

KAROL MIŃKOWSKI, ARTUR KALINOWSKI, ANNA KRUPSKA

## WPLYW WSTĘPNEJ OBRÓBKI ENZYMATYCZNEJ NASION NA PARAMETRY PROCESU TŁOCZENIA I CECHY JAKOŚCIOWE OLEJU LNIANEGO

### Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu wstępnej obróbki nasion za pomocą dodanych enzymów na parametry procesu tłoczenia w prasie ślimakowej i cechy jakościowe oleju lnianego. Materiałem wyjściowym do badań były nasiona wysokolinolenowej odmiany lnu 'Bukoz' (IWNiRZ Poznań). Obróbce enzymatycznej poddano rozdrobnione nasiona w postaci płatków. Płatki o wilgotności 20 % poddawano obróbce enzymatycznej w temp. 50 °C przez 3 h, następnie suszono je w suszarce owiewowej. Olej tłoczono za pomocą prasy ślimakowej UNO-SE Farnet. Do badań stosowano enzymy: celulazę i proteazę w postaci preparatów handlowych Celluclast 1.5 L oraz Alcalase 2.4 L, a także ich mieszaniny w proporcji 50 : 50 i 10 : 90, w dawkach [% smb]: 0,125, 0,25 i 0,50.

Obróbka enzymatyczna nasion lnu przed tłoczeniem na zimno przyczyniła się do wzrostu przelotowości prasy ślimakowej i wydajności tłoczenia oraz do obniżenia temperatury wytłoku. Największą wydajność tłoczenia (79,8 %) uzyskano po zastosowaniu mieszaniny enzymów celulazy i proteazy w proporcji 10 : 90 i w dawce 0,25 % smb. Obróbka enzymatyczna powodowała nieznaczny wzrost zawartości pierwotnych i wtórnych produktów oksydacji a także liczby kwasowej oleju. Proces przyczynił się również do niewielkiego wzrostu zawartości naturalnych przeciwutleniaczy w oleju - związków fenolowych i tokoferoli.

**Słowa kluczowe:** nasiona lnu, obróbka enzymatyczna, celulaza, proteaza, tłoczenie na zimno, olej lniany

### Wprowadzenie

Olej lniany bogaty w PUFA *n-3* stanowi ważne uzupełnienie diety człowieka ze względu na swe cenne walory żywieniowe i zdrowotne. Pozyskuje się go zazwyczaj metodą tłoczenia na zimno z całych nasion. Jest to metoda mało efektywna, charakteryzującą się niską wydajnością. Zastosowanie podwójnego tłoczenia zwiększa uzysk

---

*Dr hab. K. Mińkowski, prof. IBPRS, mgr inż. A. Kalinowski, mgr inż. A. Krupska, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Oddział Technologii Mięsa i Tłuszczu, ul. Jubilerska 4, 04-190 Warszawa. Kontakt: karol.minkowski@ibprs.pl*

oleju, ale jest on niższej jakości [6]. Mechaniczne zniszczenie struktury tkankowej nasion i częściowe otwarcie komórek nasiennych przed tłoczeniem w sposób istotny ułatwia wydobycie oleju z surowca [12, 14]. Dalsze otwarcie komórek można uzyskać poprzez enzymatyczną hydrolizę składników miazgi nasiennej, możliwą do przeprowadzenia przed każdym ze sposobów wydobywania oleju [23, 25]. Wprowadzenie enzymów degradujących ściany komórkowe przez konwersję celulozy do glukozy, celobiozy i wyższych polimerów oraz rozszczepiających kompleks cząsteczek lipoproteinowych do prostych lipidów i cząsteczek białek ułatwia wydobywanie oleju [23]. Wyniki badań prowadzonych na różnych surowcach (soja, bawełna, len, ogórecznik, rzepak, oliwka) wskazują, że obróbka enzymatyczna nasion przed wydobyciem oleju podwyższa jego wydajność [2, 8, 9, 28, 31, 32]. Jakość pozyskiwanego oleju w największym stopniu zależy od jakości nasion, sposobu i parametrów ich obróbki wstępnej oraz metody wydobywania [14]. Olej pozyskany z surowca poddanego obróbce enzymatycznej i hydrotermicznej, a następnie ekstrakcji wodnej charakteryzuje się z reguły mniejszą zawartością wolnych kwasów tłuszczowych, nadtlenków, liczbą zmydlenia oraz większą zawartością tokoferoli i związków fenolowych w porównaniu z próbą kontrolną oraz z olejem pozyskanym w wyniku ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi [36]. Tłoczony na zimno olej z nasion rzepaku poddanych obróbce enzymatycznej i hydrotermicznej zawiera więcej związków fenolowych i ma wyższą pojemność antyoksydacyjną [30], z nasion ogórecznika lekarskiego zawiera więcej  $\gamma$ -tokoferolu [29], a z nasion bawełny –  $\alpha$ -tokoferolu [8]. Procesy enzymatyczne są naturalnymi, przyjaznymi dla środowiska mechanizmami, przebiegającymi w łagodnych warunkach, charakteryzującymi się dużą specyficznością, natomiast ich wadą jest wrażliwość enzymów na ogrzewanie, pH środowiska i zanieczyszczenia. Stosowanie procesów enzymatycznych wiąże się z wyższymi kosztami w porównaniu z procesami konwencjonalnymi [23, 36]. Dodatek obcych enzymów do materiału nasiennego poprzedzony jest zwykle termiczną inaktywacją rodzimych enzymów [2] lub obróbką termiczną prowadzoną bezpośrednio przed tłoczeniem w temperaturze ok. 100 °C [30]. Pozyskany w ten sposób olej nie może być jednak określany jako tłoczony na zimno. Jest to możliwe, kiedy obróbka enzymatyczna i hydrotermiczna nasion i tłoczenie oleju prowadzone są w łagodnych warunkach termicznych, gdy temperatura nie przekracza 50 °C [4]. Wykazano, że płatkowanie nasion lnu i ich łagodna obróbka hydrotermiczna, bez dodatku enzymów wpływają na znaczną poprawę parametrów tłoczenia oraz cechy sensoryczne oleju i tylko w niewielkim stopniu przyczyniają się do zmniejszenia jego stabilności [13]. Dało to podstawę do podjęcia badań nad wykorzystaniem enzymów do dalszego zwiększenia wydajności oleju lnianego tłoczonego na zimno.

Celem pracy było określenie wpływu wstępnej obróbki enzymatycznej nasion na parametry procesu tłoczenia w prasie ślimakowej i cechy jakościowe oleju lnianego.

## Material i metody badań

Materiałem wyjściowym były nasiona lnu polskiej odmiany „Bukoz” (Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań), pochodzące z upraw ekologicznych, ze zbiorów w roku 2012. Nasiona charakteryzowały się typową wilgotnością (6,0 %) i zawartością tłuszczu (41,9 %) i były praktycznie pozbawione zanieczyszczeń. Bezpośrednim materiałem do badań były płatki otrzymane z nasion poddanych wstępnemu nawilżeniu za pomocą wody destylowanej do wilgotności 8,5 %, starannemu ręcznemu wymieszaniu i przetrzymaniu w szczelnie zamkniętych torbach polietylenowych w temp. 8 °C (w chłodziarce) przez 5 dni, w celu wyrównania wilgotności w całej masie materiału. Do płatkowania wykorzystano młyn laboratoryjny typu Gosmet według Sadkiewicza (RSZZBM Gosmet, Bydgoszcz) o wymiennych walcach, wyposażony według zamówienia w parę gładkich walców, z ustawioną fabrycznie stałą szczeliną pomiędzy nimi o wielkości 0,2 mm, poruszających się z prędkością obrotową 450 obr./min. W badaniach stosowano enzymy: celulazę i proteazę w postaci preparatów handlowych odpowiednio: Celluclast 1.5 L, o aktywności celulolitycznej 1500 NCU/g, z *Trichoderma reesei* ATTC 26921 oraz Alcalase 2.4 L z *Bacillus licheniformis* o aktywności proteolitycznej  $\geq 2,4$  U/g, a także ich mieszaniny w proporcji 50 : 50 oraz 10 : 90. Oba preparaty, dopuszczone do stosowania w żywności, pochodziły z firmy Novozymes A/S (Dania). Próbkę płatków o wilgotności 20 % uzyskiwano w wyniku ich nawilżenia za pomocą wody destylowanej, starannego ręcznego wymieszania i przechowania w szczelnie zamkniętych torbach polietylenowych przez 2 dni w temp. 8 °C (w chłodziarce), w celu wyrównania wilgotności w całej masie materiału. Enzymy dodawano poprzez ich rozpylenie na powierzchni płatków za pomocą atomizera i staranne ostrożne mieszanie. Inkubację płatków prowadzono w cieplarni laboratoryjnej Incubat 801 (J P Selecta S.A., Hiszpania) przez 3 h w temp. 50 °C. Płatki po inkubacji podsuszano w 4-półkowej suszarce owiewowej, typ DA 750 (Rommelsbacher, Niemcy). Temperatura powietrza suszącego wynosiła 60 °C, temperatura wewnętrzna złoża płatków na półce, mierzona za pomocą bezkontaktowego termometru laserowego Ray Temp 3 (ETI Ltd., Wielka Brytania), wynosiła 44,5 °C, a przybliżony czas podsuszania do wilgotności 8,5 % to ok. 50 min. Wilgotność końcową określano metodą wagową. Przy ustalaniu powyższych parametrów brano pod uwagę dobrą efektywność tłoczenia oleju i możliwie najkrótszy czas podsuszania. Płatki poddawano następnie tłoczeniu. Próbkę kontrolną wykonywano w identycznych warunkach jak obróbkę enzymatyczną, a zamiast preparatu enzymatycznego dodawano odpowiednią ilość wody.

Oleje tłoczono w prasie ślimakowej o nominalnej przelotowości 9 ÷ 12 kg/h, typ UNO-SE (Farmet a.s, Czechy). Prasa była wyposażona w dyszę wylotową o średnicy 8 mm. Temperaturę płatków, oleju oraz wytloku mierzono za pomocą bezkontaktowego termometru laserowego Ray Temp 3. Oleje oczyszczano przez naturalną sedyment-

tację w ciągu 3 dni, a po ich dekantacji analizowano próbki w ciągu 4 dni. Zawartość zanieczyszczeń nierozpuszczalnych oznaczano w oleju otrzymanym bezpośrednio po tłoczeniu. Doświadczenie przeprowadzono w dwóch seriach, a oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach ( $n = 2 \times 3$ ). W poszczególnych wariantach doświadczeń określano przelotowość prasy oraz wydajność tłoczenia. Przelotowość prasy określano na podstawie pomiaru czasu tłoczenia surowca o masie 1 kg. Wydajność tłoczenia (W) obliczano na podstawie masy uzyskanego oleju, masy próbki nasion/płatków i procentowej zawartości oleju w nasionach (1).

$$W [\%] = \frac{\text{masa oleju (g)} \times 100 \times 100}{\text{zawartość oleju (\%)} \times \text{masa nasion(g)}} \quad (1)$$

W olejach oznaczano: barwę ogółem metodą spektrofotometryczną przy długości fali 442 nm i 668 nm [20], zawartość zanieczyszczeń nierozpuszczalnych w heksanie [17], zawartość wody i substancji lotnych [16], liczbę kwasową [15], liczbę nadtlenkową [18], liczbę anizydynową [19], zawartość związków fenolowych ogółem [27] oraz zawartość tokoferoli [21]. Wskaźnik oksydacji Totox wyliczano z równania (2):

$$\text{Totox} = 2\text{LOO} + \text{LA} \quad (2)$$

gdzie: LOO – liczba nadtlenkowa wyrażona w milirównoważnikach tlenu aktywnego/kg; LA – liczba anizydynowa.

Oznaczanie zawartości związków fenolowych ogółem w olejach wykonywano metodą z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu'a [27]. Olej (3 g) rozpuszczano w 15 ml heksanu i ekstrahowano związki fenolowe za pomocą metanolu ( $3 \times 5$  ml), przez wytrząsanie w ciągu 2 min przy każdej ekstrakcji. Połączone ekstrakty zostawiano na 16 h. Po rozdzieleniu frakcję metanolową przemywano 25 ml heksanu w celu usunięcia resztek oleju. Próbki metanolowych ekstraktów (0,2 ml) przenoszono do kolb o pojemności 10 ml, do których dodawano 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Całość wytrząsano i zostawiano na 3 min. Następnie dodawano 1 ml nasyconego roztworu węgla sodu i uzupełniano wodą destylowaną do 10 ml. Po 1 h mierzono absorbancję roztworu przy długości fali  $\lambda = 725$  nm w odniesieniu do próby kontrolnej, z zastosowaniem spektrofotometru U-2900 (Hitachi High-Tech, Japonia). Całkowitą zawartość związków fenolowych określano na podstawie krzywej kalibracyjnej, jako ekwiwalent kwasu ferulowego (FAE), dominującego wśród kwasów fenolowych nasion lnu [5].

Oznaczanie zawartości tokoferoli ( $-\alpha$ T,  $-\gamma$ T i  $-\delta$ T) wykonywano metodą HPLC (HP 1100 z detektorem UV) według PN-EN 12822:2002 [21]. Do rozdzielania stosowano kolumnę Supelcosil LC-18 (25 cm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m). Rozdział prowadzono w temp. 30 °C, przy przepływie fazy ruchomej (metanol : woda, 97 : 3) 1 ml/min. Oznaczano homologię  $-\alpha$ ,  $-\gamma$  i  $-\delta$  przy długości fali  $\lambda = 292$  nm.

Oleje poddawano także analizie sensorycznej. Oceniano ich smakowitość ogółem w skali 5-punktowej oraz w sposób opisowy dominującą nutę smakową [10].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu Statgraphic Plus 5.1. Do oceny istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test Duncana (przy  $p \leq 0,05$ ).

### Wyniki i dyskusja

W tab. 1. i 2. przedstawiono parametry tłoczenia płatków poddanych obróbce enzymatycznej za pomocą celulazy oraz proteazy. W próbie kontrolnej płatki poddawano tylko obróbce hydrotermicznej, w warunkach identycznych jak przy zastosowaniu enzymów. Obróbka enzymatyczna płatków przyczyniła się do korzystnych zmian w procesie tłoczenia oleju. Nastąpił wzrost przelotowości prasy i wydajności tłoczenia, a także obniżenie temperatury wylotu. Znikomy był jej wpływ na temperaturę oleju. Przelotowość prasy była istotnie ( $p \leq 0,05$ ) zależna od zastosowanej dawki preparatu.

Tabela 1. Wyniki parametrów procesu tłoczenia oleju lnianego, determinowane wpływem działania celulazy

Table 1. Parameter results of linseed oil pressing process as determined by the effect of cellulase activity

| Wyszczególnienie<br>Specification              | Dawka / Dose [% smb / % of ddm]   |                         |                         |                         |
|--|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|  | Próba kontrolna<br>Control sample | 0,125                   | 0,25                    | 0,50                    |
|  | $\bar{x} \pm s / SD$              | $\bar{x} \pm s / SD$    | $\bar{x} \pm s / SD$    | $\bar{x} \pm s / SD$    |
| Przelotowość prasy<br>Capacity of press [kg/h] | 13,5 <sup>a</sup> ± 0,1           | 14,8 <sup>b</sup> ± 0,1 | 14,1 <sup>c</sup> ± 0,1 | 14,7 <sup>b</sup> ± 0,1 |
| Wydajność tłoczenia<br>Yield of pressing [%]   | 74,8 <sup>a</sup> ± 1,1           | 75,6 <sup>b</sup> ± 1,2 | 77,5 <sup>c</sup> ± 1,2 | 77,0 <sup>d</sup> ± 1,3 |
| Temperatura oleju<br>Temperature of oil [°C]   | 47 <sup>a</sup> ± 1               | 46 <sup>a</sup> ± 1     | 48 <sup>b</sup> ± 1     | 48 <sup>b</sup> ± 1     |
| Temperatura wylotu<br>Temperature of cake [°C] | 68 <sup>a</sup> ± 1               | 65 <sup>b</sup> ± 1     | 66 <sup>b</sup> ± 1     | 64 <sup>c</sup> ± 1     |

Objaśnienia / Explanatory notes:

smb – sucha masa beztłuszczowa / fat-free dry matter;

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; s / SD – odchylenie standardowe / standard deviation; n = 6

a - d – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie ( $p \leq 0,05$ ) / mean values in rows and denoted by different letters differ statistically significantly ( $p \leq 0.05$ ).

Tabela 2. Wyniki parametrów procesu tłoczenia oleju lnianego, determinowane wpływem działania proteazy

Table 2. Parameter results of linseed oil pressing process as determined by the effect of protease activity

| Wyszczególnienie<br>Specification               | Dawka / Dose [% smb / % of ddm]   |                         |                         |                         |
|---|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   | Próba kontrolna<br>Control sample | 0,125                   | 0,25                    | 0,50                    |
|   | $\bar{x} \pm s / SD$              | $\bar{x} \pm s / SD$    | $\bar{x} \pm s / SD$    | $\bar{x} \pm s / SD$    |
| Przelotowość prasy<br>Capacity of press [kg/h]  | 13,5 <sup>a</sup> ± 0,1           | 14,7 <sup>b</sup> ± 0,2 | 13,9 <sup>c</sup> ± 0,2 | 14,1 <sup>c</sup> ± 0,1 |
| Wydajność tłoczenia<br>Yield of pressing [%]    | 74,8 <sup>a</sup> ± 1,1           | 76,9 <sup>b</sup> ± 1,7 | 79,4 <sup>c</sup> ± 1,8 | 78,5 <sup>d</sup> ± 2,0 |
| Temperatura oleju<br>Temperature of oil [°C]    | 47 <sup>a</sup> ± 1               | 48 <sup>a</sup> ± 1     | 47 <sup>a</sup> ± 1     | 47 <sup>a</sup> ± 1     |
| Temperatura wytloku<br>Temperature of cake [°C] | 68 <sup>a</sup> ± 1               | 67 <sup>a</sup> ± 1     | 66 <sup>b</sup> ± 1     | 66 <sup>b</sup> ± 1     |

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

W przypadku obu enzymów największą przelotowość prasy uzyskano po zastosowaniu dawki 0,125 % smb (odpowiednio: 14,8 i 14,1 kg/h). Równocześnie jednak wydajność tłoczenia była najmniejsza. Podwajając dawkę enzymu w obu przypadkach uzyskano najwyższą wydajność tłoczenia (77,5 i 79,4 %), ale przy nieznacznie mniejszej przelotowości prasy. Z kolei 4-krotny wzrost dawki enzymów nie przyczynił się do dalszej poprawy parametrów tłoczenia. Przy identycznych dawkach zastosowanie proteazy pozwala uzyskać wyższą wydajność tłoczenia niż przy użyciu celulazy. Korzystniejsze działanie proteazy w porównaniu z celulazą obserwowali także Lamsal i wsp. [2] oraz Bargal i wsp. [7]. Jak podają Rosenthal i wsp. [23], w wyniku działania enzymów proteolitycznych następuje zniszczenie białkowej błony oleozynowej i uwolnienie oleju z oleosomów. Skuteczność działania celulazy mogła być częściowo ograniczona z powodu wcześniejszego dokładnego mechanicznego zniszczenia struktur celulozowych i otwarcia komórek liścieni w procesie płatkowania. Maksymalny wzrost wydajności tłoczenia w przypadku celulazy wyniósł 3,6 %, a proteazy – 6,1 %, przy równocześnie niewielkim wzroście przelotowości prasy. Sumaryczny efekt osiągnięty w wyniku płatkowania nasion i ich obróbki enzymatycznej i hydrotermicznej to wzrost wydajności tłoczenia: w przypadku celulazy o 7,6 %, a proteazy – o 10,3 % oraz wzrost przelotowości prasy o 65 % w odniesieniu do parametrów uzyskanych podczas tłoczenia oleju z całych nasion [13]. Działanie celulazy oraz proteazy wywierało znikomy wpływ na temperaturę oleju, która w każdym przypadku była niższa niż 50 °C (tab. 1 i 2). Oznacza to, że pozyskiwany olej można uznać za tłoczony na zimno [35]. Temperatura wytloku przy zastosowaniu enzymów była istotnie ( $p \leq 0,05$ ) niższa,

o  $1 \div 3$  °C, od temperatury próby kontrolnej. Wynika to prawdopodobnie z degradacyjnego działania enzymów na masę nasienną i z jej mniejszych oporów tarcia w prasie ślimakowej [23]. Niższa temperatura wytloku pozwala na lepsze zachowanie wartości biologicznej zawartych w nim białek [14]. Temperatura płatków po obróbce enzymatycznej, bezpośrednio przed tłoczeniem, w każdym z wariantów wynosiła średnio  $32 \pm 1$  °C i nie odbiegała od temperatury próby kontrolnej. Oprócz pojedynczych enzymów stosowano także mieszaninę celulazy i proteazy w proporcjach 10 : 90 i 50 : 50 w dawce 0,25 % smb. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 3.

Tabela 3. Wyniki parametrów procesu tłoczenia oleju lnianego, determinowane wpływem działania mieszaniny celulazy i proteazy

Table 3. Parameter results of linseed oil pressing process as determined by the effect of cellulose-protease mixture activity

| Wyszczególnienie<br>Specification               | Celulaza / Proteaza<br>Cellulase / Protease |                      |                      |
|---|---|----------------------|----------------------|
|   | Próba kontrolna<br>Control sample           | Mix. 10 : 90         | Mix. 50 : 50         |
|   | $\bar{x} \pm s / SD$                        | $\bar{x} \pm s / SD$ | $\bar{x} \pm s / SD$ |
| Przelotowość prasy<br>Capacity of press [kg/h]  | $13,5^a \pm 0,1$                            | $14,3^c \pm 0,1$     | $13,9^b \pm 0,1$     |
| Wydajność tłoczenia<br>Yield of pressing [%]    | $74,8^a \pm 1,1$                            | $79,8^c \pm 1,1$     | $78,6^b \pm 1,1$     |
| Temperatura oleju<br>Temperature of oil [°C]    | $47^a \pm 1$                                | $47^a \pm 1$         | $47^a \pm 1$         |
| Temperatura wytloku<br>Temperature of cake [°C] | $68^a \pm 1$                                | $66^b \pm 1$         | $66^b \pm 1$         |

Objaśnienia / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; s / SD – odchylenie standardowe / standard deviation; n = 6  
a - c – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie ( $p \leq 0,05$ ) / mean values in rows and denoted by different letters differ statistically significantly ( $p \leq 0.05$ ).

Istotnie ( $p \leq 0,05$ ) większą przelotowość prasy oraz wydajność tłoczenia uzyskano po zastosowaniu mieszaniny celulazy i proteazy w proporcji 10 : 90. Wydajność tłoczenia (79,8 %) w tym wariantcie była największa w prowadzonych badaniach. Zastosowanie mieszaniny enzymów w proporcji 50 : 50 spowodowało niewielkie obniżenie wyników przelotowości prasy i wydajności tłoczenia. Na korzystny synergizm enzymów celulolitycznych i proteolitycznych zwracają uwagę Rosenthal i wsp. [23], a także Yusoff i wsp. [36]. Temperatura pozyskiwanych olejów, jak i wytloków (tab. 3) nie odbiegały od tych, jakie występowały przy stosowaniu pojedynczych enzymów (tab. 1 i 2). W tab. 4. przedstawiono wyniki badań wybranych cech jakościowych olejów pozyskiwanych w poszczególnych wariantach doświadczeń.

Barwa ogólna, a także poszczególne jej składowe, to jest absorbancja przy  $\lambda = 442$  nm, pochodząca od barwników karotenoidowych oraz absorbancja przy  $\lambda = 670$  nm, pochodząca od barwników chlorofilowych, olejów po hydrolizie enzymatycznej nie różniły się istotnie ( $p \leq 0,05$ ) od analogicznych wskaźników próby kontrolnej. Barwniki karotenoidowe są uznawane za związki najbardziej skuteczne w hamowaniu utleniania fotosensybilizowanego i ich ubytek jest niekorzystny, natomiast barwniki chlorofilowe są w olejach niepożądane. Barwniki chlorofilowe pełnią funkcję fotosensybilizatorów, które reagując bezpośrednio z tlenem tripletowym, generują wysoce reaktywny tlen singletowy. Inicjują w ten sposób proces autooksydacji lipidów oraz, rzadziej, będąc w stanie wzbudzonym, biorą udział w utlenianiu lipidów tlenem tripletowym [24]. Olej lniany tłoczony na zimno charakteryzuje się ciemną barwą [1], która ulega rozjaśnieniu w wyniku niskotemperaturowej hydrotermicznej obróbki płatków [12]. Dodatek enzymów nie spowodował istotnych zmian barwy ogółem i ich składowych. Zawartość zanieczyszczeń nierozpuszczalnych w wyniku działania celulazy wzrosła w sposób istotny ( $p \leq 0,05$ ) z 4,2 do 4,4 %. Działanie celulazy, enzymu degradującego ściany komórkowe, sprzyja powstawaniu frakcji drobnej [23], która przechodzi do oleju. Zastosowanie proteazy, z racji jej odmiennego działania polegającego na rozszczepieniu połączeń lipoproteinowych oraz hydrolizie białkowej błony oleozynowej oleosomów [23], nie spowodowało żadnych zmian tego parametru. Wzrost zawartości zanieczyszczeń o 0,1 % nastąpił w przypadku mieszaniny celulazy i proteazy w proporcji 50 : 50. Zastosowanie enzymów nie miało istotnego ( $p \leq 0,05$ ) wpływu na zawartość wody i substancji lotnych. Duża zawartość wody w oleju jest niepożądana, a jej obecność przyczynia się przede wszystkim do hydrolizy triacylogliceroli [14]. W badanych olejach nie przekraczała ona 0,5 % i była mniejsza od podanej przez Choo i wsp. [3]. Hydroliza enzymatyczna spowodowała niewielkie, zależne od rodzaju zastosowanego enzymu, zmiany jakościowe oleju pod względem liczby kwasowej (LK), liczby nadtlenkowej (LOO) i anizydynowej (LA). Oleje charakteryzowały się średnim stopniem hydrolizy lipidów. LK wzrosła istotnie ( $p \leq 0,05$ ) w przypadku celulazy z 2,11 do 2,20 mg KOH/g, a proteazy – do 2,18 mg KOH/g, przy dopuszczalnym dla olejów tłoczonych na zimno poziomie LK = 4 mg KOH/g [4]. Podobnie stwierdzono w przypadku hydrolizy enzymatycznej nasion rzepaku [30] i ogórecznika lekarskiego [28].

Zawartość pierwotnych produktów utlenienia określona za pomocą liczby nad-tlenkowej wzrosła w przypadku stosowania celulazy o 6,8 %, z 1,48 do 1,58 meq  $O_2$ /kg, a proteazy – o 5,4 %, do 1,56 meq  $O_2$ /kg. Poziom LOO dopuszczalny dla olejów tłoczonych na zimno wynosi 15 meq  $O_2$ /kg [4]. Zastosowanie enzymów nie miało istotnego ( $p \leq 0,05$ ) wpływu na zawartość wtórnych produktów utlenienia, mierzonych za pomocą liczby anizydynowej. Przy stosowaniu mieszaniny enzymów wartości LK, LOO i LA lokowały się pomiędzy granicami wyznaczonymi przez działanie pojedyn-



czych enzymów. Oznaczenie LOO i LA umożliwiło wyliczenie wskaźnika Totox, który w sposób umowny wyraża ogólny stopień utlenienia olejów. Przy stosowaniu celulazy wynosił on 3,52, a proteazy – 3,47 jednostek. Były to wartości znacznie poniżej

Tabela 4. Jakość tłoczonego oleju lnianego, determinowana obróbką enzymatyczną nasion  
Table 4. Quality of pressed linseed oil pressing as determined by the effect of seeds enzymatic treatment

| Wyszczególnienie<br>Specification  | Rodzaj próby / Type of sample                                |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|
|  | Próba kontrolna<br>Control sample                            | Celulaza<br>Cellulase  | Proteaza<br>Protease   | Celulaza /<br>Proteaza<br>Cellulase /<br>Protease<br>Mix 10 : 90 | Celulaza /<br>Proteaza<br>Cellulase /<br>Protease<br>Mix 50 : 50 |
|  | $\bar{x} \pm s / SD$   | $\bar{x} \pm s / SD$   | $\bar{x} \pm s / SD$   | $\bar{x} \pm s / SD$   | $\bar{x} \pm s / SD$   |
| Smakowitość ogólna<br>General palatability [pkt / score]   | 4,6  | 4,6  | 4,7  | 4,6  | 4,6  |
| Barwa ogólna / General colour [1000<br>× (A <sub>442</sub> +A <sub>668</sub> )<br>A <sub>442</sub><br>A <sub>668</sub>     | 549 <sup>a</sup><br>0,529 <sup>a</sup><br>0,020 <sup>a</sup> | 546 <sup>a</sup><br>0,527 <sup>a</sup><br>0,019 <sup>a</sup> | 547 <sup>a</sup><br>0,527 <sup>a</sup><br>0,020 <sup>a</sup> | 545 <sup>a</sup><br>0,525 <sup>a</sup><br>0,020 <sup>a</sup>     | 546 <sup>a</sup><br>0,526 <sup>a</sup><br>0,020 <sup>a</sup>     |
| Zawartość zanieczyszczeń nierozpuszczalnych<br>Content of insoluble impurities [%]   | 4,2 <sup>a</sup> ± 0,1                                       | 4,4 <sup>b</sup> ± 0,1                                       | 4,2 <sup>a</sup> ± 0,1                                       | 4,2 <sup>a</sup> ± 0,1   | 4,3 <sup>ab</sup> ± 0,1  |
| Zawartość wody i substancji lotnych<br>Content of water and volatile substances [%]  | 0,41 <sup>a</sup> ± 0,02                                     | 0,40 <sup>a</sup> ± 0,02                                     | 0,41 <sup>a</sup> ± 0,02                                     | 0,40 <sup>a</sup> ± 0,02   | 0,41 <sup>a</sup> ± 0,02   |
| Liczba kwasowa / Acid value [mg KOH/1g]  | 2,11 <sup>a</sup> ± 0,05                                     | 2,20 <sup>b</sup> ± 0,04                                     | 2,18 <sup>c</sup> ± 0,05                                     | 2,17 <sup>c</sup> ± 0,05   | 2,18 <sup>c</sup> ± 0,05   |
| Liczba nadtlenkowa / Peroxide value [meq. O <sub>2</sub> /kg]  | 1,48 <sup>a</sup> ± 0,06                                     | 1,58 <sup>b</sup> ± 0,06                                     | 1,56 <sup>b</sup> ± 0,07                                     | 1,56 <sup>b</sup> ± 0,07   | 1,57 <sup>b</sup> ± 0,06   |
| Liczba anizydynowa / Anisidine value [-]   | 0,35 <sup>a</sup> ± 0,05                                     | 0,36 <sup>a</sup> ± 0,05                                     | 0,35 <sup>a</sup> ± 0,05                                     | 0,36 <sup>a</sup> ± 0,05   | 0,36 <sup>a</sup> ± 0,04   |
| Wskaźnik Totox / Totox index [-]   | 3,31 <sup>a</sup> ± 0,08                                     | 3,52 <sup>b</sup> ± 0,08                                     | 3,47 <sup>b</sup> ± 0,08                                     | 3,48 <sup>b</sup> ± 0,08   | 3,50 <sup>b</sup> ± 0,07   |
| Zawartość związków fenolowych ogółem<br>Total Content of phenolic compounds [mg/kg]  | 14,8 <sup>a</sup> ± 0,7                                      | 15,9 <sup>b</sup> ± 0,5                                      | 15,4 <sup>c</sup> ± 0,6                                      | 15,6 <sup>c</sup> ± 0,5  | 15,8 <sup>b</sup> ± 0,5  |
| Zawartość tokoferoli ogółem<br>Total content of tocopherols [mg/kg]<br>w tym γ-tokoferol<br>including γ-tocopherol [mg/kg] | 495,2 <sup>a</sup> ± 18,6<br>478,2 <sup>a</sup> ± 18,9       | 512,1 <sup>b</sup> ± 17,9<br>493,2 <sup>b</sup> ± 18,4       | 522,4 <sup>c</sup> ± 18,8<br>509,6 <sup>c</sup> ± 20,4       | 518,1 <sup>d</sup> ± 18,4<br>505,7 <sup>d</sup> ± 19,9           | 517,4 <sup>d</sup> ± 16,5<br>506,1 <sup>d</sup> ± 17,3           |

Objaśnienia / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; s / SD – odchylenie standardowe / standard deviation; n = 6 (3 × 2);  
a - d – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie (p ≤ 0,05) / mean values in rows and denoted by different letters differ statistically significantly (p ≤ 0.05).

granicznego poziomu 10 jednostek wyznaczającego dobrą jakość olejów jadalnych [35]. Obróbka enzymatyczna płatków przyczyniła się do wzrostu zawartości związków fenolowych ogółem w oleju o 7,4 %, z 14,8 do 15,9 mg/kg w przypadku celulazy i o 4,1 %, do 15,4 mg/kg, kiedy stosowano proteazę. Nasiona lnu zawierają szereg związków fenolowych, ale ich hydrofilowa natura sprawia, że zostają przede wszystkim w wytloku, natomiast w oleju są obecne tylko w nieznaczących ilościach [5]. Duży wzrost zawartości związków fenolowych obserwowano w oleju oliwkowym, po hydrolizie enzymatycznej pasty z owoców oliwki w procesie malaksacji [22, 32], a także w oleju rzepakowym po obróbce enzymatycznej nasion za pomocą enzymów celulolitycznych i pektolitycznych, a następnie ogrzewaniu w temp. 120 °C [30]. Przy porównywaniu wyników należy mieć na uwadze niespecyficzną powszechnie stosowaną metody oznaczania zawartości związków fenolowych ogółem z użyciem odczynnika Folina-Ciocolteu'a, gdyż może on reagować także z innymi składnikami wykazującymi właściwości redukujące, takimi jak: niektóre cukry, aminokwasy, białka czy produkty reakcji Maillarda [27]. Związki fenolowe pełnią funkcje naturalnych przeciwutleniaczy i wywierają znaczący wpływ na stabilność oksydacyjną i wartość żywieniową oleju [11]. Ich ilość w olejach tłoczonych na zimno może się znacznie wahać od 1 do 307 mg/100 g [3, 26]. Dodatek enzymów miał istotny ( $p \leq 0,05$ ) wpływ na zawartość tokoferoli ogółem, a także  $\alpha$ -tokoferolu w olejach. Zawartość tokoferoli ogółem wzrosła w wyniku działania celulazy o 3,4 %, a proteazy – o 5,6 %. O wzroście zawartości tokoferoli ogółem decydował przyrost zawartości  $\alpha$ -tokoferolu, dominującego w oleju lnianym [5]. Dodatek mieszanin enzymów spowodował niewielki wzrost zawartości tokoferoli, a wartości mieściły się w przedziale wyznaczonym przez działanie pojedynczych enzymów. Niewielki wzrost zawartości tokoferoli obserwowano także w przypadku oleju ogórecznikowego [29] oraz rzepakowego [30]. Należy zaznaczyć, że zawartość tokoferoli w oleju lnianym może się znacznie wahać [1, 3].

Zastosowanie enzymów nie miało wpływu na smakowość oleju, a jej oceny punktowe były niemal identyczne. W olejach, podobnie jak w próbie kontrolnej, dominowała nuta smakowa „skórki od chleba”, bez nut orzechowej oraz gorzkiej, charakterystycznych dla olejów otrzymywanych z całych nasion, niepoddanych obróbce hydrotermicznej i enzymatycznej [10, 33]. Nuta „skórki od chleba” pojawia się w oleju w wyniku hydrotermicznej obróbki płatków, bez stosowania enzymów [13]. Można przypuszczać, że jest to skutek reakcji Maillarda, zachodzących także w niskiej temperaturze. Są one inicjowane przez bezpośrednią reakcję grupy karbonylowej bądź hemiacetalowej cukrów redukujących z grupą aminową aminokwasów, peptydów lub innych związków, a ich skutkiem jest między innymi powstawanie lotnych związków o małych cząsteczkach, nadających produktom charakterystyczny aromat [34]. Substraty tych reakcji występują w masie beztłuszczowej nasion lnu [5].

## Wnioski

1. Hydroliza enzymatyczna nasion lnu przed tłoczeniem na zimno przyczynia się do wzrostu przelotowości prasy ślimakowej i wydajności tłoczenia oraz do obniżenia temperatury wylotku. Największą wydajność tłoczenia (79,8 %) uzyskano po zastosowaniu mieszaniny enzymów celulazy i proteazy, w proporcji 10 : 90 i dawce 0,25 % smb. Zastosowanie samej celulazy jest mniej efektywne niż proteazy.
2. Hydroliza enzymatyczna nasion lnu przed tłoczeniem na zimno powoduje nieznaczny wzrost zawartości pierwotnych i wtórnych produktów utlenienia a także liczby kwasowej oleju. Proces przyczynia się do niewielkiego wzrostu zawartości naturalnych przeciwutleniaczy w oleju – związków fenolowych i tokoferoli.

## Literatura

- [1] Abyzaytoun R., Shahidi F.: Oxidative stability of flax and hemp oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2006, **83**, 855-861.
- [2] Bargale P.C., Sosulski K., Sosulski F.W.: Enzymatic hydrolysis of soybean for solvent and mechanical oil extraction. *J. Food Proc. Eng.*, 2000, **23**, 321-327.
- [3] Choo W.S., Birch J., Dufour J.P.: Physicochemical and characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. Food Comp. Anal.*, 2007, **20**, 202-211.
- [4] Codex Alimentarius: Standard for named vegetable oil. Codex-Stan 210-1999. Amendment: 2005, 2011, 2013, 2015.
- [5] Daun J.K., Barthet V.J., Chomick T.L., Duguid S.: Structure, composition, and variety development of flaxseed. In: *Flaxseed in human nutrition*. 2<sup>nd</sup> ed. Eds. L.U. Thompson and S.C. Cunnae. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 2003, pp. 1-40.
- [6] Kasote D.M., Badhe Y.S., Hegde M.V.: Effect of mechanical press oil extraction processing on quality of linseed oil. *Ind. Crops Prod.*, 2013, **42**, 10-13.
- [7] Lamsal B.P., Murphy A., Johnson L.A.: Flaking and extrusion as mechanical treatments for enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2006, **83** (11), 973-979.
- [8] Latif S., Anwar F., Ashraf M.: Characterization of enzyme-assisted cold-pressed cottonseed oil. *J. Food Lipids*, 2007, **14**, 424-436.
- [9] Long J.J., Fu Y.J., Zu Y.G., Li J., Wang W., Gu C.B., Luo M.: Ultrasound-assisted extraction of flaxseed oil using immobilized enzymes. *Biores. Technol.*, 2011, **102**, 9991-9996.
- [10] Mińkowski K.: Studia nad stabilnością oksydacyjną olejów roślinnych bogatych w polienowe kwasy tłuszczowe o budowie trienowej. Rozprawa habilitacyjna. *Rocz. Inst. Przem. Mięś.*, 2008, **46** (4).
- [11] Mińkowski K., Zawada K., Ptasznik S., Kalinowski A.: Wpływ związków fenolowych nasion na stabilność oksydacyjną i aktywność antyrodnikową wyloczonych z nich olejów bogatych w PUFA n-3. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **89** (4), 118-132.
- [12] Mińkowski K., Kalinowski A., Krupska A.: Wpływ sposobu przygotowania nasion oraz dławienia masy nasiennej w prasie ślimakowej na parametry procesu tłoczenia i cechy jakościowe oleju lnianego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, **95** (4), 75-87.
- [13] Mińkowski K., Kalinowski A., Krupska A.: Wpływ płatkowania i niskotemperaturowej hydrotermicznej obróbki płatków na parametry procesu tłoczenia i cechy jakościowe oleju lnianego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, **99** (2), 79-90.
- [14] Niewiadomski H.: *Technologia tłuszczów jadalnych*. WNT, Warszawa 1993.
- [15] PN-EN ISO 660:2010. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby kwasowej i kwasowości.

- [16] PN EN ISO 662:2001. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartość wody i substancji lotnych.
- [17] PN-EN ISO 663:2009. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości zanieczyszczeń nierozpuszczalnych.
- [18] PN-EN ISO 3960:2012. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej. Jodometryczne (wizualne) oznaczanie punktu końcowego.
- [19] PN-EN ISO 6885:2016-04. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby anizydynowej.
- [20] PN-A-86934:1995. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Spektrofotometryczne oznaczanie barwy ogólnej.
- [21] PN-EN 12822:2014-08. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości witaminy E metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Pomiar  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferolu.
- [22] Ranalli A., Gomez T., Delcuratolo D., Contento S.K.: Improving virgine olive oil quality by means of innovative extracting biotechnologies. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 2597-2602.
- [23] Rosenthal A., Pyle D.L., Niranjana K.: Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **19**, 402-420.
- [24] Rotkiewicz D., Konopka I., Tańska M.: Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe olejów roślinnych oraz ich funkcje. *Rośliny Oleiste*, 2002, **23**, 561-579.
- [25] Russin T.A., Boye J.J., Arcand Y., Rajamohamed S.H.: Alternative techniques for defatting soy: A practical review. *Food Bioproc. Technol.*, 2011, **4** (2), 200-223.
- [26] Siger A., Nogala-Kałucka M., Lampart-Szczapa E.: The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J. Food Lipids*, 2008, **15**, 137-149.
- [27] Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.*, 1999, **299**, 152-178.
- [28] Soto C., Chamy R., Zuniga M.E.: Enzymatic hydrolysis and pressing conditions effect on borage oil extraction by cold pressing. *Food Chem.*, 2007, **102**, 834-840.
- [29] Soto C., Concha J., Zuniga M.E.: Antioxidant content of oil and defatted meal obtained from borage seeds by an enzymatic-aided cold pressing process. *Process Biochem.*, 2008, **43**, 696-699.
- [30] Szydłowska-Czerniak A., Karlovits G., Hellner G., Dianoczki H., Szlyk E.: Effect of enzymatic and hydrothermal treatments of rapeseeds on quality of the pressed oils: Part I. Antioxidant capacity and antioxidant content. *Process Biochem.*, 2010, **45**, 7-17.
- [31] Szydłowska-Czerniak A., Karlovits G., Hellner G., Szlyk E.: Effect of enzymatic and hydrothermal treatments of rapeseeds on quality of the pressed oils: Part II. Oil yield and oxidative stability. *Process Biochem.*, 2010, **45**, 247-258.
- [32] Vierhuis E., Servili M., Baldioli M., Schols H.A., Voragen A.G.J., Montedoro G.F.: Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 1218-1223.
- [33] Wiesenborn D., Kangas N., Tostenson K., Hall III C., Chang K.: Sensory and oxidative quality of screw-pressed flaxseed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2005, **82**, 887-892.
- [34] Wilska-Jeszka J.: Monosacharydy i oligosacharydy. W: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. Red. Z.E. Sikorski. WNT, Warszawa 1994, ss. 93-130.
- [35] Wroniak M., Kwiatkowska M., Krygier K.: Charakterystyka wybranych olejów tłoczonych na zimno. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **47** (2), 46-58.
- [36] Yusoff M.M., Gordon M.H., Niranjana K.: Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: A review. *Food Sci. Technol.*, 2015, **41**, 60-82.

## EFFECT OF ENZYMATIC PRE-TREATMENT OF SEEDS ON PRESSING PROCESS PARAMETERS AND QUALITY OF LINSEED OIL

### S u m m a r y

The objective of the study was to determine the effect of enzymatic pre-treatment of seeds with the use of enzymes added on some selected parameters of the pressing process in an expeller press as well as on the quality characteristics of linseed oil.

The initial research material consisted of flaxseeds of the high linolenic 'Bukoz' flax variety (IWNiRZ, Poznań, PL). The seeds, crumbled to form flakes, were enzymatically processed. The flakes with a 20 % of moisture content underwent enzymatic treatment at a temperature of 50 °C for 3 hours and, next, were dried in an air-flow dryer. The oil was pressed using a UNO-SE expeller press manufactured by Farnet (CZ). In the experiment, the cellulase and protease enzymes were used, i.e. Celluclast 1.5 L and Alcalase 2.4 L commercial preparations including their 10:90 and 50:50 mixtures in the doses (% of ddm): 0.125, 0.25, and 0.50.

The enzymatic treatment of flaxseeds prior to cold pressing contributed to the increase in the press capacity as well as in the oil yield and, further, to the decrease in the cake temperature. The highest yield of pressing (79.8 %) was achieved when the 10:90 mixture of cellulase and protease enzymes was applied in the dose of 0.25 % ddm. The enzymatic treatment caused the content of primary and secondary oxidation products and the acid value of oil to slightly increase. Moreover, the process contributed to a slight increase in the content of natural antioxidants in oil: phenolic compounds and tocopherols.

**Key words:** flax seeds, enzymatic treatment, cellulase, protease, cold pressing, flax oil ☒