<0,01	<0,01
20 °C	ciemność/dark	10,00	9,78	9,75	0,00	<0,01	<0,01
20 °C	światło dzienne daylight	10,00	9,53	8,73	0,00	0,04	0,13

Objaśnienia:/ Explanatory notes:

Stężenie etanolu w roztworze 40% obj. / Ethanol concentration in solution – 40% v/v;

* Wzrost nasłonecznienia w drugim tygodniu przechowywania / Increase of insolation in the second week of storage.

Tabela 6

Zawartość karbaminianu etylu determinowana stężeniem cyjanowodoru.
Content of ethyl carbamate determined by prussic acid concentrations.

Cyjanowodór / Prussic acid			Karbaminian etylu / Ethyl carbamate		
[mg/l spirytusu 40% obj.] / [mg/l spirit 40% v/v]					
Tygodnie przechowywania / Storage weeks					
0	1	2	0	1	2
0	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01
10	9,53	8,73	0,00	0,04	0,13
20	18,90	16,68	0,00	0,19	1,11

Objaśnienia:/ Explanatory notes:

Stężenie etanolu w roztworze 40% obj. / Ethanol concentration in solution – 40 % v/v

Warunki przechowywania: światło dzienne, temp. 20°C, wzrost nasłonecznienia w drugim tygodniu przechowywania

Storage conditions: daylight, temp. 20°C, increase of insolation in the second week.

Tabela 7

Zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu determinowana stężeniem etanolu.

Content of prussic acid and ethyl carbamate determined by ethanol concentration.

Stężenie alkoholu [% obj.] Ethanol concentration [% v/v]			Cyjanowodór Prussic acid [mg/l]			Karbaminian etylu Ethyl carbamate [mg/l]		
Tygodnie przechowywania / Storage weeks								
0	1	2	0	1	2	0	1	2
20	19,85	19,30	10,00	9,71	9,03	0,00	<0,01	0,02
40	39,60	39,45	10,00	9,53	8,57	0,00	0,04	0,13
60	59,40	59,15	10,00	8,75	8,13	0,00	0,13	0,43

Objaśnienia:/ Explanatory notes:

Warunki przechowywania: światło dzienne, temp. 20°C, wzrost nasłonecznienia w drugim tygodniu przechowywania / Storage conditions: daylight, temp. 20°C, increase of insolation in the second week.

Analizując otrzymane wyniki, stwierdzono katalityczny wpływ światła na syntezę karbaminianu etylu. W ciągu dwóch tygodni prowadzenia obserwacji stwierdzono zmniejszenie zawartości cyjanowodoru w badanym spirytusie z 10,00 do 8,73 mg/l spirytusu 40% obj. oraz zwiększenie stężenia karbaminianu etylu do 0,13 mg/l spirytusu 40% obj. W drugim tygodniu przechowywania prób nastąpił wzrost nasłonecznienia – stężenie EC w tym okresie wzrosło ponad dwukrotnie w stosunku do

oznaczonego po pierwszym tygodniu. W przypadku prób przechowywanych bez dostępu światła, zarówno w temp. 4°C, jak i w 20°C, jego stężenie było mniejsze od 0,01 mg/l spirytusu 40% obj. (tab. 5). Otrzymane wyniki potwierdzają wnioski sformułowane przez Baumaną i Zimmerli`ego [2] oraz Mildau i wsp. [6], że warunki przechowywania (światło i temperatura) mogą istotnie wpływać na zawartość karbaminianu etylu w destylatach owocowych. Szybkość syntezy EC zwiększa się wraz z podwyższeniem temperatury magazynowania, a przechowywanie prób destylatów w ciemności zabezpiecza je przed wzrostem stężenia karbaminianu etylu.

Dokonano oceny wpływu stężenia cyjanowodoru na zawartość karbaminianu etylu (tab. 6). Stwierdzono 9-krotny wzrost zawartości EC, od 0,13 do 1,11 mg/l spirytusu 40% obj., przechowywanego przez 2 tygodnie z dodatkiem 20 mg HCN/l w porównaniu z zawierającym 10 mg HCN/l. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że wysokie stężenie cyjanokwamów oraz naświetlenie prób spirytusu były główną przyczyną wzrostu zawartości karbaminianu etylu.

Wykazano istotny wpływ koncentracji etanolu w roztworach spirytusowych na tworzenie karbaminianu etylu ($r=0,9660$). Po dwutygodniowym okresie przechowywania (w analogicznych warunkach) prób spirytusu, o mocy 20, 40, 60% obj., z dodatkiem 10 mg HCN/l każda, największe stężenie EC (0,43 mg/l) oznaczono w próbie o zawartości etanolu 60% obj. (tab. 7).

Wnioski

1. Stwierdzono wpływ rodzaju fermentowanych owoców na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w uzyskanych destylatach; największą zawartość cyjanowodoru (4,42 mg/l spirytusu 40% obj.) oraz karbaminianu etylu (2,41 mg/l spirytusu 40% obj.) oznaczono w surowym spiry图斯ie wiśniowym, zaś ich najmniejszym stężeniem odznaczał się destylat jabłkowy (1,07 mg HCN i 0,20 mg EC/l spirytusu 40% obj.).
2. Podwyższenie temperatury fermentacji zacierów śliwkowych z 18 do 36°C wpłynęło na około 2-krotny wzrost stężenia cyjanowodoru do wartości 5,77 mg/l spirytusu 40% obj. i ponad 3-krotne zwiększenie zawartości karbaminianu, do 1,37 mg/l spirytusu 40% obj.
3. Regulacja pH zacierów śliwkowych od wartości 3,5 do 5,0 spowodowała 60-procentowy wzrost stężenia cyjanowodoru, do 6,86 g/l spirytusu 40% obj. W warunkach prowadzonych doświadczeń nie zaobserwowano istotnego wpływu pH zacierów na zawartość karbaminianu etylu w destylatach; jego stężenie wynosiło od 0,54 do 0,65 mg/l spirytusu 40% obj.
4. Z przeprowadzonych badań modelowych wynika, że światło, temperatura oraz podwyższone stężenie etanolu i cyjanowodoru mogą sprzyjać syntezie karbaminianu etylu.

Praca naukowa finansowana ze środków KBN w latach 2004-2006 jako projekt badawczy nr 2P06T 007 26.

Literatura

- [1] Balcerek M., Szopa J.S.: Optimierung der Gewinnungstechnologie von Aronia-Spirituosen - Teil I: Auswahl der Gärungsbedingungen für die Aronia-Maischen. Dtsch. Lebensmitt. Rundsch., 2002, **98** (9), 326-331.
- [2] Bauman U., Zimmerli B.: Beschleunigte Ethylcarbamatbildung in Spirituosen. Schweiz. Z. Obst u. Weinbau, 1986, **122** (21), 602-607.
- [3] Christoph N., Schmitt A., Hildenbrand K.: Ethylcarbamate in Obstbranntweinen. Alk. Ind, 1987, **100**(16), 369 i 404, 409-411; 1988, **15**, 342-347; 1988, **16**, 369-374.
- [4] Conacher H.B.S., Page B.D., Lau B.P., Lawrence J.F., Bailey R., Calway P., Hanchay J. P., Mori B.: Capillary gas chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by GC/MS. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1987, **70** (4), 749-751.
- [5] Fujinawa S., Todoroki H., Ohashi N., Toda J., Terasaki M.: Application of an acid urease to wine: determination of trace urea in wine. J. Food Sci., 1990, **55** (4), 1018-1022, 1038.
- [6] Mildau G., Preuss A., Frank W., Heering W.: Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages. Improved analysis and light dependent formation (in German). Dtsch. Lebensmitt. Rundsch., 1987, **3**, 69.
- [7] Opolska G., Drzazga B.: Charakterystyka związków smakowo-zapachowych destylatów owocowych i ich powstawanie. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 1991, **6**, 12-13 i 16.
- [8] Ough C.: Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. J. Agric. Food. Chem., 1976, **24**, 2323-2328.
- [9] Ough, C. S., Crowl E. A., Gutlove B. R.: Carbamyl compounds reactions with ethanol. Am. J. Enol. Vitic., 1988, **39** (3), 239.
- [10] PN-A-79528:2000. Spirytus (alkohol etylowy). Metody badań.
- [11] PN-90/A-75101:2002. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych.
- [12] PN-A-79529-13:2005. Napoje spirytusowe i spirytus butelkowany. Metody badań. Oznaczanie zawartości cyjanowodoru.
- [13] Stoewsand G.S., Anderson J.I., Munson I.: Inhibition by wine of tumor genesis induced by ethyl carbamate (urethane) in mince. Fd. Chem. Toxic., 1991, **29**, 291-295.
- [14] Voldřich M., Kyzlink V.: Cyanogenesis in canned stone fruits. J. Food Sci., 1992, **57** (1), 161-162, 189.
- [15] Wai Nang Choy, Madakas G., Paradisin W.: Co-administration of ethanol transiently inhibits urethane genotoxicity as detected by a kinetic study of micronuclei induction in mice. Safety Evaluation Center, Schering-Plough Research Institute. New York 1995.


ETHYL CARBAMATE CONTENT IN FRUIT DISTILLATES

S u m m a r y

The aim of this paper was to determine the effect of fruit types and fermentation conditions (pH, temperature) of fruit mashes on the ethyl carbamate content in received distillates.

The influence of storage conditions of spirits and concentration of ethanol and prussic acid on the content changes of ethyl carbamate was also tested.

The highest levels of prussic acid (4,42 mg/l spirit 40% v/v) and ethyl carbamate (2,41 mg/l spirit 40% v/v) were found in raw cherry spirit, the lowest concentrations of these compounds were assayed in the apple distillate (1,07 mg HCN and 0,20 mg EC/l spirit 40% v/v). The increase of fermentation temperatures of plum mashes from 18 to 36°C, influenced on the levels of prussic acid and urethane in received distillates. Prussic acid content at 18°C was 2,65 mg and at 36°C – 5,77 mg/l spirit 40% v/v (2-fold increase). Ethyl carbamate content at 18°C was 0,42 mg and at 36°C 1,37 mg/l spirit 40% v/v (3-fold increase). The increase of the pH value from 3,5 to 5,0 of plum mashes, has no effect on ethyl carbamate levels in raw spirits; its concentration was from 0,54 to 0,65 mg/l spirit 40% v/v. From carried out tests it can be observed that light, temperature, higher ethanol and prussic acid concentration may be conducive to ethyl carbamate synthesis.

Key words: prussic acid, ethyl carbamate (urethane), fruit distillates, fermentation 

MIROSŁAW PYSZ, PAWEŁ M. PISULEWSKI, TERESA LESZCZYŃSKA

**WPŁYW ODDZIAŁYWANIA IMPULSOWEGO I CIĄGŁEGO POLA
MIKROFALOWEGO NA WARTOŚĆ ŻYWIENIOWĄ
I WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE
KIEŁKOWANYCH NASION SOI**

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było porównanie wpływu nietermicznej i termicznej metody obróbki żywności, a więc oddziaływania impulsowego oraz ciągłego pola mikrofalowego na zawartość składników odżywczych, wybranych składników nieodżywczych oraz właściwości przeciwutleniające kiełkowanych nasion soi.

Materiał badawczy stanowiły nasiona trzech odmian soi hodowli krajowej: Augusta, Aldana i Nawiko. Nasiona poddano kiełkowaniu, a następnie obróbce nietermicznej przy zastosowaniu impulsowego pola mikrofalowego oraz ogrzewaniu za pomocą ciągłego pola mikrofalowego. Podstawowy skład chemiczny materiału badawczego oznaczono metodami standardowymi AOAC. Aktywność inhibitorów tripsyny oznaczono metodą Kakade i wsp., zawartość polifenoli przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu'a, natomiast aktywność przeciwutleniającą metodą Pekkarinen i wsp. z zastosowaniem wolnego rodnika DPPH^{*}.

Kiełkowanie nasion spowodowało uzyskanie statystycznie istotnej ($P < 0,05$) redukcji zawartości inhibitorów tripsyny i polifenoli oraz obniżenia aktywności przeciwutleniającej. Procesy termiczne, którym poddano skiełkowane nasiona spowodowały statystycznie istotną ($P < 0,05$) inaktywację termolabilnych składników soi (inhibitorów tripsyny), przy jednoczesnym wzroście zawartości polifenoli oraz aktywności przeciwutleniającej. Zastosowanie procesów nietermicznych spowodowało statystycznie istotny ($P < 0,05$) wzrost aktywności inhibitorów tripsyny oraz aktywności przeciwutleniającej skiełkowanych nasion soi. Wykazano dodatnią, umiarkowaną korelację pomiędzy zawartością polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą kiełkowanych i poddanych obróbce nietermicznej nasion soi oraz silną korelację tych parametrów po obróbce termicznej badanych nasion.

Słowa kluczowe: pole mikrofalowe, kiełkowane nasiona soi, polifenole, aktywność przeciwutleniająca

Wprowadzenie

Rosnąca świadomość żywieniowa konsumentów wymaga od producentów żywności ciągłego podnoszenia jakości swoich produktów. Obecnie wzrasta

Dr inż. M. Pysz, prof. dr hab. P. M. Pisulewski, dr hab. T. Leszczyńska, Katedra Żywnienia Człowieka, Akademia Rolnicza w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, tel. (012) 662-48-17, fax. (012) 662-48-12

zainteresowanie żywnością bezpieczną, o wysokiej jakości zdrowotnej, żywnością o odpowiedniej zawartości składników odżywczych, o jak najmniejszej zawartości substancji konserwujących, a jednocześnie wygodnej w przygotowaniu do spożycia i łatwej do przechowywania [18]. Coraz większą uwagę zwraca się także na właściwości funkcjonalne produktów spożywczych oraz zachowanie wartości odżywczej w procesach przetwarzania. Dlatego też dokonuje się ciągły postęp technologiczny w produkcji żywności, a producenci poszukują nowych technologii [4, 25].

Jedną z nowoczesnych metod utrwalania żywności może być impulsowe pole mikrofalowe. Badania naukowe dowodzą, że tzw. „nietermiczne” metody utrwalania żywności, do których zalicza się impulsowe pole mikrofalowe, zapewniają bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności, nie powodując strat składników odżywczych i substancji funkcjonalnych [8, 13, 14, 18].

Celem przeprowadzonych badań było porównanie wpływu nietermicznej i termicznej metody obróbki żywności, a więc impulsowego oraz ciągłego pola mikrofalowego na zawartość składników odżywczych, wybranych składników nieodżywczych oraz właściwości przeciwutleniających kiełkowanych nasion soi.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły nasiona trzech odmian soi hodowli krajowej: Augusta i Nawiko zakupione w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin AR w Poznaniu oraz Aldana pochodząca z Hodowli Roślin Strzelce w Strzelcach.

Nasiona wszystkich odmian poddawano kiełkowaniu. Przed procesem kiełkowania nasiona poddawano sterylizacji przez moczenie w etanolu w ciągu 1 min. Następnie nasiona uwodniono w wodzie destylowanej przez 6 h w temp. pokojowej i umieszczano pomiędzy grubą warstwą wilgotnej bawełnianej ściereczki. Nasiona pozostawiano na 4 dni przy średniej temp. 23°C. Były one okresowo zraszane wodą destylowaną.

Kiełkowane nasiona soi (K) wszystkich badanych odmian poddano obróbce nietermicznej przy zastosowaniu impulsowego pola mikrofalowego w reaktorze mikrofalowym RM 2001 firmy Plazmatronika o mocy 800 W. Badania przeprowadzono w Katedrze Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Wydziału Nauk o Żywności Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Kiełkowane nasiona otrzymały różną ilość impulsów: 15 (K+IPM15) i 20 (K+IPM20). Szerokość jednego impulsu wynosiła 90 ms, a odstęp pomiędzy impulsami trwał 600 ms. Temperatura podczas trwania procesu utrzymywała się na stałym poziomie 16°C.

Drugą partię tych samych skiełkowanych nasion soi poddawano ogrzewaniu za pomocą ciągłego pola mikrofalowego wg metody Rajkó i Szabó [24] w kuchence mikrofalowej Panasonic DIMENSION 4 nastawionej na moc 800 W w ciągu 111 oraz 222 sek. Nasiona otrzymały różne dawki energii: 1000 J/g (K+PM1000) i 2000 J/g (K+PM2000). Nasiona soi poddane kiełkowaniu oraz procesom nietermicznym i termicznym liofilizowano w urządzeniu CHRIST ALPHA 1-4 i rozdrabniano w młynku laboratoryjnym typu WŻ-1.

Podstawowy skład chemiczny materiału badawczego oznaczano standardowymi metodami AOAC [3]. Inhibitory trypsyny oznaczano metodą Kakade i wsp. [11] z zastosowaniem substratu syntetycznego BAPNA (N- α -Benzyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride), zawartość polifenoli metodą z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu'a, a aktywność przeciwutleniającą metodą Pekkarinen i wsp. [20] z zastosowaniem trwałego wolnego rodnika DPPH* (1,1-dwufenylo-2-pikrylhydrazyl).

Wyniki poddano dwuczynnikowej analizie wariancji, istotność różnic pomiędzy średnimi weryfikowano przy użyciu wielokrotnego testu rozstępu Dunkana na poziomie istotności $P < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wartość żywieniowa i właściwości przeciwutleniające surowych i kiełkowanych nasion soi

Zawartość podstawowych składników odżywczych i nieodżywczych w surowych i kiełkowanych nasionach soi odmian: Augusta, Aldana i Nawiko przedstawiono w tab. 1.

Zawartość białka w surowych nasionach soi poszczególnych odmian była zróżnicowana i kształtowała się na poziomie: 43,5% s.m. ('Augusta'), 37,7% s.m. ('Aldana'), 41,2% s.m. ('Nawiko'). Zwraca uwagę wyższa zawartość białka w nasionach soi odmian Augusta i Nawiko w porównaniu z odmianą Aldana. Ilości te zawierają się w zakresie 28,9–59,5% s.m., jaki uzyskała Konecka [15] oraz 35,0–45,0% s.m. otrzymanym przez Świderskiego i wsp. [26].

Zawartość białka uległa zmianie podczas procesu kiełkowania (K). W nasionach soi 'Aldana' nastąpiło zmniejszenie zawartości tego składnika o 3%, natomiast w soi 'Nawiko' wzrost o 7%. Zmiany te były statystycznie istotne ($P < 0,05$). Z danych literaturowych wynika, że kiełkowanie nasion roślin strączkowych wpływa na zawartość białka. Ghorpade i Kadam [7] oraz Donangelo i wsp. [5] podają, że zawartość białka po procesie kiełkowania wzrosła o 11% w soi i aż o 84% w soczewicy. Badania Pysza i wsp. [23] także dowodzą, że kiełkowanie zwiększało zawartość białka w nasionach grochu o 20%, a soi o 4,7%. Natomiast Maciejewska i wsp. [19] dowiedli, że po przeprowadzeniu kiełkowania nastąpiło zmniejszenie zawartości białka w soi o 16,7%, a w fasoli o 19,9%.

Tabela 1

Zawartość składników odżywczych i nieodżywczych w surowych i kiełkowanych nasionach soi odmian: Augusta, Aldana i Nawiko.

Nutritive and nonnutritive components content in raw and germinated soybean seeds, cultivars: Augusta, Aldana and Nawiko.

Rodzaj produktu Product type	Odmiana a Cultivar	Białko ogółem Total protein [% s.m.]	Tłuszcz Fat [%s.m.]	Popiół Ash [%s.m.]	Sacharydy ogółem Total saccharides [% s.m.]	Aktywność inhibitorów trypsyny Trypsin inhibitors activity [TIU/ mg]	Polifenole Polyphenols [mg/ 100 g s.m.]	Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity [% RSA]
Nasiona surowe Raw seeds	Augusta	43,5d	13,0a	5,7b	37,8d	46,5e	543,1cd	49de
	Aldana	37,7b	13,5a	6,6c	42,3f	45,8d	566,9f	53g
	Nawiko	41,2c	13,2a	5,5a	40,1e	50,5f	549,4cde	51ef
Nasiona kiełkowane Germinated seeds	Augusta	43,0d	19,4b	5,7b	31,9ab	38,9a	494,0a	41b
	Aldana	36,5a	22,8c	6,7d	34,1c	39,9b	537,2c	42bc
	Nawiko	44,2de	19,4b	5,6ab	31,0a	42,7c	514,7ab	39ab

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($P < 0,05$)
Mean values in the same column with the different letters are statistically significantly different at the level ($P < 0.05$).

Zawartość tłuszczu w soi kształtowała się na poziomie: 13,0% s.m. ('Augusta'), 13,5% s.m. ('Aldana'), 13,2% s.m. ('Nawiko'). Różnice te były statystycznie nieistotne ($P > 0,05$). Otrzymane wyniki są niższe od zakresu 14,4–25,0% s.m. podanego przez Konecką [15], a także od poziomu 18,0–22,0% s.m. uzyskanego przez Jasińską i Koteckiego [10]. Pisulewska i Pisulewski [21] również otrzymali wyższe zawartości tłuszczu, tj. 21,0% s.m., w nasionach soi.

Po procesie kiełkowania (K) stwierdzono statystycznie istotny ($P < 0,05$) wzrost zawartości tłuszczu we wszystkich badanych odmianach nasion soi. W nasionach soi 'Augusta' ilość tłuszczu zwiększyła się o 49%, 'Aldana' o 69%, a w 'Nawiko' o 47%. Wyraźnemu wzrostowi zawartości tłuszczu w kiełkowanych nasionach towarzyszyło statystycznie istotne zmniejszenie zawartości ($P < 0,05$) sacharydów. W wyniku redukcji względnej zawartości niektórych składników otrzymuje się zwiększoną zawartość innych. Jest to zgodne z wynikami prezentowanymi przez Donangelo i wsp. [5], którzy także uzyskali wzrost zawartości tłuszczu w skiełkowanych nasionach soi (o 6,2%), łubinu (o 2,7%) oraz fasoli (o ok. 29%). Również Pysz i wsp. [23] stwierdzili zwiększenie (o 20,2%) zawartości tłuszczu w wyniku kiełkowania nasion soi. Natomiast odmienne zmiany zaprezentowali Ghorpade i Kadam [7], którzy dowiedli zmniejszenia zawartości tłuszczu podczas kiełkowania soi o około 83%.

Zawartość składników mineralnych (w postaci popiołu) w nasionach trzech badanych odmian soi kształtowała się następująco: 5,7% s.m. – 'Augusta', 6,6% s.m. – 'Aldana', 5,5% s.m. – 'Nawiko'. Stwierdzono statystycznie istotne ($P < 0,05$) różnice odmianowe. Nasiona soi 'Aldana' charakteryzowały się wyraźnie wyższą zawartością związków mineralnych, oznaczonych jako popiół, w porównaniu z odmianami Augusta oraz Nawiko. Wyniki te są zgodne z rezultatami badań Świderskiego i Waszkiewicz-Robak [27], którzy podają zawartość popiołu na poziomie ok. 6,0%, oraz

Jasińskiej i Koteckiego [10], którzy oznaczyli 6,6% zawartości popiołu w soi. Niższe wartości (ok. 4,7%) uzyskali Jacórzynski i Baryłko-Pikielna [9].

Proces kiełkowania (K) przyczynił się do nieznacznego, ale statystycznie istotnego ($P < 0,05$) wzrostu składników mineralnych w nasionach soi 'Aldana' (o 2%). Zawartość popiołu w skiełkowanych nasionach pozostałych odmian nie zmieniła się statystycznie istotnie ($P > 0,05$). Znacznie większy wzrost zawartości popiołu (o 52%) w kiełkowanych nasionach soi uzyskali Ghorpade i Kadam [7]. Zawartość bezazotowych substancji wyciągowych (sacharydów) w surowych nasionach soi poszczególnych odmian była zróżnicowana ($P < 0,05$) i kształtowała się na poziomie: 37,8% s.m. – 'Augusta', 42,3% s.m. – 'Aldana', 40,1% s.m. – 'Nawiko'. Wartości te są niewiele wyższe od ilości jaką podają Jacórzynski i Baryłko-Pikielna [9] – 34,8%, Świdorski i wsp. [28] – 28,6% (soja 'RAH-182') i 33,1% (soja 'Progres') oraz Kunachowicz i wsp. [16] – 32,7%.

Pod wpływem kiełkowania (K) nastąpił o statystycznie istotne ($P < 0,05$) obniżenie zawartości sacharydów w nasionach soi: 'Augusta' o 16%, 'Aldana' o 19%, a 'Nawiko' o 23%. Zostało to spowodowane wykorzystaniem ww. składnika przez roślinę podczas kiełkowania. Znaczny ubytek sacharydów doprowadził do zmiany proporcji składników odżywczych nasion soi. W wyniku tego zaobserwowano widoczny wzrost zawartości tłuszczu we wszystkich badanych odmianach soi oraz wzrost zawartości białka w nasionach soi 'Nawiko'.

W nasionach surowych najwyższą aktywność antytrypsynową stwierdzono w odmianie Nawiko (50,5 TIU/mg). Natomiast wyraźnie niższą ($P < 0,05$) aktywnością charakteryzowały się nasiona soi odmiany Augusta (46,5 TIU/mg) oraz Aldana (45,8 TIU/mg). Otrzymane wyniki są zbliżone do przedziału 50,4–83,3 TIU/mg podanego przez Zadernowskiego i Borowską [30]. Pisulewska i Pisulewski [21] podają, że aktywność inhibitorów trypsyny w soi 'Aldana' wynosi 57,13 TIU/mg, a w soi 'Nawiko' 62,08 TIU/mg. Natomiast Leontowicz i Kulasek [17] podają aktywność antytrypsynową nasion soi na poziomie 71,4 TIU/mg.

Kiełkowanie (K) spowodowało statystycznie istotną ($P < 0,05$) redukcję zawartości inhibitorów trypsyny: w nasionach soi 'Augusta' o 16%, 'Aldana' o 13%, a 'Nawiko' o 15% (tab.1). Inni badacze także wykazali, że kiełkowanie nasion roślin strączkowych redukuje zawartość inhibitorów trypsyny [5, 6, 7, 12, 17].

Pod względem zawartości polifenoli w badanym materiale stwierdzono duże różnice odmianowe. Najniższą zawartość polifenoli stwierdzono w nasionach soi odmiany Augusta (543,1 mg/100g s.m.), niewiele wyższą w 'Nawiko' (549,4 mg/100g s.m.), a najwyższą w nasionach 'Aldana' (566,9 mg/100g s.m.). Kiełkowanie nasion soi (K) spowodowało statystycznie istotny ($P < 0,05$) spadek zawartości polifenoli, w nasionach soi 'Augusta' o 9%, 'Nawiko' o 5%, a w 'Aldanie' o 6%. Odmienne wyniki otrzymali Pisulewski i wsp. [22]. W ich doświadczeniach kiełkowanie nasion bobu zwiększało zawartość polifenoli.

Aktywność przeciwutleniająca badanych nasion kształtowała się następująco: 49% RSA soja 'Augusta', 53% RSA 'Aldana' oraz 51% RSA 'Nawiko'. Aktywność

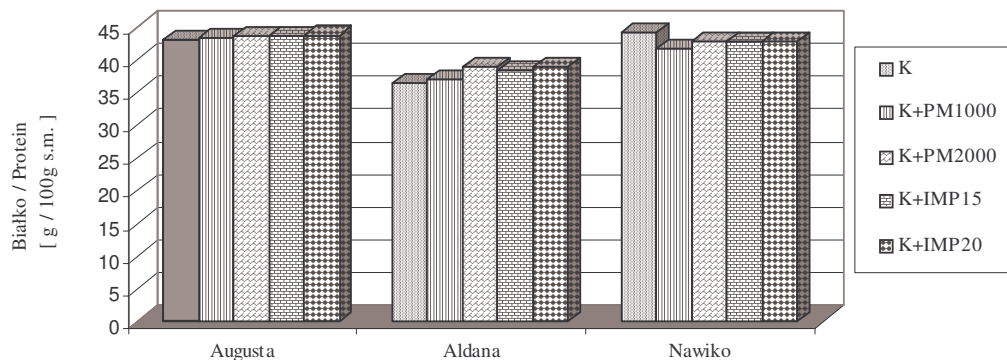
przeciwutleniająca nasion soi odmiany Aldana była wyraźnie wyższa od aktywności pozostałych odmian, co związane jest z wyższą zawartością polifenoli w nasionach tej odmiany.

Kiełkowanie (K) spowodowało wyraźną ($P < 0,05$) redukcję aktywności przeciwutleniającej nasion soi wszystkich odmian. W nasionach soi 'Augusta' aktywność przeciwutleniająca zmniejszyła się o 16%, 'Aldana' o 21%, a w 'Nawiko' o 23%. Wynik ten nie jest nieoczekiwany, gdyż jednocześnie zaobserwowano istotną redukcję zawartości czynników przeciwutleniających, tj. inhibitorów trypsyny i polifenoli.

Wpływ ciągłego i impulsowego pola mikrofalowego na wartość żywieniową i właściwości przeciwutleniające kiełkowanych nasion soi

Wpływ ciągłego pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 1000 J/g (K+PM1000), oraz 2000 J/g (K+PM2000), a także impulsowego pola mikrofalowego o 15 (K+IPM15) oraz 20 impulsach (K+IPM20) na zawartość białka w nasionach soi w porównaniu z zawartością tego składnika w nasionach kiełkowanych (K) przedstawiono na rys. 1.

Wzrost zawartości białka, odpowiednio o 7; 5 oraz 7%, można zauważyć w kiełkowanych nasionach soi 'Aldana' poddanych działaniu pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 2000 J/g (K+PM2000), 15 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM15) oraz 20 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM20). Pysz i wsp. [23] również otrzymali wzrost zawartości białka w nasionach soi pod wpływem procesów termicznych, takich jak autoklawowanie oraz gotowanie, odpowiednio o 3 i 31%. Natomiast w nasionach soi 'Nawiko' poddanych działaniu pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 1000 J/g (K+PM1000) zaobserwowano statystycznie istotne ($P < 0,05$) zmniejszenie zawartości białka (o 6%). Mniejszy, aczkolwiek również statystycznie istotny ($P < 0,05$), spadek zawartości białka (o 3%) wystąpił także w nasionach soi 'Nawiko' poddanych wpływowi pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 2000 J/g (K+PM2000), 15 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM15) oraz 20 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM20). Jest to również zgodne z wynikami badań Pysza i wsp. [23], którzy otrzymali redukcję zawartości białka (o 10%) w nasionach grochu poddanych procesowi termicznemu, którym było autoklawowanie. W przypadku soi 'Augusta' nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic ($P > 0,05$) pomiędzy zastosowanymi procesami technologicznymi. Podobne wyniki otrzymali Khalil i Mansour [12], którzy dowiedli, że gotowanie i autoklawowanie nasion bobu nie prowadziło do zmian zawartości białka.

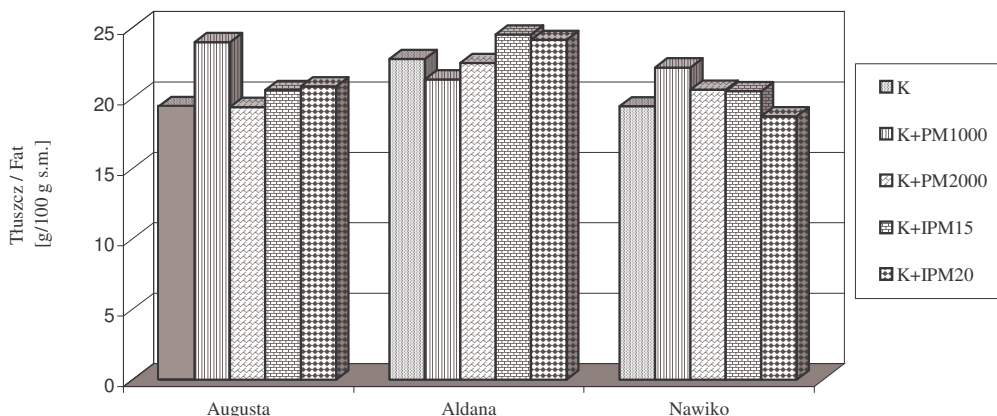


Rys. 1. Wpływ kiełkowania oraz oddziaływania pola mikrofalowego na zawartość białka w nasionach trzech odmian soi.

Fig. 1. The influence of germinating and affecting of microwave field on protein content in three different cultivars of soybean seeds.

Wpływ ciągłego pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 1000 J/g (K+PM1000) oraz 2000 J/g (K+PM2000), a także impulsowego pola mikrofalowego o 15 (K+IPM15) oraz 20 impulsach (K+IPM20) na zawartość tłuszczu w nasionach soi w porównaniu z zawartością tego składnika w nasionach kiełkowanych (K) przedstawiono na rys. 2.

Ogrzewanie ciągłym polem mikrofalowym o zakresie absorpcji energii 1000 J/g (K+PM1000) spowodowało statystycznie istotny ($P < 0,05$) wzrost zawartości tłuszczu w nasionach soi 'Augusta' (o 24%) oraz 'Nawiko' (o 14%), natomiast spadek (o 7%) w przypadku soi 'Aldana'. Podobne wyniki otrzymali Pysz i wsp. [23], u których procesy termiczne (autoklawowanie i gotowanie) doprowadziły do wzrostu (o 8 i 15%) zawartości tłuszczu w nasionach grochu. W przypadku nasion soi otrzymali wyniki mniej jednoznaczne, tzn. zmniejszenie (o 20%) zawartości tłuszczu w nasionach poddanych autoklawowaniu, a wzrost (o 10%) w nasionach gotowanych. Działanie ciągłym polem mikrofalowym o zakresie absorpcji energii 2000 J/g (K+PM2000) na nasiona soi nie spowodowało statystycznie istotnych różnic ($P > 0,05$) w zawartości tłuszczu. Podobnie w przypadku działania 15 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM15) na nasiona 'Augusta' i 'Nawiko' oraz 20 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM20) na 'Nawiko'. Jest to zgodne z wynikami innych badaczy [12], którzy dowiedli, że procesy termiczne nie powodują istotnych zmian zawartości tłuszczu w nasionach bobu. Nasiona soi 'Aldana' poddane wpływowi 15 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM15) charakteryzowały się statystycznie istotnym ($P < 0,05$) wzrostem zawartości tłuszczu (o 8%). Działanie 20 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM20) również doprowadziło do statystycznie istotnego ($P < 0,05$) wzrostu zawartości tłuszczu w nasionach soi 'Augusta' (o 7%) oraz 'Aldana' (o 6%).

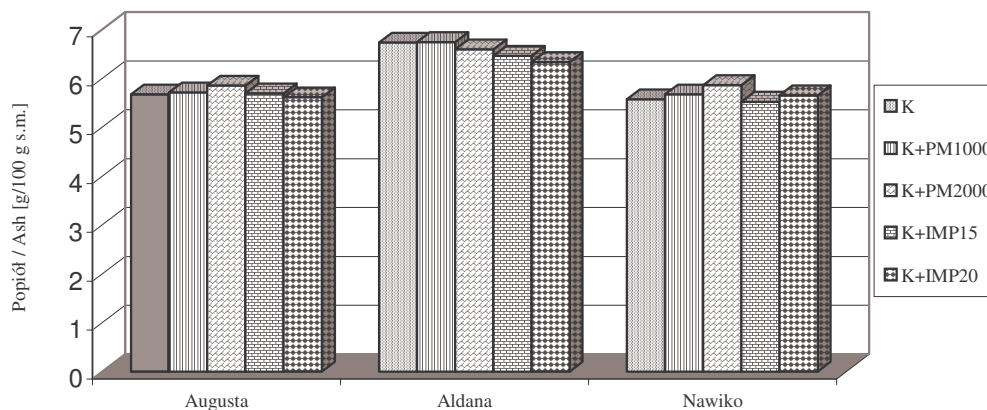


Rys. 2. Wpływ kiełkowania oraz oddziaływania pola mikrofalowego na zawartość tłuszczu w nasionach trzech odmian soi.

Fig. 2. The influence of germinating and affecting of microwave field on fat content in three different cultivars of soybean seeds.

Wpływ ciągłego pola mikrofalowego o dwóch różnych zakresach absorpcji energii (K+PM1000, K+PM2000) oraz impulsów tego pola (K+ +IPM15, K+IPM20) na zawartość związków mineralnych oznaczonych w postaci popiołu w kiełkowanych nasionach soi odmiany Augusta, Aldana i Nawiko przedstawiono na rys. 3.

Działanie tradycyjnego pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 1000 J/g (K+PM1000) nie spowodowało statystycznie istotnych ($P > 0,05$) różnic zawartości składników mineralnych oznaczonych jako popiół w badanym materiale. Podobne wyniki otrzymali Khalil i Mansour [12], w badaniach których zastosowane procesy termiczne także nie powodowały zmian zawartości popiołu w nasionach bobu. Zwiększenie dawki energii (K+PM2000) spowodowało istotny ($P < 0,05$) wzrost składników mineralnych w nasionach soi 'Augusta' (o 4%) i 'Nawiko' (o 5%) oraz redukcję (o 1%) w przypadku 'Aldany'. Pysz i wsp. [23] uzyskali zmniejszenie zawartości popiołu (odpowiednio o 31 i 32% oraz 17 i 19%) w gotowanych oraz autoklawowanych nasionach grochu i soi. Natomiast działanie impulsowego pola mikrofalowego (K+IPM15 oraz K+IPM20) nie miało statystycznie istotnego ($P > 0,05$) wpływu na zawartość popiołu w soi odmiany Augusta i Nawiko, jednak spowodowało istotną redukcję składników mineralnych w 'Aldanie' (odpowiednio o 3 i 6%).

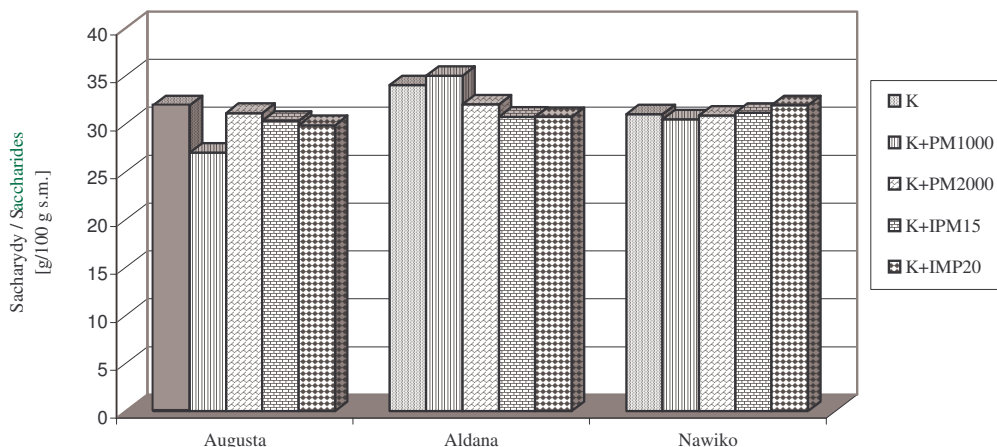


Rys. 3. Wpływ kiełkowania oraz oddziaływania pola mikrofalowego na zawartość popiołu w nasionach trzech odmian soi.

Fig. 3. The influence of germinating and affecting of microwave field on ash content in three different cultivars of soybean seeds.

Wpływ wybranych procesów technologicznych, tj. ciągłego pola mikrofalowego o dwóch różnych zakresach absorpcji energii (K+PM1000, K+PM2000) oraz 15 i 20 impulsów tego pola (K+IPM15, K+IPM20), na zawartość sacharydów w nasionach soi w porównaniu z nasionami kiełkowanymi (K) przedstawiono na rys. 4.

W przypadku soi 'Augusta' uwagę zwraca znaczne (o 15%) obniżenie zawartości sacharydów pod wpływem ciągłego pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 1000 J/g (K+PM1000) oraz mniejsze (o 6%), aczkolwiek statystycznie istotne ($P < 0,05$), pod wpływem 20 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM20). Nasiona soi odmiany Aldana charakteryzowały się statystycznie istotnie ($P < 0,05$) zmniejszoną zawartością bezazotowych substancji wyciągowych po działaniu ciągłego pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 2000 J/g (K+PM2000), 15 oraz 20 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM15, K+IPM20) – odpowiednio o 6 oraz 10%. Natomiast zastosowane procesy technologiczne nie wpłynęły statystycznie istotnie ($P > 0,05$) na zawartość sacharydów w nasionach soi odmiany Nawiko. Khalil i Mansour [12] nie stwierdzili istotnych zmian zawartości sacharydów w nasionach bobu poddanych procesom termicznym.



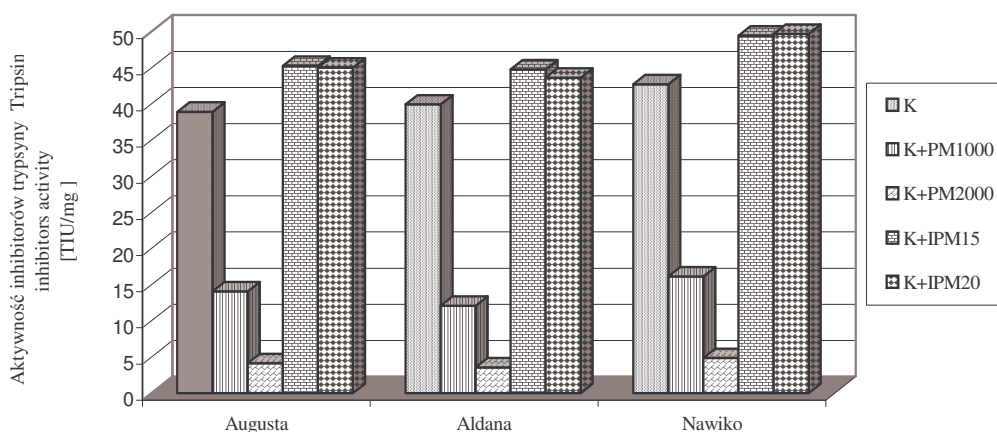
Rys. 4. Wpływ kiełkowania oraz oddziaływania pola mikrofalowego na zawartość sacharydów w nasionach trzech odmian soi.

Fig. 4. The influence of germinating and affecting of microwave field on saccharides content in three different cultivars of soybean seeds.

Na rys. 5. przedstawiono znaczne zróżnicowanie aktywności inhibitorów tripsyny w zależności od odmiany oraz rodzaju zastosowanej obróbki technologicznej. Związki te należą do składników termolabilnych, dlatego też oddziaływanie pola mikrofalowego także wpłynęło na obniżenie aktywności antytrypsynowej. Pod wpływem pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 1000 J/g (K+PM1000) uzyskano 70% inaktywacji inhibitorów tripsyny w nasionach soi 'Augusta', 74% w 'Aldanie' oraz 68% w 'Nawiko'. Zastosowanie wyższej dawki energii, tj. K+PM2000, spowodowało inaktywację inhibitorów tripsyny w większym zakresie. W soi odmiany Augusta inaktywacja wyniosła 91%, w 'Aldanie' 92%, a w 'Nawiko' 90%. Podobne efekty, związane z termolabilnością inhibitorów tripsyny, były obserwowane również przez innych badaczy [1, 2, 17, 22, 24, 29]. Natomiast działanie impulsowego pola mikrofalowego (K+IPM15 oraz K+IPM20) spowodowało statystycznie istotny ($P < 0,05$) niewielki spadek aktywności inhibitorów tripsyny, niezależny od ilości zastosowanych impulsów. Aktywność antytrypsynowa nasion poddanych działaniu 15 impulsów pola mikrofalowego (K+IPM15) obniżyła się o 2% w przypadku nasion soi 'Aldana' i 'Nawiko' oraz o 3% w soi 'Augusta'. W nasionach poddanych 20 impulsom pola mikrofalowego (K+IPM20) stopień inaktywacji inhibitorów tripsyny wynosił w przypadku soi odmian: Nawiko, Augusta i Aldana odpowiednio 2, 3 oraz 5%.

Na rys. 6. przedstawiono zawartość polifenoli w zależności od odmiany i zastosowanego procesu technologicznego. Procesy termiczne (K+PM1000 oraz K+PM2000) spowodowały statystycznie istotny ($P < 0,05$) wzrost zawartości polifenoli w nasionach soi odmiany Augusta (o 6%). W przypadku 'Aldany' i 'Nawiko' zmiany zawartości polifenoli nie były statystycznie istotne ($P > 0,05$). Odmienne wyniki otrzymali Pisulewski i wsp. [22]. W ich doświadczeniach poddanie

procesom termicznym kiełkowanych nasion bobu nie prowadziło do systematycznych zmian zawartości tych związków. W doświadczeniach Alonso i wsp. [1], przeprowadzonych w podobnych warunkach, zawartość polifenoli uległa zmniejszeniu. Nie zaobserwowano wyraźnego ($P > 0,05$) wpływu na ww. związki zastosowanych procesów nietermicznych (K+IPM15 oraz K+IPM20).

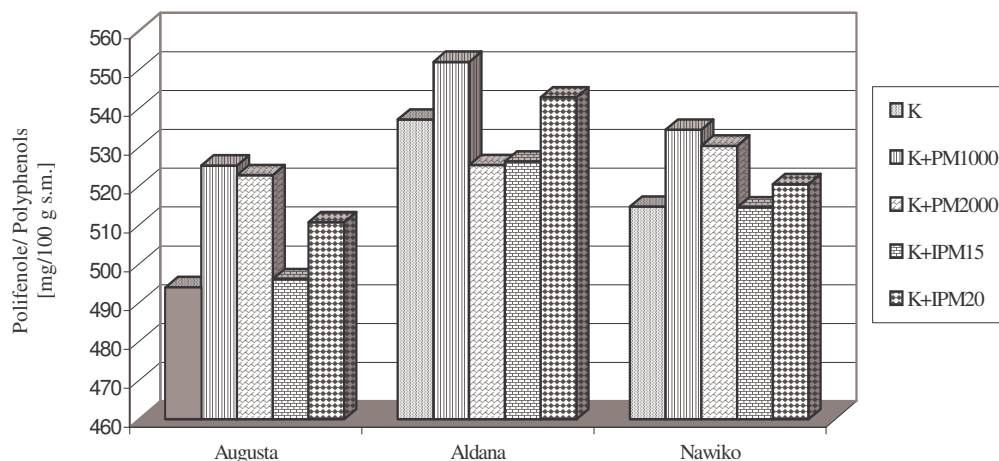


Rys. 5. Wpływ kiełkowania oraz oddziaływania pola mikrofalowego na aktywność inhibitorów tripsyny w nasionach trzech odmian soi.

Fig. 5. The influence of germinating and affecting of microwave field on trypsin inhibitors activity in three different cultivars of soybean seeds

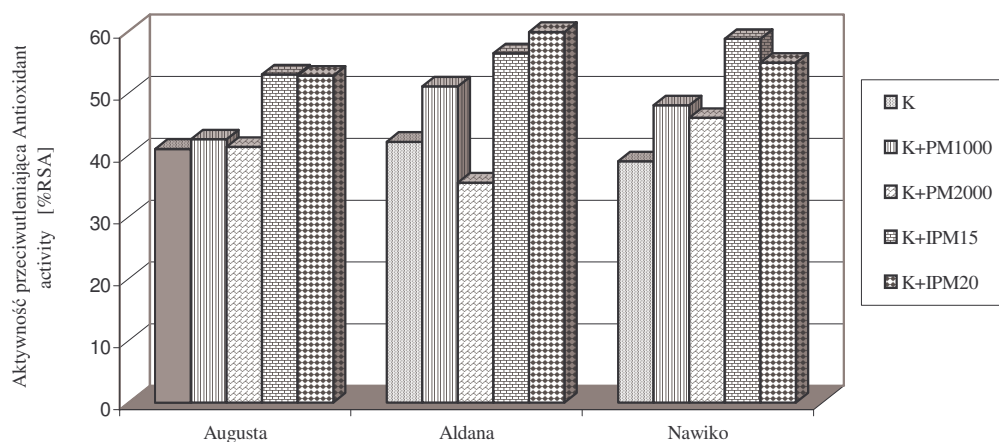
Wpływ procesów technologicznych na aktywność przeciwutleniającą badanego materiału przedstawiono na rys. 7. Zastosowane procesy termiczne (K+PM1000, K+PM2000) nie doprowadziły do statystycznie istotnych ($P > 0,05$) zmian aktywności przeciwutleniającej nasion soi 'Augusta', natomiast spowodowały znaczny ($P < 0,05$) wzrost w przypadku soi 'Aldana' (o 21%) oraz 'Nawiko' (o 18 i 23%). Koreluje to z wykazanim wcześniej wzrostem zawartości polifenoli. Obliczony współczynnik korelacji liniowej Pearsona pomiędzy zawartością polifenoli oraz aktywnością przeciwutleniającą kiełkowanych nasion soi (K) oraz nasion poddanych obróbce nietermicznej przy zastosowaniu impulsowego pola mikrofalowego (K+IPM15, K+IPM20) wyniósł: $r_{xy} = 0,3$. Świadczy to o umiarkowanej zależności łączącej obie zmienne. Natomiast współczynnik korelacji liniowej Pearsona tych samych cech w przypadku kiełkowanych nasion soi (K) oraz nasion poddanych ogrzewaniu za pomocą ciągłego pola mikrofalowego (K+PM1000, K+PM2000) wyniósł: $r_{xy} = 0,9$, co dowodzi silnej zależności łączącej obie zmienne. Wobec powyższego można powiązać obecność polifenoli z aktywnością przeciwutleniającą nasion soi. Zaskakującym wynikiem wydaje się statystycznie istotne ($P < 0,05$) obniżenie (o 14%) aktywności przeciwutleniającej nasion soi 'Aldana' poddanych działaniu ciągłego pola mikrofalowego o zakresie absorpcji energii 2000 J/g (K+PM2000). Mogło ono być spowodowane zmniejszeniem aktywności antytrypsynowej oraz niewielką redukcją

polifenoli. Zastosowane procesy nietermiczne doprowadziły do wyraźnego wzrostu



Rys. 6. Wpływ kiełkowania oraz oddziaływania pola mikrofalowego na zawartość polifenoli w nasionach trzech odmian soi

Fig. 6. The influence of germinating and affecting of microwave field on polyphenols content in three different cultivars of soybean seeds



Rys. 7. Wpływ kiełkowania oraz oddziaływania pola mikrofalowego na aktywność przeciwutleniającą nasion trzech odmian soi.

Fig. 7. The influence of germinating and affecting of microwave field on antioxidant activity in three different cultivars of soybean seeds.

($P < 0,05$) aktywności przeciwutleniającej nasion soi, niezależnego od ilości zastosowanych impulsów. Było to prawdopodobnie wynikiem wzrostu aktywności inhibitorów tripsyny przy jednoczesnym braku zmian zawartości polifenoli. Największy wzrost aktywności przeciwutleniającej po działaniu impulsowego pola mikrofalowego (K+IPM15 oraz K+IPM20) zaobserwowano w przypadku soi odmiany

Nawiko (odpowiednio o 51 i 41%), nieco mniejszy w 'Aldanie' (o 33 i 43%), a najmniejszy, ale statystycznie istotny ($P < 0,05$) w soi 'Augusta' (o 29%).

Wnioski

1. Wykazano zróżnicowanie odmianowe badanych nasion roślin strączkowych, a ich podstawowy skład chemiczny był zgodny z danymi literaturowymi.
2. Kiełkowanie nasion spowodowało zmianę proporcji składników żywieniowych. Zmniejszeniu zawartości sacharydów równocześnie towarzyszył wzrost zawartości tłuszczu oraz białka.
3. Kiełkowanie nasion spowodowało statystycznie istotną ($P < 0,05$) redukcję aktywności inhibitorów trypsyny i polifenoli oraz obniżenie aktywności przeciwutleniającej.
4. Procesy termiczne (K+PM1000, K+PM2000) spowodowały statystycznie istotną ($P < 0,05$) inaktywację termolabilnych składników nasion soi (inhibitorów trypsyny), przy jednoczesnym wzroście zawartości polifenoli oraz aktywności przeciwutleniającej.
5. Zastosowanie procesów nietermicznych (K+IPM15, K+IPM20) spowodowało istotny ($P < 0,05$) wzrost aktywności inhibitorów trypsyny oraz aktywności przeciwutleniającej badanych nasion.
6. Wykazano dodatnią, umiarkowaną korelację pomiędzy zawartością polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą kiełkowanych i poddanych obróbce nietermicznej nasion soi oraz silną w przypadku poddanych procesom termicznym.

Literatura

- [1] Alonso R., Aguirre A., Marzo F.: Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.*, 2000, **68**, 159-165.
- [2] Anderson R.L., Wolf W.J.: Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.*, 1995, **125**, 581S-588S.
- [3] AOAC, Official Methods of Analysis (16th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA 1995.
- [4] Dolińska R., Warchalewski J.R.: Przyszłościowe technologie żywności z udziałem mikrofal i ich wpływ na składniki żywności. *Przem. Spoż.*, 2003, **11**, 2-27.
- [5] Donangelo C.M., Trugo L.C., Trugo N.M.F., Eggum B.O.: Effect of germination of legume seeds on chemical composition and protein and energy utilisation in rats. *Food Chem.*, 1995, **53**, 23-27.
- [6] Frans H.M.G. Savelkoul, Hung Boer, Tamminga S., van Oort M.G.: Biotechnological degradation of lectins, tannins and trypsin inhibitors in legumes. Conference Europeenne sur les protea - gineux, Angers 1992, pp. 197-398.
- [7] Ghorpade V.M., Kadam S.S.: Germination. W: CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry. Processing Technology and Utilization. CRC Press, Inc. Boca Raton, Floryda 1989, pp. 165-176.
- [8] Gould G.W.: New processing technologies: an overview. Symposium on "Nutritional effects of new processing technologies". *Proc. Nutr. Soc.*, 2001, **60**, 463-474.

- [9] Jacórzyński B., Baryłko-Pikielna N.: Perspektywy wykorzystania nasion roślin strączkowych w żywieniu ludzi. *Przeg. Gastr.*, 1981, **1**, 9-12.
- [10] Jasińska Z., Kotecki A.: *Rośliny strączkowe*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1993.
- [11] Kakade M., Rackis J., Mc Ghee J., Puski G.: Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.*, 1974, **51** (3), 376-382.
- [12] Khalil A.H., Mansour E.H.: The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritonal quality of faba beans. *Food Chem.*, 1995, **54**, 177-189.
- [13] Knorr D., Ade-Omowaye B.I.O., Heinz V.: Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *Proc. Nutr. Soci.*, 2002, **61**, 311-318.
- [14] Kołożyn-Krajewska D.: Bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktów żywnościowych utrwalanych metodami nietermicznymi. *Przem. Ferm. Owoc.Warz.*, 1999, **9**, 2-6.
- [15] Konecka K.: Soja dawniej i dzisiaj. *Postępy Nauk Rolniczych*, 1991, **4-6**, 19-27.
- [16] Kunachowicz H., Nadolna I., Iwanow K., Przygoda B.: Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. *Wyd. Lek. PZWL*. Warszawa 1999.
- [17] Leontowicz H., Kulasek G.: Naturalne pokarmowe inhibitory enzymów trawiennych. *Med. Wet.*, 1998, **3**, 159-165.
- [18] Lewicki P.P.: Przyszłościowe kierunki rozwoju technologii żywności. *Żywność, Żywienie a Zdrowie*, 1999, **3**, 247-258.
- [19] Maciejewska E., Smaczyński R., Świdorski F.: Changes in contents of selected components in soybean and bean seeds during germination. *Annals of Warsaw Agricultural University SGGW Forestry and Wood Technology*, 1993, **20**, 51-56.
- [20] Pekkarinen S.S., Stöckmann H., Schwarz K., Heinonen I.M., Hopia A.I.: Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3036-3043.
- [21] Pisulewska E., Pisulewski P.M.: Trypsin inhibitor activity of legume seeds (peas, chickling vetch, lentils, and soya beans) as affected by the technique of harvest. *Anim. Feed Sci. Techn.*, 2000, **86**, 261-265.
- [22] Pisulewski P.M., Pisulewska E.K., Sawina-Pysz J.: Wpływ procesów termicznych oraz kiełkowania na skład chemiczny i zawartość substancji nieodżywczych w suchych nasionach bobu (*Vicia faba var. major*). *Bibl. Frag. Agr.*, 2000, 8.
- [23] Pysz M., Bieżanowska R., Pisulewski P.M.: Porównanie wpływu zabiegów termicznych i kiełkowania na skład chemiczny, zawartość substancji nieodżywczych oraz wartość odżywczą białka nasion grochu i soi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **1** (26), 85-91.
- [24] Rajkó R., Szabó G.: Designed experiments for reducing antinutritive agents in soybean by microwave energy. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 3565-3569.
- [25] Sumnu G.: A review on microwave baking of foods. *Int. J. Food Sci. Techn.*, 2001, **36**, 117-127.
- [26] Świdorski F., Paraska W., Waszkiewicz-Robak B.: Receptury potraw z udziałem roślin strączkowych dla zakładów żywienia zbiorowego. *Przedsiębiorstwo Badawczo-Projektowe Zdrowa Żywność*, 1989, s. 2-7.
- [27] Świdorski F., Waszkiewicz-Robak B.: Soja w żywieniu człowieka. *Biulet. Instyt. Hod. i Akł. Roś. SGGW*, 1996, **198**, 163-170.
- [28] Świdorski F., Waszkiewicz-Robak B., Sadowska E.: Wykorzystanie nasion nowych odmian soi w produkcji żywności. *Biulet. Instyt. Hod. i Ak. Roś. SGGW*, 1987, **164**, 151-158.
- [29] Vidal-Valverde C., Frias J., Diaz-Pollan C., Fernandez M., Lopez-Jurado M., Urbano G.: Influence of processing on trypsin inhibitor activity of faba beans and its physiological effect. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 3559-3564.
- [30] Zadernowski R., Borowska J.: Charakterystyka wybranych substancji antyżywnościowych występujących w nasionach strączkowych. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 1992, **1**, 20-22.

**THE INFLUENCE OF PULSE AND CONTINUOUS MICROWAVE FIELD AFFECTING
ON NUTRITION VALUE AND ANTIOXIDANT PROPERTIES
OF GERMINATED SOYBEAN SEEDS**

S u m m a r y

The purpose of the research was to compare the influence of non-thermal and thermal food processing method, pulse and continuous microwave field affecting on nutrition value, selected nonnutritive components and antioxidant properties of germinated soybean seeds.

Seeds of three locally grown soybean cultivars: Augusta, Aldana, Nawiko were used as the test material. The seeds were subject to germination, and then to non-thermal processing with pulse microwave field and heating by continuous microwave field. Standard AOAC methods were applied to determine basic chemical composition of samples. Trypsin inhibitor activity was determined acc. to Kakade at all method, polyphenol content was determined using Folin and Ciocalteau's phenol phenol reagent, and antioxidant activity was measured acc. to Pekkarinen at all method using stable free radical DPPH'.

Seed germination led to statistically important ($P < 0.05$) reduction in trypsin inhibitor activity and polyphenol content, and it reduced antioxidant activity. Thermal processes resulted in statistically substantial ($P < 0.05$) inactivation of thermo-labile soybean seed component (trypsin inhibitors), and at the same time increased polyphenol content and antioxidant activity. Non-thermal process application brought about statistically considerable ($P < 0.05$) growth in trypsin inhibitor activity and antioxidant activity of studied seeds. Study proved positive moderate correlation between polyphenol content and antioxidant activity of germinated and put to non-thermal processing soybean seeds, and strong correlation of these parameters in case of seeds subject to thermal processes.

Key words: microwave field, germinated soybean seeds, polyphenols, antioxidant activity ☒

ALEKSANDRA SZYDŁOWSKA, EWA CZARNIECKA-SKUBINA

**WPLYW SPOSOBU GOTOWANIA I PRZECHOWYWANIA PO
UGOTOWANIU NA TEMPERATURĘ, WYDAJNOŚĆ I JAKOŚĆ
SENSORYCZNĄ BROKUŁÓW**

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu sposobu gotowania (w garnku przy rozpoczęciu procesu od wody wrzącej, w garnku w parze, w piecu konwekcyjno-parowym w parze) oraz przechowywania po ugotowaniu w bemarze i w termoporcie na wydajność, jakość sensoryczną (ocenianą metodami niestrukturowanej skali graficznej i parzystą) i barwę brokułów ocenianą instrumentalnie. Podczas przechowywania w bemarze i termoporcie badano ponadto zmiany temperatury brokułów i wody.

Najwyższą wydajność procesu, wynikającą z wchłonięcia wody, uzyskano gotując brokuły w wodzie, rozpoczynając proces od wrzącej wody. Stwierdzono, że sposób gotowania oraz sposób i czas przechowywania wpływają statystycznie istotnie na jakość sensoryczną brokułów. Jakość sensoryczna brokułów gotowanych w garnku przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody jest statystycznie istotnie lepsza od brokułów gotowanych w parze (w garnku i w piecu konwekcyjno-parowym).

Przechowywanie gotowanych brokułów w bemarze powoduje znaczne obniżenie ich jakości sensorycznej (barwy, zapachu, smaku, konsystencji, jakości ogólnej) w porównaniu z przechowywaniem w termoporcie, co potwierdziła ocena barwy metodą instrumentalną. Brokuły nie powinny być przechowywane w bemarze. W celu utrzymania dobrej jakości sensorycznej i właściwej temperatury brokułów przechowywanych po ugotowaniu w termoporcie należy przekładać je do wygrzanych, pojemników GN, wypełnionych całkowicie, szczelnie zamykać termoport i nie przekraczać czasu przechowywania 1,5 h.

Słowa kluczowe: brokuły, jakość sensoryczna, bemar, termoport

Wprowadzenie

Brokuły to warzywa, które w Polsce są uprawiane dopiero od początku XX w. Zyskały aprobatę konsumentów ze względu na wysoką wartość odżywczą, w tym znaczne ilości prowitaminy A (β -karotenu), witamin B₁ oraz C, składników mineralnych i błonnika pokarmowego [2, 3, 6, 10, 11, 18], a także przypisywane im

Mgr inż. A. Szydłowska, dr inż. E. Czarniecka-Skubina, Zakład Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa

właściwości antykancerogenne [7, 10, 11, 15, 17]. Ich zaletą jest również dostępność w sprzedaży przez cały rok zarówno w formie świeżej, jak i mrożonej, dzięki czemu są wykorzystywane przez indywidualnego odbiorcę w warunkach domowych, jak również na potrzeby zakładów gastronomicznych czy cateringu.

Klient współczesnej gastronomii oczekuje odpowiedniej jakości potrawy, związanej z trzema aspektami: jakością sensoryczną, wartością odżywczą i bezpieczeństwem zdrowotnym. Aby uzyskać właściwą jakość potraw, ważne jest zastosowanie odpowiedniego procesu technologicznego [19, 20], właściwe przechowywanie po przeprowadzonej obróbce, tak by w chwili dotarcia do konsumenta potrawa była bezpieczna do spożycia, o wysokiej jakości sensorycznej i wartości odżywczej, a także o odpowiedniej temperaturze.

W przypadku warzyw często polecane jest gotowanie w parze, jako metoda zapobiegająca wypłukiwaniu z surowca cennych składników odżywczych tj.: witamin czy związków mineralnych. Nowoczesne rozwiązania technologiczne w gastronomii to gotowanie w wyspecjalizowanych urządzeniach, takich jak piec konwekcyjno-parowy, wyposażony w opcję gotowania w parze.

Po zastosowaniu odpowiednio dobranej metody obróbki termicznej ważne jest zagwarantowanie właściwych warunków przechowywania potrawy, takich jak temperatura i czas przechowywania. Profesjonalnym rozwiązaniem tego problemu w gastronomii, a zwłaszcza cateringu jest zastosowanie np. bemału czy termoportu. Współcześnie, zwłaszcza termoporty stają się powszechne z uwagi na rozwój usług cateringowych.

W literaturze brak jest badań na temat zagadnień związanych z wpływem przechowywania potrawy w bemałach i termoportach na wyróżniki jej jakości, takie jak: wartość odżywcza, jakość sensoryczna czy bezpieczeństwo spożycia. Z punktu widzenia konsumenta istotna jest również temperatura potrawy. Zatem celowym jest podjęcie badań nad wpływem sposobu gotowania i przechowywania po ugotowaniu w bemału i termoporcie na jakość wybranego warzywa – brokułów, z uwzględnieniem temperatury uzyskanej potrawy.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły brokuły średnio późnej odmiany Shadow F₁ firmy „Bejo Zaden”, pochodzące od jednego producenta z uprawy tradycyjnej. Odmiana ta jest polecana do uprawy późnoletniej i jesiennej do sprzedaży w formie świeżej. Do badań użyto brokułów o średniej masie 450 g, które przywożono bezpośrednio z pola bądź przechowywano do następnego dnia w chłodni w temp. 0–1°C i wilgotności względnej powietrza 95–98% [1, 5, 14].

Surowiec po usunięciu liści, skróceniu łodyg i umyciu, o masie 450 g, poddawano obróbce cieplnej:

- w garnku przy rozpoczęciu procesu od wody wrzącej (proces przeprowadzano w stalowym garnku, ogrzewanym elektrycznie, w wodzie wodociągowej o obj. 2,5 l, w ciągu 7 min),
- w garnku w parze (proces przeprowadzano w garnku, zaopatrzonym w perforowaną wkładkę, ogrzewanym elektrycznie, w ciągu 15 min),
- w piecu konwekcyjno-parowym w parze (proces przeprowadzano w pojemnikach GN w piecu firmy Electrolux, w temp. 95°C z wykorzystaniem pary, w ciągu 30 min).

Warunki procesu gotowania ustalono eksperymentalnie. Czas gotowania ustalono na podstawie sensorycznej oceny konsystencji metodą skali werbalnej [16]. Za odpowiedni uznawano czas gotowania, gdy 80% oceniających uznało konsystencję brokułów za właściwą.

Brokuły po ugotowaniu przechowywano w czasie 0-4 h:

- w termoporcie firmy Cambro, UPCS 180, o wymiarach 31,5 × 43,5 × 64 cm (wys., szer., dł.), pojemności 23 l, w stalowych pojemnikach GN ¼,
- w bemarze elektrycznym, w temp. medium grzewczego (wody) 65°C, w stalowych pojemnikach GN ¼.

Brokuły bezpośrednio po ugotowaniu umieszczano w pojemnikach GN w bemarze oraz w termoporcie. Każdorazowo w pojemnikach umieszczano porcję 1,8 kg brokułów. Pomiary temperatury brokułów przechowywanych w termoporcie wykonano w dwóch wersjach przechowywania: w pojemnikach GN o temperaturze pokojowej i pojemnikach GN wygrzewanych każdorazowo w temperaturze 90°C przez 10 min. Pojemniki GN w bemarze są zawsze wygrzane z uwagi na fakt, że są ogrzewane przez medium grzewcze (wodę) już podczas rozgrzewania bamaru. Dodatkowo zbadano zmiany temperatury wody w czasie przechowywania przez 0–4 h w pojemnikach GN¼, w bemarze i termoporcie. Każdorazowo przechowywano 3,5 litra przegotowanej wody.

W brokułach gotowanych i przechowywanych określano:

- wydajności procesu gotowania i przechowywania w termoporcie i bemarze;
- zmiany temp. brokułów podczas ich przechowywania w bemarze i w termoporcie w czasie 0-4 h. Pomiary przeprowadzano co 0,5 h za pomocą termopary umieszczonej w kilku miejscach warzywa. W przypadku termoportu, w celu uniknięcia strat ciepła, otwierano pojemniki jednorazowo tylko po danym czasie przechowywania;
- jakość sensoryczną brokułów metodą skalowania z wykorzystaniem niestrukturowanej skali graficznej (oznaczenia brzegowe jakości: bardzo niepożądana, bardzo pożądana) oraz metodą parzystą [8], bezpośrednio po ugotowaniu oraz po przechowywaniu gotowanych prób co 0,5 h tj. po 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 i po 4 h. Za pomocą obu metod oceniano zapach, barwę, smak, konsystencję i jakość ogólną brokułów.

W ocenie metodą niestrukturowanej skali graficznej barwę brokułów określano w zakresie: brunatnozielona, z odcieniem brązowym – intensywnie zielona, koloru świeżej trawy, smak i zapach: nietypowe – typowe dla warzyw kapustnych, konsystencję: zbyt miękka, rozpadająca się – zwięzła.

Do oceny metodą parzystą każdorazowo podawano dwie próbki: próbkę bezpośrednio po ugotowaniu i próbkę po przechowywaniu. Oceniający miał za zadanie odpowiedzieć na pytanie oddzielne dla każdego z badanych wyróżników, którą z prób w każdej parze bardziej preferuje ze względu na wskazaną cechę (barwę, zapach, smak, konsystencję, jakość ogólną).

Oceny dokonywał 10-osobowy zespół, którego członkowie zostali przeszkoleni w zakresie wykonywania podstawowych metod analizy sensorycznej i byli sprawdzeni ze względu na indywidualną wrażliwość sensoryczną.

Próbki ugotowanych brokułów podawane były w gniazdach izotermicznych. Brokuły oceniane bezpośrednio po ugotowaniu były podawane w temp. 65°C, natomiast brokuły przechowywane po ugotowaniu oceniano w temperaturze jaką miały po danym czasie przechowywania,

- barwę, bezpośrednio po ugotowaniu i po przechowywaniu, metodą instrumentalną przy użyciu aparatu Minolta Chroma-Meters w systemie L*a*b*. Parametry barwy mierzono przy źródle światła C.

Badania każdego wariantu doświadczenia (metody gotowania i sposobu oraz czasu przechowywania) powtarzano trzykrotnie.

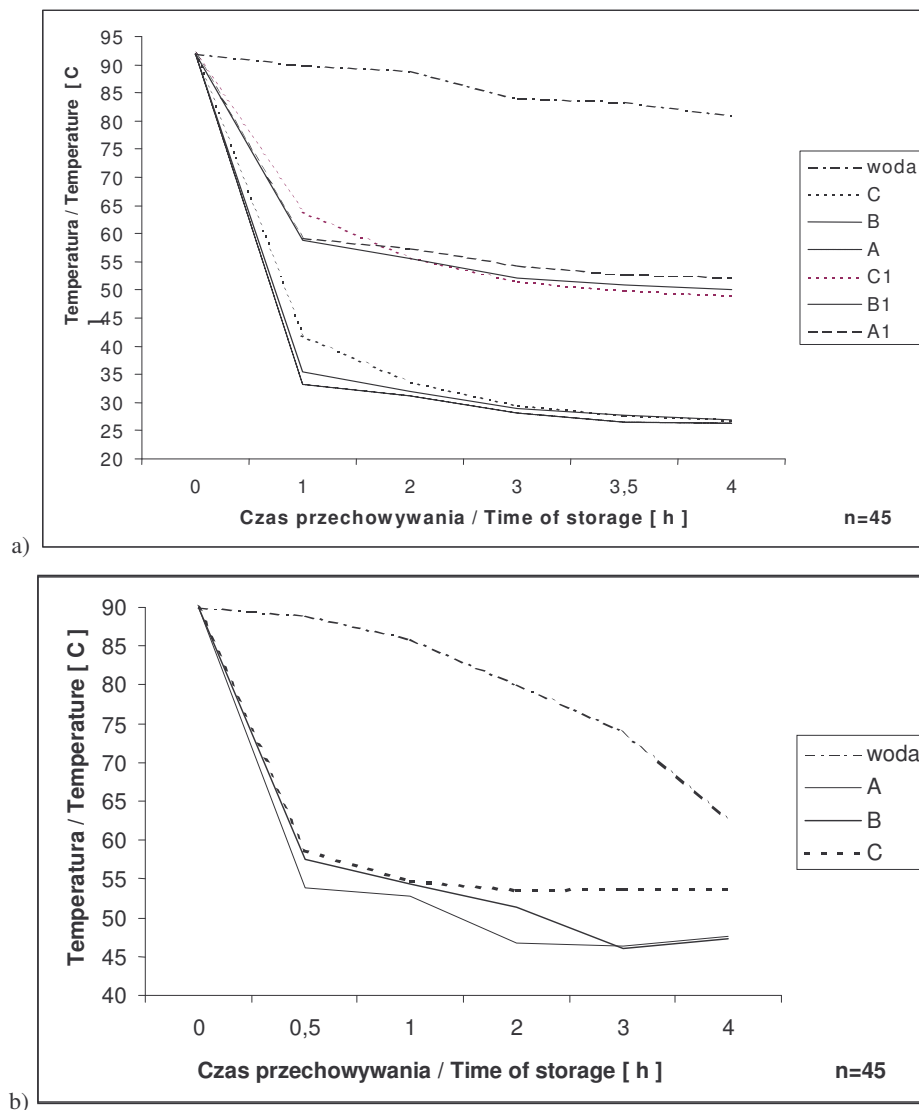
Ocena statystyczna wyników obejmowała obliczenie odchylenia standardowego, analizę wariancji i liniową analizę regresji, do obliczenia których wykorzystano program komputerowy Statgraphics 5. Statystycznie istotne różnice pomiędzy wynikami określono na podstawie najmniejszej istotnej różnicy ($p < 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Zmiany temperatury przechowywanych brokułów i wody

Podczas przechowywania ugotowanych brokułów oraz wody w termoporcie i w beamarze w czasie 0–4 h badano zmiany temperatury. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 1.

Gorące warzywa (85°C) umieszczone w pojemnikach GN o temp. pokojowej i przechowywane w termoporcie, po 0,5–1 h wykazywały temp. obniżoną do około 33–42°C (w zależności od metody gotowania); później temperatura stabilizowała się i obserwowano mniejsze jej spadki. Przechowywanie brokułów w pojemnikach GN o temperaturze pokojowej powodowało większe wychłodzenie surowca niż wówczas,



Rys. 1. Wpływ czasu przechowywania [a) w termoporcie i b) w beamarze] na zmiany temperatury ugotowanych brokułów [A, A1 – brokuły gotowane w garnku przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody, B, B1 – brokuły gotowane w garnku w parze, C, C1 – brokuły gotowane w piecu konwekcyjno-parowym w parze; A, B, C – pojemniki GN o temp. pokojowej, A1, B1, C1 – pojemniki GN wygrzane].

Fig.1. Effect of time of storage [a) in thermoport and b) warmholding] on changes of temperature of cooked broccoli [A, A1 – broccoli cooking in pot starting with boiled water, B, B1 – broccoli steam cooking in pot, C, C1 – broccoli steam cooking in convection-steam oven; A, B, C – room temperature container, A1, B1, C1 – warm GN container].

gdy brokuły były przechowywane w pojemnikach wygrzanych (po 4 h osiągnięto temp. maksymalnie do 49–52,4°C). Tak znaczne obniżenie temperatury brokułów

wynikało z faktu niepełnego wypełnienia pojemników GN ugotowanym surowcem. Obniżenie temperatury brokułów przechowywanych w termoporcie po ugotowaniu jest o wiele większe niż podają producenci termoportów (według nich temperatura posiłku obniża się z 93° do 78°C podczas 6 h przechowywania). Według danych literaturowych [13] obniżenie temperatury posiłków przechowywanych w temp. pokojowej w termoporcie po upływie 1 h wynosi około 4°C, a po 4 h – około 9°C w stosunku do temp. początkowej posiłku.

Po 0,5 h przechowywania w beamarze zaobserwowano obniżenie temperatury brokułów do około 54–58,7°C (w zależności od metody gotowania i związanej z tym początkowej temperatury ugotowanego surowca). Temperatura medium grzewczego podczas przechowywania brokułów wynosiła 65°C ze względu na fakt, że jest to warzywo o delikatnej konsystencji po ugotowaniu.

Po 4 h przechowywania w termoporcie temperatura brokułów gotowanych wszystkimi metodami, wynosiła poniżej 30°C, natomiast po przechowywaniu w tym czasie brokułów w beamarze około 50°C, z uwagi na fakt stałego podgrzewania (rys. 1).

W wodzie przechowywanej w termoporcie przez 4 h odnotowano po tym czasie obniżenie temp. z 92 do 81°C, natomiast w beamarze do 65°C (przy zastosowaniu temp. medium grzewczego 65°C). Zjawisko dążenia układu surowiec-naczynie do wyrównywania temperatur zachodzi zarówno w przypadku przechowywania wody, jak i brokułów. Różnice w spadku temperatury wody i brokułów w czasie 4 h przechowywania w termoporcie wynikają z: innej powierzchni wymiany ciepła (w przypadku warzyw większa), z innego współczynnika oddawania ciepła od materiału do ścian urządzenia i innego współczynnika pojemności cieplnej (im jest on większy tym wolniej ciało przekazuje ciepło). Wpływ ma przede wszystkim fakt, że brokuły niecałkowicie wypełniały pojemniki GN, podczas gdy woda wypełniała je całkowicie.

Wydaje się, że podniesienie temperatury wody w beamarze podczas przechowywania brokułów spowodowałoby wzrost temperatury surowca, ale prawdopodobnie pogorszenie jakości sensorycznej, gdyż wstępne próby z brokułami przechowywanymi przy wyższej temperaturze medium grzewczego w beamarze powodowały uzyskanie produktu nieakceptowanego z punktu widzenia konsumenta (zbrązowienie powierzchni, bardzo miękka konsystencja).

Uzyskana temperatura końcowa brokułów po przechowywaniu nie jest akceptowana ze względów bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Nie należy więc przechowywać brokułów w termoporcie przy niepełnym wypełnieniu pojemników GN i dobrze jest stosować wygrzane pojemniki, natomiast w beamarze, aby uzyskać wyższą temperaturę przechowywania potrawy należałoby podnieść temperaturę medium grzewczego. Optymalną temperaturą przechowywania dań ciepłych, biorąc pod uwagę ich dobrą jakość sensoryczną i mikrobiologiczną jest temp. powyżej 63°C. Bardzo ważne przy przechowywaniu jest zachowanie ciągłości łańcucha cieplnego [12].

Wydajność procesu gotowania i przechowywania po ugotowaniu

Najwyższą wydajność procesu gotowania stwierdzono w przypadku gotowania brokułów w garnku przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody – 111%, co jest wynikiem wchłonięcia wody przez surowiec. W przypadku zastosowania metod z użyciem pary (gotowanie w garnku i w piecu konwekcyjno-parowym) uzyskano wydajności, odpowiednio 103 i 100%. Proces przechowywania brokułów po ugotowaniu w beamarze i w termoporcie nie wpłynął na zmianę wydajności.

Jakość sensoryczna gotowanych i przechowywanych po ugotowaniu brokułów

Porównując wpływ sposobu gotowania na jakość sensoryczną brokułów stwierdzono, że metoda gotowania i związany z tym czas procesu wpływa statystycznie istotnie na wyróżniki jakości sensorycznej (barwę, zapach, smak, konsystencję, jakość ogólną). Jakość brokułów gotowanych tradycyjnie w garnku przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody była statystycznie istotnie lepsza pod względem badanych wyróżników od brokułów gotowanych w parze (w garnku i w piecu konwekcyjno-parowym), co przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Jakość sensoryczna brokułów, oceniana metodą niestrukturowanej skali graficznej (10 cm), w zależności od sposobu gotowania.

Sensory quality of broccoli estimated by unstructured graphical scale method (10cm) depending on cooking method.

Sposób gotowania Cooking method	Wartości średnie / Mean values n = 30				
	Barwa Colour	Zapach Odour	Smak Taste	Konsystencja Texture	Jakość ogólna Overall quality
W garnku przy rozpoczęciu procesu od wody wrzącej Cooking in pot starting with boiling water	8,8±0,2 c	8,6±0,3 b	8,4±0,2 c	8,4± 0,2 b	8,6± 0,1 c
W garnku w parze Steam cooking in pot	8,4± 0,2 b	8,2± 0,3 a	8,1± 0,2 b	7,9± 0,2 a	8,1± 0,2 b
W piecu konwekcyjno-parowym w parze Steam cooking in convection-steam oven	7,8± 0,3 a	7,9± 0,3 a	7,8± 0,2 a	7,9± 0,2 a	7,9± 0,2 a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie, ± odchylenie standardowe / Table shows mean values, ± standard deviation;

a, b ... – wyniki oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie / the same letter in each column indicates no statistically significant differences between the results.

Najniższą jakość, zwłaszcza pod względem barwy i smaku, stwierdzono w przypadku brokułów gotowanych w piecu konwekcyjno-parowym w parze z uwagi na najdłuższy czas gotowania. W literaturze formułowany jest pogląd, że gotowanie

warzyw w piecu konwekcyjno-parowym pozwala na lepsze zachowanie ich barwy [9]. W gastronomii brokuły gotuje się zazwyczaj w piecu konwekcyjno-parowym, ale jak wynika z przeprowadzonego wywiadu wśród kucharzy warszawskiej gastronomii, najczęściej w ten sposób gotowane są brokuły mrożone, które uprzednio były blanszowane, a więc są częściowo obgotowane i nie potrzeba tak długiego czasu gotowania jak zastosowany w badaniach.

Wyniki wpływu czasu przechowywania ugotowanych brokułów w beamarze i w termoporcie na jakość sensoryczną przedstawiono na rysunku 2.

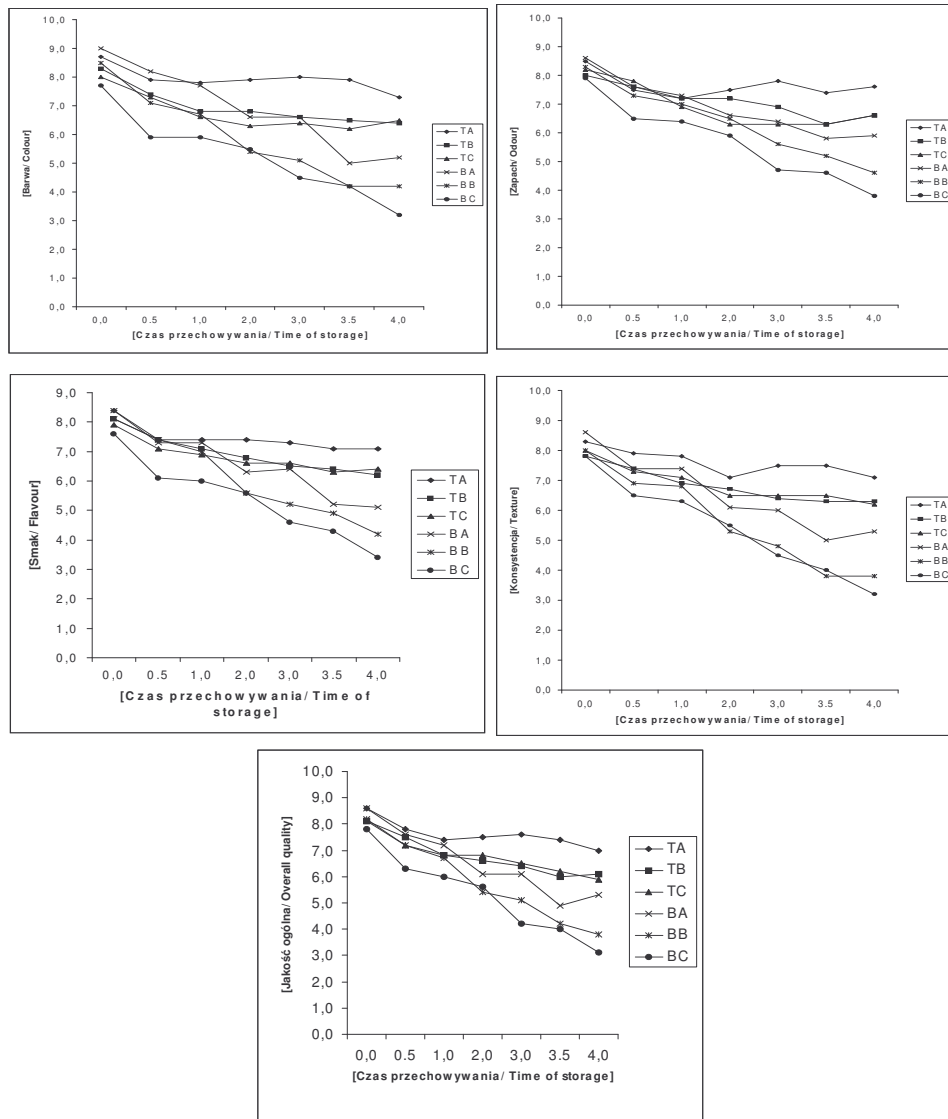
Wyniki analizy regresji liniowej dotyczące wpływu przechowywania na jakość sensoryczną gotowanych brokułów wskazują na dość znaczną siłę związku między zmienną zależną (jakością sensoryczną) a niezależną (czasem przechowywania w beamarze i termoporcie). Współczynnik korelacji w przypadku zależności jakości ogólnej od czasu przechowywania wyniosły: w metodzie gotowania w garnku przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody w termoporcie $r = -0,485$ (mniejsza zależność), a w beamarze $r = -0,892$; w garnku w parze w termoporcie $r = -0,799$, a w beamarze $r = -0,916$, w piecu konwekcyjno-parowym w parze, w termoporcie $r = -0,827$, a w beamarze $r = -0,933$.

Czas przechowywania zarówno w beamarze, jak i w termoporcie wpływał więc statystycznie istotnie na badane cechy jakości sensorycznej i w miarę wydłużania czasu przechowywania jakość wszystkich badanych cech obniżała się.

W przypadku badanych metod gotowania, po 4 h przechowywania w beamarze, stwierdzono obniżenie jakości sensorycznej (barwy, zapachu, smaku, konsystencji i jakości ogólnej) do znacznie niższych wartości w porównaniu z brokułami przechowywanymi w termoporcie. Było to wynikiem stałego podgrzewania brokułów w czasie przechowywania (temp. medium grzewczego w beamarze wynosiła 65°C).

Jakość sensoryczna (barwa, zapach, smak, konsystencja, jakość ogólna) ugotowanych brokułów przechowywanych w termoporcie ulegała również pogorszeniu w miarę wydłużania czasu przechowywania. Stwierdzono jednak lepszą jakość brokułów przechowywanych w termoporcie w porównaniu z brokułami przechowywanymi w beamarze (rys. 2).

W ocenie metodą parzystą, podając równolegle dwie próbki brokułów bezpośrednio po ugotowaniu i brokułów po przechowywaniu w termoporcie lub beamarze stwierdzono, że 0,5 h przechowywanie wpływało w sposób statystycznie istotny tylko na niektóre wyróżniki jakości sensorycznej, natomiast przechowywanie ugotowanych brokułów powyżej 0,5 h wpływało w sposób statystycznie istotny na wszystkie badane wyróżniki jakości sensorycznej. Uzyskane oceny przedstawiono w tab. 2.



Rys. 2. Wpływ czasu przechowywania w termoporcie i bemarze na jakość sensoryczną brokułów ocenianą metodą niestrukturowanej skali graficznej. Przechowywanie po ugotowaniu w termoporcie: TA, TB, TC i w bemarze: BA, BB, BC. A, B, C; metody gotowania: A – w garnku przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody, B – w garnku w parze, C – w piecu konwekcyjno-parowym w parze.

Fig. 2. Effect of time storage in the thermoport and warmholding on sensory quality of broccoli estimated by unstructural graphical scale. Storage after cooking in thermoport: TA, TB, TC and warmholding: BA, BB, BC. A, B, C – methods of cooking: A – cooking in pot starting with boiled water, B – Steam cooking in pot, C – Steam cooking in convection-steam oven.

Jakość sensoryczna brokułów, oceniana metodą parzystą, determinowana czasem przechowywania w termoporcie i bumarze.

Sensory quality of broccoli estimated by dual method determined by time storage in the thermoport and warmholding.

Przechowywanie Storage	Sposób gotowa- nia Cooking method	Jakość Quality	Wyniki jakości sensorycznej ugotowanych brokułów i brokułów po ugotowaniu i przechowywaniu Results of the sensory quality of cooked broccoli and broccoli after cooking and storage											
			Czas przechowywania (h) n = 30											
			0	0,5	0	1	0	2	0	3	0	3,5	0	4
Przechowywanie w termoporcie Storage in thermoport	A	Colour	20	10	24	6	25	5	23	7	23	7	22	8
		Odour	20	10	28	2	21	9	21	9	29	1	27	3
		Taste	25	5	21	9	22	8	23	7	28	2	21	9
		Texture	18	12	21	9	22	8	21	9	26	4	21	9
		Overall quality	20	10	28	2	22	8	23	7	29	1	21	9
	B	Colour	20	10	26	4	30	0	26	4	25	5	25	5
		Odour	19	11	28	2	27	3	26	4	21	9	26	4
		Taste	25	5	26	4	26	4	27	3	26	4	23	7
		Texture	23	7	24	6	21	9	21	9	26	4	22	8
		Overall quality	25	5	26	4	27	3	27	3	26	4	25	5
	C	Colour	17	13	28	2	25	5	26	4	26	4	22	8
		Odour	16	14	25	5	26	4	26	4	29	1	27	3
		Taste	15	15	21	9	25	5	24	6	24	6	29	1
		Texture	14	16	21	9	24	6	21	9	26	4	27	3
		Overall quality	16	14	21	9	27	3	22	8	28	2	29	1
Przechowywanie w bumarze Warmholding	A	Colour	23	7	30	0	30	0	24	6	30	0	30	0
		Odour	25	5	29	1	29	1	25	5	29	1	25	5
		Taste	18	12	28	2	27	3	24	6	28	2	24	6
		Texture	19	11	29	1	29	1	23	7	30	0	27	3
		Overall quality	20	10	30	0	29	1	24	6	29	1	25	5
	B	Colour	27	3	30	0	30	0	30	0	29	1	30	0
		Odour	22	8	27	3	30	0	28	2	29	1	30	0
		Taste	23	7	26	4	27	3	27	3	27	3	29	1
		Texture	22	8	28	1	28	2	25	5	27	3	29	1
		Overall quality	23	7	27	3	28	2	28	2	28	2	30	0

c.d. Tab. 2

	C	Colour	28	2	29	1	25	5	30	0	25	5	30	0
--	---	--------	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---

	Odour	27	3	27	3	26	4	28	2	27	3	30	0
	Taste	28	2	28	2	26	4	27	3	27	3	30	0
	Texture	27	3	24	6	25	5	27	3	27	3	30	0
	Overall quality	28	2	27	3	26	4	28	2	28	2	30	0

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Pominięto prezentację wyników uzyskanych po 1,5 i 2,5 h przechowywania z uwagi na nieznaczne zmiany jakości sensorycznej / Results presentation after 1,5 and 2,5 hour of storage was skipped because of inconsiderable sensory quality changes.

Minimum zgodnych ocen niezbędnych do ustalenia istotnego zróżnicowania - 21 (poziom istotności $\alpha = 0,05$) / Minimum of compliance estimates to establish significant differences - 21 (significance level $\alpha = 0.05$).

A - brokuły gotowane w garnku przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody / broccoli cooking in pot starting with boiled water; B- brokuły gotowane w garnku w parze / broccoli steam cooking in pot; C- brokuły gotowane w piecu konwekcyjno-parowym w parze / broccoli steam cooking in convection-steam oven

Barwa brokułów gotowanych i przechowywanych po ugotowaniu

Stwierdzono statystycznie istotny wpływ sposobu gotowania na barwę brokułów mierzoną instrumentalnie. Uzyskane wyniki pomiaru barwy brokułów w zależności od sposobu gotowania przedstawiono w tab. 3.

Jak wynika z przedstawionych danych, większe zmiany barwy w stosunku do surowca świeżego następowały w brokułach gotowanych metodami z użyciem pary, co wynikało najprawdopodobniej z faktu dłuższego czasu obróbki cieplnej w porównaniu z gotowaniem w garnku przy rozpoczęciu procesu od wody wrzącej. Znaczenie może mieć wpływ wody o odczynie obojętnym w przypadku gotowania w niej brokułów. Gotowanie w wodzie ułatwia wyługowanie i rozcieńczenie kwasów organicznych (kwas szczawiowy, kwas cytrynowy) zawartych w tkankach, które mogą powodować powstanie, pod wpływem ciepła, oliwkowozielonej barwy (wynik przekształcenia się zielonego chlorofilu w oliwkowozieloną feofitynę) [20].

Próbki brokułów gotowanych trzema sposobami były w stosunku do brokułów świeżych:

- jaśniejsze – stwierdzono wzrost wartości L,
- mniej zielone – wartości Δa były dodatnie,
- bardziej żółte – wartości Δb były dodatnie.

Pod wpływem procesu gotowania zmieniało się również nasycenie barwy brokułów z 0,968 w przypadku brokułów świeżych do 0,611 w przypadku brokułów gotowanych tradycyjnie w wodzie i do 0,502; 0,528 – brokułów gotowanych w parze.

Zmiany barwy (ΔE) w porównaniu z surowcem świeżym były znacznie mniejsze w przypadku gotowania tradycyjnego (4,20) niż gotowania w parze (5,02; 5,04).

Barwa brokułów w zależności od sposobu ich gotowania.

Broccoli colour depending on cooking method.

Sposób gotowania Cooking method	Wartości średnie współczynników Mean values of coefficients n=90							
	L*	a*	b*	ΔL	Δa	Δb	a/b	ΔE
Brokuły świeże Fresh broccoli	93,70 $\pm 0,1a$	-10,68 $\pm 0,05b$	+11,03 $\pm 0,1a$	-	-	-	0,968	-
W garnku przy rozpoczęciu procesu od wody wrzącej Cooking in pot starting with boiling water	95,52 $\pm 0,2 ab$	-6,91 $\pm 0,1a$	+11,31 $\pm 0,1a$	1,82	3,77	0,28	0,611	4,20
W garnku w parze Steam cooking in pot	96,30 $\pm 0,15b$	-6,67 $\pm 0,1a$	+12,64 $\pm 0,1b$	2,60	4,01	1,61	0,528	5,04
W piecu konwekcyjno- parowym w parze Steam cooking in convection- steam oven	95,64 $\pm 0,1ab$	-6,33 $\pm 0,1a$	+12,61 $\pm 0,1b$	1,94	4,35	1,58	0,502	5,02

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie współczynników: L* – jasność; -a* – barwa zielona; -b* – barwa niebieska; a/b – nasycenie barwy; +a – barwa czerwona; +b – barwa żółta; ΔE – zmiana barwy / Table shows mean values for: L*- brightness; -a* - green colour; -b* - blue colour; a/b - saturation of colour; +a – red colour; +b - yellow colour; ΔE - changes of colour.

a, b - wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie / mean values signed with the same letter indicates no statistically significant differences between the results.

Wyniki instrumentalnej oceny barwy potwierdzają dane uzyskane przy użyciu metody sensorycznej, w której barwę brokułów gotowanych w garnku w wodzie oceniano najlepiej. Brokuły świeże stanowiące surowiec do badań należały do odmiany o barwie niebiesko-zielonej i charakteryzowały się parametrami: L*= 93,70, a*= -10,68 i b*= 11,03 (tab. 4). Literatura przedmiotu nie zawiera danych na temat wpływu sposobu gotowania na jakość sensoryczną i barwę brokułów. Jedynie Artes i wsp. [4] podają wartości parametrów barwy świeżych brokułów, ale odnoszą się one do odmiany o barwie żółto-zielonej, a mianowicie: L*= 88,19, a*= - 4,16 i b*= 21,97.

Ponadto stwierdzono statystycznie istotny wpływ czasu i sposobu przechowywania na barwę brokułów mierzoną instrumentalnie. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 4.

Próbki brokułów gotowanych i przechowywanych przez 4 h były:

- jaśniejsze w stosunku do surowca świeżego (wartość ΔL dodatnia), przy czym nieco większe pojaśnienie barwy w przypadku wszystkich metod gotowania stwierdzono w przypadku przechowywania w beamarze,

- z przewagą koloru żółtego (wartości Δb dodatnie), zmiany Δb były wyższe w przypadku przechowywania w bemarze,
- ze zmniejszającym się udziałem koloru zielonego (wartości Δa dodatnie), zmiany Δa były wyższe w przypadku przechowywania w bemarze.

Tabela 4

Barwa brokułów w zależności od sposobu ich gotowania i przechowywania.
Broccoli colour depending on cooking method and storage.

Sposób przechowywania Method of storage	Sposób gotowania Cooking method	Wartości średnie współczynników Mean values of coefficients n=90							
		L*	a*	b*	ΔL	Δa	Δb	a/b	ΔE
	Brokuły świeże Fresh broccoli	93,70 $\pm 0,1$	-10,68 $\pm 0,1$	+11,03 $\pm 0,1$	-	-	-	0,968	-
W termoporcie – 4 h In thermoport	A	97,68 $\pm 0,2$	-5,45 $\pm 0,05$	+12,80 $\pm 0,2$	3,98	5,23	1,77	0,426	6,81
	B	96,93 $\pm 0,15$	-5,90 $\pm 0,1$	+13,16 $\pm 0,05$	3,23	4,78	2,13	0,448	6,15
	C	97,70 $\pm 0,1$	-4,10 $\pm 0,05$	+13,99 $\pm 0,1$	4,00	6,58	2,96	0,293	8,25
W bemarze – 4 h Warmholdin g	A	98,01 $\pm 0,1$	-4,55 $\pm 0,1$	+13,32 $\pm 0,1$	4,31	6,13	2,29	0,342	7,84
	B	97,37 $\pm 0,1$	-4,85 $\pm 0,1$	+14,49 $\pm 0,05$	3,67	5,83	3,46	0,335	7,71
	C	97,78 $\pm 0,1$	-3,25 $\pm 0,1$	+14,85 $\pm 0,1$	4,08	7,43	3,82	0,219	9,30

Objaśnienia: / Explanatory notes:

A – gotowanie w garnku przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody / Cooking in pot starting with boiling water; B – gotowanie w garnku w parze / Steam Cooking in pot; C – gotowanie w piecu konwekcyjno-parowym w parze / Steam cooking in convection-steam oven.

W tabeli przedstawiono wartości średnie współczynników: L* – jasność; -a – barwa zielona; -b – barwa niebieska; a/b – nasycenie barwy; +a – barwa czerwona; +b – barwa żółta; ΔE – zmiana barwy / Table shows mean values for: L*- brightness; -a - green colour; -b - blue colour, a/b - saturation of colour, +a – red colour; +b - yellow colour; ΔE – changes of colour,

a, b ... – wyniki oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie / results signed with the same letter indicates no statistically significant differences between the results.

Nasycenie barwy (a/b) brokułów malało w zależności od sposobu gotowania i sposobu przechowywania, przy czym najmniejsze nasycenie stwierdzono w brokułach gotowanych w piecu konwekcyjno- parowym w parze i przechowywanych w bemarze.

Po upływie 4 h przechowywania brokułów, gotowanych w beamarze, następowały większe zmiany barwy (ΔE) w stosunku do surowca świeżego niż w termoporcie po takim samym czasie przechowywania, co potwierdziło wyniki oceny sensorycznej.

Badania są kontynuowane z użyciem innych surowców (ziemniaki, zupy) w celu określenia optymalnych warunków przechowywania potraw w beamarze i w termoporcie, jak również wpływu przechowywania na jakość sensoryczną i wartość odżywczą.

Wnioski

1. Najlepszymi cechami sensorycznymi (barwa, zapach, smak, konsystencja, jakość ogólna) charakteryzowały się brokuły gotowane w garnku, przy rozpoczęciu procesu od wrzącej wody. Brokuły gotowane w parze (w garnku i w piecu konwekcyjno-parowym) były oceniane istotnie niżej, na co wpłynął wydłużony czas gotowania.
2. Przechowywanie brokułów w beamarze powodowało znacznie większe negatywne zmiany jakości sensorycznej niż przechowywanie w termoporcie z uwagi na stałe podgrzewanie. Przedłużanie czasu przechowywania powyżej 1,5 h, co jest stosowane w gastronomii, powoduje znaczne obniżenie temperatury i jakości sensorycznej przechowywanego surowca.
3. W celu utrzymania właściwej temperatury i dobrej jakości gotowanych brokułów podczas ich przechowywania w termoporcie, należy przekładać warzywo bezpośrednio po ugotowaniu do wygrzanych pojemników GN, szczelnie zamykać termoport i przechowywać go w temp. pokojowej nie dłużej niż 1,5 h. Najbardziej istotny jest stopień wypełnienia pojemników GN, przy pełnym wypełnieniu pojemników temperatura surowca jest utrzymywana lepiej.
4. Brokuły nie powinny być przechowywane w beamarze. Podniesienie temperatury medium grzewczego powyżej 63°C spowodowałoby wzrost bezpieczeństwa mikrobiologicznego brokułów, ale obniżenie jakości sensorycznej.
5. Temperatura i czas gotowania oraz przechowywania po ugotowaniu są czynnikami krytycznymi jakości sensorycznej uzyskanej potrawy.

Literatura

- [1] Adamicki F.: Co wpływa na jakość przechowywanych brokułów? *Warzywnictwo*, 2001, **16**, 25-26.
- [2] Albrecht J.A., Schafer H.W., Zottola: Relationship of total to initial and retained ascorbic acid in selected cruciferous noncruciferous vegetables. *J. Food Sci.*, 1990, **55**, 182.
- [3] Albrecht J.A., Schafer H.W., Zottola E.A.: Sulphydryl and scorbic acid relationships in selected vegetables and fruits. *J. Food Sci.*, 1991, **2 (56)**, 427-429.
- [4] Artes F., Vallejo F., Martinez J.A.: Quality of broccoli as influenced by film wrapping during shipment. *Komputerowa baza danych Springer – Verlag*, 2001.
- [5] Babik I.: Nowe odmiany brokułów. *Owoce, Warzywa, Kwiaty*, 2000, **9**, 10.

- [6] Favell D.J.: A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*, 1998, **1** (62), 61.
- [7] Gey K.F., Brubacher G.B., Stahelin H.B.: Plasma levels of antioxidant vitamin in relation of ischemic heart diseases and cancer. *Amer. J. Clin.Nutr.*, 1987, **5** (45), 1368.
- [8] Graf E., Saguy J.S.: *Food Product Development from concept to the marketplace*, chapt. 8. Moskowitz H.R. *Optimizing consumer product acceptance and perceived sensory quality*. An avi Book, Publ.Van Nostrad Reinhold, New York 1991, pp.157-187.
- [9] Grześnińska W.: Nareszcie nic się nie przypała. *Przeg. Gastr.*, 1999, **9**, 4-5.
- [10] Hrnčirik K., Valusek J., Velisek J.: Investigation of ascorbigen as breakdown product of glucobrassicin autolysis in Brassica vegetables, *Komputerowa baza danych Springer- Verlag*, 2001.
- [11] Jacob A.R.: *Vitamin C in modern nutrition in health and disease*.vol 1. red. Shills M.E., Olson J.A., Shike M., Ed. Lea&Febiger, 1994, p.432.
- [12] Kołożyn – Krajewska D. (red.): *Higiena produkcji żywności*. Wyd. SGGW, Warszawa 2003.
- [13] Koziorowska B., Biernat M.: Termosy - wygoda i jakość. *Przeg. Gastr.*, 2001, **6**, 6-7.
- [14] Kunicki E: *Uprawa brokułów*. Hortpress, Warszawa, 1998, s.6-8, s.11, s.40.
- [15] Lang A., Ward S., Michie C.A.: Eating broccoli could prevent cancer. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 2679-2683 SW.
- [16] PN – ISO 4121: 1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Ocena produktów żywnościowych przy użyciu metod skalowania.
- [17] Steinkellner H.: Effect of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA - reactive dietary carcinogens. *Mutation Research*, 2001, 480-481, 286-287.
- [18] Wartanowicz M.: *Witaminy*. W: *Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*. cz.1. pod red. Gawęcki J., Hryniewiecki L. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2000.
- [19] Zalewski S: *Obróbka termiczna warzyw i owoców*. *Przeg. Gastr.*, 1988, **5**, 11-13.
- [20] Zalewski S. (red.): *Podstawy technologii gastronomicznej*. WNT, Warszawa 2003.

EFFECT OF COOKING METHODS AND STORAGE AFTER COOKING ON TEMPERATURE, YIELD AND SENSORY QUALITY OF BROCCOLI

S u m m a r y

The aim of this paper was evaluation of the influence of different cooking methods (cooking in pot starting with boiling water, steam cooking in pot, steam cooking in convection-steam oven), and storage after cooking (warmholding and storage in the thermoport) of broccoli, on yield, sensory quality (evaluated by unstructural graphical scale and dual method) and colour determined by instrumenthal method. Temperature changes of broccoli and water during storage in warmholding and in the thermoport were also tested.

The highest yield of cooking process due to high water absorbtion, was observed in the case of cooking in pot starting with boiling water. Study shows that different methods of cooking and storage time statistically significantly affected sensory quality of broccoli. Sensory quality of cooked broccoli in pot starting with boiling water was statistically significantly better than steam cooked broccoli (in pot and in convection - steam oven).

Warmholding of cooked broccoli in comparison to storage in the thermoport caused the significant decrease of sensory quality, what was confirmed by instrumenthal colour determination method. It looks that broccoli should not be hold in warm.

To preserve good sensory quality and proper temperature during storage in the thermoport after cooking it is recommended to put broccoli into warm GN container, fully filled in, close it properly and storage max.1.5 hour.

Key words: broccoli, sensory quality, warmholding, thermoport 