ŻYWNOŚĆ

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 3 (44) **Kraków 2005** **Rok 12**

SPIS TREŚCI

Od Redakcji 3

MARIUSZ ROSIŃSKI, DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA, JERZY R. WARCHALEWSKI: Przegląd metod separacji i oczyszczania białek przydatnych w badaniach i analizie żywności 5

KONRAD ACHREMOWICZ, KATARZYNA SZARY-SWORST: Wielonienasycone kwasy tłuszczowe czynnikiem poprawy stanu zdrowia człowieka..... 23

JERZY SZPENDOWSKI, JAN KŁOBUKOWSKI, ELŻBIETA PROKOP: Wpływ dodatku chlorku wapnia i ogrzewania mleka na skład chemiczny serów twarogowych..... 36

EWA STASIUK, PIOTR PRZYBYŁOWSKI: Wpływ zmodyfikowanego sposobu stosowania KNO_3 na cechy sensoryczne i mikrobiologiczne serów dojrzewających podpuszczkowych..... 46

DOROTA GUMUL, JAROSŁAW KORUS, BOHDAN ACHREMOWICZ: Parametry procesu ekstruzji a zawartość polisacharydów nieskrobiowych oraz aktywność przeciwutleniająca otrąb żytnich 61

ZBIGNIEW RZEDZICKI, MAŁGORZATA KASPRZAK: Wpływ temperatury obróbki termoplastycznej na wybrane właściwości fizyczne ekstrudatów z udziałem razówki lędźwianowej (*Lathyrus sativus*) 70

BOŻENA BORYCKA: Wiązanie jonów miedzi, cynku i żelaza przez włókno pokarmowe z wytłoków czarnych porzeczek..... 83

MAŁGORZATA PIECYK, MIROSŁAWA KLEPACKA, ELWIRA WOROBIEJ: Zawartość inhibitorów trypsyny, oligosacharydów oraz fosforu fitynowego w preparatach białkowych otrzymanych z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*) metodą krystalizacji i izolacji klasycznej 92

ANDRZEJ TYBURCY, EWELINA TOSZEK, ANETA CEGIEŁKA: Porównanie składu surowcowego i wskaźników chemicznych parówek drobiowych i wieprzowych oferowanych w sprzedaży detalicznej w Warszawie..... 105

JAROSŁAWA RUTKOWSKA, ANNA ŻBIKOWSKA: Możliwości zastosowania margaryn płynnych do produkcji ciast biszkoptowo-tłuszczowych 113

KAMILA MYSZKA, WOJCIECH BIAŁAS, KATARZYNA CZACZYK: Kinetyka tworzenia biofilmów bakteryjnych na materiałach technicznych w zależności od dostępności składników odżywczych..... 127

GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie krajowym..... 138

HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Współczesny leksykon wiedzy o żywności..... 142

STANISŁAW POPEK: Nowe książki..... 144

ANTONI RUTKOWSKI: XIII Światowy Kongres Technologii i Nauki o Żywności..... 148

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 3 (44) **Kraków 2005** **Vol. 12**

CONTENTS

From the Editor 3

MARIUSZ ROSIŃSKI, DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA, JERZY R. WARCHALEWSKI: The review of protein separation and purification methods appearing useful in research and food analysis 5

KONRAD ACHREMOWICZ, KATARZYNA SZARY-SWORST: Polyunsaturated fatty acids as human health improvers 23

JERZY SZPENDOWSKI, JAN KŁOBUKOWSKI, ELŻBIETA PROKOP: The effect of calcium chloride added to milk and milk heating on the chemical composition of cottage cheeses 36

EWA STASIUK, PIOTR PRZYBYŁOWSKI: The impact of a modified method with KNO_3 applied on the sensory and microbiological features of ripening rennet cheeses 46

DOROTA GUMUL, JAROSŁAW KORUS, BOHDAN ACHREMOWICZ: Parameters of the extrusion process and the content of non-starch polysaccharides and the antioxidant activity of rye bran 61

ZBIGNIEW RZEDZICKI, MAŁGORZATA KASPRZAK: The effect of thermoplastic treatment temperature on some selected physical properties of extrudates with everlasting pea whole grain meal added *(Lathyrus sativus)* 70

BOŻENA BORYCKA: Binding of the copper, zinc and iron ions to dietary fibre from black currant pomace 83

MAŁGORZATA PIECYK, MIROSŁAWA KLEPACKA, ELWIRA WOROBIEJ: The content of trypsin inhibitors, oligosccharides, and phytic acid in the bean seed (*Phaseolus vulgaris*) preparations obtained by crystallization and classical isolation 92

ANDRZEJ TYBURCY, EWELINA TOSZEK, ANETA CEGIEŁKA: The comparison between the raw material composition of chemical characteristics of poultry and pork frankfurters offered for retail sales on the Warsaw market 105

JAROSŁAWA RUTKOWSKA, ANNA ŻBIKOWSKA: Possibilities of applying liquid margarines to produce sponge cakes 113

KAMILA MYSZKA, WOJCIECH BIAŁAS, KATARZYNA CZACZYK: The kinetics of bacterial biofilm formation on some technical materials depending on the availability of nutrients 127

GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish legislation 138

HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Food science lexicon – contemporary terms 142

STANISŁAW POPEK: Book reviews 144

ANTONI RUTKOWSKI: The 13th World Congress of Food Technochogy and Science 148

The Food Technologist 149

Only reviewed papers are published

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

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Tadeusz Sikora; tel./fax 012/ 293-50-54
Sekretarz redakcji: dr Ewa Ślawska; tel. 012/ 662-51-61; 657-69-78;
e-mail: ewaslawska@wp.pl
Redaktorzy: prof. dr hab. Bohdan Achremowicz, prof dr hab. Włodzimierz Grajek, prof dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska, prof. dr hab. Bogusław Król, prof. dr hab. Krzysztof Krygier, prof. dr hab. Mieczysław Pałasiński, dr Teresa Woźniakiewicz prof. dr hab. Stefan Ziajka
Stali współpracownicy: prof. dr hab. Teresa Fortuna (Kraków), prof. dr hab. Jacek Kijowski (Poznań), dr Grażyna Morkis (Warszawa), dr hab. inż. Stanisław Popek (Kraków), prof. dr hab. Maria Soral-Śmietana (Olsztyn)

RADA PROGRAMOWA: prof. dr Antoni Rutkowski (*przewodniczący*), dr hab. Kazimierz Dąbrowski (*sekretarz*), prof. dr hab. Barbara Baraniak, prof. dr hab. Nina Baryłko-Pikielna, prof. dr hab. Józefa Chrzanowska, prof. dr hab. Janusz Czapski, prof. dr hab. Zbigniew Czarnecki, prof. dr hab. Mirosław Fik, prof. dr hab. Józef Fornal, prof. dr hab. Roman A. Grzybowski, prof. dr hab. Jan Iciek, prof. dr hab. Edward Kołakowski, prof. dr hab. Henryk Kostyra, prof. dr hab. Andrzej Lenart, prof. dr hab. Paweł M. Pisulewski, prof. dr hab. Piotr Przybyłowski, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz

KONSULTANCI NAUKOWI: prof. dr hab. Zbigniew Duda, prof. dr hab. Jan Kisza, prof. dr hab. Helena Oberman

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

WYDAWCA:
POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI
WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994-1999 wydawcą kwartalnika był Oddział Małopolski PTTŻ

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2005

Printed in Poland

Wydawanie publikacji dofinansowane przez Komitet Badań Naukowych

ISSN 1425-6959
ISBN 83-89541-53-X

ADRES REDAKCJI:
31-425 KRAKÓW, AL. 29 LISTOPADA 46

Nakład: 800 egz.

SKŁAD I DRUK:

Wydawnictwo Naukowe „Akapit", Kraków
tel./fax (012) 280-71-51; www.akapit.kraków.pl
e-mail: wn@akapit.krakow.pl

ISSN 1425-6959
ISBN 83-89541-53-x

Warunki prenumeraty

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

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

Wydawnictwo Naukowe PTTŻ

31-425 Kraków, Al. 29 Listopada 46

Nr konta: Deutsche Bank Oddz. w Krakowie

70 1910 1048 0009 1444 1121 0001

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 5 – 22

MARIUSZ ROSIŃSKI, DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA,
JERZY R. WARCHALEWSKI

PRZEGLĄD METOD SEPARACJI I OCZYSZCZANIA BIAŁEK PRZYDATNYCH W BADANIACH I ANALIZIE ŻYWNOŚCI

S t r e s z c z e n i e

Dokonano przeglądu nowoczesnych metod separacji i oczyszczania białek przydatnych w badaniach i analizie żywności. Proces oczyszczania białek obejmuje cztery główne etapy: wybór źródła białka, ekstrakcję białka z materiału biologicznego, oczyszczanie wyekstrahowanego białka z wykorzystaniem technik chromatografii kolumnowej oraz jego przechowywanie do czasu analizy.

Zawartość białka w materiale biologicznym i jego rozmieszczenie jest jednym z czynników decydujących o wyborze źródła białka. Znaczne ilości białek można uzyskać wykorzystując techniki rekombinacji DNA, które prowadzą do ich zwiększonej ekspresji w komórkach bakteryjnych. W przypadku izolacji białek wewnątrzkomórkowych należy zastosować dodatkowe zabiegi mające na celu rozbicie zarówno tkanek, jak i komórek. Komórki znajdujące się w zawiesinie rozbija się za pomocą szeregu metod. W przypadku białek integralnych, związanych z błoną biologiczną, błona biologiczna zostaje poddana działaniu detergentu anionowego, takiego jak Tryton X-100, który nie denaturuje białka i zapobiega jego inaktywacji.

Przed przystąpieniem do dalszego oczyszczania białek należy określić ich przeznaczenie, wymagany stopień czystości oraz aktywność. W zależności od przeznaczenia produkt finalny może mieć trzy stopnie czystości: bardzo wysoki >99%, wysoki 95-99% oraz umiarkowany <95%.

Techniki chromatograficzne są wykorzystywane do separacji makromolekuł na podstawie takich parametrów, jak: wielkość i kształt, hydrofobowość, ładunek powierzchniowy czy powinowactwo. Pierwszą z tych technik - sączeniem molekularnym zwanym także filtracją żelową - rozdziela się białka na podstawie wielkości i kształtu ich cząsteczek. Separacja białek za pomocą chromatografii jonowymiennej polega na wykorzystaniu różnic w ładunku powierzchniowym cząsteczek białka. W chromatografii oddziaływań hydrofobowych uwzględnia się różnice w hydrofobowości białka, natomiast w chromatografii powinowactwa wykorzystuje się powinowactwo dwóch substancji, np. enzymu i substratu, z których jedna jest unieruchomiona na nośniku.

Dyskutowano także stopień czystości białka jako produktu finalnego w zależności od jego potencjalnego zastosowania.

Słowa kluczowe: źródło białka, wyodrębnianie białek, metody chromatograficzne, przechowywanie białek

---

Mgr inż. M. Rosiński, dr inż. D. Piasecka-Kwiatkowska, prof. dr hab. J. R. Warchalewski,Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań

Wprowadzenie

Żywność stanowi skomplikowaną matrycę związków chemicznych, często labilnych. Dla analityka badanie składników żywności stwarza określone trudności i wymaga zastosowania albo specyficznych metod, albo bardzo dokładnego wyodrębnienia analizowanych związków w stanie możliwie niezmodyfikowanym, w szczególności białek.

Stały postęp w zakresie rozwoju technik i metod separacji oraz oczyszczania białek ma istotny wpływ na wiele dziedzin nauki i przemysłu. Wymagany stopień czystości białka jako produktu końcowego jest różny w zależności od jego potencjalnych zastosowań, np. wysoki stopień czystości jest konieczny w przypadku zastosowań terapeutycznych i badań krystalograficznych, natomiast niższy w przypadku dodatków w przemyśle spożywczym [17].

Oczyszczanie białek jest procesem, w którym wyróżnia się następujące etapy: wybór źródła białka, izolowanie i ekstrakcja białka z wybranego materiału biologicznego, oczyszczanie wyizolowanych białek na drodze chromatografii kolumnowych, przechowywanie oczyszczonego białka.

Wybór źródła białka

Po ustaleniu białka docelowego dokonuje się wyboru źródła białka. Materiałem wyjściowym mogą być tkanki roślinne, zwierzęce, drożdże oraz bakterie. O wyborze materiału biologicznego decyduje zarówno rozmieszczenie białka, jak i jego zawartość w surowcu.

Białka występujące w materiale biologicznym można podzielić na trzy grupy, w zależności od umiejscowienia:

- białka rozpuszczalne, obecne w płynach ustrojowych;
- białka występujące wewnątrz komórki:
  - w cytozolu;
  - w organellach komórkowych;
- białka nierozpuszczalne lub połączone z częściami stałymi komórki:
  - białka błonowe;
  - białka strukturalne.

Znaczne ilości białek można uzyskać stosując techniki rekombinacji DNA, które prowadzą do ich zwiększonej ekspresji w komórkach bakteryjnych czy eukariotycznych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku białek rzadko występujących lub występujących w małych ilościach.

Izolowanie i ekstrakcja białka z wybranego materiału biologicznego

Kolejnym etapem, po ustaleniu odpowiedniego źródła, jest uwolnienie oczyszczanego białka do roztworu. Ma to istotne znaczenie w przypadku białek występujących np. w organellach komórkowych czy związanych z błonami

biologicznymi. W przypadku izolacji tych białek należy zastosować dodatkowe zabiegi mające na celu rozbicie zarówno tkanek, jak i komórek. Komórki znajdujące się w zawiesinie rozbija się za pomocą szeregu metod (tab.1).

Tabela 1

Metody uwalniania białek z materiału biologicznego do roztworu
Methods of extracting proteins from biological material and introducing them into a solution

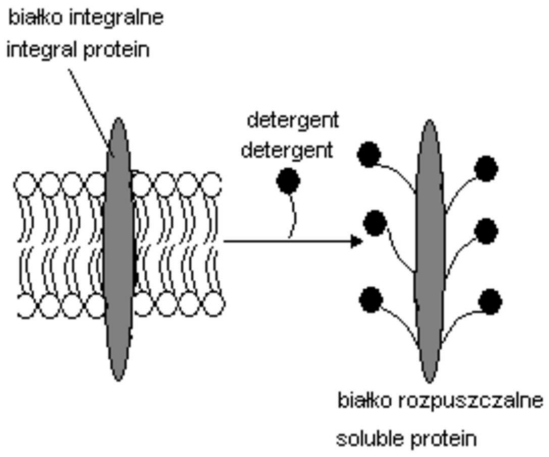
Metody uwalniania białek Methods of extracting and introducing proteins	Źródło białka Source of protein
Łagodna Gentle method	
Liza komórki (szok osmotyczny) Cell lysis (osmotic shock)	Erytrocyty, *E.coli*, okołoplazmowe: białka wewnątrzkomórkowe Erythrocytes, *E.coli*, periplasm: intrarcellural proteins
Trawienie enzymatyczne Enzymatic digestion	Bakterie: białka wewnątrzkomórkowe Bacteria: intracellural proteins
Ręczna homogenizacja Manual homogenisation	Tkanka wątroby Liver tissue
Siekanie (mielenie) Mincing (grinding)	Mięśnie Muscles
Umiarkowana Moderate method	
Homogenizator Blade'a Blade's homogeniser	Tkanka mięśniowa, większość tkanek roślinnych i zwierzęcych Muscle tissue, the majority of animal and plant tissues
Mielenie ze ścieraniem, np. piaskiem Grinding using abrasive materials, e.g. sand	Bakterie, tkanki roślinne Bacteria, plant tissues
Energiczna Vigorous method	
Ultradźwięki Ultrasonication	Zawiesina komórek Cell suspension
Homogenizator Manton-Gaulina Manton-Gaulin homogeniser	Zawiesina komórek Cell suspension
Prasa Frencha French press	Bakterie, komórki roślinne Bacteria, plant cells
Precypitacja frakcyjna Fractional precipitation	Lizat komórek, przeciwciała monoklonalne, białka zewnątrzkomórkowe Cells lysate, monoclonal antibodies, extra-cellular proteins

Źródło: / Source: [17]

Spośród metod fizycznych stosuje się najczęściej homogenizację, sonikację (działanie ultradźwięków), bądź też działanie wysokich ciśnień (prasa Frencha). Inną metodą rozbijania komórek jest tzw. „bomba azotowa", wykorzystująca gwałtowną dekompresję zawiesiny komórek nasyconej rozpuszczalnym gazem, najczęściej azotem, pod wysokim ciśnieniem. Z innych metod można wymienić ogrzewanie, działanie zasadami czy detergentami oraz rozpuszczalnikami organicznymi. Inną

prostą metodą rozbicia komórek i uwolnienia zawartości cytoplazmy jest liza osmotyczna, polegająca na rozerwaniu komórek na skutek dyfuzji wody z roztworu izotonicznego do bardziej stężonego – cytozolu, wskutek czego dochodzi do pęcznienia i rozerwania komórki [7].

Dodatkowy etap oczyszczania stosuje się w przypadku białek związanych z błonami (rys 1).



Rys. 1. Mechanizm uwalniania białek błonowych za pomocą detergentów.
Fig. 1. Mechanism of releasing membrane proteins using detergents.

Stanowią one w przybliżeniu 1/3 wszystkich białek zakodowanych w genomie, jednak mniej niż 1% ma poznaną strukturę. Wysoko wydajna krystalografia zwiększa możliwości poznania struktury tych białek. Do celów krystalograficznych niezbędne jest otrzymanie białka o wysokim stopniu czystości [12]. W przypadku białek integralnych, związanych z hydrofobowym rdzeniem, błona biologiczna zostaje poddana działaniu detergentu anionowego, takiego jak Tryton X-100, który nie denaturuje białka i zapobiega jego inaktywacji.

W wyniku działania detergentu dochodzi do uszkodzenia podwójnej warstwy lipidowej i uwolnienia do roztworu integralnych białek błonowych, które zostają okryte warstwą cząsteczek detergentu, co zapobiega agregacji białka. Wybór detergentu jest jednym z czynników mającym wpływ na czystość uzyskanego białka. Istnieje wiele różnych detergentów w codziennym użyciu w biochemii, ale kilka o dopiero co poznawanych właściwościach. Mieszaniny detergentów są szczególnie przydatne, z niedenaturującymi dodatkami, które często odgrywają krytyczną rolę w procesie oczyszczania [12]. Natomiast peryferyjne białka błonowe, które niezwiązane są z rdzeniem hydrofobowym błony biologicznej, można usunąć bez dezintegracji dwuwarstwy lipidowej, przez przemywanie błon roztworem o dużej sile jonowej, np. 1 M NaCl lub o wysokim pH, na skutek zerwania oddziaływań jonowych i wodorowych, przytrzymujących białka peryferyjne na powierzchni błony [2, 5, 7, 8, 13].

Oczyszczanie wyizolowanych białek na drodze chromatografii kolumnowych

Przed przystąpieniem do dalszego oczyszczania białek należy określić ich przeznaczenie, wymagany stopień czystości oraz aktywność. W zależności od przeznaczenia produkt finalny może mieć trzy stopnie czystości: bardzo wysoki >99%, wysoki 95-99% oraz umiarkowany <95% (tab. 2).

O zaakceptowaniu określonego stopnia czystości decyduje również rodzaj zanieczyszczenia, który pozostał w preparacie białkowym. Mogą być tolerowane tylko te, które są nieszkodliwe. Gorzej, jeśli wykazują one aktywność biologiczną i ich obecność może wiązać się z poważnymi problemami zarówno w analityce, jak i zastosowaniach terapeutycznych. Dlatego ważne jest wczesne rozpoznanie rodzaju zanieczyszczeń i stwierdzenie, które muszą być bezwzględnie usunięte, a które mogą pozostać w preparacie na akceptowalnym poziomie. Ważne jest wczesne usunięcie wszelkich czynników powodujących straty białka i obniżenie jego aktywności biologicznej, np. proteazy [17].

Tabela 2

Wymagany stopień czystości preparatu białkowego w zależności od jego przeznaczenia.
A required purity degree of a protein product depending on its application.

Bardzo wysoki > 95% Extremely high degree > 95%	Badania *in vivo*, zastosowania terapeutyczne *In vivo* studies, therapeutic application
Wysoki 95 – 99% High degree 95 – 99%	Krystalografia oraz większość metod fizykochemicznych X-ray crystalography and the majority of physical & chemical characterisation methods
Umiarkowany < 95% Moderate degree < 95%	Antygen do produkcji przeciwciał, sekwencjonowanie białka od N-końca Antigen to produce antibodies, N-terminal sequencing

Źródło: / Source: [17]

W celu właściwego oczyszczania białek obecnych w materiale biologicznym ważna jest znajomość właściwości białka docelowego oraz zanieczyszczeń, które należy usunąć. Dotyczy to zarówno technik separacji, jak i warunków oczyszczania, tak aby straty białka spowodowane jego inaktywacją były możliwie najmniejsze. Warunkiem otrzymania białka o wymaganej aktywności biologicznej i niezmienionej strukturze jest zapewnienie warunków podobnych do naturalnych, jakie występują w materiale biologicznym. Pomimo dużej ostrożności stosowane procedury oczyszczania mogą powodować zmianę warunków środowiskowych, co nierzadko ma negatywny wpływ na stabilność oczyszczanych białek. Znajomość parametrów środowiska krytycznych dla stabilności białka ma istotne znaczenie w zminimalizowaniu zmian podczas doboru buforów do ekstrakcji i przy dalszych etapach oczyszczania. Dotyczy to zwłaszcza takich parametrów, jak: pH, siła jonowa, właściwości redukujące,

obecność kofaktorów czy takich czynników fizycznych, jak czas, temperatura, ciśnienie [17]. Istnieje wiele związków, które mają stabilizujący wpływ na strukturę białka. Związki redukujące, takie jak ditiotreitol (DTT) czy β-merkaptoetanol zapobiegają utlenianiu grup tiolowych, dzięki czemu chronią białko przed zmianami konformacyjnymi czy utratą aktywności enzymatycznej. Kolejnym ważnym czynnikiem mającym wpływ na stabilność białka i jego rozpuszczalność jest pH środowiska. Jeśli pH środowiska jest identyczne z punktem izoelektrycznym białka, wówczas rozpuszczalność białka maleje i łatwo ulega ono agregacji. Jednym z kluczowych parametrów, który należy brać pod uwagę, jest siła jonowa środowiska. Niekorzystne stężenie soli w buforze może prowadzić do agregacji białek. Przy sile jonowej w przedziale od zera do wartości fizjologicznych (0,15–0,2 M) niektóre białka wykazują tendencję do tworzenia precypitatów na skutek niewystarczających ładunków powodujących odpychanie się cząsteczek białka. Natomiast, gdy stężenie soli jest za wysokie, wówczas białka ulegają wysalaniu. Jeśli białko wykazuje stabilność temperaturową, to można wykonywać wszelkie czynności w niższej temperaturze [10]. Ważna jest też wiedza o wrażliwości na działanie enzymów proteolitycznych, co ma wpływ na podjęcie decyzji o usunięciu proteaz lub też dodatku inhibitorów. Równie ważna jest znajomość właściwości mających bezpośredni wpływ na dobór techniki separacji (tab. 3), takich jak: masa cząsteczkowa (sączenie molekularne), ładunek powierzchniowy białka (w celu ustalenia warunków chromatografii jonowymiennej), powinowactwo (wybór ligandu do chromatografii powinowactwa), hydrofobowość (wybór medium do chromatografii hydrofobowej) [10, 17].

Bardzo istotne jest opracowanie metod analitycznych umożliwiających monitoring dobrze przeprowadzonego procesu oczyszczania białka. Dotyczy to zarówno samego białka, jak i metod identyfikacji krytycznych zanieczyszczeń. Ilość białka oznacza się zwykle za pomocą metod Lowry'ego [14] czy Bradforda [3]. W eluacie białko może być mierzone na podstawie pomiaru absorbancji światła o długości fali 280 nm, absorbowanego przez tyrozynę, tryptofan i fenyloalaninę. Z innych metod można wyróżnić: metody immunochemiczne, takie jak ELISA czy immunoblotting [20], metody elektroforetyczne, szczególne przydatne do określania efektywności oczyszczania (SDS-PAGE, NATIVE) czy metody chromatograficzne HPLC [16]. Ponadto, jeśli oczyszczane białko wykazuje aktywność biologiczną, wówczas ta jego właściwość może być wykorzystana do określania stopnia czystości.

Tabela 3

Właściwości białka mające wpływ na dobór parametrów oczyszczania.
Properties of proteins and their effect on the selection of the purification process parameters.

Próba i właściwości białka docelowego Sample and properties of a target protein	Wpływ na strategię oczyszczania Type of the effect on the purification strategy
Stabilność temperaturowa Temperature stability	Możliwość pracy w niższej temperaturze It is possible to work at a lower temperature
Stabilność pH pH stability	Wybór buforów do ekstrakcji i oczyszczania, ustalenie warunków chromatografii jonowymiennej, powinowactwa i odwróconej fazy Selecting buffers for extraction and purification, identifying conditions of the ion exchange, affinity or reversed phase chromatography
Wymagania dotyczące detergentów (zwykle niejonowych) Requirements referring to detergents (usually non-ion detergents)	Wpływ na stabilność białka, izolowanie białek błonowych Effect on the protein stability; separation of cell proteins
Stężenie soli (siła jonowa środowiska) Concentration rate of salts (ion strength)	Ustalenie warunków precypitacji oraz warunków oddziaływań hydrofobowych Identifying precipitation conditions and conditions of the hydrophobic interaction chromatography
Obecność kofaktorów w celu zapewnienia stabilności i aktywności Presence of co-factors to ensure the stability and activity	Wybór dodatków, pH, soli, buforów Selection of additives, pH, salts, and buffers
Wrażliwość na działanie proteaz Protease sensitivity	Usunięcie proteaz lub dodatek inhibitorów Fast removal of proteases or addition of inhibitors
Wrażliwość na jony metali Sensitivity to metal ions	Dodatek związków chelatujących do buforów (EDTA lub EGTA) Addition of EDTA or EGTA to buffers
Wrażliwość na utlenianie Redox sensitivity	Dodatek reduktorów wiązań S-S (2-merkaptoetanol, DTT) Addition of bond reducing agents (2-merkaptoethanol, DTT)
Masa cząsteczkowa Molecular weight	Wybór medium do sączenia molekularnego Selection of gel filtration media
Ładunek powierzchniowy białka Surface charge of the protein	Ustalenie warunków chromatografii jonowymiennej Identifying and determining the ion exchange conditions
Powinowactwo Bio-specific affinity	Wybór ligandu do chromatografii powinowactwa Selecting a ligand for the affinity chromatography
Hydrofobowość Hydrophobicity	Wybór medium do chromatografii oddziaływań hydrofobowych Selecting a medium for the hydrophobic interaction chromatography

Przy podejmowaniu decyzji odnośnie do oczyszczania białka bardzo ważne jest zastosowanie procedury wykorzystującej jak najmniejszą liczbę technik, jednocześnie zapewniającą uzyskanie produktu o wymaganym stopniu czystości i wymaganej aktywności. Wynika to m.in. z ryzyka utraty znacznych ilości białka oraz jego aktywności na poszczególnych etapach oczyszczania, a także istnieje możliwość znacznego wydłużenia czasu i tym samym zwiększenie kosztów finalnych całego procesu oczyszczania. Przykładowo, jeśli próba ma niską siłę jonową środowiska, wówczas w pierwszym etapie może być oczyszczana przy zastosowaniu IEX (tab. 4).

Tabela 4

Porównanie warunków początkowych i końcowych stosowanych technik chromatograficznych.
Comparison of the starting and closing conditions for the chromatographic techniques applied.

Technika Technique	Warunki początkowe Starting conditions	Warunki końcowe Closing conditions
Chromatografia jonowymienna (IEX) Ion exchange chromatography	Niskie stężenie soli, objętość próby nielimitowana Low ionic strength, sample volume not limited	Wysokie stężenie soli lub zmiana pH, próba zagęszczona High ionic strength or pH change, concentrated sample
Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC) Hydrophobic interaction chromatography	Wysokie stężenie soli, objętość próby nielimitowana High ionic strength, sample volume not limited	Niskie stężenie soli, próba zagęszczona, Low ionic strength, concentrated sample
Chromatografia powinowactwa (AC) Affinity chromatography	Warunki charakterystyczne wiązania do ligandu, objętość próby nielimitowana Specific binding conditions, sample volume not limited	Warunki charakterystyczne dla elucji, próba zagęszczona Specific elution conditions, concentrated sample
Sączenie molekularne (GF) Gel filtration	Ograniczona objętość próby <5% całkowitej objętości kolumny Limited sample volume <5% total column volume)	Wymiana buforu, próba rozcieńczona Buffer exchange; diluted sample

Źródło: / Source: [17]

Po elucji z kolumny IEX próba znajduje się zwykle w buforze o wysokiej sile jonowej i w następnym etapie może być oczyszczana na kolumnie HIC (w razie potrzeby można ustalić pH oraz dodać soli). I odwrotnie, jeśli próba jest eluowana z kolumny HIC, wówczas ma wysokie stężenie soli i niekiedy należy ją rozcieńczyć lub wymienić bufor do poziomu umożliwiającego zastosowanie IEX [17]. Kolejny przykład, precypitacja siarczanem amonu stanowi często pierwszy etap klarowania i zagęszczania białka i w tej sytuacji HIC, która przebiega w warunkach wysokiego stężenia soli niezbędnego do związania białek w matrycy kolumny, stanowi idealną technikę w pierwszym etapie oczyszczania. Stężenie soli oraz objętość końcowa próby zostanie znacznie zmniejszona po elucji z kolumny HIC. Rozcieńczanie frakcji lub szybka wymiana buforu, z zastosowaniem kolumienek do odsalania Sephadex G-25, przygotowuje próby do etapu oczyszczania na IEX lub AC. Z kolei technika sączenia molekularnego jest szczególnie przydatna po technikach zagęszczających (IEX, HIC, AC), z uwagi na ograniczenia objętości nanoszonych prób [17].

Bardzo często frakcjonowanie białek przeprowadza się stosując związki chemiczne powodujące precypitację (tab. 5).

Tabela 5

Przykłady stosowania związków chemicznych do precypitacji białek.
Examples of chemical compounds used in the protein precipitation process.

Związek precypitujący Precipitation agent	Rodzaj próby Sample type	Komentarz Comment
Siarczan amonu Ammonium sulphate	>1mg białka/ml, szczególnie immunoglobuliny >1mg /ml proteins, especially immunoglobulins	Stabilizuje białka, nie denaturuje, supernatant bezpośrenio kierowany na HIC Stabilizes proteins; no denaturation, supernatant can go directly to HIC
Glikol polietylenowy Polyethylene glycol	Białka plazmy Plasma proteins	Nie denaturuje białka, supernatant bezpośrednio kierowany do IEX lub AC. No protein denaturation; supernatant goes directly to IEX or to AC
Aceton Acetone	Precypitacja peptydów lub zagęszczanie białek do elektroforezy Useful in the peptide precipitation or while concentrating proteins for the electrophoresis process	Może denaturować białka nieodwracalnie Can irreversibly denature protein

Źródło:/Source: [17]

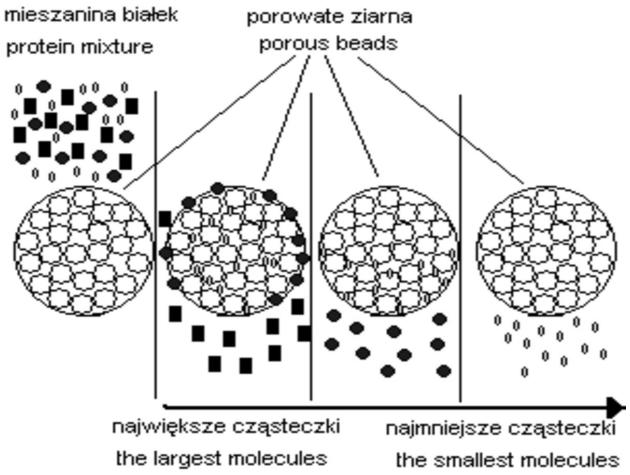
Najczęściej stosuje się siarczan amonu, którego zaletą jest to, że zachowuje natywną strukturę białka. W technice tej wykorzystuje się fakt, że w obecności dużego stężenia soli rozpuszczalność większości białek maleje. Przy odpowiednio dużym stężeniu soli białko wypada z roztworu, czyli ulega precypitacji. Wielkość obszarów hydrofobowych w strukturach wysalanych białek wpływa bezpośrednio na zastosowanie niezbędnego stężenia soli. Białka o większych obszarach hydrofobowych ulegają wysalaniu szybciej niż te o mniejszych obszarach hydrofobowych. Stąd też jest możliwe zastosowanie tej procedury do frakcjonowania mieszaniny białek. Wysalanie stosuje się również w późniejszych etapach procesu oczyszczania, aby zagęścić rozcieńczony roztwór białka, ponieważ białko po precypitacji może zostać ponownie rozpuszczone w mniejszej objętości buforu [17].

Techniki chromatograficzne są wykorzystywane do separacji makromolekuł na podstawie takich parametrów, jak: wielkość i kształt, hydrofobowość, ładunek powierzchniowy czy powinowactwo [1].

Sączenie molekularne

Stosując sączenie molekularne, zwane także filtracją żelową, rozdziela się białka na podstawie wielkości i kształtu ich cząsteczek. W technice tej mała objętość próby, stanowiąca < 5% objętości kolumny, jest nanoszona na szczyt kolumny, której wypełnienie stanowią porowate ziarna nierozpuszczalnego polimeru, takiego jak poliakryloamid. Ponadto stosuje się ziarna, których podstawowym składnikiem jest

dekstran (Sephadex). Do syntezy ziaren żelu Sephadex stosuje się dekstran o średniej masie cząsteczkowej 30–50·10^3 Da. Otrzymane ziarna mają zdolność wiązania wody w granicach 25 ml/ml. Żele serii G stosowane są do rozdziału substancji w środowisku wodnym i glicerolowym, natomiast w środowiskach polarnych stosuje się Sephadex LH-20. Innym związkiem do produkcji ziaren jest agaroza, a otrzymany związek – Sepharose – jest przeznaczony do rozdzielania cząstek o masie powyżej 100·10^4 Da [11]. Podczas rozdziału małe cząsteczki, takie jak jony, dyfundują w głąb żelu i poruszają się wolniej w kolumnie, natomiast cząsteczki większe lub o wydłużonym kształcie wypływają z kolumny jako pierwsze (rys. 2).



Rys. 2. Mechanizm separacji cząsteczek na podstawie wielkości i kształtu przy zastosowaniu sączenia molekularnego.

Fig. 2. Mechanism of separating molecules by their sizes and shapes in a gel filtration process.

W przeciwieństwie do pozostałych technik chromatograficznych cząsteczki nie wiążą się z wypełniaczem kolumny, dlatego skład buforu nie ma wpływu na rozdział. Zaletą tej metody jest także fakt, że warunki rozdziału mogą być dostosowane do rodzaju próby, a także warunków wymaganych w kolejnych etapach oczyszczania, analizy czy przechowywania.

Technika ta szczególnie nadaje się do oczyszczania białek wrażliwych na zmiany pH czy występowanie jonów metali. Sam rozdział może być prowadzony w obecności niezbędnych jonów, kofaktorów, detergentów, mocznika, przy wysokiej lub niskiej sile jonowej, a oczyszczone białka mogą znajdować się w dowolnym buforze [6].

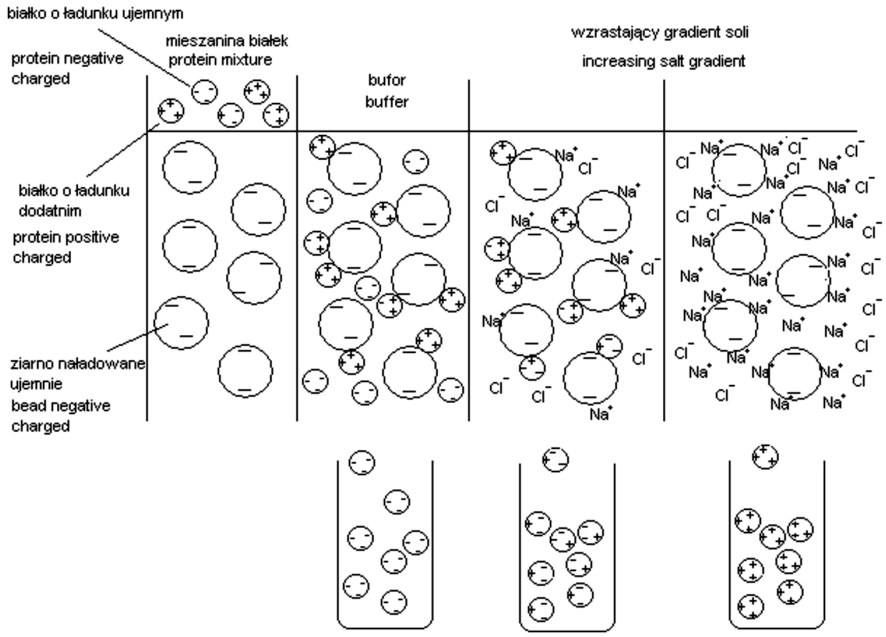
Chromatografia jonowymienna

W chromatografii jonowymiennej rozdział białek uzależniony jest od ich powierzchniowego ładunku i polega na odwracalnej wymianie jonowej ze znajdującymi się w roztworze, obdarzonymi ładunkiem przeciwnym, unieruchomionymi jonami wymieniacza jonowego. Pierwszym etapem jest kalibracja,

podczas której wymieniacz jonowy jest doprowadzany do warunków początkowych, dotyczy to pH oraz siły jonowej środowiska, które zapewniają wymianę jonową pożądanych cząsteczek z buforem inicjującym. Na tym etapie grupy wymieniacza są związane z przeciwjonami buforu startowego (zwykle Cl^- lub Na^+). W drugim etapie następuje naniesienie próby na kolumnę oraz adsorpcja znajdujących się w roztworze cząsteczek o ładunku przeciwnym do ładunku grup wymieniacza. Obdarzone ładunkiem cząsteczki białka wypierają związane z wymieniaczem przeciwjony i wiążą się z nim odwracalnie. Niezwiązane substancje mogą być wymyte z kolumny za pomocą buforu startowego. Następnie, związane białka są usuwane z kolumny na drodze wymiany jonowej z buforem wymywającym. Osiąga się to zwykle przez zwiększenie siły jonowej (wzrost stężenia soli) buforu eluującego lub przez zmianę jego pH. W przypadku zwiększania stężenia soli desorpcja następuje wraz ze zwiększaniem gradientu soli, a związane cząsteczki są uwalniane z kolumny w zależności od siły wiązania z wymieniaczem (rys. 3).

Najsłabiej związane substancje są eluowane jako pierwsze. Oprócz elucji gradientem NaCl, białka można wymywać zmieniając pH buforu, co powoduje zmianę stanu jonizacji bocznych reszt aminokwasów, a co za tym idzie ładunku białka. Po zakończonym rozdziale kolumnę regeneruje się w celu usunięcia z niej substancji niewymytych, na drodze elucji buforem o wysokiej sile jonowej, a następnie przeprowadza się kalibrację do warunków początkowych [17].

Do rozdziału białek obdarzonych ładunkiem ujemnym stosuje się kolumny zawierające dodatnio naładowane grupy dietyloaminoetylowe (DEAE), takie jak DEAE-celuloza lub DEAE-Sephadex. Jest to typ chromatografii anionowymiennej. Natomiast do rozdziału białek o ładunku dodatnim stosuje się kolumny zawierające wypełnienie obdarzone ładunkiem ujemnym grup karboksymetylowych (CM), np. CM-celuloza lub CM-Sephadex. Jest to typ chromatografii kationowymiennej [7, 9, 11].

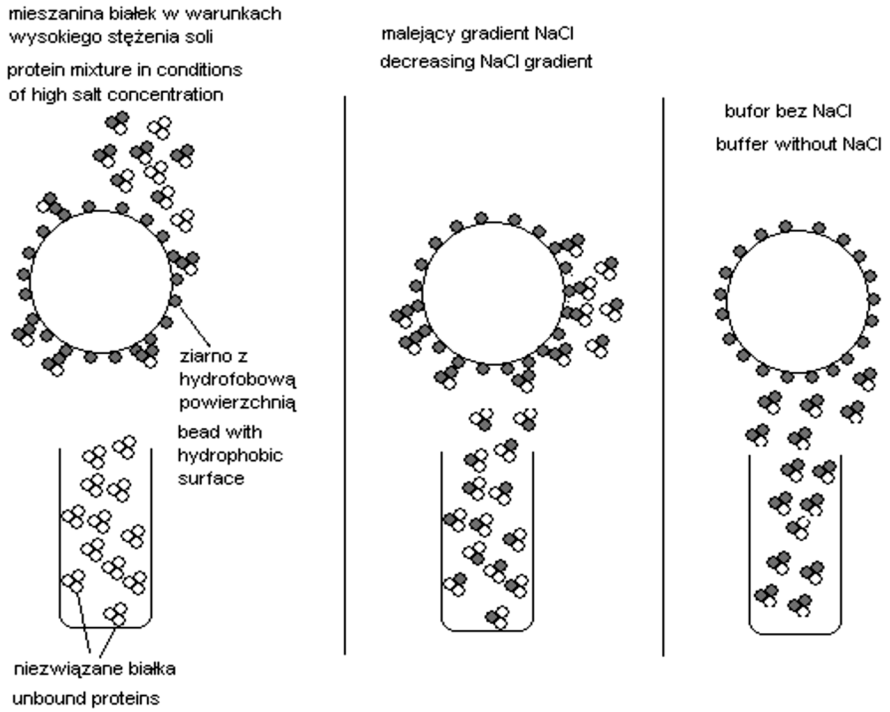


Rys. 3. Przykład rozdziału białek za pomocą techniki chromatografii jonowymiennej w gradiencie soli.
Fig. 3. Example of separating proteins with the use of ion exchange chromatography in a salt gradient.

Chromatografia oddziaływań hydrofobowych

Ważną techniką oczyszczania białek, wykorzystującą ich hydrofobową naturę, często stosowaną w połączeniu z chromatografią jonowymienną oraz sączeniem molekularnym, jest chromatografia oddziaływań hydrofobowych.

Technika chromatografii oddziaływań hydrofobowych rozdziela białka na podstawie różnic w sile oddziaływania obszarów hydrofobowych białka z jeszcze bardziej hydrofobowymi grupami ligandów, umocowanymi na powierzchni nośnika pozbawionego ładunku elektrycznego. Wiązanie białka do nośnika hydrofobowego jest osiągane przez stosowanie buforów o wysokiej sile jonowej środowiska, np. 1,5 M roztwór siarczanu amonu, a uwalnianie białek następuje przez ich wymywanie buforem o zmniejszającym się gradiencie soli [2, 12, 17, 19]. Mechanizm oczyszczania białek za pomocą techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych przedstawiono na rys. 4. Inny sposób elucji polega na zwiększeniu pH buforu czy dodatku komponentów wykazujących silne powinowactwo do ligandu lub zwiększające hydrofilność białek, np. alkohole i aminy alifatyczne lub detergenty niejonowe.

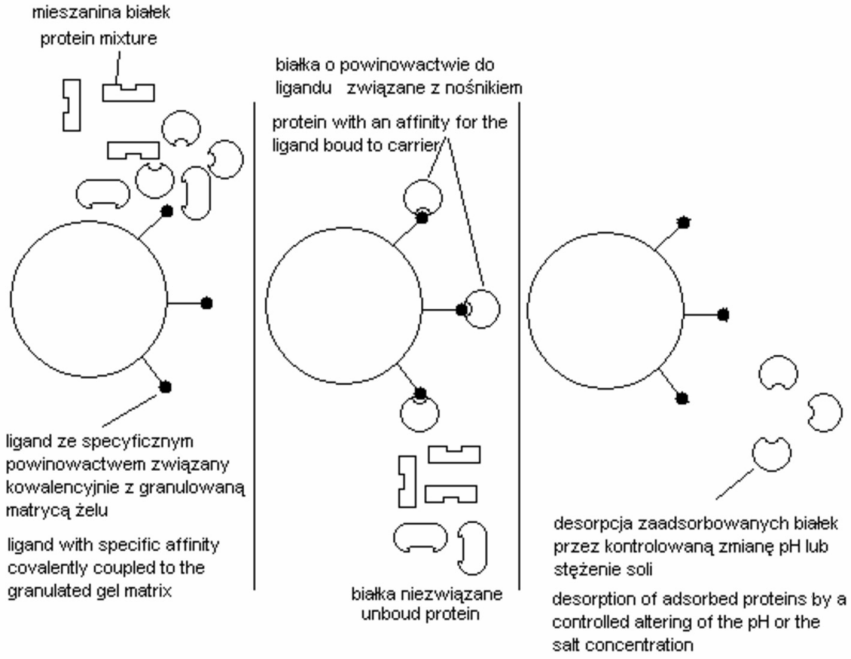


Rys. 4. Oczyszczanie białek za pomocą techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych.
Fig. 4. The protein purification process with the use of hydrophobic interaction chromatography.

Chromatografia powinowactwa

Techniką rozdziału wykorzystującą wzajemne powinowactwo dwóch substancji jest chromatografia powinowactwa. Umożliwia ona rozdział białek na podstawie odwracalnej reakcji dwóch wykazujących specyficzne powinowactwo substancji, z których jedna – ligand związana jest ze stałym nośnikiem. Dzięki tej technice można oczyszczać następujące substancje: enzym-substrat, enzym-inhibitor, przeciwciało-antygen, hormon-receptor, kwasy nukleinowe-białka [1, 4, 11, 15, 21]. Na rys. 5 przedstawiono schemat oczyszczania białek techniką chromatografii powinowactwa.

W chromatografii powinowactwa wyróżnia się następujące etapy: kalibracja, adsorpcja białka i elucja niezwiązanego materiału, zakończenie wymywania niezwiązanego materiału, elucja związanych białek, zakończenie wymywania związanych białek, kalibracja kolumny.



Rys. 5. Oczyszczanie białek za pomocą techniki chromatografii powinowactwa.
Fig.5. Protein purification with using affinity chromatography.

Jedną z najskuteczniejszych technik oczyszczania białek jest chromatografia immunopowinowactwa, wykorzystująca unieruchomione przeciwciała. Wysokie powinowactwo przeciwciała do antygenu może być wykorzystane do wysoce selektywnej adsorpcji białek. W chromatografii immunopowinowactwa zastosowanie mają dwa rodzaje przeciwciał: przeciwciała poliklonalne i przeciwciała monoklonalne. Przeciwciała poliklonalne, otrzymane w wyniku immunizacji zwierzęcia, są mieszaniną przeciwciał o różnej specyficzności, wiążących różne epitopy antygenu [21]. Przeciwciała te są relatywnie łatwe do otrzymania, jednak mają także kilka wad. Ze względu na duże zróżnicowanie przeciwciał pod względem specyficzności istnieje niebezpieczeństwo wystąpienia reakcji krzyżowej, czyli wiązania białek mających identyczny lub zbliżony strukturalnie epitop, co w konsekwencji uniemożliwiłoby skuteczne oczyszczanie danego białka. Ponadto, produkcja przeciwciał poliklonalnych nie jest powtarzalna ze względu na cechy osobnicze immunizowanych zwierząt tego samego gatunku, co wiąże się z dodatkowymi etapami usuwania niepożądanych przeciwciał. Poza tym trudno jest uzyskać odpowiednią ilość krwi – w zależności od gatunku zwierzęcia od kilku do kilkudziesięciu cm^3. Natomiast przeciwciała monoklonalne, mimo że ich otrzymanie jest znacznie droższe i bardziej złożone, mają wiele zalet, dzięki którym doskonale nadają się do oczyszczania białek. Po pierwsze, do ich produkcji nie potrzeba antygenu o wysokim stopniu czystości. Poza tym mogą być

otrzymywane potencjalnie w nieograniczonej ilości oraz, co jest bardzo istotne, dzięki identycznej specyficzności, tj. wiązaniu tego samego epitopu z identyczną siłą, zapewniają powtarzalność procesu oczyszczania, dotyczącą zwłaszcza warunków wiązania i elucji białek [4].

Ze względu na siłę oddziaływania między antygenem i przeciwciałem dość trudno jest wymyć antygen z kolumny immunopowinowactwa. Jednak można tego dokonać na kilka sposobów, np.: zastosowanie skrajnych wartości pH (3 lub 10), użycie związków denaturujących (8 M mocznik lub 6 M chlorowodorek guanidyny) lub związków chaotropowych (3 M KSCN). Aczkolwiek należy liczyć się z tym, że elucja w tych warunkach prowadzi bardzo często do zmian strukturalnych białka, co jest niepożądane, zwłaszcza w przypadku białek wykazujących aktywność biologiczną, np. enzymów [4].

Przechowywanie oczyszczonego białka

Warunki w jakich przechowuje się białko mają istotny wpływ na zachowanie jego niezmienionej struktury oraz aktywności biologicznej przez cały okres przechowywania. Okres ten może wynosić od kilku dni do ponad roku w zależności od natury białka oraz warunków przechowywania. Czynnikami, które mają największy wpływ na stabilność białka podczas przechowywania są: temperatura, czas przechowywania, czystość preparatu. Porównanie warunków przechowywania przedstawiono w tab. 6.

Tabela 6

Porównanie warunków przechowywania białek.
Comparison of the protein storage conditions.

Warunki przechowywania Storage conditions	Roztwór w temp. 4°C Solution at 4°C	25-50% glicerol lub glikol etylenowy w temp. -20°C 25-50% glycerol or ethylene glycol at -20°C	Zamrożone w temp. od -20°C do –80°C lub w ciekłym azocie Frozen at -20°C to -80°C or in liquid nitrogen	Liofilizowane (zwykle zamrożone) Lyophilised (usually frozen)
Czas przechowywania Storage period	1 miesiąc 1 month	1 rok 1 year	Kilka lat Several years	Kilka lat Several years
Wymagania dotyczące sterylności lub dodatku substancji anytbakteryjnych Requirements with regard to sterile conditions or antibacterial agents added	Tak Yes	Zwykle tak Usually yes	Nie No	Nie No
Rozmrażanie próby Defrosting of the sample	Wiele razy Many times	Wiele razy Many times	Jeden raz Once	Jeden raz Once

Źródło: / Source: [18]

Białka do czasu wykonania analiz powinny być przechowywane w temperaturze poniżej 4°C w czystych, autoklawowanych szklanych pojemnikach lub probówkach polipropylenowych. Przechowywanie w temperaturze pokojowej prowadzi bardzo często do degradacji i obniżenia aktywności biologicznej białka, głównie na skutek obecności drobnoustrojów. Natomiast w temp. 4°C białka można przechowywać od jednego dnia do kilku tygodni. Obniżenie temp. do przedziału od -20°C do -80°C wydłuża okres przechowywania białka nawet do kilku lat. W tym przypadku należy unikać rozmrażania i ponownego zamrażania preparatu, ponieważ prowadzi to do obniżenia stabilności białka, a w rezultacie do obniżenia jego aktywności. Dlatego preparat białka przeznaczony do zamrożenia należy przechowywać w małych porcjach, które nie będą ponownie zamrażane [18].

Na stabilność białka wpływa również stężenie białka w preparacie. Białko o stężeniu poniżej 1 mg/ml jest bardziej podatne na inaktywację i straty ze względu na niski poziom wiązania do ścianek naczynia, w którym jest przechowywane [18]. Dlatego najlepszym sposobem jest przechowywanie białka w bardziej skoncentrowanej formie albo dodanie białka stabilizującego, takiego jak oczyszczona albumina serum krwi bydlęcej (BSA) do końcowego stężenia 10–15 mg/ml, co pozwoli ochronić przechowywane białko przed stratami.

Wiele składników może mieć wpływ na okres przechowywania białka [18], np.:

- substancje krioochronne, takie jak glicerol lub glikol etylenowy w stężeniu 25–50%, pomagają stabilizować białko przez zapobieganie tworzeniu się kryształów lodu, który niszczy strukturę białka przechowywanego w temp. -20°C i niższej;
- inhibitory proteaz, które zapobiegają degradacji proteolitycznej białka;
- substancje antybakteryjne, takie jak azydek sodu (NaN_3) w stężeniu 0,02-0,05% hamują wzrost mikroorganizmów;
- związki chelatujące w stężeniu 1–5 mM zapobiegają utlenianiu grup –SH indukowanemu przez metale;
- związki redukujące, takie jak DTT, czy 2-merkaptoetanol w stężeniu 1–5 mM zapobiegają utlenianiu cysteiny, stabilizując tym samym strukturę przestrzenną białka.

Podsumowanie

Wyizolowanie białka z zachowaniem jego aktywności biologicznej i struktury natywnej jest zadaniem trudnym, wynikającym z konieczności zapewnienia warunków zbliżonych do naturalnych podczas samego procesu oczyszczania i przechowywania. Ograniczenie, tam gdzie to jest możliwe, liczby etapów oczyszczania sprzyja zmniejszeniu strat oczyszczanego białka. Dlatego też stosowane metody powinny być starannie dobrane i na tyle łagodne, aby zminimalizować degradację cząsteczek białka, a ponadto powinny charakteryzować się bardzo wysoką specyficznością rozdzielczą białek występujących w materiale biologicznym, co pozwala na wysoki stopień ich

oczyszczenia. Ma to duże znaczenie zarówno w badaniach, jak i w analityce żywności, a także w poznaniu ich właściwości funkcjonalnych, szczególnie w przypadku białek stosowanych jako dodatki do żywności.

Literatura

[1] Affinity Chromatography Handbook. www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/affinity.pdf.

[2] Bowie J.U.: Stabilizing membrane proteins. Curr. Opin. Struc. Biol., 2001, **11**, 397-402.

[3] Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Bioch., 1976, **72**, 248-254.

[4] Burgess R.R., Thompson N.E.: Advances in gentle immunoaffinity chromatography. Curr. Opin. Biotech., 2002, **13**, 304-308.

[5] Eriks L.R., Mayor J.A., Kaplan R.S.: A strategy for identification and quantification of detergents frequently used in the purification of membrane proteins. Anal. Bioch., 2003, **323,** 234-241.

[6] Gel Filtration Handbook. home.postech.ac.kr/~smw1905/source/gel%20filtration.pdf.

[7] Hames B.D., Hooper N.M., Houghton J.D.: Krótkie wykłady. Biochemia. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1999.

[8] Ichimura T., Ikuta N., Uda Y., Horigome T., Omata S.: Separation of membrane proteins solubilized with a non-denaturing detergent and a high salt concentration by hydroxyapatite high-performance liquid chromatography. Anal. Bioch. 1995, **224**, 250-255.

[9] Ion Exchange Chromatography Handbook. www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/ion_exchange.pdf

[10] Kaufmann M.: Unstable proteins: how to subject them to chromatographic separations for purification procedures. J. Chrom. B., 1997, **699** 347-369.

[11] Kłyszejko-Stefanowicz L. (red.): Ćwiczenia z biochemii. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1999.

[12] Lienqueo M.E., Mahn A., Vasquez L., Asenjo J.A.: Methodology for predicting the separation of proteins by hydrophobic interaction chromatography and its application to a cell extract. J. Chrom. A., 2003, **1009** 189-196.

[13] Loll P.J.: Membrane protein structural biology: the high troughput challenge. J. Struc. Biol., 2003, **142** 144-153.

[14] Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall J.R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. Biol.Chem.1951, **193**, 265-275.

[15] Muronetz V.I., Sholukh M., Korpela T: Use of protein – protein interactions in affinity chromatography. J. Biochem. Biophys. Methods, 2001, **49** 29-47.

[16] Pospiech E., Peltre G., Wąsowicz E., Jeleń H., Greaser M.L., Mikołajczak B., Bresińska A., Gorączka A.: Metody separacji i ocena rozdziałów: elektroforeza, wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa, spektroskopia masowa. W: Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii – pod red. M. Jankiewicza i Z. Kędziora. Wyd. AR. Poznań 2003, s. 155-193.

[17] Protein Purification Handbook. www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/handbook.pdf

[18] Protein stability and storage. Technical resource. TR0043.0 www.piercenet.com/files/TR0043dh4

[19] Queiroz J.A., Tomaz C.T., Cabral J.M.S.: Hydrophobic interaction chromatography of proteins. J. Biotech. 2001, **87** 143-169.

[20] Warchalewski J.R., Kałużewska M., Piasecka-Kwiatkowska, Daussant J., Bielecki S., Wyatt G.M., Gruchała L.: Metody immunoanaliz i ich zastosowanie w przemyśle spożywczym. W: Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii – pod red. M. Jankiewicza i Z. Kędziora. Wyd. AR Poznań 2003, s. 17-154.

[21] Wilchek M., Miron T.: Thirty years of affinity chromatography. Reac. Func. Polym., 1999, **41** 263-268.

THE REVIEW OF PROTEIN SEPARATION AND PURIFICATION METHODS APPEARING USEFUL IN RESEARCH AND FOOD ANALYSIS

S u m m a r y

In this paper, some up-to-date methods of protein separation and purification appearing useful in research and food analysis were reviewed. The protein purification process includes four major phases: selecting a source of protein, isolating and extracting protein from the biological material, purifying the extracted protein using a column chromatography technique, and, finally, storing the protein obtained until it is taken for further analysis.

The content of protein in a biological material and its distribution is one of the factors determining the protein source to be selected. It is possible to win considerable amounts of proteins by employing a DNA recombination technique leading to their increased expression in bacterial cells. When isolating intracellular proteins, it is necessary to utilize additional measures in order to destroy both the tissues and the cells. The cells present in a suspension are destroyed using several methods. With regard to integral protein bound to a biological membrane, an anionic detergent, for example Tryton X-100, is applied to such a biological membrane since this anionic detergent does not cause the denaturation of protein, and it prevents inactivation of the proteins.

Prior to starting the purification process of proteins, it is necessary to determine the application of the final proteins to be obtained, the required degree of their purity, and their activity. Depending on its applications, the final protein product can have three degrees of purity: very high > 99%, high, ranging between 95 and 99%, and moderate < 95%.

Chromatographic techniques are employed to separate macromolecules on the basis of such parameters like: size and shape, hydrophobicity, surface net charge, or affinity. The first of those techniques is molecular sieving chromatography, also known as a gel filtration. If this technique is applied, macromolecules are separated according to their sizes and shapes. The other technique is ion exchange chromatography and with it, proteins are separated according to differences in the surface net charge of protein macromolecules. While applying the hydrophobic interaction chromatography, the separation of proteins is based on differences in the protein hydrophobicity, whereas the affinity chromatography utilizes the affinity of two substances, for example an enzyme and a substrate, and one of these two substances is carrier-bound, thus, immobilized.

In the paper, the purity degree of protein as a final product was discussed with regard to the potential application of such a protein product.

Key words: source protein, protein isolation, chromatographic methods, storage of proteins

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 23 -35

KONRAD ACHREMOWICZ, KATARZYNA SZARY-SWORST

WIELONIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE CZYNNIKIEM POPRAWY STANU ZDROWIA CZŁOWIEKA

S t r e s z c z e n i e

Tłuszcze są podstawowym, wysokoenergetycznym składnikiem żywności. Uważa się, że wysoki poziom spożycia tłuszczu, jak i niewłaściwy jego skład mogą powodować zagrożenia chorobami cywilizacyjnymi jak: otyłość, zaburzenia układu krążenia, nowotwory jelita grubego i piersi, a także osłabienie układu odpornościowego. Szczególne znaczenie ma skład kwasów tłuszczowych diety, a zwłaszcza proporcja kwasów nasyconych do jedno- i wielonienasyconych. Tłuszcze są również ważnym składnikiem strukturalnym błon komórkowych (fosfolipidy, cholesterol). Wielonienasycone niezbędne kwasy tłuszczowe (WNNKT) szeregu n-3 i n-6 nie mogą być syntetyzowane przez człowieka i muszą być dostarczane w diecie. Podstawowe z nich to kwas α-linolenowy (C 18:3) z rodziny n-3, będący prekursorem kwasu eikozapentaenowego (EPA) i dokozaheksaenowego (DHA) oraz kwas linolowy (C 18:2) n-6, prekursor kwasu arachidonowego (AA). Błony komórkowe ośrodkowego układu nerwowego i siatkówki oka funkcjonują prawidłowo dzięki podwójnej warstwie fosfolipidowej zbudowanej głównie z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Dostarczenie tych kwasów, a zwłaszcza niesyntetyzowanych endogennie, decyduje o rozwoju umysłowym dzieci i prawidłowym funkcjonowaniu dorosłych.

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie izomerami trans i cis nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz sprzężonymi kwasami tłuszczowymi (CLA). Dąży się do wyjaśnienia mechanizmów działania na poziomie molekularnym i genetycznym oraz określenia roli tych kwasów w stymulowaniu stanu zdrowia ludzi. Badania prowadzone ze zwierzętami (zwłaszcza gryzoniami) wykazały, że CLA, a zwłaszcza izomer trans-10 i cis-12 redukowały lub zapobiegały otłuszczeniu, poprawiały oporność insulinową, inhibowały rozwój komórek rakowych i redukowały stany zapalne. Konieczne są dalsze badania, zwłaszcza dotyczące przydatności CLA dla ludzi, jako nutraceutyku, w prewencji i leczeniu chorób cywilizacyjnych.

Słowa kluczowe: kwasy tłuszczowe, choroby cywilizacyjne, profilaktyka, izomery nienasyconych kwasów, tłuszczowych, sprzężone kwasy tłuszczowe

Wprowadzenie

Występowanie chorób cywilizacyjnych, jak zawały serca czy nowotwory, jest obecnie główną przyczyną przedwczesnych zgonów w krajach wysoko rozwiniętych [42]. Wpływa na to wadliwy sposób odżywiania się, siedzący, często pełen stresów

Lek. med. wet. K. Achremowicz - Nutricia Polska, e-mail Konrad.Achremowicz@nutricia.com.pl, mgr inż. K. Szary-Sworst - Katedra Technologii Węglowodanów Akademia Rolnicza, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

tryb życia i ulegania nałogom prowadzącym do wyniszczenia organizmu. Szczególnie niebezpieczna jest otyłość występująca na tle wysokiego spożycia tłuszczu, a zwłaszcza niewłaściwego składu kwasów tłuszczowych w diecie, stanowiąca zagrożenie wystąpienia nadciśnienienia, a także zaburzeń metabolicznych, jak wzrost we krwi poziomu frakcji LDL cholesterolu, glukozy, insuliny czy triacylogliceroli [33].

Użycie tłuszczu w procesach kulinarnych, jak smażenie i pieczenie, powoduje jego niekorzystne przemiany m.in. utlenianie, hydrolizę, polimeryzację, cyklizację. Większość powstałych związków obniża wartość żywieniową produktów, a niektóre stanowią zagrożenie dla zdrowia [48]. W dokumencie „Promocja Zdrowego Serca, Europejski Consensus" Unii Europejskiej sformułowano zalecenie, aby przemysł spożywczy zastępował w produkowanej żywności nasycone kwasy tłuszczowe i izomery trans nienasyconych kwasów tłuszczowych kwasami tłuszczowymi jedno- i wielonienasyconymi [6, 12]. Zalecenia żywieniowe dla populacji Europy postulują ograniczenie spożycia tłuszczów ogółem do poziomu poniżej 30%, nasyconych kwasów tłuszczowych (NKT) poniżej 10% i izomerów trans nasyconych kwasów tłuszczowych poniżej 2% spożytej energii. Natomiast wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) powinny stanowić; n-6 od 2 do 8% energii, a n-3 w ilości 2 g/dzień kwasu α-linolenowego (ALA) i 200 mg/dzień długołańcuchowych kwasów tłuszczowych eikozapentaenowego i dokozaheksaenowego [7]. W celu zapewnienia właściwego przyswajania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ich spożyciu powinna towarzyszyć witamina E jako naturalny przeciwutleniacz. Zalecana ilość to 0,4 mg α–tokoferolu na 1 g WNKT w diecie (1mg alfa tokoferolu = 1j.m. wit. E) [15, 41].

Od 2006 r. w Stanach Zjednoczonych na etykietach olejów spożywczych musi być podana zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych i izomerów trans [29]. Tłuszcze w diecie człowieka stanowią główny materiał energetyczny, co przy wysokiej kaloryczności umożliwia ich wykorzystanie dla poprawy stanu odżywienia. Nadmiar tłuszczu powoduje jednak wystąpienie otyłości i miażdżycy naczyń krwionośnych. Substancje tłuszczowe jak lipidy (cholesterol, fosfolipidy) są również ważnym materiałem strukturalnym wbudowanym w błony komórkowe. Metabolity wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (prostaglandyny, leukotrieny) pełnią istotną rolę w reakcjach fizjologicznych na poziomie komórkowym (krzepnięcie) [50].

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe szeregu n-3 i n-6 nazywane są witaminą F, ponieważ muszą być dostarczane człowiekowi z pożywieniem [26]. Najważniejsze z nich to kwas α-linolenowy (n-3) ALA i kwas linolowy (n-6) LA. Kwas α-linolenowy ma pierwsze podwójne wiązanie przy 3. atomie C, licząc od grupy $-CH_3$, dlatego określany jest jako n-3 (lub omega 3). Kwas linolowy ma pierwsze podwójne wiązanie przy 6. atomie C od metylowego końca. W diecie człowieka powinny one stanowić 1/3 dziennego zapotrzebowania na tłuszcz, przy stosunku n-6 do n-3 jak 5:1 do 3:1 [23, 31]. Organizm człowieka wykorzystuje je głównie do budowy długołańcuchowych

pochodnych. Mają one ponad 18 atomów C w łańcuchu i więcej niż 3 wiązania nienasycone (ang. nazwa LC PUFA-long chain polyunsaturated fatty acids). Błony komórkowe ośrodkowego układu nerwowego (mózg, rdzeń kręgowy) zawierają stosunkowo niewiele kwasów linolowego i α-linolenowego, natomiast przeważają ich długołańcuchowe pochodne. Strukturę błon komórkowych tworzy podwójna warstwa fosfolipidowa z wbudowanymi wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, a ich udział ma decydujący wpływ na funkcje mózgu. Dostarczenie WNKT, a zwłaszcza tych, których organizm nie syntetyzuje, jest istotnym zagadnieniem w żywieniu dzieci i młodzieży, które potrzebują ich do prawidłowego rozwoju umysłowego [20, 21, 27].

Współczesne badania wskazują na pewne zagrożenia związane z nadmierną zawartością NNKT w diecie. Możliwe są ujemne skutki obniżenia naturalnej odporności organizmu na drodze żywieniowej poprzez zwiększenie spożycia kwasów tłuszczowych n-3 przez ludzi zdrowych. Natomiast terapeutyczne wykorzystanie tych kwasów w żywieniu osób cierpiących na schorzenia o podłożu zapalnym jest w pełni uzasadnione [16, 38, 47].

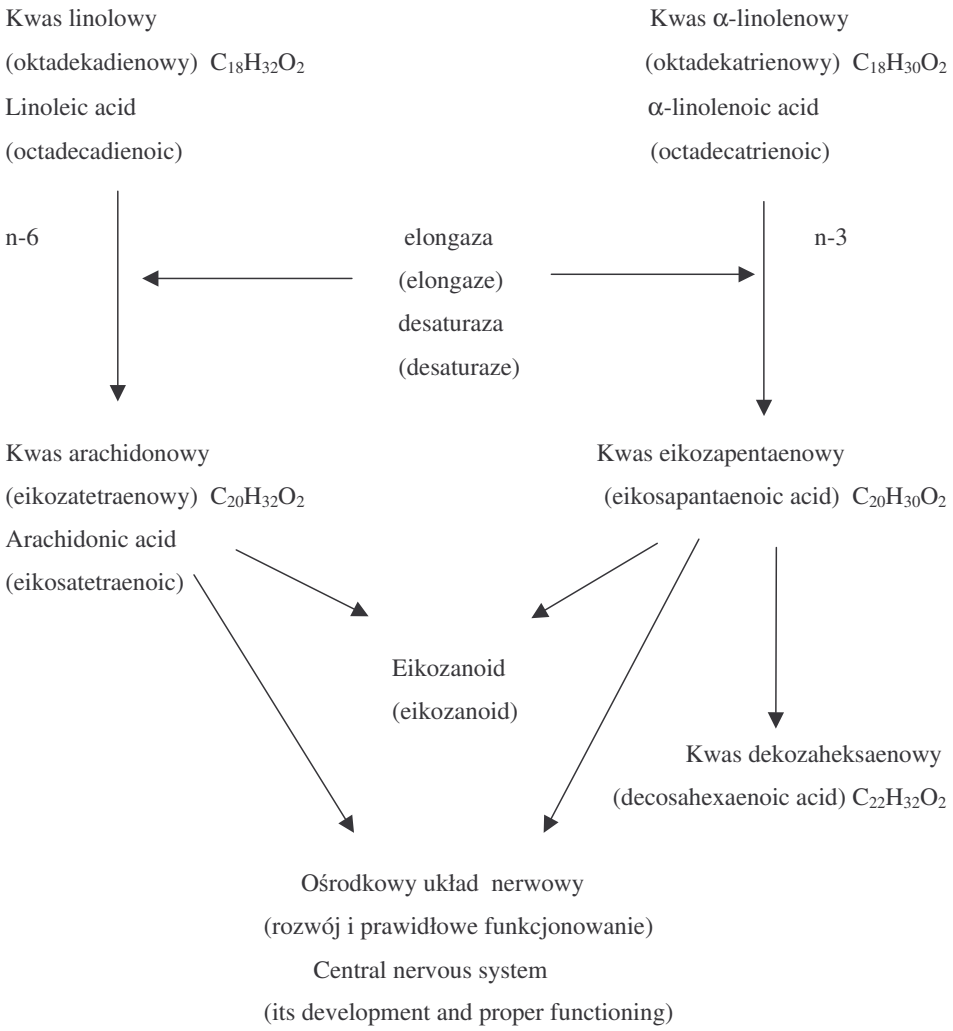
Dieta ma ogromny wpływ na ludzkie zdrowie. Choroby sercowo-naczyniowe są główną przyczyną śmierci w wielu krajach. Są one powodowane długookresowymi zmianami arteriosklerotycznymi. Redukcja spożycia kwasów tłuszczowych nasyconych oraz wzrost wielonienasyconych jest najbardziej skuteczną metodą obniżenia poziomu cholesterolu we krwi. Wiele badań wskazuje, że społeczności spożywające dietę bogatą w wielonienasycone kwasy n-3 charakteryzowały się mniejszą częstotliwością występowania chorób sercowo-naczyniowych (arterioskleroza, choroby naczyń wieńcowych, atherothrombotic endopints), pewnych typów raka i alergii [8]. Nadmierna konsumpcja n-6 kwasów zaburza metabolizm n-3 kwasów i przeszkadza w fizjologicznej równowadze związków, które są syntetyzowane z tych kwasów [32].

Kwasy α-linolenowy, dokozaheksaenowy (DHA) i eikozapentaenowy (EPA) znajdują się w grupie kwasów n-3. Kwas linolowy i arachidonowy należą do grupy kwasów n-6.

Metabolizm kwasów tłuszczowych

Organizm człowieka dysponuje odpowiednimi szlakami metabolicznymi zapewniającymi syntezę długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, których brakuje w diecie. Prekursorami w tych procesach są kwas linolowy i α-linolenowy (rys. 1). Enzymy elongazy wydłużają łańcuchy węglowe, a desaturazy wytwarzają dodatkowe wiązania podwójne, co prowadzi do powstania kwasów tłuszczowych wielonienasyconych o długości łańcuchów liczących minimum 20 atomów C. W tym procesie najważniejszymi pochodnymi są kwas arachidonowy (AA) n-6, powstały z kwasu linolowego, a z kwasu α-linolenowego powstaje kwas

eikozapentaenowy (EPA) będący prekursorem DHA. Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe określa się jako niezbędne w organizmie człowieka, są one konieczne do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania mózgu oraz siatkówki oka [32].



Rys. 1 Metabolizm wielonienasyconych kwasów tłuszczowych prowadzący do syntezy długołańcuchowych pochodnych i ich wpływ na rozwój i funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego [43].

Fig. 1. Metabolism of poly-unsaturated fatty acids resulting in the synthesis of long chain products, and their effect on the development and functioning of the central nervous system [43].

Dostarczenie długołańcuchowych niezbędnych nienasyconych kwasów w diecie dla dzieci i młodzieży jest szczególnie ważnym zagadnieniem związanym z ich prawidłowym rozwojem, zwłaszcza ośrodkowego układu nerwowego. Układy

enzymatyczne u niemowląt są niewydolne i dzieci karmione piersią otrzymują w mleku matki duże ilości tych kwasów [17]. Dla wcześniaków stosuje się suplementację standardowych mieszanek mleka w celu lepszego ich upodobnienia do pokarmu kobiecego i poprawy zaopatrzenia organizmów w te niezbędne składniki odżywcze.

W badaniach klinicznych wykazano, że dzieci odżywiane mlekiem suplementowanym długołańcuchowymi WNKT lepiej się rozwijają pod względem psychoruchowym, a także mają lepszą ostrość widzenia (test Tellera). Dużo uwagi poświęcono zwłaszcza kwasowi dokozaheksaenowemu, którego niedobór wydaje się być szczególnie krytyczny w budowie błon komórkowych ośrodkowego układu nerwowego i siatkówki oka. Zwiększona podaż prekursora kwasu linolowego nie poprawia funkcji narządu wzroku. Wskazuje to na konieczność zapewnienia długołańcuchowych WNKT w pożywieniu. Nie ustalono dotychczas, jaki wpływ na rozwój dzieci starszych ma suplementacja tymi kwasami. Potrzebne są dalsze badania w celu wyjaśnienia tych problemów. W badaniach ze zwierzętami wykazano zależności pomiędzy regeneracją i wzrostem tkanek a dostarczaniem w paszy kwasu arachidowego, który, jak się przypuszcza, może być czynnikiem wzrostu [43].

W ostatnim dziesięcioleciu przeprowadzono wiele badań zmierzających do wyjaśnienia roli suplementacji diety wielonienasyconymi niezbędnymi kwasami tłuszczowymi (WNNKT) n-6 i n-3 o długości łańcucha C_{18} do C_{20}, w celu utrzymania dobrego stanu zdrowia. Spożycie kwasów z grupy n-3 jest oceniane jako zbyt niskie w populacji krajów zachodnich. Zdolność organizmu człowieka do konwersji kwasu α-linolenowego do kwasu eikozapentaenowego i dokozaheksaenowego jest mała, a głównym czynnikiem konwersji jest Δ,6–desaturaza, której aktywność maleje z wiekiem. Osoby starsze są grupą ryzyka o ograniczonym odżywianiu powodowanym małą różnorodnością wyboru żywności i mniejszym poborom energii. Ludzie starsi spożywający zbyt mało WNNKT n-3 mogą mieć kłopoty ze zdrowiem objawiające się podatnością na artretyzm, cukrzycę, raka, toczeń i łuszczycę.

Liczne badania przeprowadzone na wolontariuszach wykazały, że kwas dokozaheksaenowy (DHA) dodany do diety może zwiększyć poziom DHA w lipidach krwi, ale często jest hamowany przez kwas arachidonowy (AA). Jak wykazano, przy małej (0,4 %) suplementacji diety kwasami EPA i DHA ich smak nie jest wyczuwalny i mogą być stosowane [4]. W badaniach przeprowadzonych przez Payet i wsp. [36] określono efekt wzbogacenia diety proszkiem jajowym fortyfikowanym DHA, zgodnie z zaleceniami dietetycznymi stosowanymi we Francji, na lipidy krwi starszej wiekiem populacji. Osoby w wieku 63-93 lata (pensjonariusze domu opieki) spożywały produkty jajeczne wzbogacone w DHA (150 mg/d) raz dziennie przez 9 miesięcy. Co 3 miesiące oznaczano lipidy zawarte w osoczu krwi i kwasy tłuszczowe w błonach komórkowych erytrocytów. Wzbogacona w DHA dieta spowodowała wzrost zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych po 9 miesiącach w surowicy i błonach komórkowych erytrocytów o odpowiednio 14,5 i 25,3%. Wywołane to było głównie działaniem DHA i co było niespodziewanym wynikiem, ciągłym wzrostem

poziomu AA. Wzrost ten nastąpił w wyniku zwiększonej jego dawki w diecie (+ 50 mg/d) i prawdopodobnie zwiększonej biosyntezy, na co wskazywał poziom dihomo-γ-linolowego kwasu. Za próbę kontrolną w tych badaniach przyjęto grupę młodych, zdrowych ludzi, u których oznaczono poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Uzyskane wyniki były zgodne z zasadami typowego metabolizmu zachodzącego w organizmie człowieka [36].

Zapewnienie zdrowia populacji można osiągnąć zmieniając niekorzystne nawyki żywieniowe polegające na ograniczeniu spożycia tłuszczu i przestrzeganiu zachowania właściwego składu kwasów tłuszczowych w pożywieniu [40]. Zachowanie odpowiednich proporcji pomiędzy kwasami tłuszczowymi nasyconymi, jednonienasyconymi i wielonienasyconymi uzyskuje się dobierając odpowiednie produkty spożywcze lub stosując suplementację. Jako szczególnie wartościowe pod tym względem uważane są ryby, zwłaszcza tłuste, pochodzenia morskiego jak makrela, łosoś czy śledź atlantycki [22]. Zwiększenie udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-3 w diecie można uzyskać spożywając minimum 200-300 g ryb tygodniowo, co zapewnia ok. 0,3 g EPA i DHA dziennie [51].

Ryby takie zawierają więcej kwasu eikozapentaenowego, a pochodzące z mórz południowych, jak tuńczyk czy sardela, są bogate w kwas dokozaheksaenowy. Zalecany dawniej do podawania dzieciom tran otrzymywany z rybich wątrób jest bogaty w kwasy tłuszczowe, witaminy A i D oraz cholesterol.

Obecnie zalecane są oleje z wątroby rekina, podnoszące odporność i aktywizujące system immunologiczny, zwłaszcza w okresie osłabienia organizmu i rekonwalescencji. Składnikiem takiego oleju są alkoksyglicerole (alkiloglicerole-lipidy eterowe), obecne są one również w mleku. Mleko kobiet zawiera ich 10 razy więcej niż mleko krowie. Związki te wykazują silne właściwości przeciwutleniające, stymulują także fagocytozę i apoptozę (niszczenie komórek rakowych).W mleku kobiecym, będącym najlepszym pokarmem dla niemowląt, występują lipidy zawierające izomery trans [19, 49].

W badaniach Dybkowskiej i wsp. [10] oceniono poziom spożycia WNNKT typu n-3 i n-6 w przeciętnej polskiej racji pokarmowej. Stwierdzono, że poziom spożycia WNKT z grupy n-6 stanowi 5,2% wartości energetycznej diety (13 g dziennie), a kwasów n-3 jedynie 0,95% energii (2,4 g dziennie). Spożycie kwasu ALA z grupy n-3 wynosiło 0,9% energii i było zbliżone do zalecanego (1%), ale spożycie długołańcuchowych form n-3 EPA i DHA wynosiło 0,04% wartości energetycznej diety i było niższe od zalecanego (0,3%). Spożycie kwasu linolowego n-6 wynosiło 5% energii i znacznie przekraczało górną granicę zaleceń (3%). Rezultaty badań wskazują na potrzebę zwiększenia spożycia długołańcuchowych form kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 w polskiej diecie, co można uzyskać przez zwiększenie konsumpcji ryb i przetworów rybnych oraz wzbogacanie w te składniki żywności.

Izomery nienasyconych kwasów tłuszczowych

Nienasycone kwasy tłuszczowe w zależności od przestrzennego położenia atomu wodoru przy podwójnym wiązaniu węgla mogą występować w określonej konfiguracji przestrzennej. Liczba atomów C w łańcuchu, a także liczba i położenie podwójnych wiązań decydują o właściwościach i roli w organizmie określonych kwasów tłuszczowych i tłuszczów złożonych, w których skład one wchodzą. Znaczenie szczególnie mają często oznaczane w tłuszczach izomery cis i trans. Naturalnie występujące kwasy tłuszczowe mają konfigurację cis, jedynie w tłuszczach przeżuwaczy znajduje się 1–6% izomerów trans przekształconych z formy cis. Zmiana konfiguracji przestrzennej następuje w wyniku działania bakterii obecnych w przedżołądkach tych zwierząt. W konfiguracji trans atomy wodoru są umiejscowione po przeciwnych stronach atomów węgla tworzących podwójne wiązanie, różnią się także przestrzenną budową łańcucha. Izomery trans mają łańcuch węglowodorowy prosty, a jest on wygięty w izomerach cis [44, 52].

Nienasycone kwasy tłuszczowe trans wbudowane do błon komórkowych, zamiast izomerów cis, powodują zmiany cech, takich jak: przepuszczalność, aktywność i liczbę receptorów oraz enzymów związanych z tymi błonami, co wiąże się z pogorszeniem funkcji życiowych komórek. Wykazano, że nienasycone kwasy tłuszczowe trans powstają głównie w procesie uwodornienia tłuszczów nienasyconych, ulegają przemianom metabolicznym w organizmie człowieka podobnie jak tłuszcze nasycone i mogą powodować niekorzystne zmiany miażdżycowe w naczyniach krwionośnych [24, 25]. Niewłaściwe postępowanie z tłuszczami, jak utlenianie podczas przechowywania czy nadmierne ogrzewanie może powodować niekorzystne przemiany prowadzące do powstania pochodnych o zmienionej konfiguracji, szkodliwych dla człowieka. Izomery o konfiguracji trans, produkty utlenienia, rozpadu lub polimeryzacji są przykładem takich szkodliwych związków. W procesie przemysłowego utwardzania tłuszczów powstają izomery trans NKT, następuje także wysycenie podwójnych wiązań w tych kwasach obecnych w olejach roślinnych. Ich metabolizm podobnie jak nasyconych kwasów tłuszczowych powoduje zmiany miażdżycowe w naczyniach krwionośnych [11, 45]. Kwasy tłuszczowe cis są bardzo podatne na utlenianie, ale prawdopodobnie nie dotyczy to kwasów monoenowych [18].

Utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych jest główną przyczyną psucia się wielu produktów spożywczych zawierających tłuszcz. Szybkość utleniania zależy od liczby wiązań podwójnych, ich rodzaju (izolowane lub sprzężone, o konfiguracji trans lub cis). Jak wykazała Szukalska [46], tłuszcze zawierające więcej izomerów trans niż cis kwasów oktadecenowych charakteryzują się wyższą odpornością na utlenianie. Pozwala to sądzić, że konfiguracja geometryczna kwasów tłuszczowych oktadecenowych w triacyloglicerolach ma wpływ na szybkość utleniania tłuszczu. Podstawowymi składnikami frakcji trans izomerów kwasów tłuszczowych są kwasy oktadecenowe (18:1). Kwasy o kilku podwójnych wiązaniach (18:2 i 18:3) występują

w mniejszych ilościach, ale podobnie jak poprzednie są uważane za szkodliwe składniki żywności. Wyjątek stanowią sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) głównie izomery 9c,11t i 10t, 12c [2, 13].

Sprzężone kwasy tłuszczowe

Sprzężony kwas linolowy jest pozycyjnym i geometrycznym izomerem kwasu dienowego n-6 alifatycznego kwasu tłuszczowego C 18. W literaturze angielskiej określany jest jako conjugated linoleic acid (CLA). Sprzężenie kwasu linolowego oznacza brak oddzielenia 2 wiązań podwójnych przez grupę metylenową. Najbardziej popularnym źródłem CLA w diecie jest mleko przeżuwaczy, większość produktów mleczarskich, wołowina, baranina, a także wieprzowina [28, 39]. W produktach tych występuje sprzężony kwas linolowy, a ponad 90% jest w konfiguracji cis 9 – trans 11. Sprzężony kwas linolenowy, który ma specyficzne zalety, wykazał szerokie spektrum aktywności w organizmie. CLA zawiera mieszaninę izomerów pozycyjnych i geometrycznych. Najbardziej aktywne formy to: 9 cis, 11 trans, 10 trans i 11 cis kwasu linolenowego C 18:2. Dodany do diety jako tłuszcz CLA wpływa na metabolizm kwasów tłuszczowych i ich skład, jednak może mieć niekorzystny wpływ na fizykochemiczne cechy mięsa [14, 34]. Ponadto Du i wsp. [9] sugerowali, że CLA pośrednio zwiększa stabilność utleniania mięsa przez wzrost poziomu nasyconych kwasów tłuszczowych z jednoczesnym zmniejszeniem nienasyconych kwasów tłuszczowych, a także inhibituje wytwarzanie wolnych rodników. CLA nie wykazał żadnych przeciwutleniających działań [30, 37].

Artykuły spożywcze dietetyczne wzbogacone w chemicznie przygotowaną mieszaninę izomerów CLA, o różnym składzie i stopniu czystości, są szeroko dostępne w handlu [1, 3 ,5].

Zainteresowanie unikalnymi właściwościami CLA zostało wywołane po obserwacjach sprzed ponad 20 lat, gdy stwierdzono, że otrzymany z tłuszczu ekstrahowanego z mielonego i smażonego na grillu mięsa wołowego wykazał on właściwości przeciwrakowe [35]. Od tego czasu przeprowadzono wiele badań w nadziei znalezienia skutecznego preparatu terapeutycznego. W różnych badaniach ze zwierzętami wykazano, że CLA zmniejszał lub zapobiegał otłuszczeniu ciała, poprawiał oporność insulinową, hamował tworzenie tłuszczu, ale także hamował rozwój raka i likwidował stany zapalne. Te obserwacje prowadziły do wielu spekulacji odnośnie potencjalnej roli CLA w zapewnieniu zdrowia ludziom. Znaczenie tych odkryć istotnie wzrasta, ponieważ wykazują one działanie izomeru trans 10 – cis 12 CLA, uważanego za najbardziej efektywnego modyfikatora procesów biochemicznych i regulatora systemów wewnątrzkomórkowych [1].

Sprzężony kwas linolenowy (CLA) wykazuje rozległe działanie fizjologiczne [35], przede wszystkim: przeciwrakowe, zwiększające odporność immunologiczną, ograniczające stany zapalne, ograniczające działania kataboliczne stymulacji immunologicznej, ograniczające astmę u badanych zwierząt, ograniczające

arteriosklerozę, zwiększające wzrost młodych gryzoni, ograniczające odkładanie tkanki tłuszczowej, zwiększające przyrosty masy ciała u osób szczupłych, ograniczające negatywne objawy przy diecie odchudzającej, ograniczające symptomy cukrzycy w układach modelowych, ograniczające nadciśnienie.

W wielu laboratoriach podejmuje się obecnie biologiczne badania molekularne na poziomie genów w celu wyjaśnienia mechanizmów i efektów działania CLA. Badania te zapewne doprowadzą do ustalenia na czym polega unikalne działanie sprzężonego kwasu linolowego i jakie są jego możliwości jako składnika żywności funkcjonalnej czy nutraceutyku. W marcu 2003 r. w Winnipeg (Canada) odbyła się międzynarodowa konferencja naukowa dotycząca roli CLA jako czynnika poprawiającego ludzkie zdrowie [1].

Pomimo wielu obiecujących rezultatów badań przeprowadzonych zwłaszcza na zwierzętach, dotychczasowe wyniki dotyczące przydatności CLA dla ludzi, jako nutraceutyku, w prewencji lub leczeniu chorób chronicznych wskazują, że jest ona ograniczona.

Podsumowanie

Badania naukowe wykazują istotną rolę spożycia tłuszczu jako czynnika wpływającego na rozwój wielu chorób cywilizacyjnych, jak otyłość, choroby sercowo-naczyniowe i onkologiczne. W zapobieganiu wystąpienia tych chorób, oprócz poziomu spożycia tłuszczu, istotny jest jego skład, a zwłaszcza udział kwasów tłuszczowych nasyconych oraz jedno- i wielonienasyconych (WKT). Korzystne działanie na organizm człowieka wykazują kwasy tłuszczowe jedno- i wielonienasycone, a także właściwy stosunek kwasów z grupy n-6 i n-3 wynoszący 4:1. Organizm człowieka nie wytwarza enzymów mających uzdolnienia do syntezy WKT (z grupy n-3 i n-6), dlatego konieczne jest dostarczenie tych związków w diecie. Podstawowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe z grupy n-6 to kwas linolowy, będący prekursorem kwasu arachidonowego, a z grupy n-3 kwas α-linolenowy, prekursor kwasu eikozapentaenowego i dokozaheksaenowego. Kwas arachidonowy i eikozapentaenowy są prekursorami tzw. hormonów tkankowych (eikozanoidów), a dokozaheksaenowy składnikiem komórek mózgu, siatkówki oka i plemników, warunkującym ich działanie fizjologiczne. Wystarczająca zawartość kwasu dokozaheksaenowego w diecie kobiet ciężarnych i niemowląt zabezpiecza prawidłowy rozwój centralnego układu nerwowego u noworodków i dzieci. Wzbogacanie odżywek dla niemowląt w te niezbędne kwasy tłuszczowe stosują już producenci mieszanek. W badaniach na zwierzętach udowodniono efekty prozdrowotne nowopoznanych WKT tj. izomerów sprzężonego kwasu linolowego (conjugated linoleic acid – CLA). Związki te mają właściwości przeciwzapalne, dlatego też prowadzone są prace zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów ich przeciwmiażdżycowego i przeciwnowotworowego działania. Współczesne zalecenia żywieniowe sformułowane na podstawie oceny poziomu spożycia NNKT typu n-3 i n-6 w polskiej racji pokarmowej wskazują na

potrzebę zwiększania spożycia długołańcuchowych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3, przez konsumpcję ryb i przetworów rybnych oraz wzbogacanie żywności.

Literatura

[1] Angel A.: The role of conjugated linoleic acid in human health. Preface. Am. J. Clin. Nutr. Supl., 2004, **6 (s),** 1131S.

[2] Bartnikowska E., Obiedziński M., Grześkiewicz S.: Rola i znaczenie żywieniowe sprzężonych dienów kwasu linolowego. Przem. Spoż., 1999, **7(53)**, 16-18 i 42.

[3] Bellise F., Diplock A.T., Hornsta G.: Functional food science in Europe. Br. J. Nutr. Supl., 1998, **1**, 80.

[4] Berger K.G.: Fats and oils group holds fish oil from. Inform., 1995, **8**, 925.

[5] Blum M.: Designing foods for better health. Food Ingred., 1996, **3,** 25.

[6] Cichocka A.: Profilaktyka chorób układu krążenia. Przem. Spoż., 2004, **2 (57)**, 30-31.

[7] Connor W.E.: Alfa- linolenic acid in health and disease. Am. J. Clin. Nutr., 1999, **69**, 827-828.

[8] Connor W. E.: Importance of n-3 fatty acids in health and disease. Am. J. Clin. Nutr., 2000, **71**, Suppl., S171.

[9] Du M., Ahn D.U., Nam K. C., Sell J. L.: Influence of dietary conjugated linoleic acid on volatile profiles, color and lipid oxidation of irradiated raw chicken meat. Meat Sci., 2000, **56**, 387-395.

[10] Dybkowska E., Wankiewicz-Robak B., Świderski F.: Assessment of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake in the average polish diet. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2004, **4**, 409-414.

[11] Dyerberg J.: The influence of trans fatty acids on health. Danish Nutr. Coun., 1995, **3**, 3.

[12] ESC Annual Congress. Teudera: co-operation is the key to beating cardiovascular disease. 2004. www.escardio.org/ initiatives/ News/evento/esc-congress/ Tendera Vision, htm.

[13] Fritsche J., Rickert R., Steinhart H., Yurawecz M., Mossoba M., Sehat N., Roach J., Kramer J., Ku Y.: Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. Feet/Lipid, 1999, **101**, 272-276.

[14] Joo S.T., Lee J. I., Ha Y. L., Park G. B.: Effects of dietary conjugated linoleic acid on fatty acid composition, lipid oxidation, colour, and water-holding capacity of pork loin. J Anim. Sci., 2002, **80**, 108-112.

[15] Gibney M. J., Vorster H. H., Kok F. J.: Introduction to Human Nutrition. Blackwell Science, Oxford 2002.

[16] Grimm H., Mayer K., Mayser P., Eigenbrodt E.: Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. Brit. J. Nutr., 2002, **87**, Suppl. 1, 559-567.

[17] Hornstra C.: Essential fatty acids pregnancy and pregnancy complications. Nutr. Today, 1994, **4,** 26.

[18] Hilder M.: Oxidation of oils. Lipid technologies and applications. Ed. F Gynstone and F. Padley. M. Dekker Inc, New York 1997, pp. 178-188.

[19] Jensen R., McGuire M.A., McGuire M.K.: Trans fatty acids in human milk. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2000, **102**, 640-646.

[20] Katan M.B., Zock P.L., Mensink R.P.: Trans fatty acids and their effects on lipoprotein in humans. J. Lip. Res., 1995, **15**, 473-486.

[21] Kłosiewicz-Latoszek L.: Znaczenie kwasów tłuszczowych omega-3 w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych. Żyw. Czł. Met., 2002, **29 (1/2)**, 78-87.

[22] Kolanowski W.: Olej rybi jako źródło kwasów tłuszczowych omega-3 znaczenie zdrowotne i wzbogacanie żywności. Przem. Spoż., 2000, **54 (9)**, 56-58.

[23] Kolanowski W., Świderski F.: Wielonienasycone kwasy tłuszczowe z grupy n-3 (n-3 PUFA). Korzystne działanie zdrowotne, zalecenie spożycia, wzbogacanie żywności. Żyw. Człow. Metab., 1997, **2**, 49-63.

[24] Kozłowska-Wojciechowska M.: Tłuszcze pokarmowe w profilaktyce miażdżycy. Med. po Dypl., 2003, **12,** 88-100.
[25] Kozłowska-Wojciechowska M.: Profilaktyka wybranych chorób dietozależnych. Med. po Dypl., 2003, **12**, 100-104.
[26] Kromhout D.: Dietary fats: long term implication for health. Nutr. Rev., 1992, **4 (II)**, 49.
[27] Lauritzen D.: Food enrichment with marine omega-3 fatty acids. Food Ingred., 1994, **1/2**, 41.
[28] Leth T., Ovesen L., Hansen K.: Fatty acid composition of meat from ruminants, with special emphasis on trans fatty acids. J. Am. Oil Chem. Soc., 1998, **75**, 1001-1005.
[29] List. G. R.: Decreasing trans and saturated fatty acid content in food oils. Food Technol. 2004, **1 (58)**, 23-30.
[30] Livisay S. A., Zhou S., Ip C., Decker E. A.: Impact of dietary conjugated linoleic acid on the oxidative stability of rat liver microsomes and skeletal muscle homogenates. J. Agric. Food Chemistry, 2000, **48**, 4162-4170.
[31] Marciniak-Łukasiak K., Krygier K.: Charakterystyka kwasów omega-3 i ich zastosowanie w żywności funkcjonalnej. Przem. Spoż., 2004, **12 (57)**, 32-36.
[32] Newton J.S.: Long chain fatty acids in health and nutrition. J. Food Lipids. 1996, **31 (3)**, 233-249.
[33] Obiedziński M., Bartnikowska E., Cieślak B., Jankowski P., Grześkiewicz S.: Skład kwasów tłuszczowych i koncentracja steroli. Przem. Spoż., 1996, **10 (50)**, 13-16.
[34] Ostrowska F., Muralitharan M., Cross R.F., Bauman D. E., Dunshea F. R.: Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. J. Nutr., 1999, **129**, 2037-2042.
[35] Pariza M.W.: Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. The Am. J. Clin. Nutr., Supl., 2004, **6 (S)**, 1132s.
[36] Payet M.,Mohamed H., Esmail, Polichetti E., Le Brun G, Adjemout L., Donnarel G., Portugal H., Pieroni G.: Docosahexaenoic acid-enriched egg consumption inoluces acc retion of arachidonic acid in erythrocytes of elderly platines. Br. J. Nutr., 2004, **91**, 789- 796.
[37] Pieszka M., Połtowicz K., Barowicz T., Pieras M.: Effect of sunflower oil or CLA addition on α-tocopherol status and lipid oxidation in pork. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2004, **3**, 303-306.
[38] Pisulewski P. M.., Achremowicz K., Kostogrys R. B., Franczyk M.: Biochemiczne mechanizmy prozdrowotnego oddziaływania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na stan zdrowia człowieka. Post. Nauk Roln., 2005, (w druku).
[39] Precht D., Molkentin J.: Trans unsaturated fatty acids in bovine milk fat and dairy products. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2000, **102**, 635-639.
[40] Schwarz W.: Trans unsaturated fatty acids in European nutrition. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2000, **102**, 633-635.
[41] Simopoules A. P., Leaf A., Salem N: Workshop on the essentiality at an recommended dietary intake for omega-6 and omega-3 fatty acids. ISS FAL Newsletter 1999, **6**, 14.
[42] Simpoulos A. P.: Evolutionary aspects of die, essential fatty acids and cardiovascular disease. Eur. Heart J. Suppl., 2001, **3**, supl. D, D8-D21.
[43] Socha P.: Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe w żywieniu niemowląt z niską masą urodzeniową, 2002, www.nurticia.com.pl.
[44] Stachowska E., Chlubek D., Ciechanowski K.: Izomery trans n kwasów tłuszczowych – działania metaboliczne i efekty kliniczne. Pol. Merk. Lek. 2001, **57**, 173-176.
[45] Stender S., Dyeberg J., Holmer G., Ovesen L., Sandström B.: The influence of trans fatty acids on health. Clinical Sci. 1995, **88**, 375-392.
[46] Szukalska E.: Wpływ konfiguracji geometrycznej oktadecenowych kwasów tłuszczowych w żywności na szybkość utleniania lipidów. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2003, **3 (36)**, 52-64.

[47] Thies F. Nebe-von-Caron G., Powell J. R. Yagoob P. Newshome E. H., Colder P. C.: Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural healing cell activity in healthy subject aged >55. Am. J. Clin. Nutr., 2001, **73**, 539-548.
[48] Tynek M., Hazuka Z.: Dodatki ograniczające przemiany termooksydatywne tłuszczów. Przem. Spoż., 2004, **12,** 42-46.
[49] Wolff R., Precht D., Molkentin J.: Trans-18:1 acid content and profile in human milk lipids. Critical survey of data in connection with analytical methods. J. Am. Oil Chem. Soc., 1998, **75**, 661-671.
[50] Ziemlański Ś.: Tłuszcze w żywieniu człowieka. Żyw. Człow. Metab., 1997, **27**, 35-48.
[51] Ziemlański Ś., Budzyńska-Topolowska J.: Współczesne poglądy na role fizjologiczną wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3. Żyw. Człow. Met., 1992, **19 (2)**, 100-113.
[52] Żegarska Z., Borejszo Z.: Trans fatty acid content of some food products in Poland. J. Food Lipids, 2001, **8**, 271-279.

POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AS HUMAN HEALTH IMPROVERS

S u m m a r y

Fats are a basic, highly energetic component of food. Generally, it is believed that a high consumption level of fats alongside the improper composition of fats in a diet may cause risks of many typical civilization diseases such as: obesity, functional disorders of cardiovascular system, colorectal carcinoma, mammary cancer//breast carcinoma, as well as decreased power of the immune system. The composition of fatty acids in a daily diet is of special importance, in particular the rate between the saturated and single- and poly-unsaturated fatty acids. Lipids are also an important structural constituent of cell membrane (phospholipids, cholesterol). The n-3 and n-6 m poly-unsaturated fatty acids (EFA) are impossible to be manufactured (synthetized), thus, they must be supplied in a diet. The two basic EFAs are: an α**-**linolenic acid (C18:3) from the n-3 family, a precursor to eicosapentaenoic acid (EPA) and to docosahexaenoic acid (DHA), and a linoleic acid (C18:2) from the n-6 family, a precursor to arachidonic acid (AA). Cell membranes of the central neural system and of the retina function properly owing to a double layer of phospholipid molecules, and this layer consists mainly of EFAs. Therefore, human organisms must be supplied with EFAs, especially with EFAs that are not synthetised endogenicly, as they determine both the mental development of children and the proper functioning of the organisms of adults.

Recently, there is a growing interest in trans- and cis-isomers of fatty acids, and in their conjugated forms (CLA). It is also attempted to explain mechanisms of their action at the molecular and genetic level, and to determine their role in stimulating the health condition of people. Experiments and research on animals (in particular with rodents) proved that CLA, especially the trans-10 & cis-12 isomers, could reduce or prevent fat deposition, improve the insulin response, inhibit the growth of cancerous cells, and reduce inflammatory processes. It is indispensable to conduct further investigation, especially for the purpose of checking the usefulness of CLA as a nutraceutic in preventing and treating contemporary civilization diseases.

Key words: fatty acids, civilization diseases, prophylaxis, unsaturated fatty acid isomers, and conjugated fatty acids

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 36 – 45

JERZY SZPENDOWSKI, JAN KŁOBUKOWSKI, ELŻBIETA PROKOP

WPŁYW DODATKU CHLORKU WAPNIA I OGRZEWANIA MLEKA NA SKŁAD CHEMICZNY SERÓW TWAROGOWYCH

S t r e s z c z e n i e

W pracy podjęto badania nad określeniem wpływu dodatku chlorku wapnia do mleka oraz jego pasteryzacji na skład chemiczny serów twarogowych. Oznaczono zawartość wody, białka, tłuszczu, laktozy, popiołu, wapnia, fosforu i magnezu w twarogach.

Stwierdzono, że sery twarogowe wyprodukowane z mleka wzbogaconego w jony wapniowe (z dodatkiem 0,01-0,05% $CaCl_2$) i pasteryzowanego w temp. 90°C w ciągu 15 s, w porównaniu z serem twarogowym otrzymywanym z mleka pasteryzowanego w temp. 75°C w ciągu 15 s, charakteryzowały się istotnie wyższą (na poziomie istotności $\alpha = 0,05$) zawartością popiołu. Dodatek chlorku wapnia do mleka przed pasteryzacją wpływał istotnie na zwiększenie zawartości wapnia (współczynnik korelacji r = 0,9206) oraz fosforu (współczynnik korelacji r = 0,9072) w serach twarogowych.

Słowa kluczowe: sery twarogowe, skład chemiczny, wapń, fosfor, magnez

Wprowadzenie

Sery twarogowe zaliczane są do wysokowartościowych produktów w naszej diecie, będących dobrym źródłem białka, makroelementów, kwasów organicznych i witamin. Podstawą produkcji twarogów jest proces koagulacji kwasowej kazeiny, zachodzącej w wyniku ukierunkowanej fermentacji mlekowej, prowadzonej przez dodawane do mleka bakterie fermentacji mlekowej [27]. Masa białkowa po procesie koagulacji może być następnie oddzielana od serwatki metodą separacji wirówkowej, przy użyciu materiału filtracyjnego lub form perforowanych, co pozwala na 75% wykorzystanie białka mleka w produkcie. Znacznym postępem w technologii mleczarskiej jest zastosowanie techniki ultrafiltracji, która umożliwia w 99–100% wykorzystać białka w twarogu [17, 22]. Wysoki stopień wykorzystania białka w serach

Prof. dr hab. J. Szpendowski, E. Prokop, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn, dr hab. J. Kłobukowski, prof. UWM, Katedra Żywienia Człowieka, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Słoneczna 44, 10-718 Olsztyn, e-mail: szpend@uwm.edu.pl

twarogowych uzyskuje się również metodą wapniowo-termiczno-kwasowej koagulacji, która polega na wzbogacaniu mleka w jony wapniowe, przeprowadzeniu wysokiej pasteryzacji, a następnie koagulacji białek metodą kwasową. W czasie ogrzewania mleka do temp. powyżej 70°C zachodzi denaturacja białek serwatkowych, głównie β-laktoglobuliny i α-laktoalbuminy, prowadząca do tworzenia się rozpuszczalnych polimerów i agregatów białkowych, które mogą ulegać interakcji z micelami kazeinowymi [5, 14, 18, 23]. Indukowane termicznie kompleksy białkowe mogą być wydzielone z mleka poprzez koagulację w punkcie izoelektrycznym kazeiny, co jest wykorzystywane zarówno w technologii produkcji serów twarogowych, jak i preparatów białkowych [16].

W twarogu produkowanym według technologii tradycyjnej z mleka pasteryzowanego w temp. 75°C/15 s, przy zastosowaniu separacji wirówkowej lub przy użyciu materiału filtracyjnego wykorzystuje się białko mleka w postaci kazeiny, natomiast w twarogu produkowanym techniką ultrafiltracji oraz metodą wapniowo-termiczno-kwasową, obok kazeiny, wydzielane są z mleka również białka serwatkowe, charakteryzujące się bardzo wysoką wartością odżywczą [7]. Sery twarogowe produkowane z mleka wzbogaconego w jony wapniowe i poddanego wysokiej pasteryzacji (powyżej 90°C/15 s) wykazują wyższą wartość odżywczą białka, w porównaniu z twarogami produkowanymi metodą tradycyjną [8]. Zależnie od sposobu przygotowania mleka, przebiegu koagulacji białka oraz zastosowanej techniki separacji masy twarogowej otrzymuje się serki twarogowe charakteryzujące się różnymi właściwościami fizykochemicznymi, sensorycznymi i odżywczymi [6, 20]. Wzrost zawartości wapnia w twarogu można uzyskiwać, stosując dodatek soli wapniowych do mleka przed lub po procesie pasteryzacji mleka [12, 28].

Złożone procesy interakcji białek z udziałem niektórych makroelementów, jakie mają miejsce w czasie wapniowo-termiczno-kwasowej koagulacji białek mleka, mogą determinować stopień retencji składników mleka w serach twarogowych i wpływać na ich skład chemiczny, a w konsekwencji na wartość odżywczą.

Stąd celem pracy było określenie wpływu zastosowania metody wapniowo-termiczno-kwasowej na skład chemiczny serów twarogowych, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości wapnia, fosforu i magnezu.

Materiał i metody badań

Produkcję serów twarogowych przeprowadzono w skali ćwierć-technicznej. Na jeden wyrób przeznaczano 150 litrów mleka. Surowcem do produkcji serków twarogowych było mleko odtłuszczone o zawartości do 0,05% tłuszczu. Poszczególne warianty technologiczne produkcji serów twarogowych różniły się wysokością

temperatury pasteryzacji mleka i dodatkiem chlorku wapnia. Mleko przed procesem koagulacji kwasowej przygotowywano następująco:

wariant 1 – mleko bez dodatku chlorku wapnia pasteryzowano w temp. 75°C w ciągu 15 s (metoda tradycyjna),

wariant 2 – mleko bez dodatku chlorku wapnia pasteryzowano w temp. 90°C w ciągu 15 s,

wariant 3 – do mleka wprowadzano 5% roztwór chlorku wapnia do uzyskania stężenia od 0,01 do 0,05% i pasteryzowano w temp. 90°C w ciągu 15 s (metoda wapniowo – termiczno-kwasowa).

Po schłodzeniu mleka do temp. 28°C wprowadzano liofilizowaną szczepionkę czystych kultur bakterii fermentacji mlekowej w ilości 0,5 opakowania na 150 l mleka. Mleko poddawano procesowi koagulacji kwasowej, trwającej około 16 godz., doprowadzając do uzyskania kwasowości 4,6 pH (punkt izoelektryczny kazeiny). Średniozwięzły skrzep rozdrabniano ręcznie przy użyciu krajaczy, osuszano w temp. 35°C w ciągu około 2 godz. do uzyskania odpowiedniej zwięzłości ziarna. Masę twarogową umieszczano w woreczkach płóciennych, formując produkt w formie klinków o masie około 1 kg, które następnie prasowano w czasie 2 godz. przy użyciu prasy pneumatycznej. Twarogi pakowano próżniowo i chłodzono do temp. 8°C.

W twarogach oznaczano zawartość: wody, tłuszczu, białka, popiołu metodami standardowymi wg AOAC [1] oraz laktozy metodą Bertranda [4]. Zawartość wapnia i magnezu oznaczano, po mineralizacji na mokro, metodą płomieniowej spektrometrii absorpcji atomowej (płomień acetylen-powietrze) [24], przy użyciu spektrofotometru absorpcji atomowej Unicam 939 Solar, wyposażonego w stację danych ADAX, z zastosowaniem korekcji tła oraz odpowiednich dla danego pierwiastka lamp katodowych. Oznaczając wapń, w celu wyeliminowania oddziaływania fosforu, do wszystkich próbek i wzorców dodawano roztwór chlorku lantanu w ilości zapewniającej 1% stężenie La^{+3} w badanych roztworach. Fosfor oznaczano metodą kolorymetryczną (molibdenianową z hydrochinonem i siarczynem sodowym) [24].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, korzystając z pakietu Statistica v. 6.0. Obliczono wartości średnie, odchylenie standardowe, natomiast istotność różnic pomiędzy wariantami technologicznymi badano testem t-Studenta, na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ [11].

Wyniki i dyskusja

Zasadniczym celem dodatku chlorku wapnia do mleka oraz zastosowanie wysokiej pasteryzacji mleka w metodzie wapniowo-termiczno-kwasowej produkcji serów twarogowych było podwyższenie retencji białka w twarogu oraz jego wartości odżywczej, dzięki zachodzącej w tych warunkach interakcji białek serwatkowych z kazeiną oraz ich wspólnej koagulacji [2, 9, 10, 15, 23].

Rezultaty badań podstawowego składu chemicznego serów twarogowych (tab. 1) wykazały, że temperatura pasteryzacji mleka przed procesem koagulacji kwasowej nie wpływała na zawartość wody, białka, tłuszczu, laktozy i popiołu w twarogach (brak różnic statystycznie istotnych przy $\alpha = 0,05$). Twarogi wyprodukowane z mleka pasteryzowanego w temp. 75°C/15 s, jak również w temp. 90°C/15 s zawierały: 72,8 – 73,4% wody, 22,09 – 22,42% białka, 0,5 – 0,51% tłuszczu, 3,68 – 3,74% laktozy i 0,83 – 0,84% popiołu. Wykazano natomiast istotnie wyższą zawartość popiołu w serach twarogowych wyprodukowanych z mleka wzbogaconego w chlorek wapnia, dodawanego do mleka przed procesem koagulacji białka. Sery twarogowe wyprodukowane metodą wapniowo – termiczno-kwasową, z mleka wzbogaconego w 0,05% chlorku wapnia i pasteryzowanego w temp. 90°C/15 s, zawierały 1,27% popiołu. Natomiast w serach twarogowych otrzymanych z mleka pasteryzowanego w temp. 75°C/15 s bez dodatku chlorku wapnia stwierdzono 0,83% popiołu.

Tabela 1

Wpływ dodatku $CaCl_2$ i ogrzewania mleka na skład chemiczny serów twarogowych (n = 7).
The effect of $CaCl_2$ added and of milk heating on the chemical compositions of cottage cheeses (n=7).

Dodatek $CaCl_2$ do mleka [%] $CaCl_{2\,a}$ quantity added to milk in [%]	Pasteryzacja mleka – temp./ czas [°C/s] Pasteurization of milk – temp./ time period [°C/s]	Składniki [%] Components [%]				
		woda water	białko protein	tłuszcz fat	laktoza lactose	popiół ash
-	75/ 15	$72,80^{A}$ ±3,7	$22,42^{A}$ ±1,5	$0,50^{A}$ ±0,04	$3,74^{A}$ ±0,2	$0,84^{A}$ ±0,06
-	90/ 15	$73,40^{A}$ ±3,5	$22,09^{A}$ ±1,3	$0,51^{A}$ ±0,05	$3,68^{A}$ ±0,3	$0,83^{A}$ ±0,06
0,01	90/ 15	$73,21^{A}$ ±3,4	$22,08^{A}$ ±1,8	$0,52^{A}$ ±0,05	$3,71^{A}$ ±0,2	$0,91^{B}$ ±0,05
0,02	90/ 15	$73,57^{A}$ ±3,5	$22,67^{A}$ ±1,4	$0,51^{A}$ ±0,05	$3,68^{A}$ ±0,3	$0,99^{C}$ ±0,05
0,03	90/ 15	$73,42^{A}$ ±3,6	$22,35^{A}$ ±1,7	$0,53^{A}$ ±0,04	$3,69^{A}$ ±0,3	$1,14^{D}$ ±0,04
0,04	90/ 15	$73,90^{A}$ ±3,5	$22,44^{A}$ ±1,3	$0,49^{A}$ ±0,05	$3,65^{A}$ ±0,2	$1,23^{E}$ ±0,06
0,05	90/ 15	$74,31^{A}$ ±3,6	$22,12^{A}$ ±1,7	$0,55^{A}$ ±0,05	$3,66^{A}$ ±0,4	$1,27^{F}$ ±0,05

Objaśnienia: / Explanatory notes:
A, B,C,D,E,F – wartości średnie oznaczone różnymi literami w tej samej kolumnie różnią się w sposób statystycznie istotny przy $\alpha = 0,05$ / mean values designated by different letters and placed in the same column are statistically significantly different at a level of $\alpha = 0.05$.

Chmura i wsp. [6] wykazali w badaniach wyższą zawartość popiołu w serach twarogowych wyprodukowanych metodą termo-wirówkową, polegającą na przeprowadzeniu wysokiej pasteryzacji znormalizowanej śmietanki (90^{o}C/2 min) w porównaniu z twarogami produkowanymi z mleka pasteryzowanego w temp. 75^{o}C/15 s. Wysoka temperatura pasteryzacji surowca wpłynęła na zwiększenie retencji związków mineralnych mleka w serkach twarogowych. Poziom substancji mineralnych składających się na popiół, po mineralizacji próbki serów twarogowych, uzależniony był od zawartości tych substancji w mleku oraz ilości pierwiastków przemieszczających się do serwatki usuwanej z produktu.

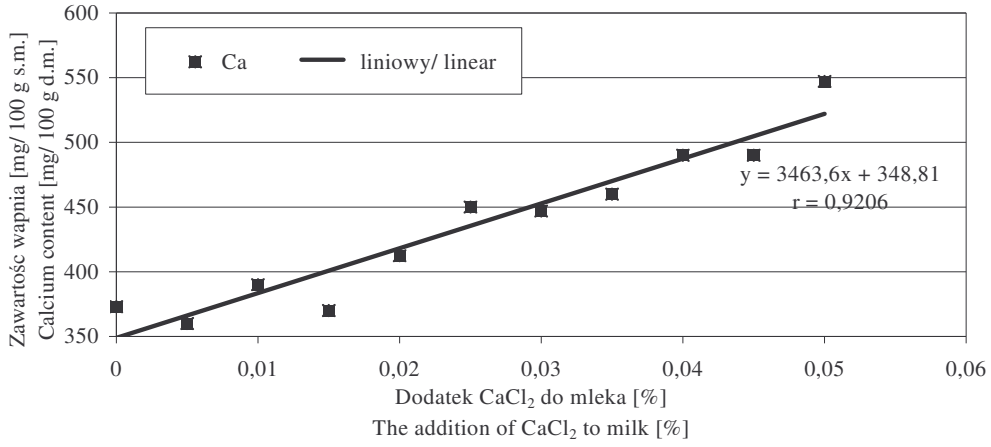
Zdecydowanie większa część (około 65%) składników mineralnych przemieszcza się do serwatki po procesie koagulacji kwasowej białka, natomiast około 35% związana jest z białkiem [6].

Zawartość popiołu w serach twarogowych może odzwierciedlać stopień odmineralizowania białka przez kwas mlekowy w procesie koagulacji kwasowej oraz retencję niektórych ważnych, z punktu widzenia żywieniowego, makroelementów w strukturze miceli kazeinowych [16]. Ze wzrostem kwasowości masy twarogowej obserwuje się zwiększenie migracji związków mineralnych do serwatki i obniżenie stopnia ich związania w twarogach [6].

Dalsze badania miały na celu określenie wpływu dodatku chlorku wapnia do mleka przed procesem pasteryzacji na zawartość wapnia, fosforu i magnezu w twarogach.

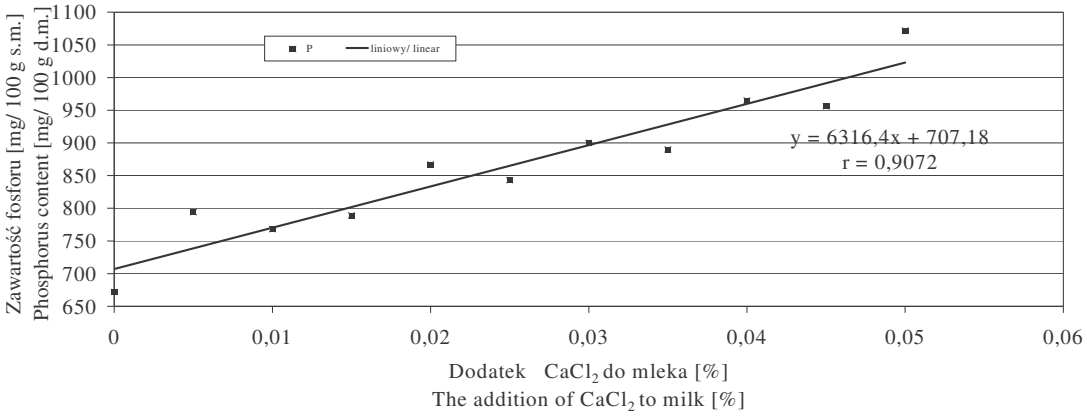
Na podstawie wyników badań zawartości wapnia (y) w serach twarogowych (rys. 1) stwierdzono statystycznie istotną dodatnią korelację z ilością chlorku wapnia (x) dodawanego do mleka (przy $\alpha = 0,05$). Współczynnik korelacji tej zależności wynosił r = 0,9206, natomiast krzywa regresji przedstawiała się następująco: y = 3463,6x + 348,81. Sery twarogowe wyprodukowane z mleka bez dodatku chlorku wapnia zawierały średnio 373 mg wapnia/100 g suchej masy twarogu, natomiast twarogi z mleka wzbogaconego w 0,05% chlorku wapnia zawierały 547,1 mg wapnia/100 g s.m. produktu. Badania zawartości fosforu w serach twarogowych (rys. 2) również wykazały statystycznie istotną dodatnią korelację z ilością chlorku wapnia dodawanego do mleka przed pasteryzacją. Współczynnik korelacji tej zależności wynosił r = 0,9072, natomiast krzywa regresji przedstawiała się następująco; y = 6316,4x + 707,18. Sery twarogowe wyprodukowane z mleka bez dodatku chlorku wapnia zawierały średnio 672 mg fosforu/100 g suchej masy twarogu, natomiast produkty otrzymane z mleka wzbogaconego w 0,05% chlorku wapnia zawierały 1072 mg fosforu/100 g s.m. twarogu. Nie wykazano statystycznie istotnej zależności pomiędzy dodatkiem chlorku wapnia do mleka przed procesem pasteryzacji a poziomem magnezu w serach twarogowych (rys. 3). Sery twarogowe zawierały od 31 do 40 mg magnezu/100 g s.m. produktu.

Według Vissera i wsp. [25], w czasie ogrzewania mleka następuje tworzenie się kompleksów pomiędzy β-laktoglobuliną i α-laktoalbuminą a kazeiną za pośrednictwem wiązań disiarczkowych, wodorowych oraz jonowych, w których uczestniczy amorficzny fosforan wapniowy. Białka serwatkowe tworzą stabilne kompleksy, głównie z frakcjami kazeiny-α_{s1}, kazeiny-β i kazeiny-κ [10]. Struktura micelarna kazeiny w mleku zależy w dużym stopniu od amorficznego fosforanu wapnia, który uczestniczy w tworzeniu kompleksu białkowego za pośrednictwem reszt lizyny. Intensywna obróbka termiczna mleka powoduje nieodwracalną transformację amorficznego fosforanu wapniowego w formę hydroksyapatytu. Po ukwaszeniu mleka do punktu izoelektrycznego kazeiny następuje uwalnianie amorficznego fosforanu wapniowego z miceli kazeinowych i formowanie się struktury żelu.



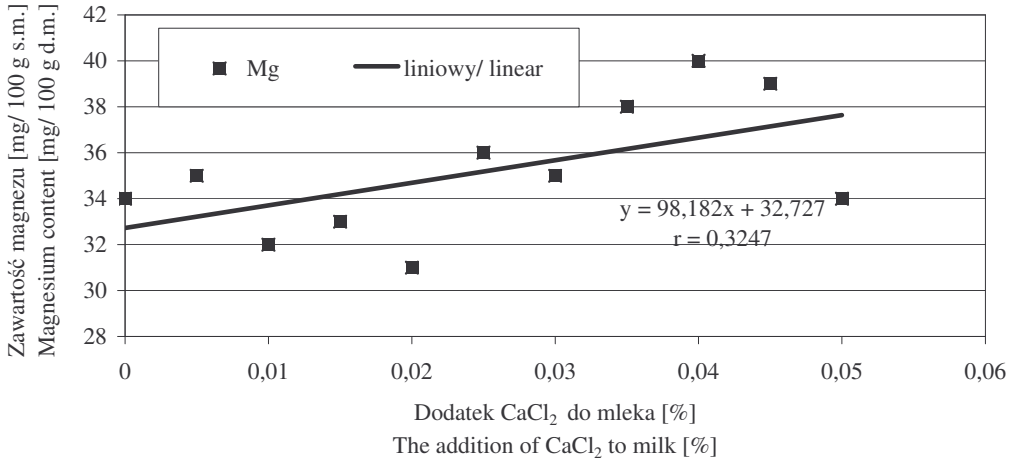
Rys. 1. Wpływ dodatku $CaCl_2$ do mleka przed pasteryzacją (90°C/15 s) na zawartość wapnia w serach twarogowych (n = 7).

Fig. 1. The effect of $CaCl_2$ added to milk prior to its pasteurization (90°C/15 s) on the content of calcium in cottage chesses (n = 7).



Rys. 2. Wpływ dodatku $CaCl_2$ do mleka przed pasteryzacją (90°C/ 15 s) na zawartość fosforu w serach twarogowych (n = 7).

Fig. 2. The effect of $CaCl_2$ added to milk prior to its pasteurization (90°C/15 s) on the content of phosphorus in cottage chesses (n = 7).



Rys. 3. Wpływ dodatku $CaCl_2$ do mleka przed pasteryzacją (90°C/ 15 s) na zawartość magnezu w serach twarogowych (n = 7).

Fig. 3. The effect of $CaCl_2$ added to milk prior its to pasteurization (90°C/15 s) on the content of magnesium in cottage chesses (n=7).

Natomiast fosforan wapniowy przechodzi do serwatki. Dodatek jonów wapniowych do mleka przed pasteryzacją powoduje zwiększenie powierzchni miceli kazeinowych, potęguje polimeryzację i agregację białek serwatkowych i w konsekwencji zwiększa efekt interakcji pomiędzy kazeiną a agregatami białek serwatkowych [3, 26]. Niekorzystną konsekwencją tego zabiegu jest obniżenie

stabilności termicznej mleka, co utrudnia przeprowadzenie procesu pasteryzacji surowca [28]. W czasie ogrzewania mleka zachodzi przekształcanie się rozpuszczalnego wapnia w formę koloidalną, która uczestniczy w kształtowaniu się kompleksu kazeiny z białkami serwatkowymi [19]. Żuraw i wsp. [29] wykazali, że poziom wapnia jonowego w mleku determinuje zawartość „koloidalnego" fosforanu wapniowego, który jest czynnikiem strukturotwórczym i wpływa na wielkość miceli kazeinowych. Badania zawartości wapnia i fosforu „koloidalnego" w mleku regenerowanym z proszku mlecznego produkowanego z mleka wzbogaconego w 3,6 M $CaCl_2$ wykazały, że zawiera więcej obydwu pierwiastków w porównaniu z mlekiem otrzymanym po regeneracji proszku otrzymanego z mleka bez dodatku chlorku wapnia [21]. Uważa się, że wiązania jonowe pomiędzy resztami kwasu fosforowego za pośrednictwem jonów wapniowych decydują o stabilności powstałych kompleksów pomiędzy białkami mleka [25]. Prawdopodobnie również magnez, w formie fosforanu „koloidalnego", uczestniczy również w tworzeniu struktury micelarnej kazeiny oraz skrzepu kwasowego w serach twarogowych [16], czego jednak nie potwierdzają rezultaty badań niniejszej pracy. Zdaniem niektórych autorów, na stabilność kompleksów pomiędzy kazeiną a białkami serwatkowymi, determinującą stopień ich wykorzystania w twarogu, wpływa również stężenie jonów sodowych, cytrynianowych i zawartość laktozy [26].

Z przeprowadzonych badań wynika, że na skutek wysokiej pasteryzacji (w temp. 90^{o}C w ciągu 15 s) mleka wzbogaconego w jony wapniowe (dodatek 0,01 – 0,05% $CaCl_2$), może zwiększać się nie tylko zawartość wapnia, ale również i fosforu w twarogu. Prawdopodobnie ze wzrostem zawartości wapnia „jonowego" w mleku wzrasta „zapotrzebowanie" na fosfor rodzimy mleka, który w formie „koloidalnego" fosforanu wapnia jest wbudowywany w strukturę skrzepu twarogowego. Wynika stąd, że korzystnym efektem stosowania metody wapniowo-termiczno-kwasowej w technologii serów twarogowych jest nie tylko lepsze wykorzystanie białka w produkcie oraz jego wyższa wartość odżywcza, ale również wzrost zawartości wartościowego wapnia i fosforu w tych produktach.

Wnioski

1. Sery twarogowe wyprodukowane z mleka wzbogaconego w jony wapniowe (z dodatkiem 0,01–0,05% $CaCl_2$) i pasteryzowanego w temp. 90^{o}C w ciągu 15 s, w porównaniu z serem twarogowym otrzymywanym z mleka pasteryzowanego w temp. 75^{o}C w ciągu 15 s, charakteryzowały się statystycznie istotnie wyższą (przy $\alpha = 0,05$) zawartością związków mineralnych, wyrażonych jako popiół.
2. Dodatek chlorku wapnia do mleka przed pasteryzacją wpływał istotnie na zwiększenie zawartości wapnia ($r = 0,9206$) oraz fosforu ($r = 0,9072$) w serach twarogowych.

Literatura

[1] AOAC.: Official Methods of Analysis 12th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC 1975.

[2] Bealieu M., Pouliot Y., Pouliot M.: Composition and microstructure of casein: whey protein aggregates formed by heating model solutions at 95°C. Int. Dairy J., 1999, **9**, 393-394.

[3] Britten M., Giroux H.: Acid-inducted gelation of whey protein polymers: effect of pH and calcium concentration during polymerization. Food Hydrocolloids, 2001, **15**, 609-617.

[4] Budsławski J., Drabent Z. Metody analizy żywności. WNT. Warszawa 1972.

[5] Carbonaro M., Bonomi F., Iametti S., Cappelloni M.: Aggregation of proteins in whey from raw and heat-processed milk: Formation of soluble macro-aggregates and nutritional consequences. Lebensm. Wiss. u. – Technol., 1998, **31**, 522-529.

[6] Chmura S., Śmietana Z., Żulewska J.: The effect of the production method on selected physical-chemical properties of cottage cheeses. Pol. J. Natural Sci., 2002, **11 (2)**, 189-197.

[7] Chojnowski W.: Wpływ wybranych parametrów technologicznych na zmiany w strukturze, właściwościach fizykochemicznych oraz wartości biologicznej białek serwatkowych. Acta Acad. Agricult. Techn. Olst., Technologia Alimentorum, 1985, **21**, 1-40.

[8] Cichon R.: Wpływ obróbki wapniowo-termicznej mleka na zmiany w składzie aminokwasowym i wartości odżywczej białka twarogów i serów. Zesz. Nauk. ART. Olszt., Technol. Żywn., 1979, **14**, 73-121.

[9] Correding M., Dalgleish D., The mechanism of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. Int. Dairy J., 1999, **9**, 233-236.

[10] Dalgleish D., Goff D., Luan B.: Exchange reactions between whey proteins and caseins in heated soya oil-in-water emulsion system – behavior of individual proteins. Food Hydrocolloids, 2002, **16**, 295-302.

[11] Gawęcki J., Wagner W.: Podstawy metodologii badań doświadczalnych w nauce o żywności. PWN. Warszawa 1984.

[12] Kitlas M., Ziarno M.: Próba wzbogacenia serów twarogowych w wapń. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2002, **3 (32)** Supl., 79-88.

[13] Nitecka E., Popiołek P.: Wpływ metody koagulacji mleka na zmiany wartości odżywczej białka twarogów. Przem. Spoż., 1990, **11**, 284 – 286.

[14] Oldfield D., Singh H., Taylor M., Pearce K.: Heat-inducted interactions of β-lactoglobulin and α-lactoalbumin with the casein micelle in pH-adjusted skim milk. Int. Dairy J., 2000, **10**, 509-518.

[15] Oldfield D., Singh H., Taylor M.: Association of β-lactoglobulin and α-lactoalbumin with casein micelles in skim milk heated in an ultra-high temperature plant. Int. Dairy J., 1998, **8**, 765-770.

[16] Pijanowski E., Zarys chemii i technologii mleczarswa. PWRiL. Warszawa 1984.

[17] Rojewska H.: Ultrafiltracja w technologii serków twarogowych. Przegl. Mlecz., 1997, **12**, 402-403.

[18] Schokker E.P., Singh H., Creamer L.K.: Heat-inducted aggregation of β-lactoglobulin A and B with α-lactoalbumin. Int. Dairy J., 2000, **10**, 843-853.

[19] Singh H., Waungana A.: Influence of heat treatment of milk on cheese-making properties. Int. Dairy J., 2001, **11**, 543-551.

[20] Szpendowski J., Kłobukowski J., Bohdziewicz K., Kujawski M.: Characteristic of the chemical compositions and the nutritive value of protein in selected curd cheeses. Pol. J. Natural Sci. 2004, **2**, 143-150.

[21] Śmietana Z., Żuraw J., Płodzień T., Szpendowski J.: Charakterystyka wapnia i fosforu w mleku regenerowanym z proszku. Roczn. Inst. Przem. Mlecz. 1983, **2 (70)**, 39-51.

[22] Śmietana Z., Derengiewicz W., Jankowski A., Wojdyński T.: Nowa technika i technologia produkcji twarogów. Przegl. Mlecz., 1998, **9**, 288-292.
[23] Vasbinder A., van Mil P., Bot A., Kruif K.: Acid-inducted gelation of heat-treated milk studied by diffusing wave spectroscopy. Colloids and Surfaces, 2001, **21**, 245-250.
[24] Whiteside P.J.: Atomic Absorption – Data Book. Cambridge 1976.
[25] Visser J., Minihan A., Smith P., Tjan S.B., Heertje I.: Effects of pH and temperature on the milk salt system. Neth. Milk Dairy J., 1986, **40**, 351-368.
[26] Załęska-Roskosz D., Śmietana Z., Poznański S.: Wpływ dodatku jonów wapniowych i ogrzewania mleka na zmiany białek. Roczn. Inst. Prze. Mlecz., 1981, **2**, 67, 59-65.
[27] Ziajka S.: Mleczarstwo zagadnienia wybrane. T. II. Wyd. AR-T w Olsztynie 1997.
[28] Ziarno M., Semeniuk E., Kycia K.: Wpływ dodatku soli wapnia na stabilność mleka przeznaczonego do produkcji sera typu cottage cheese. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2004, **2 (39),** 81-91.
[29] Żuraw J., Śmietana Z., Szpendowski J., Chojnowski W.: Influence de l'addition de sels de calcium et du chauffage sur les diverses formes de calcium dans le lait. Le Lait, 1986, **66**, 421-429.

THE EFFECT OF CALCIUM CHLORIDE ADDED TO MILK AND MILK HEATING ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF COTTAGE CHEESES

S u m m a r y

In this paper, the objective was to study and identify the effect of calcium chloride added to milk and the effect of pasteurisation of the enriched milk on the chemical composition of cottage cheeses produced from it. The content of water, protein, fat, lactose, ash, calcium, phosphorus, and magnesium was determined.

It was stated that cottage cheeses produced from milk, enriched by calcium ions (with 0.01-0.05% of $CaCl_2$ added) and pasteurised at a temperature of 90^{o}C during a period of 15 s, had a significantly higher ash content ($\alpha = 0,05$) compared to cottage cheeses produced from milk pasteurised for the same period of 15 s, but at a temperature of 75^{o}C. Calcium chloride added to milk before the pasteurisation caused a significant increase in the content of calcium (correlation coefficient r = 0,9206) and phosphorus (correlation coefficient r = 0,9072) in cottage cheeses.

Key words: cottage cheeses, chemical content, calcium, phosphorus, magnesium

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 46 -60

EWA STASIUK, PIOTR PRZYBYŁOWSKI

WPŁYW ZMODYFIKOWANEGO SPOSOBU STOSOWANIA KNO_3 NA CECHY SENSORYCZNE I MIKROBIOLOGICZNE SERÓW DOJRZEWAJĄCYCH PODPUSZCZKOWYCH

S t r e s z c z e n i e

W warunkach przemysłowych wyprodukowano sery dojrzewające podpuszczkowe, stosując dodatek saletry potasowej nie do mleka, lecz do solanki. Tak wyprodukowane sery poddano ocenie mikrobiologicznej i sensorycznej. Materiał porównawczy stanowiły sery kontrolne wyprodukowane bez dodatku lub z dodatkiem saletry do mleka serowarskiego.

Stwierdzono, że sery twarde typu szwajcarskiego i holenderskiego wyprodukowane zmodyfikowanym sposobem stosowania azotanów(V) osiągały dobrą jakość mikrobiologiczną. Następowało zahamowanie rozwoju bakterii z grupy coli i bakterii fermentacji masłowej. Dojrzałe sery gouda I wyprodukowane zmodyfikowanym sposobem stosowania KNO_3 wykazywały miano bakterii z grupy coli i miano bakterii beztlenowych przetrwalnikujących na poziomie: nieobecne w rozcieńczeniu 10^{-1} g. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku dojrzałego sera tykocińskiego. Dojrzałe sery gouda II charakteryzowały się gorszą jakością mikrobiologiczną w porównaniu z serami gouda I i tykocińskim. Miano bakterii przetrwalnikujących wynosiło: nieobecne w 10^{-1} g, natomiast miano coli wynosiło od 10^{-2} do 10^{-4}. Pomimo tego wszystkie sery wyprodukowane zmodyfikowanym sposobem stosowania saletry potasowej częściej klasyfikowano jako sery wyższej jakości. Częściej też dyskwalifikowano (poza klasą) sery kontrolne wyprodukowane przy stosowaniu dodatku azotanów do mleka serowarskiego.

Słowa kluczowe: sery podpuszczkowe dojrzewające, azotany(V), solanka, ocena sensoryczna, ocena mikrobiologiczna

Wprowadzenie

Jakość serów uwarunkowana jest takimi czynnikami, jak: jakość surowca, jakość stosowanych dodatków: kultur bakteryjnych - zakwasów, podpuszczki lub innych preparatów enzymatycznych, barwników, czy też KNO_3, $CaCl_2$; przeprowadzenie procesu technologicznego zgodnie z instrukcją, odpowiednia pielęgnacja podczas dojrzewania i przechowywania serów [2, 3, 28].

Dr inż. E. Stasiuk, prof. dr hab. inż. P. Przybyłowski, Katedra Towaroznawstwa i Ładunkoznawstwa, Akademia Morska w Gdyni, ul.Morska 83, 81-225 Gdynia

Produkcja serów ma także aspekty ekologiczne, głównie związane z zagospodarowaniem serwatki jako produktu ubocznego. Dodana do mleka serowarskiego saletra potasowa w dużej części przechodzi do serwatki, ograniczając jej dalsze wykorzystanie w przemyśle spożywczym.

W niniejszej pracy zastosowano nowy sposób stosowania KNO_3, polegający na jego dodatku do solanki, a nie do mleka serowarskiego. Następnie porównano jakość tak wyprodukowanych serów z jakością serów wyprodukowanych tradycyjną metodą stosowania KNO_3.

Celem pracy było więc stwierdzenie, jak wpływa zmodyfikowany sposób stosowania KNO_3 w produkcji sera podpuszczkowego na jego jakość.

Materiał i metody badań

Badania przeprowadzono w skali przemysłowej w Zakładzie Mleczarskim „Pasłęk ICC SERY", gdzie wyprodukowano sery podpuszczkowe dojrzewające typu holenderskiego (gouda) i typu szwajcarskiego (tykociński).

W pierwszym etapie badań wyprodukowano sery gouda I wg następującego układu doświadczalnego:

A – sery wyprodukowane z mleka bez dodatku KNO_3, po prasowaniu umieszczano w solance zawierającej 0,02% KNO_3,

B – sery wyprodukowane z mleka bez dodatku KNO_3, po prasowaniu umieszczano w solance zawierającej 0,04% KNO_3,

C – sery wyprodukowane z mleka bez dodatku KNO_3, po prasowaniu umieszczano w solance zawierającej 0,06% KNO_3,

K – sery kontrolne wyprodukowane z mleka, do którego dodano KNO_3 w ilości 0,02% i po prasowaniu solono w solance bez dodatku KNO_3.

W drugim etapie badań wyprodukowano ser tykociński wg następującego modelu doświadczenia:

A – sery wyprodukowane z mleka bez dodatku KNO_3, po prasowaniu umieszczano w solance o stężeniu KNO_3 – 0,05%,

B – sery wyprodukowane z mleka bez dodatku KNO_3, po prasowaniu umieszczano w solance o stężeniu KNO_3 – 0,10%,

C – sery wyprodukowane z mleka bez dodatku KNO_3, po prasowaniu umieszczano w solance o stężeniu KNO_3 – 0,15%,

D – sery wyprodukowane z mleka bez dodatku KNO_3, po prasowaniu umieszczano w solance bez dodatku KNO_3,

K – sery kontrolne wyprodukowane z mleka, do którego dodano KNO_3 w ilości 0,01%, po prasowaniu umieszczano w solance bez dodatku KNO_3.

Trzeci etap badań obejmował produkcję sera gouda II wg modelu doświadczenia, jak podano wyżej, z tym, że ser wariantu kontrolnego wyprodukowano z mleka zawierającego dodatek KNO_3 w ilości 0,02%.

Mleko do produkcji serów pasteryzowano w temp. 72–75ºC przez 15–20 s i następnie magazynowano (12 do 24 godz.), po czym przed procesem produkcji sera ponownie mleko pasteryzowano w tych samych warunkach.

Każdy z powyższych modeli doświadczalnych powtarzano 3-krotnie. Badania przeprowadzano w sezonie jesiennym.

Ogółem wyprodukowano ser w 36 wariantach doświadczalnych, a analizom fizykochemicznym i mikrobiologicznym poddano 435 próbek. Próbki do badań pobierano z następujących miejsc bloku sera: sera gouda I – z warstwy zewnętrznej, środkowej i rdzenia; ser tykociński – z warstwy zewnętrznej i rdzenia; ser gouda II – uśredniona próbka z ¼ bloku sera. Wyniki badań danego sera z poszczególnych miejsc poboru próbek uśredniano.

Analizy mikrobiologiczne wykonywano wg Polskiej Normy [14]. Posiewy wykonywano po sporządzeniu rozcieńczenia próbek z płynem Ringera w stosunku 1:10. Bakterie z grupy coli oznaczano na podłożu z żółcią i zielenią brylantową (BGLB). Posiewy inkubowano w temp. 37ºC (310 K) przez 48 godz. Natomiast bakterie przetrwalnikujące beztlenowe oznaczano na podłożu: agar bulionowy z glukozą i 1% ekstraktem drożdżowym. Odpowiednie rozcieńczenia wysiewano do probówek po uprzedniej pasteryzacji w temp. 80ºC (353 K) przez 10 min. Posiewy zalewano agarem i inkubowano w temp. 37ºC (310 K) przez 5 dni. Obecnie zalecane są następujące normy dotyczące oznaczeń: PN-ISO 4832 (bakterie z grupy coli) i PN-93/A-86034.12 (bakterie przetrwalnikujące) [9, 15, 16].

Ocenę sensoryczną serów przeprowadziły zespoły złożone z 5 lub 6 osób. Podczas oceny sensorycznej uwzględniono następujące wyróżniki jakościowe: kształt, wygląd, konsystencję, oczkowanie, smak, zapach oraz barwę. Sery kwalifikowano zgodnie z wymogami zawartymi w Polskiej Normie PN-68/A-86230 [13].

Wyniki i dyskusja

Zagadnieniu jakości mleka jako surowca do produkcji serów poświęcono w literaturze wiele uwagi [1, 4, 18, 19, 26]. Wiadomo bowiem, że jakość zarówno serów, jak i innych produktów mleczarskich zależy w dużym stopniu od cech fizykochemicznych i stanu mikrobiologicznego mleka surowego. Wyniki oceny mikrobiologicznej mleka repasteryzowanego przeznaczonego do produkcji serów przedstawiono w tab. 1.

Kwasowość potencjalna mleka repasteryzowanego przeznaczonego do produkcji serów gouda I, tykocińskiego i gouda II była prawidłowa i wynosiła odpowiednio: od 6,2 do 6,6ºSH, od 7,0 do 7,9ºSH i 6,8ºSH.

Tabela 1

Charakterystyka fizykochemiczna i mikrobiologiczna mleka repasteryzowanego przeznaczonego do produkcji serów.
Physical & chemical and microbiological characterization of re-pasteurized milk designed for manufacturing cheeses.

Rodzaj próbki Type of a sample	Seria badań Series of examinations	Kwasowość Acidity [°SH]	Miano coli Coli-group bacteria	Miano bakterii przetrwalnikujących Spore-forming bacteria
Mleko do produkcji sera gouda I / Milk to manufacture the Gouda I cheese	I	6,2	nb	nb
	II	6,4	nb	nb
	III	6,6	nb	nb
Mleko do produkcji sera tykocińskiego Milk to manufacture the Tykocinski cheese	I	7,3	nb	nb
	II	7,9	nb	nb
	III	7,0	nb	nb
Mleko do produkcji sera gouda II Milk to manufacture the Gouda II cheese	I	6,8	nb	ob w 0,1
	II	6,8	nb	nb
	III	6,8	ob w 0,1	nb

Objaśnienia: / Explanatory notes:
nb - nieobecne w 0,1cm^3 / absent in 0.1cm^3.
Wyniki podane w tabeli stanowią wartości średnie z trzech próbek / Values as given in the table represent the mean value of three samples analyzed.

Jakość mikrobiologiczna mleka repasteryzowanego przeznaczonego do produkcji serów była zróżnicowana. Wykazano, że w przypadku produkcji sera gouda I i tykocińskiego zarówno bakterie z grupy coli, jak i bakterie beztlenowe przetrwalnikujące były nieobecne w rozcieńczeniu 0,1 cm^3. Świadczy to o dobrej jakości mikrobiologicznej tego mleka, jak również o skutecznej pasteryzacji. Natomiast w mleku przeznaczonym do produkcji sera gouda II stwierdzono (seria III) obecność bakterii z grupy coli w rozcieńczeniu 0,1 cm^3 oraz obecność bakterii przetrwalnikujących beztlenowych w 0,1 cm^3 (seria I). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono obecności bakterii zarówno z grupy coli, jak i beztlenowców przetrwalnikujących. Tak więc jedynie mleko przeznaczone do produkcji sera gouda II było gorszej jakości mikrobiologicznej.

Stopień zanieczyszczenia mleka pałeczkami z grupy coli jest wskaźnikiem stanu sanitarnego doju oraz warunków procesu technologicznego. Podczas pasteryzacji bakterie z grupy coli giną, jednak zdarza się, że mogą one wystąpić w mleku pasteryzowanym. Jest to najczęściej spowodowane wtórnym zakażeniem mleka bakteriami pochodzącymi z niedokładnie umytych urządzeń mleczarskich i opakowań [22, 24, 29].

Podsumowując należy stwierdzić, że mleko repasteryzowane przeznaczone do produkcji serów: gouda I, tykociński i gouda II charakteryzowało się dobrą jakością mikrobiologiczną w każdej z trzech serii badawczych.

Oceniono też jakość mikrobiologiczną niektórych solanek. Wyniki przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Charakterystyka mikrobiologiczna solanek.
Microbiological characterization of brines.

Ser Cheese	Seria Series	Warianty doświadczenia Experiment variants	Miano coli Coli-group bacteria		Miano bakterii przetrwalnikujących Spore-forming bacteria	
			1	2	1	2
Gouda I	I	A	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
		B	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}
		C	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}
	II	A	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}
		B	10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}
		C	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
	III	A	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}
		B	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
		C	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
Tykociński	I	A	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
		B	nb	nb	nb	nb
		C	nb	nb	nb	nb
		D	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}

Objaśnienia: / Explanatory notes:
1 - przed soleniem / prior to salting;
2 - po soleniu / after salting
Wyniki podane w tabeli stanowią wartości średnie z trzech próbek / Values as given in the table represent the mean value of three samples analyzed.

Miano coli i bakterii przetrwalnikujących beztlenowych solanek nie różniło się znacząco przed i po procesie solenia serów. W solankach do serów gouda I miano coli wynosiło od 10^{-1} do 10^{-3}, a miano bakterii przetrwalnikujących beztlenowych od 10^{-1} do 10^{-2}. W przypadku sera tykocińskiego wartości te były o rząd wielkości niższe i wynosiły: miano coli od nieobecne do obecne w 10^{-2}, a miano bakterii przetrwalnikujących beztlenowych od nb. do obecne w 10^{-1}. Jakość mikrobiologiczna przygotowanych kąpieli solankowo-azotanowych w dużym stopniu zależała od jakości solanki zakładowej używanej w produkcji od kilku miesięcy. Ogólnie jakość tej solanki można ocenić jako dobrą.

Wyniki oceny mikrobiologicznej serów gouda I, tykocińskiego i gouda II przedstawiono w tab. 3., 4. i 5.

W ocenie mikrobiologicznej serów ujęto dwa wyróżniki – miano coli oraz miano bakterii beztlenowych przetrwalnikujących.

Tabela 3

Jakość mikrobiologiczna sera gouda I.
Microbiological quality of the Gouda I cheese.

Wariant doświadczenia Experiment variants	Miano bakterii z grupy coli Coli-group bacteria					Miano bakterii beztlenowych przetrwalnikujących Spore-forming bacteria				
	po prasowaniu after pressing	po soleniu after salting	po 2 tyg. after 2 weeks	po 4 tyg. after 4 weeks	po 6 tyg. after 6 weeks	po prasowaniu after pressing	po soleniu after salting	po 2 tyg. after 2 weeks	po 4 tyg. after 4 weeks	po 6 tyg. after 6 weeks
seria I / series I										
A	10^{-3}	nb	nb	nb	nb	nb	10^{-1}	nb	nb	nb
B	10^{-3}	nb	nb	nb	nb	nb	10^{-1}	nb	nb	nb
C	10^{-3}	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
K	10^{-3}	10^{-1}	-	-	10^{-1}	nb	nb	-	-	nb
seria II / series II										
A	10^{-2}	10^{-1}	nb	nb	nb	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}	nb
B	10^{-2}	nb	nb	nb	nb	10^{-1}	10^{-1}	nb	nb	nb
C	10^{-2-}	nb	nb	nb	nb	10^{-1}	nb	nb	nb	nb
K	10^{-2}	10^{-1}	-	-	10^{-1}	nb	nb	-	-	nb
seria III / series III										
A	10^{-4}	10^{-2}	nb	nb	nb	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	nb
B	10^{-1}	10^{-1}	nb	nb	nb	10^{-1}	nb	nb	nb	nb
C	10^{-4}	10^{-1}	nb	nb	nb	10^{-1}	nb	nb	nb	nb
K	10^{-3}	10^{-2}	-	-	10^{-1}	nb	nb	-	-	nb

Objaśnienia: / Explanatory notes:
nb - nieobecne w rozc. 10^{-1} / absent in 10^{-1} cm^3 solution;
nie badano / not analyzed;
Wyniki podane w tabeli stanowią wartości średnie z trzech próbek / Values as given in the table represent the mean value of three samples analyzed.

Tabela 4

Jakość mikrobiologiczna sera tykocińskiego.

Microbiological quality of the Tykocinski cheese.

Wariant doświadczenia Experiment variants	Miano bakterii z grupy coli Coli-group bacteria				Miano bakterii beztlenowych przetrwalnikujących Spore-forming bacteria			
	po prasowaniu after presing	po soleniu after salting	po 4 tyg. after 4 weeks	po 6 tyg. after 6 weeks	po prasowaniu after presing	po soleniu after salting	po 4 tyg. after 4 weeks	po 6 tyg. after 6 weeks
seria I / series I								
A	10^{-2}	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
B	10^{-2}	nb	nb	nb	nb	10^{-3}	nb	nb
C	10^{-2}	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
D	10^{-2}	nb	nb	nb	nb	10^{-3}	nb	nb
K	10^{-2}	10^{-1}	nb	nb	nb	nb	nb	nb
seria II / series II								
A	10^{-1}	nb	nb	nb	nb	10^{-3}	nb	nb
B	10^{-1}	nb	nb	nb	nb	10^{-2}	nb	nb
C	10^{-1}	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
D	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	nb	nb	10^{-2}	nb	nb
K	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	nb	nb	10^{-3}	nb	nb
seria III / series III								
A	10^{-1}	nb	nb	nb	nb	10^{-1}	nb	nb
B	10^{-1}	nb	nb	nb	nb	10^{-1}	nb	nb
C	10^{-1}	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	nb	nb	10^{-2}	nb	nb
K	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	nb	nb	nb	nb	nb

Objaśnienia jak w tab. 3. / Explanatory notes as in Tab. 3.

Tabela 5

Jakość mikrobiologiczna serów gouda II.

Microbiological quality of the Gouda II cheese.

Wariant doświadczenia Experiment variants	Miano bakterii z grupy coli Coli-group bacteria		Miano bakterii beztlenowych przetrwalnikujących Spore-forming bacteria	
	po soleniu after salting	po 6 tyg. after 6 weeks	po soleniu after salting	po 6 tyg. after 6 weeks
seria I / series I				
A	10^{-5}	10^{-4}	10^{-1}	nb
B	10^{-5}	10^{-3}	10^{-1}	nb
C	10^{-4}	10^{-4}	10^{-1}	nb
D	10^{-4}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-1}
K	10^{-4}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-1}
seria II / series II				
A	10^{-3}	10^{-3}	nb	nb
B	10^{-5}	10^{-2}	10^{-1}	nb
C	10^{-5}	10^{-3}	nb	nb
D	10^{-4}	10^{-2}	nb	nb
K	10^{-5}	10^{-4}	10^{-1}	10^{-1}
seria III / series III				
A	10^{-5}	10^{-3}	10^{-1}	nb
B	10^{-5}	10^{-3}	10^{-1}	nb
C	10^{-5}	10^{-4}	10^{-1}	nb
D	10^{-5}	10^{-4}	nb	nb
K	10^{-5}	10^{-4}	10^{-1}	nb

Objaśnienia jak w tab. 3. / Explanatory notes as in Tab. 3.

W serach gouda I wszystkich wariantów doświadczalnych po soleniu zaobserwowano zmniejszenie populacji bakterii z grupy coli. Próbki sera po prasowaniu wykazywały miano coli od 10^{-1} do 10^{-4}, natomiast po soleniu od nieobecne w 10^{-1} do obecne w 10^{-2}. Po 2 tygodniach dojrzewania miano coli wszystkich serów wariantów A, B i C wynosiło – nieobecne w 10^{-1}.

Miano bakterii beztlenowych przetrwalnikujących po soleniu wynosiło od nieobecne w 10^{-1} do obecne w 10^{-1} g. Zaobserwowano, że po procesie solenia serów w solance wariantu C następował całkowity zanik tych bakterii.

Dojrzałe sery gouda I charakteryzowały się wysoką jakością mikrobiologiczną i tylko w przypadku serów wariantu kontrolnego stwierdzono obecność bakterii z grupy coli w rozcieńczeniu 10^{-1}. Można więc stwierdzić, że dodatek saletry do mleka wpłynął tylko w niewielkim stopniu na zahamowanie rozwoju bakterii z grupy coli. Zakrzewski i wsp. [25] stwierdzili nawet stymulujący wpływ azotanów na rozwój tych bakterii.

Przybyłowski i wsp. [20] wykazali, że liczba bakterii z grupy coli w serach po ich uformowaniu nie była zależna od liczby tych bakterii w mleku pasteryzowanym, a od ilości dodanej saletry do mleka. Dodatek azotanów(V) wpływał nawet stymulująco na rozwój tych bakterii, o czym świadczy wyższe miano bakterii z grupy coli w większości próbek serów wyprodukowanych z dodatkiem KNO_3. Zjawisko to wystąpiło przede wszystkim w serach po uformowaniu i soleniu, natomiast w dojrzałych serach nie stwierdzano już jednoznacznego oddziaływania saletry na rozwój bakterii z grupy coli. Zakrzewski i wsp. [25] również nie stwierdzili jednoznacznego wpływu ilości saletry dodanej do mleka na miano coli serów.

Natomiast solenie serów w solance zawierającej KNO_3 dość skutecznie ograniczyło rozwój bakterii grupy coli, jak również bakterii przetrwalnikujących beztlenowych (tab. 3). Jedynie w dojrzałych serach wariantu kontrolnego (z dodatkiem saletry do mleka) stwierdzano obecność bakterii z grupy coli w rozcieńczeniu 10^{-1} wszystkich trzech serii doświadczalnych.

W próbkach sera tykocińskiego miano coli po prasowaniu wynosiło od 10^{-1} do 10^{-2}, co może wynikać z wtórnego zakażenia mleka podczas obróbki w kotłach serowarskich oraz masy serowej podczas wlewania jej do wanien prasujących. Miano bakterii przetrwalnikujących beztlenowych kształtowało się na poziomie nieobecne w 10^{-1} g.

Analiza mikrobiologiczna sera tykocińskiego po soleniu wykazała, że sery wariantów doświadczalnych A, B i C nie zawierały bakterii z grupy coli w rozcieńczeniu 10^{-1}. Natomiast w serach wariantów doświadczalnych D i K stwierdzono obecność tych bakterii w rozcieńczeniu 10^{-1}–10^{-3}. Świadczy to o hamującym wpływie azotanów(V) obecnych w solance na rozwój bakterii coli.

Zauważono jednak, że podczas dojrzewania serów wariantów D i K bakterie z grupy coli zmniejszały swoją populację. Po 4 tygodniach dojrzewania miano coli badanych próbek tych serów wynosiło od nieobecne w 10^{-1} do obecne w 10^{-1}. Natomiast w serach dojrzałych (po 6 tygodniach) nie stwierdzono już obecności bakterii z grupy coli zarówno w serach wariantów doświadczalnych A, B, C, jak i D i K.

Miano bakterii przetrwalnikujących beztlenowych sera tykocińskiego po prasowaniu wynosiło nieobecne w 10^{-1} w przypadku wszystkich wariantów doświadczalnych. Po soleniu serów w solance zawierającej duże, jak i małe stężenia azotanów(V) miano bakterii przetrwalnikujących wzrosło od 10^{-1} do 10^{-3}. Natomiast po 4 tygodniach dojrzewania nastąpił całkowity zanik tych bakterii i po 6 tygodniach wszystkie sery wykazywały miano niebecne w 10^{-1} g.

Badania te nie potwierdziły w sposób jednoznaczny hamującego wpływu azotanów(V) na rozwój bakterii przetrwalnikujących. Podobne rezultaty otrzymali Pluta i wsp. [12], nie stwierdzając jednoznacznego hamującego wpływu dodatku saletry na rozwój przetrwalników w serach.

Jakubczyk [7, 8] wiąże jakość sera dojrzewającego z obecnością bakterii przetrwalnikujących beztlenowych i stwierdza, że obecność przetrwalników może wynikać z zawartości soli w masie sera oraz rodzaju zastosowanej szczepionki.

Sery gouda II charakteryzowały się gorszą jakością mikrobiologiczną w porównaniu z serami gouda I i tykocińskim. W serach gouda II po soleniu miano coli wynosiło od 10^{-3} do 10^{-5}. Można to wiązać z gorszą jakością mikrobiologiczną mleka przeznaczonego do produkcji tych serów, a także z możliwością wtórnego zakażenia mleka repasteryzowanego.

W czasie dojrzewania serów obserwowano zmniejszenie liczebności bakterii z grupy coli. Po 6 tygodniach dojrzewania miano coli wynosiło od 10^{-2} do 10^{-4}. Tylko w 2 przypadkach miano coli po 6 tygodniach nie pozostało na niezmienionym poziomie w porównaniu z wartością po soleniu: wariant C seria I – 10^{-4} i wariant A seria II – 10^{-3}. Tak więc i w tym przypadku nie można jednoznacznie stwierdzić hamującego wpływu azotanów(V) na bakterie z grupy coli.

Miano bakterii beztlenowych przetrwalnikujących w serach gouda II po soleniu wynosiło od nieobecne w 10^{-1} do obecne w 10^{-1}g. Bakterie przetrwalnikujące nieobecne były tylko w serach serii II wariantu A, C i D oraz w wariancie D serii III. Natomiast w dojrzałych serach doświadczalnych wariantów A, B i C nie stwierdzono obecności przetrwalników. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że wpłynęły na to jony NO_3^-, które przeniknęły z solanki do miąższu sera. Jedynie w serach wariantu kontrolnego K serii I i II oraz wariantu D serii I stwierdzono obecność bakterii przetrwalnikujących w 0,1 g.

Działanie azotanów(III) na bakterie przetrwalnikujące może być uwarunkowane wielkością populacji i aktywnością bakterii z grupy coli, kwasowością środowiska, zawartością soli, aktywnością wody, aktywnością oksydazy ksantynowej, temperaturą dojrzewania serów [21, 23].

Wydaje się, że właśnie dość mała zawartość azotanów (III) i (V) w serach krajowych w porównaniu z serami z Danii i Holandii wynika z dużego zakażenia mleka i serów bakteriami z grupy coli, które intensywnie redukują azotany(V) [10, 11]. Zmarlicki [27] podaje, że z przebadanych na rynku warszawskim serów, sery importowane charakteryzowały się zwykle wyższą jakością mikrobiologiczną. Tylko w 5% próbek stwierdzono obecność bakterii *E. coli*, natomiast w próbkach serów krajowych w 51%.

Wyniki oceny sensorycznej serów wyprodukowanych zmodyfikowanym sposobem stosowania saletry potasowej przedstawiono w tab. 6.

Tabela 6

Wyniki sensorycznej oceny serów dojrzałych.
Sensory evaluation results of ripe cheeses.

Wariant dośw.	Seria	Klasa serów / Class cheeses

Experiment variants	Series	Gouda I	Tykociński	Gouda II
A	I	II	I	I
	II	I	I	I
	III	II	II	I
B	I	II	II	I
	II	I	II	I
	III	II	I	II
C	I	I	II	I
	II	II	Poza klasą Out of class	I
	III	II	I	I
D	I	-	II	II
	II	-	II	II
	III	-	II	I
K	I	II	II	II
	II	II	Poza klasą Out of class	II
	III	I	Poza klasą Out of class	II

Objaśnienia: / Explanatory notes:
Wyniki podane w tabeli stanowią wartości średnie z trzech próbek / Values as given in the table represent the mean value of three samples analyzed.

Ocena sensoryczna wykazała, że sery gouda I wariantów doświadczalnych A, B i C wykazywały cechy sera ementalskiego. Barwa serów i skórka były prawidłowe. Zapach i smak był łagodny, orzechowy, typowy dla sera ementalskiego. Sery miały duże oczka przez co wygląd zewnętrzny i kształt tych serów nadawał im oznaki wzdęcia. Będące przedmiotem badań sery cieszyły się wysokim stopniem akceptacji wśród konsumentów. Spośród wszystkich rodzajów sera oferowanych przez Zakład Mleczarski w Pasłęku sery wyprodukowane wg wariantów doświadczalnych były bardziej preferowane przez konsumentów i handlowców niż sery z mleka z dodatkiem KNO_3. Sery te mogłyby być wprowadzone do obrotu handlowego jako tzw. mini-ementaler (ze względu na wielkość bloków). Stwierdzone więc w ocenie serów cechy sera ementalskiego (zapach orzechowy, oczka duże i liczne) umożliwiły sklasyfikowanie wszystkich serów wariantu A, B i C jako wyrobów I i II klasy. Cechy typowe dla sera ementalskiego były skutkiem użycia zakwasu zawierającego m.in. bakterie propionowe. Natomiast sery wariantu kontrolnego zakwalifikowano jako sery gouda I i II klasy. Sery te nie wykazywały cech sera ementalskiego, bowiem dodatek

KNO_3 do mleka w ilości 0,02% uniemożliwił rozwój bakterii propionowych w miąższu sera i wykształcenie się cech typowych dla tego rodzaju sera.

Przeprowadzona ocena sensoryczna wykazała, że sery wszystkich wariantów doświadczalnych miały cechy typowe dla sera tykocińskiego tj.: smak słodki, lekko orzechowy, zapach czysty, łagodny. Jedynie sery wariantu K (kontrolny) serii II i III zostały zdyskwalifikowane ze względu na obcy nieprzyjemny zapach i pikantny, gorzki smak. Sery pozostałych wariantów doświadczalnych miały prawidłowy wygląd zewnętrzny, oczka były duże (wielkości czereśni), liczne i połyskliwe. Na niektórych blokach serów stwierdzono nieliczne pęknięcia na brzegach. Konsystencja ocenianych serów była elastyczna, sprężysta w całej masie. Większość ocenianych serów doświadczalnych wariantów A, B i C została zakwalifikowana do I i II klasy jakości. Jedynie sery wariantu C II zdyskwalifikowano ze względu na nietypowy, bardzo słodki smak oraz nieprawidłowe oczkowanie (liczna orzeszyna). Ogólnie sery cechowały się wysoką akceptacją osób oceniających je sensorycznie.

Przeprowadzona ocena sensoryczna serów gouda II wyprodukowanych w ramach I i II serii badań wykazała, że sery wariantów A, B i C miały cechy sera gouda. Oczkowanie było regularne, oczka były okrągłe i drobne, tylko czasami występowały pojedyncze orzeszynowate. Sery miały konsystencję elastyczną, sprężystą, jednolitą w całej masie. Jedynie w wariancie C miąższ serów był lekko twardy. Smak i zapach ocenianych serów był łagodny, lekko orzechowy, typowy dla sera gouda. Dlatego też sery wariantu A, B i C zakwalifikowano do klasy I. Natomiast ser wariantu K zakwalifikowano do II klasy jakości. Charakteryzował się on twardą konsystencją, brakiem lub bardzo małymi oczkami, jałowym smakiem i zapachem. Ser wariantu D miał cechy podobne do wariantu K. Dlatego sery te także zakwalifikowano do II klasy jakości.

Z kolei ocena sensoryczna serów gouda II serii III badań wykazała, że sery te podobnie jak sery gouda I wykazały cechy sera ementalskiego. W miąższu tych serów wykształciły się liczne, duże, owalne oczka. Smak był słodkawy, a w niektórych przypadkach lekko pikantny (wariant B i C). Były to cechy typowe dla sera typu szwajcarskiego i było to efektem użycia zakwasu zawierającego bakterie propionowe. Sery te zakwalifikowano do I i II klasy jakości.

Ocena sensoryczna potwierdziła w badanych wyrobach cechy serów szwajcarskich (sery gouda I i sery gouda II serii III). W obu tych przypadkach stosowano zakwas na bazie kultur mrożonych, pochodzących z Zakładu Doświadczalnego Instytutu Mleczarstwa w Garwolinie, który jest także wykorzystywany do produkcji serów typu szwajcarskiego. Zakwas ten zawierał dodatek bakterii propionowych odpowiedzialnych za powstawanie słodkawego smaku i dużych oczek w serze. Ich rozwój był jednak możliwy tylko w serach wyprodukowanych z mleka bez dodatku KNO_3.

Podsumowując wyniki tej oceny należy stwierdzić, iż możliwe jest wyprodukowanie serów dobrej jakości bez dodatku KNO_3 do mleka, co pozwala

również na otrzymanie serwatki częściowo lub całkowicie wolnej od azotanów (V) i (III). Taką serwatkę można przeznaczyć do produkcji koncentratu białek serwatkowych, poszukiwanego dodatku do żywności [5, 6, 17, 30].

Wnioski

1. Dodatek KNO_3 do solanki umożliwia wyprodukowanie serów twardych typu szwajcarskiego i holenderskiego o dobrych cechach jakościowych. Dyfuzja azotanów(V) z solanki do miąższu sera gwarantowała hamowanie rozwoju bakterii z grupy coli i bakterii fermentacji masłowej podczas solenia i dojrzewania serów.
2. Sery wyprodukowane wg tak zmodyfikowanego sposobu stosowania KNO_3 były klasyfikowane do wyższej klasy jakości niż sery wyprodukowane z dodatkiem KNO_3 do mleka.
3. Zmodyfikowany sposób stosowania KNO_3 przyczynia się do uzyskanie bezazotanowej serwatki, której możliwości wykorzystania w przemyśle spożywczym są bardzo szerokie.

Literatura

[1] Bonczar G., Tomalski J.: Ocena jakości mleka surowego na podstawie wybranych parametrów. Przegl. Mlecz., 1994, **2**, 35-37.
[2] Cichosz G.: Jakość sera gouda w zależności od formy kultur starterowych. Przegl. Mlecz., 2005, **2**, 4-8.
[3] Cichosz G., Tomera K., Kornacki M.: Wpływ kultur probiotycznych na jakość sensoryczną serów typu holenderskiego. Przegl. Mlecz., 2004, **1**, 10-15.
[4] Czupa S.: MASTITIS „chorobą zawodową" krów mlecznych. Przegl. Mlecz., 1998, **1**, 20-23.
[5] Glibowski P.: Zastosowanie białek serwatkowych w przemyśle spożywczym. Przegl. Mlecz., 2003, **9**, 10-13.
[6] Imbs B.: Produkty z serwatki, rynek światowy i perspektywy. Przem. Spoż., 2002, **11**, 36-37.
[7] Jakubczyk E.: Jakość serów dojrzewających a przetrwalnikujące bakterie beztlenowe. Cz.I. Przegl. Mlecz., 1996, **5**, 137-139.
[8] Jakubczyk E.: Jakość serów dojrzewających a przetrwalnikujące bakterie beztlenowe. Cz.II. Przegl. Mlecz., 1996, **6**, 173-176.
[9] Jakubczyk E., Kosikowska M., Jaworski S.: Mikrobiologiczna ocena przetworów mlecznych metodami referencyjnymi wg Polskiej Normy i metodą PetrifilmTM. Przegl. Mlecz. 1998, **6**, 164-168.
[10] Piątkiewicz A.: Mikroflora mleka i produktów mleczarskich – problem producenta i konsumenta. Przegl. Mlecz., 1988, **6**, 21-23.
[11] Pluta A.: Metody przedłużania trwałości mleka spożywczego. Przegl. Mlecz., 1997, **8**, 221-226.
[12] Pluta A., Gaweł J., Zmarlicki S.: Wpływ dodatku saletry do mleka serowarskiego na bakterie z grupy coli i przetrwalnikujące oraz jakość serów typu holenderskiego. Przegl. Mlecz., 1985, **7**, 25-27.
[13] PN-68/A-86030: Mleko i przetwory mleczarskie. Sery podpuszczkowe dojrzewające.
[14] PN-77/A-86031: Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne.

[15] PN-ISO 4832:1998: Mikrobiologia. Ogólne zasady oznaczania liczby bakterii z grupy coli. Metoda płytkowa.
[16] PN-93/A-86034.12: Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Przetrwalniki bakterii beztlenowych redukujących siarczyny – wykrywanie obecności i oznaczanie najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL).
[17] Przedpełski M., Szpineta D.: Serwatka – wartościowym komponentem żywności funkcjonalnej. Przem. Spoż., 2002, **11**, 38-39.
[18] Przybyłowski P., Sajko W., Kisza J., Janicka B.: Badania występowania azotanów i produktów ich przemian w mleku i wyrobach mleczarskich. Cz.I. Ocena cech fizykochemicznych i jakości mikrobiologicznej mleka stosowanego do wyrobu serów. Roczniki PZH, 1987, **3**, 206-213.
[19] Przybyłowski P., Kisza J., Karłowski K., Sajko W., Urbańska J., Janicka B.: Badania występowania azotanów i produktów ich przemian w mleku i wyrobach mleczarskich. Cz.II. Charakterystyka przemian azotanów i azotynów podczas produkcji i dojrzewania serów typu edamskiego i żuławskiego. Roczniki PZH, 1987, **3**, 214-228.
[20] Przybyłowski P., Śmiechowska M., Steinka I.: Wpływ zróżnicowanego dodatku KNO_3 na jakość sera żuławskiego. Cz.II. Cechy mikrobiologiczne i organoleptyczne sera żuławskiego o różnym dodatku KNO_3. Roczniki PZH, 1991, **1**, 9-13.
[21] Przybyłowski P., Śmiechowska M., Steinka I.: Mikrobiologiczna i organoleptyczna jakość sera gouda wyprodukowanego z mleka o różnym dodatku KNO_3. Przem. Spoż., 1991, **10**, 249-250.
[22] Śmiechowska M., Przybyłowski P.: Application of mathematical functions for determination of nitrate residues in Zulaw, Gouda and Edam type cheese. Milchwissenschaft. 1994, **49 (11)**, 619-622.
[23] Wojciechowski J., Matylla P.: Aktywność wody w wybranych przetworach mleczarskich. Przegl. Mlecz., 1994, **2**, 38-40.
[24] Zając M., Burzyński A.: Mikroflora mleka i jego przetworów. Przegl. Mlecz., 1988, **4**, 5-7.
[25] Zakrzewski E., Zmarlicki S., Gaweł J., Dębska J.: Zmiany zawartości azotanów i azotynów podczas wyrobu i dojrzewania sera. Przem. Spoż., 1984, **8**, 300-303.
[26] Ziajka S., Kroll J., Dzwolak W.: Wpływ surowca na jakość mleka spożywczego. Przegl. Mlecz., 1997, **9**, 262-265.
[27] Zmarlicki S.: Jakość mleka i produktów mlecznych w Polsce – stan obecny i zadania na przyszłość. Przegl. Mlecz., 1997, **2**, 35-37.
[28] Żbikowski Z., Żbikowska A.: Nowe procesy technologiczne w kreowaniu produktów mlecznych. Przegl. Mlecz., 2003, **4**, 130-133.
[29] Żuraw J., Chojnowski W., Jęsiak Z.: Wpływ wybranych czynników technologicznych na jakość sera typu holenderskiego. Przegl. Mlecz., 1995, **12**, 345-350.
[30] Zgłoszenie patentowe nr P 352082 na projekt wynalazczy pt. ”Solenie serów podpuszczkowych dojrzewających typu holenderskiego i szwajcarskiego” – autorzy: P. Przybyłowski, E. Stasiuk, J. Tatarynowicz.

THE IMPACT OF A MODIFIED METHOD WITH KNO_3 APPLIED ON THE SENSORY AND MICROBIOLOGICAL FEATURES OF RIPENING RENNET CHEESES

S u m m a r y

Under the industrial conditions, a ripening rennet cheese was manufactured with a dash of saltpetre added to the brine instead to the milk. The cheese manufactured as described above was microbiologically and organolepticly evaluated. Control cheese samples, manufactured both with no saltpetre and with saltpetre added, served as a material for comparison.

It was stated that the Swiss and Dutch cheese types, manufactured using a modified method with nitrates(V) added, showed a good microbiological quality. The colia bacteria and the butter fermentation bacteria were inhibited in their growth. The ripe Gouda I cheeses, manufactured by a modified method of applying KNO_3, had the counts of coli bacteria and of spore-forming bacteria at the same level, i.e. absent in a 10^{-1} g solution. The results obtained in the case of the ripe cheese of the Tykociński type were similar. The ripe Gouda II cheeses showed a worse microbiological quality compared to Gouda I and Tykocinski cheeses. The count of the spore-forming bacteria was: absent in 10^{-1} g, however, the counts of the coli-group bacteria ranged from 10^{-2} to 10^{-4} g.

Nevertheless, all the cheeses manufactured with the use of the modified method with saltpetre applied were more often classified as cheeses of higher quality. And the control chesses manufactured using nitrates added to milk designed for cheese were more often disqualified (i.e. regarded as out of 'class').

Key words: ripening rennet cheese, nitrates(V), brine, sensory evaluation, microbiological evaluation

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 61 - 69

DOROTA GUMUL, JAROSŁAW KORUS, BOHDAN ACHREMOWICZ

PARAMETRY PROCESU EKSTRUZJI A ZAWARTOŚĆ POLISACHARYDÓW NIESKROBIOWYCH ORAZ AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA OTRĄB ŻYTNICH

S t r e s z c z e n i e

Ekstruzja jest procesem, w wyniku którego zwiększa się w surowcu zbożowym ilość frakcji rozpuszczalnej włókna pokarmowego, działającego hipocholesterolemicznie i hipoglikemicznie na organizm człowieka. Można zatem powiedzieć, że zboża po ekstruzji zyskują dodatkową wartość prozdrowotną. Materiałem do badań były ekstrudaty z otrąb trzech odmian żyta: Amilo, Rostockie i Agrikolo, w których oznaczono zawartość: rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej frakcji włókna pokarmowego, włókna pokarmowego ogółem, pentozanów rozpuszczalnych, nierozpuszczalnych i całkowitych oraz aktywność przeciwutleniającą (przy użyciu ABTS) ekstraktów metanolowo-acetonowych otrzymanych z tych ekstrudatów. Stwierdzono, że zastosowane parametry procesu ekstruzji: 14% wilgotności materiału wyjściowego oraz temp. 120 i 180°C przyczyniły się do zwiększenia zawartości: frakcji rozpuszczalnej włókna pokarmowego, pentozanów rozpuszczalnych i aktywności przeciwutleniającej ekstrudatów z otrąb żytnich.

Słowa kluczowe: żyto, otręby, włókno pokarmowe, pentozany, aktywność przeciwutleniająca

Wprowadzenie

Ziarna roślin zbożowych są nie tylko głównym źródłem węglowodanów złożonych, czyli skrobi, ale zawierają również znaczne ilości polisacharydów nieskrobiowych (NSP), do których zalicza się błonnik pokarmowy [11]. Zarówno błonnik pokarmowy, jak i pentozany często określa się mianem naturalnych substancji nieodżywczych (NSN) spełniających funkcje profilaktyczne i prozdrowotne [10].

Spośród zbóż na szczególną uwagę zasługuje żyto. W porównaniu z ziarnem pszenicy ziarniaki żyta charakteryzują się większą zawartością: frakcji rozpuszczalnej błonnika pokarmowego, w tym pentozanów rozpuszczalnych, składników mineralnych (Ca, Fe, J, F), lizyny, czyli tzw. aminokwasu ograniczającego oraz kwasu oleinowego należącego do NNKT. Ponadto ziarno żyta jest bogatym źródłem witamin z grup B i E [7].

Dr inż. D. Gumul, dr inż. J. Korus, prof. dr hab. B. Achremowicz, Katedra Technologii Węglowodanów, Akademia Rolnicza, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

Ponad 95% światowej produkcji żyta przypada na Europę, stąd można go nazwać „zbożem europejskim" [17], a ilość produkowanego żyta na jednego mieszkańca klasyfikuje Polskę na pierwszym miejscu w świecie Jednak u największego producenta ziarna żyta prawie nie ma chleba żytniego, bowiem około 85% pieczywa rynkowego to chleb mieszany (pszenno-żytni), a istniejące nadwyżki tego zboża zużywa się na paszę [7]. Tymczasem według współczesnej wiedzy żyto jest doskonałym surowcem do produkcji żywności funkcjonalnej [5, 9, 11].

Wdrożenie techniki ekstruzji w ostatnich latach spowodowało wzrost ilości produktów typu przekąskowego oraz zbożowej „galanterii śniadaniowej", które w innych krajach są ogromnie popularne ze względu na walory smakowe, a nade wszystko dietetyczne. Podczas procesu ekstruzji zbóż proporcja między rozpuszczalną frakcją błonnika pokarmowego a frakcją nierozpuszczalną zmienia się na korzyść pierwszej frakcji, dzięki temu wyroby ekstrudowane zyskują dodatkową wartość profilaktyczną i dietetyczną [12]. Jest to niezmiernie ważne, ponieważ produkty zbożowe w żywieniu człowieka są podstawowym źródłem niezbędnych składników odżywczych oraz związków nieodżywczych, których spożycie zapobiega rozwojowi chorób cywilizacyjnych [1, 15].

Celem badań było określenie zawartości rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej frakcji włókna pokarmowego i włókna ogółem oraz pentozanów rozpuszczalnych, nierozpuszczalnych i całkowitych w ekstrudatach z otrąb żytnich, sporządzonych przy różnych parametrach tego procesu oraz określenie aktywności przeciwutleniającej finalnego wyrobu.

Materiał i metody badań

Materiałem do badań były ekstrudaty z otrąb trzech odmian żyta. Otręby uzyskano z laboratoryjnego przemiału trzech odmian żyta: Amilo, Rostockie i Agrikolo, które następnie poddawano procesowi ekstruzji przy wilgotności: 14 i 20%, zastosowano dwa profile temperaturowe: 80/100/120°C i 120/160/180°C. Ekstruzji dokonano w jednoślimakowym ekstruderze typu 20DN firmy Brabender, stosując następujące parametry: obroty ślimaka –190 obr./min, średnica dyszy – 3 mm, sprężenie ślimaka 3:1 i dwa wyżej wymienione profile temperaturowe.

W badanych próbkach ekstrudatów (100% otrąb) sporządzonych z otrąb trzech odmian żyta oznaczano:

- zawartość rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej frakcji włókna pokarmowego i włókno pokarmowe ogółem metodą enzymatyczno-wagową [2],
- zawartość pentozanów rozpuszczalnych, nierozpuszczalnych i całkowitych metodą Hashimoto i wsp. [8],
- aktywność przeciwutleniającą ekstraktów metanolowo-acetonowych otrzymanych z ekstrudatów przy zastosowaniu syntetycznego rodnika ABTS, według metody Re i wsp. [13].

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono zawartość frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej włókna pokarmowego oraz włókna pokarmowego ogółem w ekstrudatach z otrąb żytnich i materiale wyjściowym, który stanowiły otręby trzech odmian żyta.

Tabela 1

Zawartość frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej włókna pokarmowego oraz włókna pokarmowego ogółem w ekstrudatach otrzymanych z otrąb żytnich.
Content of soluble and insoluble fraction of dietary fibre and of the total dietary fibre in rye bran extrudates.

Rodzaj ekstrudatu Type of extrudates	Zawartość frakcji nierozpuszczalnej włókna pokarmowego Content of insoluble fraction of dietary fibre [%]	Zawartość frakcji rozpuszczalnej włókna pokarmowego Content of soluble fractio of dietary fibre [%]	Zawartość włókna pokarmowego ogółem Content of total dietary fibre [%]
*OA**	21,53 f**	3,90 a	25,43 cd
OA14/120*	20,28 de	5,03 c	25,31 cd
OA14/180	19,43 cd	5,43 cd	24,65 c
OA20/120	20,56 ef	5,22 cd	25,99 cd
OA20/180	20,76 ef	4,92 bc	25,68 d
OR*	20,43 e	3,67 a	24,10 c
OR14/120	17,47 a	5,41 cd	22,65 b
OR14/180	17,29 a	5,96 d	23,25 bc
OR20/120	17,76 ab	5,18 cd	23,17 b
OR20/180	18,12 ab	5,22 cd	23,34 bc
OEA*	20,57 ef	3,64 a	24,21 c
OEA14/120	17,95 ab	4,26 b	22,21 ab
OEA14/180	18,11 ab	3,62 a	21,63 ab
OEA20/120	18,72 bc	4,02 ab	22,74 b
OEA20/180	18,27 ab	3,89 ab	20,13 a

*OA14/120 - ekstrudat z otrąb żytnich odmiany Amilo, otrzymany z materiału wyjściowego o wilgotności 14%, w temp.120ºC, analogicznie pozostałe skróty, OA – otręby z żyta odmiany Amilo, OR – otręby z żyta odmiany Rostockie, OEA – otręby z żyta odmiany Agrikolo.
OA14/120 - rye bran extrudate of the Amilo variety obtained from a raw material of 14% of moisture, at 120ºC; other abbreviations are similar; OA – rye bran of the Amilo variety; OR – rye bran of the Rostockie variety; OEA – rye bran of the Agrikolo variety.
**Różne litery oznaczają wartości średnie różniące się statystycznie istotnie miedzy sobą (test Duncana, przy poziomie istotności p = 0,05).
Different letters denote mean values differing statistically significantly among themselves (Duncan test, at a significance level of p = 0.05).

Stwierdzono, że zawartość frakcji rozpuszczalnej w otrębach wzrosła w zakresie od 7 do 47% po procesie ekstruzji, w odniesieniu do materiału nieprzetworzonego. W ekstrudatach z otrąb żytnich odmiany Amilo i Rostockie największy wzrost tej frakcji

włókna pokarmowego nastąpił przy 14% wilgotności materiału wyjściowego i zastosowaniu temp. procesu hydrotermicznego: 120 i 180°C. Wyjątek pod tym względem stanowiły ekstrudaty sporządzone z otrąb żyta odmiany Agrikolo, bowiem przy zastosowaniu parametrów procesu ekstruzji: 14% wilgotności i temp.180°C, ilość frakcji rozpuszczalnej okazała się mała i równa zawartości tej frakcji w materiale wyjściowym (tab. 1). Natomiast ilość frakcji nierozpuszczalnej włókna pokarmowego zmniejszyła się w granicach od 5 do 15% we wszystkich analizowanych ekstrudatach z otrąb żytnich w stosunku do materiału wyjściowego, niezależnie od odmiany żyta. Największe zmniejszenie zawartości frakcji nierozpuszczalnej w analizowanych ekstrudatach zaobserwowano przy zastosowaniu parametrów ekstruzji: 14% wilgotności materiału wyjściowego i temp. 120 i 180°C (tab. 1). Te parametry spowodowały największy wzrost frakcji rozpuszczalnej włókna pokarmowego, która tworzy się z frakcji nierozpuszczalnej [6]. Fakt ten można tłumaczyć rozerwaniem podczas ekstruzji wiązań kowalencyjnych i niekowalencyjnych w węglowodanach, co prowadzi do powstania mniejszych i bardziej rozpuszczalnych fragmentów tych węglowodanów [16]. Ponadto efektem ekstruzji było zmniejszenie zawartości włókna pokarmowego ogółem w badanych próbkach ekstrudatów, w stosunku do otrąb trzech odmian żyta. Należy podkreślić, że największą zawartością rozpuszczalnej frakcji włókna pokarmowego o znaczeniu profilaktycznym i prozdrowotnym charakteryzowały się ekstrudaty z otrąb żyta odmiany Amilo i Rostockie, w przeciwieństwie do ekstrudatów otrzymanych z otrąb odmiany Agrikolo. Natomiast najmniejszą zawartość frakcji nierozpuszczalnej i ogólnej włókna pokarmowego oznaczono w ekstrudatach z otrąb dwóch odmiany żyta - Rostockie i Agrikolo.

Głównym składnikiem włókna pokarmowego w ziarnie żyta są pentozany, których spożycie jest ujemnie skorelowane z umieralnością z powodu raka okrężnicy, natomiast zależności między umieralnością z powodu raka okrężnicy i spożyciem włókna ogółem nie są statystycznie istotne [5]. W związku z tym na pentozany zwrócono szczególną uwagę w niniejszej pracy.

Zawartość pentozanów całkowitych i nierozpuszczalnych zmniejszyła się w analizowanych próbkach ekstrudatów w odniesieniu do materiału wyjściowego, w przeciwieństwie do frakcji rozpuszczalnej tego składnika, której ilość półtorakrotnie wzrosła we wszystkich przypadkach (tab. 2).

Ilość pentozanów rozpuszczalnych była większa w ekstrudatach sporządzonych z otrąb o wilgotności 14%, a nawilżenie materiału wyjściowego do 20% powodowało mniejszy przyrost zawartości tego składnika po ekstruzji. We wszystkich badanych ekstrudatach zawartość pentozanów rozpuszczalnych zwiększała się wraz ze wzrostem temperatury ekstruzji za wyjątkiem ekstrudatu z otrąb z żyta odmiany Rostockie, otrzymanego przy parametrach procesu hydrotermicznego: 14% wilgotności i temp. 180ºC (tab. 2). Najmniejszą zawartość frakcji rozpuszczalnej pentozanów stwierdzono

Tabela 2

Zawartość pentozanów rozpuszczalnych, nierozpuszczalnych i całkowitych w ekstrudatach otrzymanych z otrąb żytnich.
Content of soluble and insoluble pentosans and of total pentosans in rye bran extrudates.

Rodzaj ekstrudatu Type of extrudates	Zawartość pentozanów rozpuszczalnych Content of soluble pentosans [%]	Zawartość pentozanów nierozpuszczalnych Content of insoluble pentosans [%]	Zawartość pentozanów całkowitych Content of total pentosans [%]
OA*	3,34 a**	7,30 e	10,65 g
OA 14/120*	4,62 e	5,50 c	10,12 f
OA 14/180	6,29 i	3,43 a	9,72 de
OA 20/120	3,70 c	6,47 d	10,17 f
OA 20/180	4,57 e	6,33 cd	10,91 h
OR*	3,52 b	6,25 d	9,76 e
OR 14/120	5,68 h	3,93 ab	9,62 cd
OR 14/180	4,94 f	4,35 b	9,29 b
OR 20/120	4,06 d	5,48 c	9,53 c
OR 20/180	4,87 f	3,70 ab	8,57 a
OEA*	3,51 b	6,66 d	10,18 f
OEA 14/120	5,00 f	4,53 b	9,54 c
OEA 14/180	5,39 g	4,38 b	9,77 e
OEA 20/120	3,83 c	6,30 cd	10,13 f
OEA 20/180	4,57 e	5,19 c	9,77 e

*OA14/120- ekstrudat z otrąb żytnich odmiany Amilo, otrzymany z materiału wyjściowego o wilgotności 14% w temp. 120ºC, analogicznie pozostałe skróty, OA – otręby z żyta odmiany Amilo, OR – otręby z żyta odmiany Rostockie, OEA – otręby z żyta odmiany Agrikolo.
OA14/120- rye bran extrudate of the Amilo variety obtained from a raw material of 14% of moisture at 120ºC; other abbreviations are similar; OA – rye bran of the Amilo variety; OR – rye bran of the Rostockie variety; OEA – rye bran of the Agrikolo variety.
**Różne litery oznaczają wartości średnie różniące się statystycznie istotnie miedzy sobą (test Duncana, przy poziomie istotności p = 0,05).
Different letters denote mean values differing statistically significant among themselves (Duncan test, at a significance level of p = 0.05).

w ekstrudatach otrzymanych z surowca wyjściowego o największej wilgotności (20%) i niskiej temperaturze ekstruzji (120ºC). Można więc przypuszczać, że takie warunki ekstruzji nie są korzystne z uwagi na zmniejszanie się tej frakcji pentozanów, która pełni funkcje prozdrowotne i profilaktyczne. W związku z tym, aby otrzymać ekstrudaty żytnie o charakterze żywności profilaktycznej należy stosować otręby o wyjściowej wilgotności około 14% oraz temp. 120 i 180ºC. Zawartość pentozanów nierozpuszczalnych gwałtownie zmniejszyła się zwłaszcza w ekstrudatach

otrzymanych z materiału wyjściowego o wilgotności 14%, co było najprawdopodobniej związane z sukcesywnym wzrostem tworzących się ich kosztem pentozanów rozpuszczalnych. Zawartość pentozanów nierozpuszczalnych zmniejszyła się w otrębach w zakresie od 1 do 50% po procesie ekstruzji w stosunku do materiału nieprzetworzonego. Temperatura ekstruzji wpłynęła na znaczne zmniejszenie zawartości pentozanów nierozpuszczalnych w temp. 180°C w porównaniu z temp. 120°C, za wyjątkiem ekstrudatu z otrąb z żyta odmiany Rostockie sporządzonego przy wilgotności 14% materiału wyjściowego i w temp. 180°C (tab. 2). Zawartość pentozanów całkowitych po procesie ekstruzji zmniejszyła się nieznacznie lub pozostała na stałym poziomie w porównaniu z materiałem wyjściowym, który stanowiły otręby trzech odmian żyta. Zarówno wilgotność materiału wyjściowego, jak i temperatura nie wpłynęły w sposób jednoznaczny na zawartość pentozanów całkowitych we wszystkich badanych ekstrudatach (tab. 2).

Można zatem powiedzieć, że wyniki prezentowane w tej pracy, dotyczące przyrostu frakcji rozpuszczalnej włókna pokarmowego i pentozanów rozpuszczalnych w ekstrudatach z otrąb żytnich sporządzonych zwłaszcza przy parametrach procesu ekstruzji: 14% wilgotności i temp. 120 i 180°C, są zgodne z wynikami badań innych autorów [6, 14].

Stwierdzono, że proces ekstruzji włókna pokarmowego (w tym pentozanów) może zmienić nie tylko proporcje pomiędzy frakcją rozpuszczalną a nierozpuszczalną włókna, ale także jego zdolności oddziaływania na przewód pokarmowy. Zmniejszenie się ilości frakcji nierozpuszczalnej pogarsza właściwości balastotwórcze i zdolności oddziaływania na perystaltykę jelit, przy jednoczesnym wzroście frakcji rozpuszczalnej działającej prozdrowotnie na organizm człowieka i chroniącej go przed tzw. „chorobami cywilizacyjnymi" [3, 4, 14, 16]. Ponadto według wielu autorów [4, 12, 16] proces ekstruzji nadaje materiałowi roślinnemu dodatkową wartość dietetyczną i profilaktyczną, co zostało potwierdzone w tej pracy, bowiem zawartość frakcji rozpuszczalnej włókna pokarmowego i pentozanów rozpuszczalnych w ekstrudowanym materiale była zdecydowanie większa niż w materiale nieprzetworzonym (tab. 1 i 2).

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów metanolowo-acetonowych otrzymanych z ekstrudatów z otrąb trzech odmian żyta: Amilo, Rostockie i Ekoagro określono metodą TEAC przy zastosowaniu wolnego rodnika $ABTS^{\cdot+}$ (tab. 3).

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów sporządzonych z ekstrudatów z otrąb żytnich odmiany Amilo i Agrikolo wzrosła przy parametrach ekstruzji 14% wilgotności i temp. 180°C, w przeciwieństwie do pozostałych parametrów, przy których ta aktywność obniżyła się lub nie uległa zmianie (tab. 3). Potencjał przeciw-

Tabela 3

Aktywność przeciwutleniająca ekstrudatów otrzymanych z otrąb żytnich oznaczona przy zastosowaniu wolnego rodnika ABTS.
Antioxidant activity of the rye bran extrudates determined using a free radical ABTS.

Rodzaj ekstrudatu Type of extrudates	TEAC [mg Trolox/g próbki]
OA*	4,05 bc**
OA14/120*	4,02 bc
OA14/180	4,20 cd
OA20/120	3,73 b
OA20/180	4,05 bc
OR*	4,70 ef
OR14/120	5,94 h
OR14/180	5,64 h
OR20/120	3,75 ab
OR20/180	4,94 fg
OEA*	5,25 g
OEA14/120	5,10 g
OEA14/180	6,47 i
OEA20/120	3,47 a
OEA20/180	4,50 de

*OA14/120 - ekstrudat z otrąb żytnich odmiany Amilo, otrzymany z materiału wyjściowego o wilgotności 14% w temp.120ºC, analogicznie pozostałe skróty, OA - otręby z żyta odmiany Amilo, OR - otręby z żyta odmiany Rostockie, OEA –otręby z żyta odmiany Agrikolo.
OA14/120 - rye bran extrudate of the Amilo variety obtained from a raw material of 14% of moisture at 120ºC; other abbreviations are similar; OA - rye bran of the Amilo variety, OR - rye bran of the Rostockie variety, OEA - rye bran of the Agrikolo variety.
**Różne litery oznaczają wartości średnie różniące się statystycznie istotnie miedzy sobą (test Duncana, przy poziomie istotności p = 0,05).
Different letters denote mean values differing statistically significant among themselves (Duncan test, at a significance level of p = 0.05).

utleniający ekstrudatów otrzymanych z otrąb żyta odmiany Rostockie zwiększył się przy parametrach procesu hydrotermicznego: 14% wilgotności i temp. 120°C, 180°C oraz 20% wilgotności i temp. 180°C (tab. 3).

Stwierdzono, że najniższą aktywność przeciwutleniającą wykazały ekstrudaty przy zastosowaniu parametrów ekstruzji 20% wilgotności i temp. 120ºC, a przy parametrach 14% wilgotności i 120ºC następowała stabilizacja potencjału przeciwutleniającego tego materiału roślinnego. Natomiast parametry: 14% wilgotności i temp. 180ºC spowodowały wzrost aktywności przeciwutleniającej ekstrudatów. Wśród wszystkich próbek ekstrudatów największą aktywność przeciwutleniającą wykazały ekstrudaty z otrąb ziarna żyta odmiany Rostockie i Agrikolo, w przeciwieństwie do odmiany Amilo (tab. 3).

Reasumując, stwierdzono, że przy odpowiednim doborze parametrów procesu ekstruzji można zwiększyć zawartość rozpuszczalnej frakcji włókna pokarmowego, w tym pentozanów rozpuszczalnych, oraz aktywność przeciwutleniającą otrąb żytnich.

Wnioski

1. Efektem procesu ekstruzji otrąb żytnich był wzrost zawartości frakcji rozpuszczalnej włókna pokarmowego, przy zastosowaniu parametrów tego procesu: 14% wilgotności materiału wyjściowego oraz temp. 120 i 180ºC .
2. Zastosowanie parametrów procesu ekstruzji: małej wilgotności materiału wyjściowego (14%) i wysokiej temperatury tego procesu (180ºC) wpłynęło na największy wzrost zawartości pentozanów rozpuszczalnych w ekstrudatach, które pełnią funkcje prozdrowotne i profilaktyczne.
3. Stwierdzono korzystny wpływ 14% wilgotności materiału wyjściowego oraz niskiej (120ºC) i wysokiej temperatury (180ºC) na potencjał przeciwutleniający ekstrudatów z otrąb żytnich, przy czym wśród wszystkich badanych próbek największą aktywność przeciwutleniającą wykazały ekstrudaty z otrąb z żyta odmiany Rostockie i Ekoagro.

Praca naukowa finansowana ze środków Ministerstwa Nauki w latach 2004 – 2006 jako projekt badawczy zamawiany – grant KBN nr PBZ-KBN-094/P06/2003/29.

Literatura

[1] Anderson J.W.: Whole grains protect against atherosclerotic cardiovascular disease. Proc. Nutr. Soc., 2003, **62,** 135-142.
[2] AOAC. Official Methods Analysis 16th Edition. Association of Official Analytical Chemist, Arlington VA. 1995.
[3] Asp N. G., Björck I.: The effect of extrusion cooking on nutrition value. Thermal Processing and Quality of Food. Elsevier Applied publisher, London 1984.
[4] Asp N. G., Björck I: Nutritional properties of extruded food. Extrusion Cooking. AACC, Inc. St. Paul, Minesota, USA, 1989, p. 399.
[5] Bartnikowska E., Piesiewicz H.: Rola produktów zbożowych w profilaktyce chorób nowotworowych. Przegl. Piek. Cuk., 1999, **7**, 2-3.
[6] Fornal Ł. Wiaź A., Bakowska B. : Przemiany spolimeryzowanych węglowodanów w czasie ekstruzji. Acta Academiae Agriculture AC Technicae Olstenensis Technol. Alim., 1993, **25**, 125.
[7] Gąsiorowski H.: Żyto – dawne i nowe możliwości jego wykorzystania. Przegl. Zboż. Młyn., 1998, **4**, 2-4.
[8] Hashimoto S., Shogren M.D., Pomeranz Y.: Cereal pentosans: Their estimation and significance. Pentosans in wheat and milled wheat products. Cereal Chem. 1987, **64 (1),** 30 - 34.
[9] Heiniö R. L., Katina K., Wilhelmson A., Myllymäki O., Rejamäki T., Latva-Kala K., Liukkonen K., Poutanen K.: Relationship between sensory perception and flavour-active volatile compounds of germinated sourdough fermented and native rye following the extrusion process. Lebensm-Wiss u-Technol. 2003, **36**, 533-545.
[10] Kozłowska H., Troszyńska A.: Rola naturalnych substancji nieodżywczych pochodzenia roślinnego jako składników żywności funkcjonalnej. Żywność. Technologia. Jakość, 1999, **4 (21**),63-73.

[11] Mielcarz M.: Żywieniowa i technologiczna wartość nieskrobiowej frakcji cukrów (NSP) jako jednego ze składników mąki. Przegl. Zboż. Młyn., 2004, **7,** 10-11.
[12] Mościcki L.: Zmiana właściwości fizykochemicznych surowców roślinnych poddawanych procesowi ekstruzji (Cz. 1. Fizykochemiczne zmiany ekstrudatów). Przegl. Zboż. Młyn., 2002, **6**, 27-29.
[13] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. Free Radical Biology & Medicine, 1999, **26**, 1231-1237.
[14] Schweizer T.F., Reimann S.: Influence on drum drying and twin screw extrusion cooking on wheat carbohydrates. I. A comparison between wheat starch and flours of different extractions. J. Cereal Sci, 1986, **4,** 193-198
[15] Vecchia C.L., Chatenoud L., Negri E., Franceschi S.: Whole grain cereals and cancer in Italy. Proc. Nutr. Soc., 2003, **62,** 45-49.
[16] Wang W. M., Klopfenstein C.F. Ponte J.G.: Effect of twin-screw extrusion on the physical properties of dietary fibre and other components of whole wheat bran and on the baking quality the wheat bran. Cereal Chem., 1993, 70, **6**, 707-711.
[17] Zawadzki K.: Żyto - europejskie zboże wymagające wsparcia. Przegl. Zboż. Młyn., 2002, **10**, 26-27.

PARAMETERS OF THE EXTRUSION PROCESS AND THE CONTENT OF NON-STARCH POLYSACCHARIDES AND THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF RYE BRAN

S u m m a r y

Extrusion is a process during which the content of soluble fraction of a dietary fibre increases; this dietary fibre has a hipocholesterolemic and hypoglicemic effect on the human organism. Therefore, the statement that cereals win an additional health promoting quality after having been extruded is correct. The materials used in this study were rye bran extrudates of three varieties of rye: Amilo, Rostockie, and Agrikolo. In the samples investigated, the following parameters were determined: soluble and insoluble fractions of dietary fibre, total fibre content, soluble and insoluble pentosans, total pentosans, and antioxidant activity of methanol-acetone extracts obtained from these extrudates; the antioxidant activity was determined using ABTS. It was stated that the following extrusion parameters applied: moisture of 14% of the initial original material, and temperatures of 120 and 180°C, attributed to the increase in the content of the soluble fraction of dietary fibre, soluble pentosans, as well as to the higher antioxidative activity of rye bran extrudates.

Keywords: rye, bran, dietary fibre, pentosans, antioxidant activity

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 70 - 82

ZBIGNIEW RZEDZICKI, MAŁGORZATA KASPRZAK

WPŁYW TEMPERATURY OBRÓBKI TERMOPLASTYCZNEJ NA WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE EKSTRUDATÓW Z UDZIAŁEM RAZÓWKI LĘDŹWIANOWEJ (*LATHYRUS SATIVUS*)

S t r e s z c z e n i e

W pracy przedstawiono wyniki badań nad wpływem profilu rozkładu temperatury cylindra ekstrudera na przebieg procesu ekstruzji, możliwości ustabilizowania warunków wytłaczania oraz możliwości modyfikowania właściwości fizycznych ekstrudatów z udziałem razówki lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus*). Jako podstawowy składnik strukturotwórczy zastosowano kaszkę kukurydzianą. Termoplastyczną obróbkę mieszanek surowców przeprowadzono w ekstruderze jednoślimakowym (L:D=12:1, D=45 mm, stopień sprężania 3:1). W otrzymanych ekstrudatach określano stopień ekspandowania promieniowego, gęstość właściwą, teksturę, wodochłonność (WAI) ekstrudatu nierozdrobnionego, wodochłonność (WAI) ekstrudatu rozdrobnionego (ekstrudowanej masy), a także współczynnik rozpuszczalności suchej masy (WSI). Stwierdzono, że przyjęte zakresy temperatury pozwalają na stabilną pracę ekstrudera, chociaż wzrost temperatury ze 115/135/120^{o}C do 155/175/120^{o}C powodował spadek wydajności ekstrudera o około 25%. Wykazano także, że temperatura procesu ma znaczący wpływ na właściwości fizyczne ekstrudatu. Wzrost temperatury cylindra ze 115/135/120^{o}C do 155/175/120^{o}C powodował: spadek ekspandowania promieniowego z 12,6 do 8,9, gęstości właściwej z 75,2 kg/m^3 do 56,9 kg/m^3 przy zachowaniu bardzo dobrej chrupkości ekstrudatu w przedziale 0,3 – 0,35 J/g. Uzyskane ekstrudaty charakteryzowały się bardzo wysoką wodochłonnością; WAI osiągał nawet wartość 873%. Ekstruzja powodowała bardzo intensywne zmiany w rozpuszczalności suchej masy nasilające się wraz ze wzrostem temperatury; wzrost temperatury cylindra ze 115/135/120^{o}C do 155/175/120^{o}C powodował wzrost WSI z 35% nawet do 49%. Wyniki oceny sensorycznej ekstrudatów wykazały, że wprowadzenie 10% dodatku razówki lędźwianowej pozwala znacznie obniżyć temperaturę ekstruzji i uzyskać bardzo dobrej jakości chrupki już przy temp. 135/155/120^{o}C.

Słowa kluczowe: obróbka termoplastyczna, razówka lędźwianowa, ekstrudaty, właściwości fizyczne.

Wprowadzenie

Pod koniec XX w. rynek produktów zbożowych został zdominowany przez wyroby ekstrudowane. Termoplastyczna obróbka surowców znalazła zastosowanie w różnych dziedzinach przemysłu spożywczego, mleczarskiego i paszowego [13, 16]. Tą technologią można pozyskiwać szeroką gamę wyrobów np. chrupki do bezpośredniego spożycia, różnorodną galanterię cukierniczą, błyskawiczne zboża śniadaniowe,

Dr hab. inż. Z. Rzedzicki, prof. AR., mgr inż. M. Kasprzak, Zakład Projektowania Procesów Produkcyjnych, Akademia Rolnicza w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

teksturowane białka roślinne, pieczywo chrupkie, makarony instant, produkty dietetyczne, modyfikowane skrobie i mąki, karmy dla zwierząt, itp. [17]. Podstawą procesu ekstruzji jest upłynnienie przetwarzanej masy, stąd najczęściej używanym surowcem w tej technologii jest surowiec zbożowy najłatwiej upłynniający się - kaszka kukurydziana [4, 5, 7]. Kaszka kukurydziana jest surowcem ubogim w składniki odżywcze, bowiem jest produkowana z obłuszczonego i pozbawionego zarodków ziarna kukurydzy. Surowiec taki jest ubogi w białko, tłuszcze, a przede wszystkim w błonnik pokarmowy (tab. 3). Jak wykazały liczne badania naukowe, spożywanie żywności ubogiej w błonnik pokarmowy wpływa na zwiększenie ryzyka zachorowalności na wiele chorób cywilizacyjnych m.in.: układu krążenia, nowotworów, cukrzycy, otyłości, itp. [1]. Celowe wydaje się więc takie modyfikowanie wsadu surowcowego poddawanego ekstruzji, aby chociaż częściowo zrekompensować niedobory tych składników. Wiele środowisk naukowych, w szczególności trzy kolejne światowe kongresy błonnika pokarmowego, wskazują także na niezwykle istotną rolę biologicznie aktywnych składników błonnika pokarmowego [18]. Szczególnie interesujące są tu nasiona roślin strączkowych np. lędźwianu siewnego, zwanego również soczewicą białą lub ruską. Badania prowadzone przez Rzedzickiego [11] dowodzą, że krajowe odmiany soczewicy białej są bardzo dobrym komponentem do wyrobu chrupek, które mogą być z dużym powodzeniem produkowane przy użyciu nawet ekstrudera jednoślimakowego S-45. Wprowadzenie do mieszanki surowcowej tylko 10% razówki lędźwianowej dostarcza około 3% białka oraz około 3,3% bardzo cennego błonnika pokarmowego, w tym także błonnika rozpuszczalnego o silnym oddziaływaniu probiotycznym. W przeprowadzonych uprzednio badania [14] wykazano także przydatność mieszaniny kaszki kukurydzianej i razówki lędźwianowej w ekstruzji jednoślimakowej w szerokim zakresie wilgotności ekstrudowanej mieszanki.

Celem niniejszej pracy było określenie możliwości ustabilizowania warunków wytłaczania mieszanin (z udziałem 10% lędźwianu) przy zmiennym profilu rozkładu temperatury cylindra ekstrudera, analiza wpływu temperatury cylindra na podstawowe właściwości fizyczne ekstrudatu, zbadanie możliwości modyfikowania podstawowych właściwości fizycznych ekstrudatu, jak również cech sensorycznych. Badano wpływ temperatury cylindra na wydajność ekstrudera, stopień ekspandowania promieniowego ekstrudatu, gęstość właściwą, chrupkość, wodochłonność (WAI) ekstrudowanego produktu, wodochłonność (WAI) ekstrudowanej masy, a także współczynnik rozpuszczalności suchej masy (WSI). Przeprowadzono także ocenę sensoryczną pozyskanych ekstrudatów.

Materiał i metody badań

Głównym surowcem strukturotwórczym była kaszka kukurydziana z pozbawionego zarodków i obłuszczonego ziarna kukurydzy szklistej. Jako surowiec białkowo-błonnikowy zastosowano nasiona lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus*) odmiany Derek. Na podstawie wcześniejszych badań [11] oraz badań pilotujących

przyjęto udział razówki lędźwianowej w mieszance w ilości 10%; pozostałe 89% stanowiła kaszka kukurydziana oraz 1% sól kuchenna. Mieszankę surowcową nawilżano do wilgotności 13,5%. Jako zmienny parametr procesu zastosowano profil rozkładu temperatury cylindra ekstrudera (tab. 1).

Tabela 1

Model doświadczenia
Model of experiments

Próba Sample	Kaszka kukurydziana Maize semolina [%]	Lędźwian Everlasting pea [%]	Sól Salt [%]	Wilgotność Moisture [%]	Profil rozkładu temp. cylindra Barrel temperature profile [^{o}C]
1	89	10	1	13,5	115/135/120
2					125/145/120
3					135/155/120
4					145/165/120
5					155/175/120

Na podstawie badań pilotujących przyjęto stałą temp. głowicy ekstrudera 120^{o}C oraz stałą różnicę temperatur pomiędzy sekcją I i II cylindra w wysokości 20^{o}C.

Surowce poddano rozdrobnieniu w rozdrabniaczu udarowym typu H-111/3. Proces rozdrabniania prowadzono tak, aby uzyskać stopień rozdrobnienia podany w tab. 2.

W badanych surowcach oznaczano zawartość: wody metodą suszarkową (AACC, Method 44-15A), azotu ogólnego metodą Kjeldahla (AACC, Method 46-08), tłuszczu surowego metodą Soxhleta (AACC, Method 30-26), włókna surowego metodą weendejską (AACC, Method 32-10) oraz związków mineralnych w postaci popiołu (AACC, Method 08-01). Ponieważ metoda weendejska nie obrazuje rzeczywistej zawartości błonnika w pożywieniu, w celu dokładniejszego określenia jego składu frakcyjnego wykonywano oznaczenia składu frakcyjnego błonnika pokarmowego według metody detergentowej, opracowanej przez van Soesta [19, 20], tj.: włókna neutralno-detergentowego (NDF), włókna kwaśno-detergentowego (ADF), celulozy (CEL), hemicelulozy (HCEL) i ligniny kwaśno- detergentowej (ADL). Oznaczono także zawartość błonnika metodą enzymatyczną (AOAC, Method 991.43; AACC, Method 32-07; AACC, Method 32021; AOAC, Method 985.29; AACC, Method 32-05) oznaczając błonnik całkowity (TDF), nierozpuszczalny (IDF) i rozpuszczalny (SDF) (tab. 3).

Proces termoplastycznej obróbki prowadzono przy użyciu jednoślimakowego ekstrudera stosując: średnicę matrycy 3 mm, obroty ślimaka 100 obr./min, L:D = 12:1 oraz stopień sprężania 3:1. Badano wpływ zmiennego rozkładu temperatury cylindra na przebieg procesu, możliwości ustabilizowania warunków wytłaczania oraz wybrane

Tabela 2

Skład frakcyjny surowców.

Fractional composition of raw materials.

Frakcja Fraction [mm]	> 1,6	1,6 – 1,2	1,2 – 1,0	1,0 – 0,8	0,8 – 0,5	0,5 – 0,265	< 0,265	$\sum$ < 0,5 $\sum$ <0,5	Średnica zastępcza Mean diameter [mm]
Surowiec Raw material	[%]								
Kaszka kukurydz. Corn semolina	0	0,11	6,8	27,63	43,45	17,03	4,98	22,01	0,685
Lędźwian siewny Everlasting pea	0	2,2	10,35	21,3	28,68	19,24	18,23	37,47	0,645

Tabela 3

Skład chemiczny surowców użytych w badaniach [% s.m.].
Chemical composition of raw materials used in the research [% d.m.].

Materiał Material	Bezazot wyciąg N-free extract	Białko Protein	Tłuszcz Fat	Popiół Ash	Włókno surowe Crude Fibre	NDF	ADF	HCEL	CEL	ADL	IDF	SDF	TDF
Kaszka													
kukurydz.	87,09	10,62	1,21	0,63	0,45	3,66	0,86	2,8	0,74	0,12	5,28	1,01	6,29
Maize semol.													
Lędźwian													
siewny	61,64	28,03	1,16	3,36	5,81	21,9	7,91	13,99	7,84	0,07	29,01	4,31	33,32
Everlasting pea													

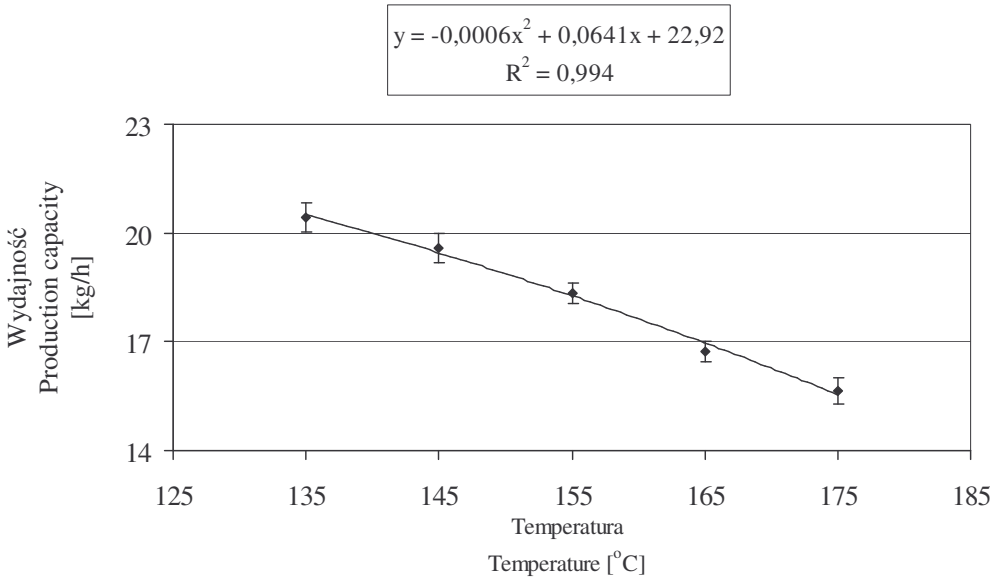
właściwości fizyczne ekstrudatów. Badano stopień ekspandowania promieniowego oraz gęstość właściwą [10]. Pomiary wodochłonności (WAI) ekstrudowanego produktu wykonano metodą odciekową wg Jao i wsp. [6], wodochłonność (Water Absorption Index WAI) ekstrudowanej masy wykonano metodą wirówkową (AACC, 88-04) we własnej modyfikacji [15], współczynnik rozpuszczalności suchej masy (Water Solubility Index WSI) badano wg metody AACC, 88-04 w modyfikacji Rzedzickiego i wsp. [15], teksturę określano metodą wielopłaszczyznowego ścinania [9]. Pomiary ekspandowania, gęstości i tekstury wykonano w 52 powtórzeniach (dwa skrajne pomiary odrzucano), pomiary wodochłonności i współczynnika rozpuszczalności suchej masy w 6 powtórzeniach. Obliczano wartości średnie, odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności. Dla zmiennych ciągłych obliczano równania regresji i współczynniki determinacji R^2.

Przeprowadzono także analizę sensoryczną uzyskanych ekstrudatów. Zastosowano dziewięciopunktową skalę ocen. Grupa 10 osób, odpowiednio wyselekcjonowanych, oceniała wygląd, smak, zapach, przeżuwalność, kleistość i chrupkość próbek.

Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki badań wykazały, że w przyjętym zakresie rozkładu temperatury cylindra od 115/135/120°C do 155/175/120°C ekstruder pracował stabilnie; nie występował poślizg surowca, ekstruder nie blokował się i nie występowało przypalanie się surowca do ścianek cylindra. Przyjęty na podstawie wcześniejszych badań [11] udział razówki lędźwianowej w ilości 10% przy założonym profilu rozkładu temperatury okazał się trafny. Przy każdym badanym profilu temperatury skład mieszaniny umożliwiał uzyskanie wysokiej jakości produktu. Wilgotność mieszanki surowcowej, przyjęta na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań [14], pozwoliła także na poprawny przebieg procesu przy każdej założonej temperaturze.

Profil rozkładu temperatury w cylindrze wpłynął znacząco na wydajność ekstrudera. Najwyższą wydajność osiągnięto przy najniższej temp. procesu 115/135/120°C; wynosiła ona ponad 20 kg/h. Wydajność najniższą, wynoszącą nieco ponad 15,6 kg/h, zaobserwowano w przypadku prób otrzymywanych w temp. 155/175/120°C. Zmiany wydajności ekstrudera w funkcji temperatury cylindra przedstawiono na rys. 1. Otrzymano ujemnie skorelowaną zależność wydajności ekstrudera od temperatury cylindra, przy bardzo wysokim współczynniku determinacji $R^2 = 0{,}994$. Wzrost temperatury przetwarzanej masy spowodował spadek lepkości i wpłynął w większym stopniu na wzrost przepływu wstecznego, hamując tym samym postępowy przepływ strumienia ekstrudowanej masy. Takie zachowanie się ekstrudowanego materiału można zaobserwować w przypadku surowców silnie klejących się, jakim jest razówka lędźwianowa. Podobną tendencję odnotowano w czasie ekstruzji mieszanek owsiano-kukurydzianych, otrzymywanych przy wilgotności surowca 13,5% i udziale otrąb owsianych w mieszance 9% [13].

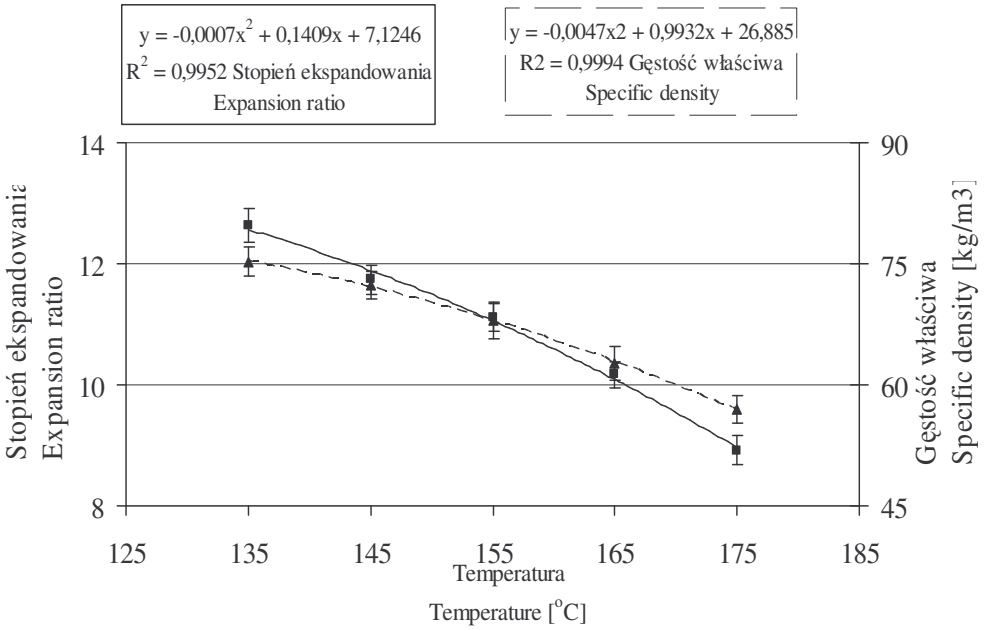


Rys. 1. Wpływ temperatury cylindra na wydajność ekstrudera (wilgotność 13,5%, udział lędźwianu 10%).

Fig. 1. The effect of barrel temperature on the production capacity of the extrusion – cooker (moisture content: 13.5%, everlasting pea content: 10%).

Pomiary stopnia ekspandowania promieniowego ekstrudatów (rys. 2) wykazały, że ekspandowanie promieniowe malało wraz ze wzrostem temperatury procesu. Odnotowano wartości ekspandowania 12,6 w temp. 115/135/120ºC oraz 8,9 w przypadku temp. 155/175/120ºC. Można by sądzić, że w miarę wzrostu temperatury procesu ekstrudat będzie mniej wyekspandowany, twardy, zbity o większej gęstości właściwej. Tak jednak nie było. Gęstość właściwa w całym badanym przedziale temperatury osiągała pożądane wartości i zawierała się w zakresie od 75,2 kg/m^3 w temp. 115/135/120ºC do 56,9 kg/m^3 w 155/175/120ºC (rys. 2). Tak więc w miarę wzrostu temperatury procesu obserwowano zmniejszenie się ekspandowania promieniowego i jednocześnie spadek gęstości właściwej. Takie nietypowe zachowanie się ekstrudowanej masy można zaobserwować w przypadku surowców silnie klejących się w ekstruderze, gdzie wzrostowi temperatury towarzyszy wzrost przepływu wstecznego, zmniejszenie wydajności ekstrudera, spadek ekspandowania i jednoczesne obniżenie gęstości właściwej. Przy zmniejszającej się wydajności w dobrze wygrzanej głowicy ekstrudera i matrycy utrzymuje się nadal stabilna prędkość wypływu ekstrudatu z matrycy i może nawet nastąpić wzrost ekspandowania wzdłużnego. Tym samym formuje się produkt o mniejszej gęstości i mniejszym wyekspandowaniu promieniowym. Uzyskane wyniki dowodzą więc, że stopień ekspandowania promieniowego nie zawsze może być miarą jakości chrupek wytwarzanych z kaszki kukurydzianej, jak to sugerują Colona i wsp. [3]. Nie zawsze bowiem wzrostowi ekspandowania promieniowego musi towarzyszyć spadek gęstości i

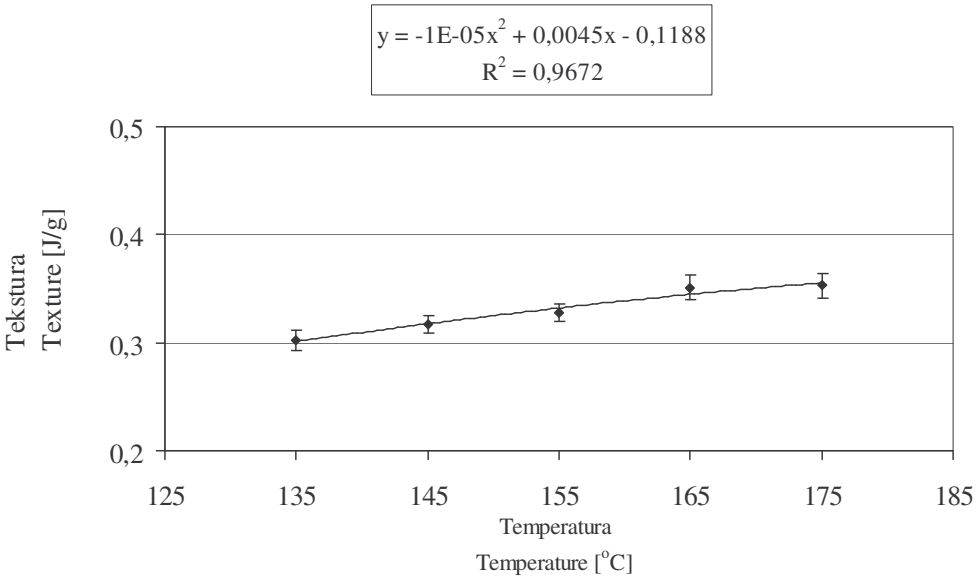
odwrotnie. Istnieje bowiem jeszcze ekspandowanie wzdłużne kształtujące produkt, dlatego najlepszą miarą oceny tych wielkości jest gęstość właściwa.



Rys. 2. Wpływ temperatury cylindra na stopień ekspandowania i gęstość właściwą ekstrudatów (wilgotność 13,5%, udział lędźwianu 10%).

Fig. 2. The effect of barrel temperature on the expansion ratio and specific density of extrudates (moisture content: 13.5%, everlasting pea content: 10%).

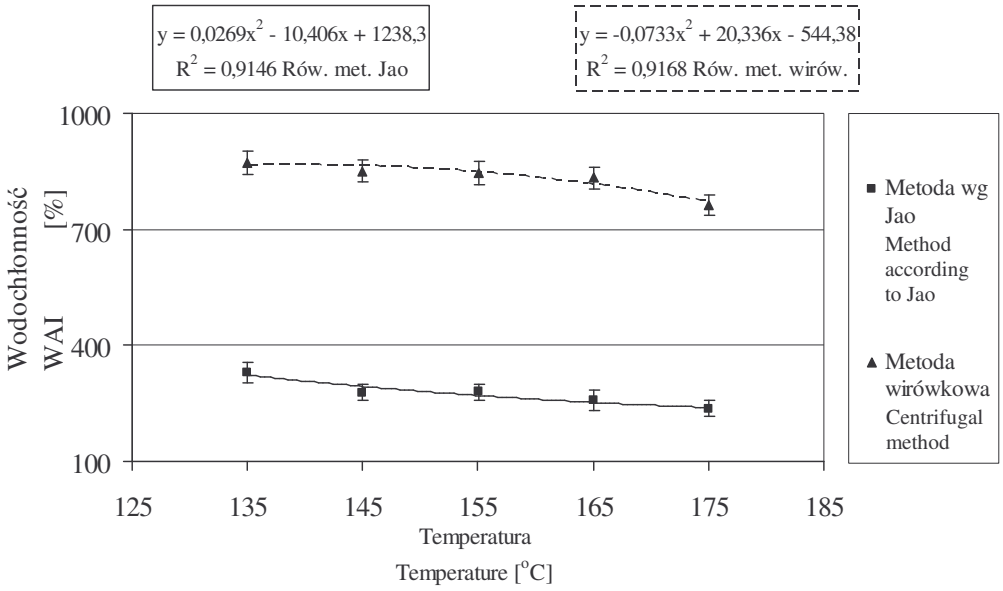
Przeprowadzono także badania tekstury ekstrudatów. Jako miarę tekstury przyjęto ilość energii koniecznej do wielopłaszczyznowego ścięcia 1 g próby. W badanym przedziale temperatury odnotowano bardzo dobrą teksturę ekstrudatu. Zwiększenie temperatury procesu nie spowodowało pogorszenia tej cechy ekstrudatów (rys. 3). Należy podkreślić szczególnie mały zakres wartości energii niszczącej mieszczący się w przedziale 0,3–0,35 J/g. Wartości energii niszczącej są dodatnio skorelowane z temperaturą cylindra przy bardzo wysokiej wartości współczynnika determinacji R^2 = 0,9672. Tak więc wprowadzenie 10% razówki lędźwianowej umożliwiło uzyskanie chrupek o bardzo dobrej teksturze przy zdecydowanie niższej temp. ekstruzji (115/135/120°C). Obuchowski i wsp. [8] poddali ocenie ekstrudaty kukurydziane i owsiane otrzymywane z ekstrudera jednoślimakowego. Jako czynniki zmienne zastosowali temperaturę strefy gotowania (165, 175, 185°C) oraz obroty ślimaka (80 obr./min, 88 obr./min). Uzyskane chrupki zarówno z kukurydzy, jak i z owsa charakteryzowały się najlepszą teksturą, gdy prowadzono proces przy 80 obr./min i temp. 185°C. Wprowadzenie lędźwianu w naszych badaniach pozwoliło uzyskać bardzo dobry produkt już przy temp. 135°C.



Rys. 3. Wpływ temperatury cylindra na teksturę ekstrudatów (wilgotność 13,5%, udział lędźwianu 10%).

Fig. 3. The effect of barrel temperature on the texture of extrudates (moisture content: 13.5%, everlasting pea content: 10%).

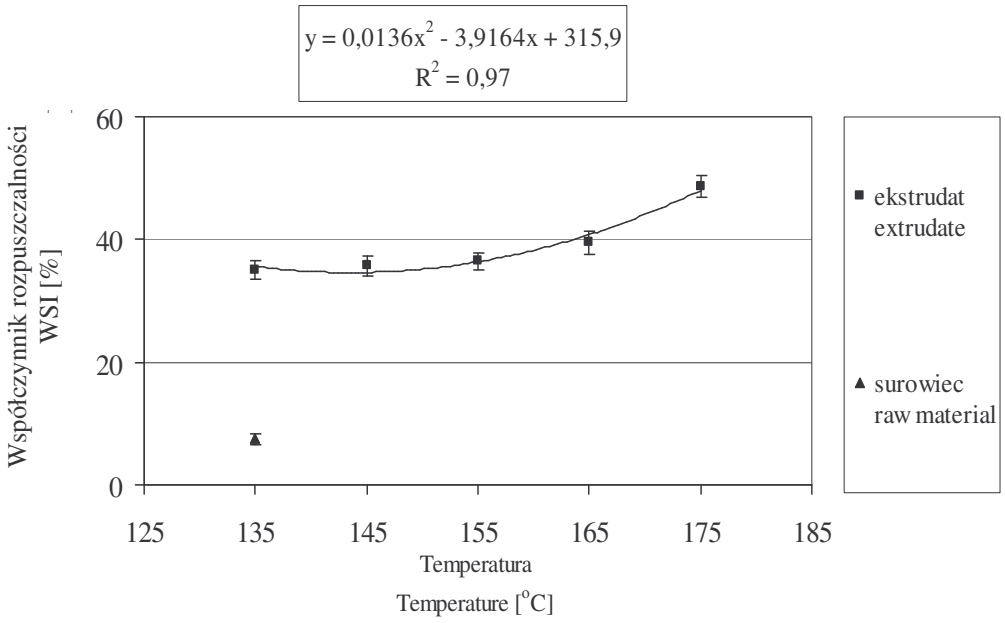
Ekstrudaty zawierające w swoim składzie razówkę lędźwianową charakteryzowały się wysokimi wartościami wodochłonności oraz krótkim czasem uwadniania. Zarówno przy zastosowaniu metody odciekowej, jak również wirówkowej uzyskano taką samą tendencję zmian wodochłonności. Wodochłonność ekstrudatów malała wraz ze wzrostem temperatury procesu. Wartości WAI ekstrudowanego produktu były zdecydowanie niższe od wartości wodochłonności ekstrudowanej masy (rys. 4). Zdolność chłonięcia wody przez nierozdrobnione chrupki wynosiła od 330% przy temp. ekstruzji 115/135/120°C do 236% w przypadku temp. 155/175/120°C. Odnotowano bardzo wysokie wartości WAI ekstrudowanej masy (rozdrobnionych chrupek). WAI ekstrudatów pozyskiwanych w temp. 115/135/120°C wynosiła odpowiednio 873% oraz 763% w przypadku temp. 155/175/120°C. Wyniki uzyskane według metody odciekowej wskazują, że stosowany 15-minutowy czas uwadniania próbek był zbyt krótki, nawet dla tak wyekspandowanych chrupek. Jest to typowe zachowanie się ekstrudatów produkowanych z udziałem nasion roślin strączkowych [12], bowiem wodochłonność produktu jest cechą zmienną, zależną od warunków prowadzenia procesu i zastosowanych surowców.



Rys. 4. Wpływ temperatury cylindra na wodochłonność ekstrudatów (wilgotność 13,5%, udział lędźwianu 10%).

Fig. 4. The effect of barrel temperature on the WAI value of extrudates (moisture content: 13.5%, everlasting pea content: 10%).

Niezwykle istotnym parametrem jakościowym produktów wysokoprzetworzonych jest współczynnik rozpuszczalności suchej masy (WSI). Produkty wysokoprzetworzone, szczególnie ekstrudowane, charakteryzują się bardzo wysoką wartością WSI przekraczającą nawet 50%. W badanych ekstrudatach, pozyskiwanych odpowiednio w temp. 115/135/120°C i 155/175/120°C, odnotowano wartości od 35 do 49% (rys. 5). Wyniki wskazują na znaczny wzrost WSI w wyniku termoplastycznej obróbki. Można to tłumaczyć degradacją polimerów skrobiowych zawartych w przetwarzanej mieszance, jak i rozpadem struktur błonnika nierozpuszczalnego. Należy jednak pamiętać, że w tym przypadku WSI mieszanki surowcowej jest już stosunkowo wysokie i wynosi 7,49%; WSI samej razówki lędźwianowej wynosi 22,64% [15]. Zgodnie z oczekiwaniami zaobserwowano wzrost WSI ekstrudatów wraz ze wzrostem temperatury procesu. Tak wysokie wartości WSI z pewnością nie są cechą pozytywną produktu zbożowego i zapowiadają bardzo szybki proces trawienia i równie szybki proces wchłaniania jelitowego, a tym samym wysokie stężenie poposiłkowe glukozy we krwi.

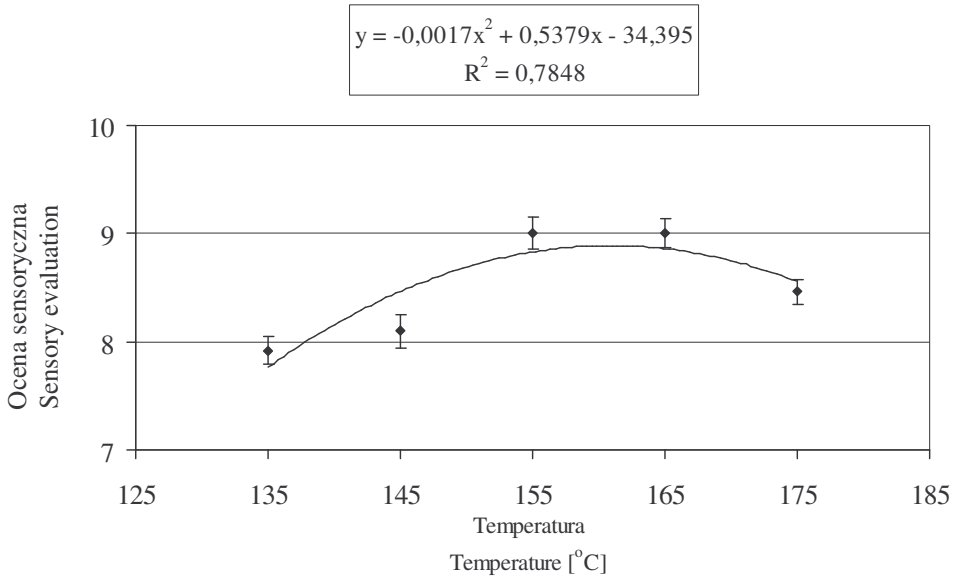


Rys. 5. Wpływ temperatury cylindra na współczynnik rozpuszczalności suchej masy ekstrudatów (wilgotność 13,5%, udział lędźwianu 10%).

Fig. 5. The effect of barrel temperature on the WSI of extrudates (moisture content: 13.5%, everlasting pea: 10%).

Przeprowadzono także sensoryczną ocenę uzyskanych ekstrudatów. Należy zaznaczyć, że w badaniach pilotażowych wyznaczono takie zakresy parametrów procesu i cech surowca, w których pozyskiwane ekstrudaty mogły być zaakceptowane jako produkt spożywczy. Najwyższe noty w wysokości 9 pkt uzyskały ekstrudaty pozyskiwane w temp. 135/155/120°C – 145/165/120°C (rys. 6). Produkty pozyskiwane w temperaturach. niższych cechowały się zbyt dużą szklistością struktury i otrzymywały niższe noty. Ekstrudaty pozyskiwane w temperaturach wyższych charakteryzowały się ciemniejszą barwą i wykazywały smak charakterystyczny dla ekstrudatów przegrzanych.

Zaprezentowane wyniki pozwalają nieco inaczej spojrzeć na dobór parametrów ekstruzji. Podnoszony przez wielu badaczy problem chorób cywilizacyjnych i notowana w ostatnich latach epidemia otyłości ma z pewnością swoje źródło nie tylko w wysokim spożyciu słodyczy, napoi słodzonych, tłuszczów zwierzęcych, ale także z pewnością w wysokim spożyciu produktów ekstrudowanych, charakteryzujących się bardzo wysoką rozpuszczalnością suchej masy (przekraczającą nawet 50%). Taka sytuacja wymaga weryfikacji dotychczasowych poglądów i nowego spojrzenia na dobór zarówno parametrów procesu ekstruzji, jak również składu ekstrudowanych mieszanek.



Rys. 6. Wpływ temperatury cylindra na wyniki oceny sensorycznej chrupek (wilgotność 13,5%, udział lędźwianu 10%).

Fig. 6. The effect of barrel temperature on the sensory evaluation of crisps (moisture content: 13.5%, everlasting pea content: 10%)

Wnioski

1. Nasiona lędźwianu siewnego mogą być cennym surowcem do produkcji ekstrudatów przeznaczonych do bezpośredniego spożycia.
2. Wzrost temperatury cylindra powodował spadek wydajności ekstrudera oraz spadek stopnia ekspandowania, gęstości właściwej i wodochłonności ekstrudatu.
3. W miarę obniżania temperatury cylindra notowano znaczący spadek współczynnika rozpuszczalności suchej masy.
4. Zastosowanie 10% dodatku razówki lędźwianowej umożliwia pozyskiwanie wysokiej jakości chrupek już przy rozkładzie temp. cylindra 135/155/120°C.
5. Najlepszą ocenę sensoryczną uzyskały próby otrzymane przy rozkładzie temperatury cylindra 135/155/120°C-145/165/120°C.

Literatura

[1] Aldoori W., Gio Vannucci E., Rockett H., Sampson L., Rimm E., Willett W.: A prospective study of dietary fiber types and symptomatic diverticular disease in men. J. Nutr., 1997, **127/5**, 714.

[2] Approved methods of the American Association of Cereal Chemists (AACC), 2000.

[3] Colonna P., Tayeb J., Mercier C.: Extrusion cooking of starch and starchy products. Extrusion cooking. AACC, Inc. St. Paul, Minesota, USA, 1989, pp. 247-319.

[4] Cichon R., Kozikowski W., Kłobukowski J., Fornal Ł.: Wpływ warunków ekstruzji na wartość odżywczą białka mieszanin mąki kukurydzianej z mąką gryczaną i białkiem mleka. Acta Academiae Agriculturea AC Technicae Olstenensis, 1993, **25**, 151-162.
[5] Guy R.: Extrusion cooking - Technologies and applications. Woodhead Publishing, London, England 2001.
[6] Jao C.Y., A.H. Chen, W.E. Goldstein: Evaluation of corn protein concentrate: extrusion study. J. Food Sci., 1985, **50**, 1275-1280.
[7] Liu Y., Hsieh F., Heymann H., Huff H.E.: Effect of process conditions on the physical and sensory properties of extruded oat-corn puff. J. Food Sci., 2000, **65 (7)**, 1253-1259.
[8] Obuchowski W., Nawrocka R.: Wpływ warunków procesu ekstruzji na zmiany w składnikach węglowodanowych przetwarzanego surowca. Przegl. Piek. i Cuk., 1996, **3**, 31-33.
[9] Rzedzicki Z.: New method of texture measurement of crisp food and feed. Int. Agrophysics, 1994, **8**, 661-670.
[10] Rzedzicki Z.: Analiza metod pomiaru ekspandowania ekstrudatów. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 1996, **430**, 105.
[11] Rzedzicki Z.: Możliwości zastosowania lędźwianu w technologii ekstruzji. Mat. Międzynarodowego Sympozjum Naukowego, Radom 1997, s. 95-103.
[12] Rzedzicki Z., Sobota A.: Badania nad procesem uwadniania ekstrudatów strączkowych. Postępy Techniki Przetwórstwa Spoż., 1999, **1-2**, 17-22.
[13] Rzedzicki Z., Szpryngiel B., Sobota A.: Estimation of some chosen physical properties of extrudates obtained from corn semolina and oat bran mixtures. Int. Agrophysics, 2000, **14 (2)**, 233-239.
[14] Rzedzicki Z., Kasprzak M.: Wpływ wilgotności surowca na właściwości fizyczne ekstrudatów zbożowo-lędźwianowych. Annales UMCS, Sec. E, 2004, **59 (1)**, 293-301.
[15] Rzedzicki Z., Mysza A., Kasprzak M.: Badania nad metodą oznaczania współczynnika rozpuszczalności suchej masy. Annales UMCS, Sec. E, 2004, **59 (1)**, 323-328
[16] Sobota A.: Badania procesu ekstruzji mieszanin o podwyższonej zawartości włókna pokarmowego. Praca doktorska. AR, Lublin 2003.
[17] Sridhar B.S., Manohar B.: Optimization of the continuously extruded unleavened flat bread (chapati) process. Eur. Food Res. Technol., 2001, **212**, 477-486.
[18] Van der Kamp J.W., N.G. Asp, J. MIller Jones, G. Schaafsma: Dietary Fibre – bio-active carbohydrates for food and feed. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2004.
[19] Van Soest P. J.: Use of detergents in the analysis of fibrous Leeds. II: A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. A.O.A.C., 1963, **46**, 829-835.
[20] Van Soest P. J., Wine R. H.: Use of detergents in the analysis of fibrous Leeds. IV: Determination of plant cell-wall constituents. J. A.O.A.C., 1967, **50**, 50-51.

THE EFFECT OF THERMOPLASTIC TREATMENT TEMPERATURE ON SOME SELECTED PHYSICAL PROPERTIES OF EXTRUDATES WITH EVERLASTING PEA WHOLE GRAIN MEAL ADDED (*LATHYRUS SATIVUS*)

S u m m a r y

In the paper, there were presented results of the research into the effect of a barrel temperature profile on the extrusion process course, on the possibilities to stabilize the extrusion – cooking conditions, and on the potential to modify physical properties of corn extrudates with a whole grain meal of everlasting pea (*Lathyrus sativus*) added. The corn semolina was used as a basic structure-forming component. The mixtures of components were thermo-plastically processed (extruded) in a single screw extrusion cooker (L:D=12:1, D=45 mm, and the compression ratio = 3:1)). In the extrudates obtained, there were determined: radial expansion ratio, specific density, texture, Water Absorption Index (WAI) of a non-

powdered extrudate, Water Absorption Index (WAI) of a powdered extrudate (extruded mass), and Water Solubility Index (WSI) of dry mass. It was confirmed that the assumed ranges of the process temperature permitted the employed extrusion cooker to stably work, although the rise in the temperatures from 115/135/120°C to 155/175/120°C produced a drop in the cooker's production capacity by about 25%. Furthermore, it was found that the extrusion temperature influenced physical properties of the extrudate. The increase in the barrel temperature from 115/135/120°C to 155/175/120°C caused the following: a decrease in the radial expansion ratio from 12.6 to 8.9, a decrease in the specific density from 75.2 kg/m^3 to 56.9 kg/m^3; however, the very good textcure of the extrudates remained unchanged and ranged from 0.3 to 0.35 J/g during the entire process. The final products produced had a very high Water Absorption Index (WAI) that was even as high as 873%. The extrusion – cooking process generated very strong changes in the Water Solubility Index (WSI) of dry mass; the changes in WSI escalated when the process temperatures rose; the increase in barrel temperature from 115/135/120/°C to 155/175/120°C generated an increase in WSI from 35% up to even 49%. The sensory analysis results of the corn extrudates proved that if 10% of the whole grain meal of everlasting pea was added to the mixture, the extrusion-cooking temperature could be significantly decreased, and it was possible to obtain crisps, i.e. final extrusion-cooking products, of a very high quality even when the process temperatures were as low as 135/155/120°C.

Key words: extrusion-cooking, everlasting pea, whole grain meal, extrudate, physical properties

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 83 - 91

BOŻENA BORYCKA

WIĄZANIE JONÓW MIEDZI, CYNKU I ŻELAZA PRZEZ WŁÓKNO POKARMOWE Z WYTŁOKÓW CZARNYCH PORZECZEK

S t r e s z c z e n i e

Odpady przemysłu owocowo-warzywnego zawierają znaczące ilości włókna pokarmowego, dlatego mogą stać się tanim i cennym błonnikowym surowcem wtórnym.

Włókno pokarmowe jest substancją dietetyczną poprawiającą i regulującą pracę organizmu przez m.in. zdolność obniżenia w organizmie poziomu żółci, kwasów tłuszczowych, cholesterolu we krwi. Szczególne nadzieje wiąże się ze zdolnością włókna do sorpcji metali, w tym metali ciężkich. Ta właściwość, w przypadku makro- i mikroelementów, może zmniejszać użyteczność błonnika jako dodatku do żywności.

Celem badań było określenie zdolności sorpcji Cu, Zn i Fe przez preparat wytłokowy z czarnych porzeczek w kontekście stosowania go jako błonnikowego dodatku do żywności.

Wyniki badań sorpcji miedzi, cynku i żelaza w środowisku kwaśnym wskazują, że włókno porzeczkowe stosunkowo najlepiej wiąże Cu (>68%), a najsłabiej, ważny dla organizmu, mikroelement Fe (>7,5%), oraz że poziom sorpcji metali przez to włókno zależy wprost proporcjonalnie od temperatury tego procesu.

Słowa kluczowe: odpady owocowe, wytłoki, włókno pokarmowe, sorpcja metali

Wprowadzenie

Szczególne znaczenie owoców i ich przetworów w profilaktyce i leczeniu niektórych chorób, wynikających z nieprawidłowego żywienia, związane jest m.in. z obecnością w nich włókna pokarmowego. Odpady przemysłu owocowo-warzywnego zawierają również znaczące ilości włókna pokarmowego i dlatego mogą stać się tanim i cennym błonnikowym surowcem wtórnym. Nie zmienia to jednak faktu, że w Polsce, bogate we włókno pokarmowe, wytłoki z owoców kolorowych, w tym z czarnych porzeczek, wyrzucane są dotychczas na wysypiska śmieci.

Włókno pokarmowe (WP) zbudowane jest z grupy składników tworzących zasadniczą część rośliny. WP definiowane jest jako kompozycja złożona z polisacharydów ścian komórkowych roślin oraz substancji im towarzyszących: celulozy, hemiceluloz, pektyn, ligniny, gum i śluzów roślinnych, związków

Dr inż. B. Borycka, Katedra Nauk o Jakości, Politechnika Radomska, 26-600 Radom, ul. Chrobrego 31.

fitynowych [31]. Naukowcy od wielu lat propagują włókno pokarmowe [1, 2, 8, 17], jako substancję dietetyczną poprawiającą i regulującą pracę organizmu przez m.in. zdolność obniżenia w organizmie poziomu żółci, kwasów tłuszczowych, cholesterolu we krwi. Szczególne nadzieje wiąże się ze zdolnością włókna do sorpcji metali, w tym metali ciężkich [4, 13]. Ta właściwość jednak w przypadku makro- i mikroelementów może zmniejszać użyteczność błonnika jako dodatku do żywności.

Powyższe względy zainspirowały do przeprowadzenia badań, których celem było określenie zdolności sorpcji jonów Cu, Zn i Fe przez preparat wytłokowy z czarnych porzeczek, prowadzące do oceny użyteczności tego preparatu jako błonnikowego dodatku do żywności.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny

Przedmiotem badań były przemysłowe wytłoki porzeczkowe po obróbce enzymatycznej [3].

Wytłoki porzeczkowe oczyszczano z koloidów i materiałów śluzowych poprzez poddanie ich obróbce enzymatycznej. Wysuszone, zmielone i przesiane przez sito wytłoki zalewano wodą destylowaną w proporcji 1:4 (m/m), po czym do mieszaniny dodawano preparatu Panzym BE (firmy Begerow) w ilości 0,3 cm^3/dm^3 zawiesiny. Mieszaninę dokładnie mieszano i ogrzewano w ciągu 1 godz. w temp. 50^{o}C. Podczas ogrzewania mieszaninę wielokrotnie mieszano. Roztwór wirowano od osadu przez 15 min w wirówce o prędkości 6000 obr./min. Oddzielony osad przemywano wodą destylowaną w proporcji 4 części wody na 1 część osadu (m/m). Zawiesinę mieszano około 15 min po czym ponownie wirowano. Czynność tę powtarzano dwukrotnie. Preparat suszono w temp. 55^{o}C. Wysuszony preparat mielono w młynku i przesiewano przez sito o średnicy ϕ= 0,2 mm. Otrzymany wytłokowy preparat porzeczkowy był bezwonny, ciemnofioletowy i nie miał żadnego charakterystycznego posmaku.

Metody badań

Frakcje WP (celuloza, hemicelulozy, lignina) w badanych preparatach oznaczano detergentowymi metodami van Soesta [32] oraz McQueena i Nicholsona [20]. Substancje pektynowe oznaczano metodą spektrofotometryczną [12]. Oznaczenia poziomu metali: Cu, Zn i Fe, wykonano metodą atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej ASA. Do przeprowadzenia mineralizacji próbek błonnikowych wybrano metodę mineralizacji na sucho [14].

W celu sporządzenia charakterystyki chemicznej preparatu błonnikowego oznaczano kwasowość ogólną metodą zalecaną w Polskiej Normie [22], a zdolność wymiany kationów (CEC) określano metodą McConnella [19].

Model doświadczenia

Próby preparatów wytłokowych nasączano, stosując 10 ml buforowanego adsorbatu na 1 g preparatu. Proces nasączania próbek preparatów prowadzono w temp. 20 i 37°C przy pH = 2,0 w ciągu 1 godz. Po określonym czasie odwirowywano próbkę w celu oddzielenia warstwy wodnej. Sorbent przemywano wodą redestylowaną, powtarzając trzykrotnie procedurę wytrząsania i odwirowywania próbki, po czym suszono go w temp. 55°C do stałej masy.

Zastosowanymi w pracy ośrodkami dyspersyjnymi były roztwory buforowe (handlowe produkty firmy POCH Gliwice) o pH = 2,0±0,05, w przybliżeniu odpowiadające środowisku soków żołądkowych. Wartość pH środowiska ustalono uwzględniając dane Harpera i wsp. (pH = 1,0÷2,5 w żołądku) [11]. Stężenia metali w roztworze dobrano na podstawie tabel składów chemicznych produktów spożywczych Łoś-Kuczery [16], Marca i wsp. [18] oraz rozporządzenia Ministra Zdrowia [23], tak aby symulowały skażone produkty mleczne (mleko i jogurt).

Wyniki i dyskusja

W celu przeprowadzenia próby oceny wpływu zawartości niektórych frakcji błonnikowych na zdolności wiązania metali zbadano zawartość neutralnego detergentowego błonnika pokarmowego (NDF) i jego frakcji w wytłokowych preparatach z czarnych porzeczek. Wyniki tych badań przedstawiono w tab. 1.

Porównując zawartość frakcji włókna pokarmowego, aktywnie uczestniczących w wiązaniu metali w badanym preparacie wytłokowym, z równowagową wytłokową kompozycją jabłkowo-porzeczkową [5], można dostrzec w nim zwiększoną zawartość frakcji hemicelulozowych (odpowiednio: 19% s.m. do 17,5% s.m). Preparat porzeczkowy charakteryzował się stosunkowo wysokim poziomem aktywnej ligniny. Z doświadczeń autorki wynika, że wytłokowe preparaty aroniowe charakteryzują się zbliżoną zawartością ligniny (>15%), lecz znacząco niższą zawartością frakcji hemicelulozowych [6]. Wyniki badań wskazują też na niższy poziom frakcji pektynowych w preparacie porzeczkowym (5,6% s.m.) w porównaniu z ilością pektyn ogółem zawartych w wytłokowych preparatach aroniowych (> 10%) [6].

Biorąc pod uwagę potencjalne zdolności jonowymienne preparatu wytłokowego z czarnych porzeczek, warto przypomnieć tezę głoszoną przez wielu badaczy, że szczególną zdolnością wiązania metali charakteryzują się składniki zawierające aktywne grupy funkcyjne. Słuszność tej tezy potwierdzają m.in. wyniki badań Platta i Clydesdale [21] oraz innych badaczy [7, 29]. Platt i Clydesdale, badając zdolność wiązania związków nieorganicznych żelaza, miedzi i cynku przez różne źródła włókna pokarmowego, wykazali korelację pomiędzy liczbą grup funkcyjnych w sorbencie a ilością związanego metalu oraz zauważyli, że najbardziej podatna, spośród badanych źródeł, na wiązanie metali okazała się lignina. Zjawisko to tłumaczyli obecnością w niej dwóch rodzajów miejsc wiążących. Autorzy ci wykazali także, że znacznie

gorszymi sorbentami metali były metylowane pektyny, a celuloza wiązała metale w minimalnym stopniu. Z doświadczeń Casterline [7] wynika, że zdolność wiązania cynku przez wybrane składniki błonnika pokarmowego przedstawia się w następującym porządku: ligniny > polipektyny > pektyny > gumy > celuloza.

Tabela 1

Zawartość i skład frakcyjny błonnika pokarmowego w porzeczkowym preparacie wytłokowym [g/100 g suszu].
The content and fraction composition of nutritive fibre in a black currant pomace preparation [g/100 g of dried fruit].

Oznaczany parametr Determined parameter		Wartość średnia $\overline{X}$ ±SD Mean value of $\overline{X}$ ±SD
WP van Soesta DF van Soesta	NDF	56,95 ± 0,84
	ADF	39,31± 0,11
	Hemicelulozy Hemicellulose	17,64
Frakcje Fractions	Lignina Lignin	16,83 ± 0,32
	Celuloza Cellulose	22,48 ± 0,98
WP Aspa DF Aspa	Nierozpuszczalne Insoluble	76,48 ± 0,15
	Rozpuszczalne Soluble	3,38 ± 0,03
Pektyna Pectin	Ogółem Total	5,32 ± 0,31
	Rozpuszczalna Soluble	0,91 ± 0,05
Sucha masa Dry mass	95,07	

Objaśnienia: / Explanatory notes:
$\overline{X}$ - wartość średnia z trzech próbek / mean value of three samples;
SD - odchylenie standardowe / standard deviation;
NDF - neutralne włókno pokarmowe (celuloza + hemicelulozy + lignina) / neutral dietary fibre (cellulose + hemicellulose + lignin);
ADF - kwaśne włókno pokarmowe (celuloza + hemicelulozy) / acid nutritive fibre (cellulose + hemicellulose).

Zdolność kationowymienna (CEC) preparatów wytłokowych jest także wielkością istotną, określającą zdolność wiązania metali przez preparat błonnikowy. Celem uzupełnienia charakterystyki jakościowej preparatu porzeczkowego, w aspekcie zdolności sorpcyjnych metali, określono wartość CEC i kwasowość ogólną, które wyniosły odpowiednio: 0,26 mEq/1 g i 0,50 g/100 g.

Wyniki badań CEC wskazują, że zdolność włókna porzeczkowego preparatu wytłokowego do wiązania kationów była stosunkowo niska w porównaniu z CEC

jabłek czy CEC pomarańczy (odpowiednio dla wymienionych odpadów w mEq/1g : 0,26: 1,9 : 2,4) [19]. Pamiętać trzeba, że zdolność wymienna kwaśnych frakcji włókna pokarmowego związana jest głównie z obecnością w nich grup karboksylowych pektyn i hemiceluloz oraz grup fenolowych ligniny [19]. Przypomnieć też należy, że McConnell i wsp. [19] wykazali, że znaczna liczba gatunków WP zachowuje się jak monofunkcyjna żywica słabo wymieniająca kationy.

Wartość kwasowości ogólnej preparatu porzeczkowego była niższa w porównaniu z kwasowością suszonych jabłek (odpowiednio: 0,50 g/100 g produktu – jako kwas cytrynowy do 1,81÷1,85 g/100 g s.m. – jako kwas jabłkowy) [24].

Wielkość sorpcji wyliczono ze stosunku ilości pierwiastka związanego z kompozycją błonnikową do ogólnej ilości tego pierwiastka wprowadzonego do układu i wyrażono w procentach. Wyniki sorpcji metali zaprezentowano w tab. 2.

Wyniki badań sorpcji Zn Fe i Cu przez preparat wytłokowy z czarnych porzeczek w środowisku kwaśnym (tab. 2.) wskazują, ze poziom związania tych metali zależał od temperatury procesu i w 37^{o}C był wyższy.

Zależności pomiędzy źródłem pochodzenia różnych preparatów błonnikowych a pH środowiska oraz temperaturą ekspozycji a zdolnością sorpcji miedzi dowiodły również badania Gawęckiego i Stachowiak [10, 25]. Ten sam zespół badaczy [9] stwierdził też związek pomiędzy kwasowością środowiska a zdolnością sorpcyjną Cu, Zn przez preparaty błonnikowe z ziemniaka. Badacze ci wykazali też, że ziemniaczane WP w warunkach zbliżonych do pH istniejących w głównych odcinkach przewodu pokarmowego: jamie ustnej i żołądku, przy pH = 6,8, znacznie lepiej wiąże wymienione metale niż przy pH = 2,2. Tezę o wpływie zróżnicowanego źródła pochodzenia WP na zdolność wiązania metali potwierdziły też wyniki badań sorpcji cynku przez błonnik pokarmowy różnego pochodzenia (celulozę, otręby pszenne, otręby żytnie, wytłoki jabłkowe) w warunkach symulujących środowisko przewodu pokarmowego człowieka, prowadzone przez Stachowiak i Kubiaka [26]. Wymienieni autorzy wykazali, że wraz ze wzrostem kwasowości roztworu z pH = 6,8 do pH = 2,2, w przypadku wytłoków jabłkowych spadek sorpcji Zn jest stosunkowo niewielki (z 60 do 51%), podczas gdy w otrębach żytnich znaczący (z 68 do 15%) [25].

Włókno porzeczkowe w środowisku o pH = 2,0 stosunkowo najlepiej wiąże Cu (>68%), gorzej Zn (>21%), a najsłabiej Fe (>7,4%). Z danych zawartych w tab. 2. wynika, że wzrost kwasowości roztworu do pH = 1 powoduje znaczący spadek sorpcji Cu (ok. 8%).

Odwrotny szereg sorpcji tych metali przez bogate ligninowo źródła w środowisku kwaśnym uzyskali Platt i Clydesdale [21]. W wyniku badań wymienieni autorzy ustalili następującą kolejność podatności metali na blokowanie miejsc aktywnych w

Tabela 2

Sorpcja metali Zn Fe i Cu przez preparat wytłokowy z czarnych porzeczek w środowisku kwaśnym.
Sorption of metals: Zn Fe, and Cu by a black currant pomace preparation in the acidy environment.

Metal	pH	Zawartość metalu Content of metal [µg/g]		Sorpcja (S)/Desorpcja(D) [%] $\overline{X}$ ±SD Sorption (S)/Desorption (D) [%] $\overline{X}$ ±SD Temperatura procesu [°C] Process temperature [°C]	
		W próbce In a sample	W adsorbacie In an adsorbate	20 °C	37 °C
Zn	2,0	49,0	24,0	21,0±2,6(S)	29,6±5,8(S)
Fe	2,0	143,0	2,0	7,4±1,8(D)	10,8±2,4(D)
Cu	2,0	11,3	6,0	68,9±1,6(S)	77,0±5,9(S)
	1,0			7,96±1,2(D)	20,3±8,8(D)

Objaśnienia:/Explanatory notes:
$\overline{X}$ – wartość średnia z 3 pomiarów /mean value of three measurements;
SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

ligninie: Fe > Cu > Zn. Jednak Thompson i Weber [28], badając sorpcję miedzi, cynku i żelaza przez sześć różnych źródeł błonnika (w tym otręby pszenne, kukurydziane,

sojowe, ryżowe, łuski owsiane i celuloza), udowodnili, że większość sorbentów (mimo zróżnicowanego poziomu w przypadku każdego źródła i każdego metalu) wiąże badane metale przy pH = 6,8, natomiast w środowisku przy pH = 0,65 pierwiastki te uwalniają się. Doświadczenia Laszlo [15] wskazywały, iż trwałość połączeń metal – błonnik jest dodatnio skorelowana z pH. W pH < 4,5, cynk i żelazo były mocniej związane z włóknem ziaren soi, natomiast przy niższym pH (3,2÷0,7) były stopniowo ekstrahowane z włókna. Podobnie Torre i wsp. [29, 30] obserwowali wzrost intensywności wiązania żelaza i cynku przez ligninę i substancje pektynowe wraz ze zmniejszaniem się pH roztworu.

Można stwierdzić, że w środowisku mocno kwaśnym Fe i Zn są słabiej sorbowane przez wytłokowe włókno z czarnych porzeczek niż miedź, bowiem w przypadku tych metali występuje w warunkach kwaśnych pewna równowaga między procesem sorpcji i desorpcji.

Wyniki badań przedstawione w tab. 2. potwierdzają zatem tezę, udowodnioną przez innych badaczy [9, 15, 27], w myśl której zarówno właściwości sorpcyjne, jak i zdolności wymiany jonowej zależą od takich parametrów, jak: źródło włókna pokarmowego, warunki i czas eksperymentu.

Wnioski

1. Preparat błonnikowy z czarnych porzeczek charakteryzował się wysoką ok. 58-procentową zawartością neutralnego włókna pokarmowego.
2. Preparat porzeczkowy wyróżniał się wysokim poziomem aktywnej hemicelulozy w reakcjach wymiany metali.

3. Wyniki badań zdolności wymiany kationów (CEC) – wskazują, że zdolność włókna porzeczkowego preparatu wytłokowego do wiązania kationów oraz jego kwasowość ogólna jest stosunkowo niska w porównaniu z innymi odpadami owocowymi.
4. Spośród badanych sorpcji metali w środowisku o pH = 2,0, włókno porzeczkowe, stosunkowo najlepiej wiąże Cu (>68%), a najsłabiej ważny dla organizmu mikroelement Fe (>7,5%). Zdolność wiązania metali w warunkach kwaśnych można zatem przedstawić w następującym szeregu Cu > Zn > Fe.
5. Poziom sorpcji Zn Fe i Cu przez preparat wytłokowy z czarnych porzeczek w środowisku kwaśnym zależy od temperatury i jest wyższy w temp. 37^{o}C niż w temp. 20^{o}C.
6. Zdolności sorpcji mikroelementów Zn Fe i Cu w środowisku symulującym soki żołądkowe nie dyskwalifikują wytłoków porzeczkowych jako potencjalnego dodatku do żywności.

Literatura

[1] Bartnikowska E.: Włókno pokarmowe w żywieniu człowieka zdrowego i chorego. Mat. Konf. : „Włókno pokarmowe - skład chemiczny i biologiczne działanie". Radzików, kwiecień 1997, s. 101-118.

[2] Bartnikowska E.: Wpływ włókna pokarmowego na metabolizm lipidów. Żyw. Człow. Met.., 1994, **21**, **3**, 269-285.

[3] Borycka B.: Wytłoki owocowe w kompozycjach błonnikowych. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 1996, **12**, 37-39.

[4] Borycka B., Żuchowski J.: Metal sorption capacity of fibre preparations from fruit pomace. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1998, **1**, 67-76.

[5] Borycka B., Górecka D.: Charakterystyka nowych wysokobłonnikowych preparatów wytłokowych. Przem. Ferm. Owoc. Warz. 2001, **2**, 30 – 33.

[6] Borycka B.: Wytłoki aroniowe w dietetycznych preparatach wysokobłonnikowych. W: J. Żuchowski (red), Towaroznawstwo wobec integracji z UE. Wyd. PR. Radom 2004, s. 704 -713.

[7] Casterline J.L. Jr., Ku Y.: Binding of zinc to apple fiber, wheat bran, and fiber components. J. Food Sci., 1993, **58**, **2**, 365-368.

[8] Cummings J.H.: Nutritional implications of dietary fiber. Amer. J. Clin. Nutr., 1978, **31**, Suppl., 521-528.

[9] Gawęcki J., Stachowiak J.: Sorpcja Cu, Zn i Mn na prepararatach błonnikowych z ziemniaka otrzymanych w zróżnicowanych warunkach obróbki termicznej. Przem. Spoż. 1991, **3**, 71-72.

[10] Gawęcki J., Stachowiak J.: Stability of copper, molybdenum, and selenium ions binding to the surface of dietary fibre preparations in simulated conditions of the human gastrointestinal tract, Acta Alim. Pol. 1989, **1**, 113-118.

[11] Harper H. A., Rodwell V. W., Mayes P. A.: Zarys chemii fizjologicznej. PZWL. Warszawa 1983.

[12] Kłyszejko-Stefanowicz L.: Ćwiczenia z biochemii. PWN. Warszawa 1972.

[13] Kritschevsky D.: Dietary fiber an antitoxic agent. Curr. Top. Nutr. Dis., 1989, **22**, 327-341.

[14] Krełowska-Kułas M.: Badania jakości produktów spożywczych. PWE. Warszawa 1993.

[15] Laszlo J. A.: Effects of gastrointestinal conditions on the mineral-binding properties of dietary fibers. Adv. Exp. Med. Biol., 1989, **249**, 133-145.

[16] Łoś-Kuczera M.: Produkty spożywcze. Skład i wartość odżywcza Wyd. IŻŻ. Warszawa 1990.

[17] Marcinkowska-Suchowierska E.: Błonnik a rak jelita grubego. Żyw. Człow. Metab., 1986, **13**, **2**, 152-156.
[18] Marzec Z., Kunachowicz H., Iwanow K., Rutkowska U.: Tabele zawartości pierwiastków śladowych w produktach spożywczych, Wyd. IŻŻ. Warszawa 1992.
[19] McConnel A.A., Eastwood M.A., Mittchell W.D.: Physical characteristics of vegetable foodstuffs that could influence bowel function. J. Sci. Fd. Agric., 1974, **25**, 1457-1463.
[20] McQueen R.E., Nicholson J.W.G.: Modification of the neutral-detergent fiber procedure for cereals and vegetables by using amylase. J. AOAC, 1979, **62**, 3, 676-680.
[21] Platt S.R., Clydesdale F. M.: Mineral biding characteristics of lignin, guar gum, cellulose, pectin and neutral detergent fiber under simulated duodenal pH conditions. J Food Sci., 1987, **52** (**5**), 1414-1419.
[22] PN-90/ A-75101/04. Oznaczanie kwasowości ogólnej.
[23] Rozporządzenie M. Z. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności. Dz. U. 2003. Nr 37, poz. 326.
[24] Sikorski Z., Drozdowski B., Samotuch B., Pałasiński M.: Chemia żywności. PWN. Warszawa 1988.
[25] Stachowiak J., Gawęcki J., Sorption of copper, molybdenum, and selenium ions on selected dietary fibre preparations, Acta Alim. Pol., 1989, **15**, 107-112**.**
[26] Stachowiak J., Kubiak A.: Sorpcja cynku na wybranych preparatach błonnikowych. Roczniki AR w Poznaniu, 1990, **210**, 77.
[27] Stachowiak J.: Właściwości sorpcyjne błonnika pokarmowego i jego głównych frakcji. Roczniki AR w Poznaniu, 1993, **256**, 57-63.
[28] Thompson A. A., Weber C.: Influence of pH binding of copper, zinc and iron in six fiber sources, J. Food Sci.,1979, **44**, 752-754.
[29] Torre M., Rodriquez A. R., Saura-Calixto F.: Binding of minerals by new sources of high dietary fiber content. Spec. Publ. Soc. Chem., 1990, **83** (Diet. Fibre. Chem. Biol. Aspects), 197-202.
[30] Torre M., Rodriquez A. R., Saura-Calixto F.: Physico-chemical mechanism of interaction between polyvalent metal cations and dietary fibre cations A. Symp. Within the Framework of the Cost 92 Programme; Topics in Dietary Fibre Research, Roma - Viterbo, 1992, p. 49.
[31] Trowell H. C.: Definition of dietary fiber and hypothesis that it is a protective factor in certain diseases. Amer. J. Clin. Nutr., 1976, **29**, 417-425.
[32] Van Soest P. J.: Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. J. AOAC, 1963, **13**, **5**, 825-835.

BINDING OF THE COPPER, ZINC AND IRON IONS TO DIETARY FIBRE FROM BLACK CURRANT POMACE

S u m m a r y

Wastes from the fruit and vegetable processing industries consist of significant quantities of nutritive fibre, thus, they could become the low-cost and valuable by-product containing cellulose.

Nutritional fibre is a dietary substance that improves and regulates the functioning of human body owing to, among other things, its ability to reduce the level of bile, fatty acids, and cholesterol in blood. In particular, the ability of fibre to absorb metals including heavy metals seems to be very promising. On the other hand, in the case of macro- and microelements, this specific property of fibre can reduce the usability of fibre as a food additive.

The objective of this research aimed at analysing the potential of a black currant pomace preparation to absorb Cu, Zn, and Fe ions in the context of this pomace being applied as a fibre additive to foodstuffs.

The results of the research into Cu, Yn and Fe ions sorption in the acidy environment indicate that the currant fibre binds Cu ions (>68%) relatively the best, whereas the sorption of Fe, an important microelement for human organisms, is the lowest (>7,5%), and that the level of metal sorption is directly proportional to temperature.

Key words: fruit waste, pomace, nutritive fibre, metal sorption

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 92 - 104

MAŁGORZATA PIECYK, MIROSŁAWA KLEPACKA, ELWIRA WOROBIEJ

ZAWARTOŚĆ INHIBITORÓW TRYPSYNY, OLIGOSACHARYDÓW ORAZ FOSFORU FITYNOWEGO W PREPARATACH BIAŁKOWYCH OTRZYMANYCH Z NASION FASOLI (PHASEOLUS VULGARIS) METODĄ KRYSTALIZACJI I IZOLACJI KLASYCZNEJ

S t r e s z c z e n i e

W pracy porównywano zawartość oligosacharydów, kwasu fitynowego oraz inhibitora trypsyny w preparatach białkowych otrzymanych z nasion fasoli białej (*Phaseolus vulgaris*) dwoma metodami: izolacji klasycznej i krystalizacji w środowisku kwaśnym. Podczas izolacji klasycznej białka odzyskano z ekstraktów alkalicznych w punkcie najmniejszej rozpuszczalności jako postać amorficzną (PBA). W drugiej metodzie wykorzystano zdolność białek fasoli do tworzenia struktur krystalicznych w środowisku kwaśnym (PBK).

Przeprowadzane badania wykazały, że zastosowanie metody krystalizacji pozwoliło na otrzymanie preparatów o mniejszej zawartości inhibitora trypsyny oraz fosforu fitynowego w porównaniu z izolacją klasyczną. W otrzymanych preparatach w porównaniu z mąką fasolową zmniejszała się również zawartość oligosacharydów. Proces krystalizacji wpływał na zmniejszenie ilości galaktocukrów do takiego samego bądź niższego poziomu niż izolacja klasyczna. Zastosowana obróbka termiczna (100^{o}C, t = 30 min) wpłynęła na zmniejszenie ilości kwasu fitynowego, natomiast zmiana zawartości galaktocukrów i inhibitora trypsyny zależała od odmiany nasion.

Słowa kluczowe: fasola, białka krystaliczne i amorficzne, inhibitor trypsyny, kwas fitynowy, galaktocukry

Wprowadzenie

Izolacja białek jest procesem technologicznym, w wyniku którego otrzymuje się preparaty wysokobiałkowe. Najczęściej stosowana jest procedura otrzymywania preparatów białkowych przez wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4,4–4,6) z alkalicznych ekstraktów mąki [29]. Metodą tą otrzymuje się białka bezpostaciowe, tzw. amorficzne. Inną metodą stosowaną do otrzymywania preparatów białkowych jest krystalizacja w środowisku kwaśnym, pozwalająca na otrzymanie różnych form kryształów [1, 25]. Wśród białek nasion roślin strączkowych najłatwiej

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

krystalizuje faseolina (główna frakcja białek fasoli) przy zastosowaniu prostych technik krystalizacji. Jak wykazały wcześniejsze badania [24, 25], struktura białek ma decydujący wpływ na ich strawność i właściwości funkcjonalne. Białka krystaliczne charakteryzują się lepszą podatnością na trawienie, jednak mogą zawierać różnorodne związki (oligosacharydy, inhibitory proteaz, kwas fitynowy, lektyny), które mogą mieć interferujący wpływ na absorpcję i metabolizm składników odżywczych w organizmie człowieka.

Wśród oligosacharydów dominują galaktocukry (rafinoza, stachioza, werbaskoza i ajugoza) określane mianem cukrów z rodziny rafinozy. Ich zawartość w suchych nasionach fasoli wynosi 3–8% [21] i zależy od wielu czynników, takich jak: gatunek, odmiana, stopień dojrzałości nasion, warunki przechowywania i warunki klimatyczne [8]. Cukrom z rodziny rafinozy przypisuje się niekorzystne działanie fizjologiczne ze względu na nieprzyswajalność przez organizm ludzki i efekt gazotwórczy. Procesy technologiczne stosowane przy otrzymywaniu preparatów białkowych oraz modyfikacje (chemiczne, fizyczne) białka przyczyniają się do znacznego zmniejszenia zawartości oligosacharydów w końcowym produkcie [26].

Inhibitory proteaz stanowią niewielką część (około 2,5%) białek dojrzałych nasion fasoli. Badania wpływu różnych procesów na aktywność inhibitorów proteaz wykazały, że pod wpływem temperatury ulegają częściowej lub całkowitej inaktywacji, przy czym jej skuteczność jest uzależniona od wilgotności [7], typu obróbki termicznej [15] oraz czasu i wysokości temperatury [13]. Generalnie procesy prowadzące do otrzymywania koncentratów lub preparatów białkowych powodują obniżenie aktywności inhibitorów [2, 23], ale jeżeli nie są poddane dodatkowo obróbce termicznej mogą wykazywać niekorzystne działanie fizjologiczne na organizm człowieka [20]. Inhibitory proteaz mogą wykazywać działanie przeciwnowotworowe, ale w wysokim stężeniu i w stanie niezinaktywowanym mogą powodować choroby trzustki [5, 23].

Do związków fitynowych występujących w nasionach roślin strączkowych zalicza się kwas fitynowy o poprawnej nazwie – według nomenklatury IUPAC – 1, 2, 3, 4, 5, 6– heksa (diwodorofosforan) mezo-inozytolu ($C_6N_{18}O_{24}P_6$) oraz jego sole – fityniany. Ogólnie nasiona fasoli zawierają 0,74–2,1% fitynianów. Niekorzystne działanie kwasu fitynowego wynika z tego, że ma prawie w całym zakresie pH ładunek ujemny i może dzięki temu łatwo tworzyć kompleksy z cząsteczkami o ładunku dodatnim, takimi jak białka lub z kationami metali [12]. Największe zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego obserwuje się w czasie kiełkowania nasion [16]. Podczas otrzymywania preparatów białkowych i koncentratów nie obserwowano zmniejszenia zawartości fitynianów [2, 10]. Ostanie badania wskazują na pozytywną rolę fitynianów poprzez zmniejszenie ryzyka wystąpienia chorób nowotworowych [28].

Celem pracy było określenie wpływu zastosowania metody krystalizacji do otrzymywania preparatów białkowych na zawartość inhibitorów trypsyny, oligosacharydów oraz fosforu fitynowego w porównaniu z izolacja klasyczną.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły nasiona fasoli białej *(Phaseolus vulgaris)* trzech odmian (Mela, Prosna, Wenta), które poddano obłuszczeniu i przemiałowi.

Do badań wykorzystywano preparaty białek amorficznych (PBA) otrzymane przez wytrącenie białek w punkcie najmniejszej rozpuszczalności (pH 4,3) z alkalicznych ekstraktów mąki (pH 9,0). Preparaty białek krystalicznych (PBK) otrzymywano przez ekstrahowanie białek z mąki kwasem cytrynowym i odzyskiwanie ich z ekstraktów przez oziębianie w temp. 5°C w ciągu 18 h. Do ekstrakcji stosowano roztwór kwasu cytrynowego o stężeniu i wartości pH: 0,03 mol/L (pH 5,5) [24, 25].

W celu zbadania podwyższonej temperatury na zawartość związków biologicznie czynnych uzyskane preparaty po zamknięciu w fiolkach w atmosferze azotu ogrzewano w łaźni wodnej (100^{o}C/30 min), po czym natychmiast chłodzono.

Zawartość inhibitora trypsyny (IT) oznaczano zmodyfikowaną metodą Hamerstranda [19]. Do oznaczeń wykorzystano syntetyczny substrat trypsyny – BAPA [p-nitro-anilid-benzoilo-DL-argininy], a ilość uwolnionej p–nitroaniliny oznaczano spektrofotometrycznie (λ = 410 nm). Ilość IT wyliczano stosując współczynnik przeliczeniowy -1 μg czystej trypsyny ma aktywność 0,019 jednostki absorbancji i podano w mg/1 g próbki w suchej masie oraz mg/1g białka.

Oligosacharydy rozdzielano przy użyciu HPLC [22]. Przeprowadzano podwójną ekstrakcję cukrów z badanych próbek (50% etanol, 1h, t = 86-90^{o}C), a otrzymane ekstrakty cukrów klarowano 10% octanem ołowiu(II), którego nadmiar usuwano 5% kwasem szczawiowym. Rozdział przeprowadzano w kolumnie Lichrosorb-NH_2 (250 mm x 4 mm, średnica ziaren 7 μm) wraz z przedkolumną (50 mm x 4 mm, średnica ziaren 7 μm). Stosowano fazę ruchomą acetonitryl: woda (65:35) o przepływie 1 cm^3/min oraz detektor RID. Na kolumnę nanoszono 20 μl próbki po uprzednim przefiltrowaniu przez filtr nylonowy (0,45 μm). Do sporządzenia krzywej wzorcowej użyto wzorców: rafinozy (firmy LOBA, Austria), stachiozy (firmy Sigma), sacharozy (firmy Merck), werbaskozy (firmy Nestec, Szwajcaria).

Zawartość fosforu fitynowego oznaczano zmodyfikowaną metodą Thiese'a [30]. Z badanych próbek ekstrahowano fosfor fitynowy w 60% metanolu (5 min, t = 80^{o}C), a następnie w 10% HCl (5 min, t = 20^{o}C). Do oznaczeń użyto odczynnika WADE (0,027% $FeCl_2$, 0,254% kwas sulfosalicylowy), w którym mierzono absorbancję (λ = 510 nm) kompleksu żelaza z kwasem salicylowym w obecności kwasu fitynowego i bez jego dodatku. Wyniki zawartości fosforu fitynowego podano w mg/g białka lub w g/100 g s.m. próbki. Do przeliczenia fosforu fitynowego na kwas fitynowy zastosowano współczynnik przeliczeniowy 3,55 [4].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu komputerowego Statgraphics, Plus 2.1, w której badano istotność różnic między średnimi wartościami w próbach, stosując test Duncana ($p \leq 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki zawartości inhibitora trypsyny, oligosacharydów i kwasu fitynowego podawano w przeliczeniu na suchą masę próbki lub białka wykorzystując przeprowadzoną wcześniej charakterystykę chemiczną mąki fasolowej i preparatów [24].

Obecność inhibitora trypsyny (IT) stwierdzono we wszystkich badanych próbkach mąki i preparatów białkowych otrzymanych z trzech badanych odmian fasoli. Porównując uzyskane wyniki analizy (tab. 1) mąki trzech badanych odmian fasoli obserwowano znaczne różnice międzyodmianowe (istotne statystycznie) pod względem ilości IT (0,159–0,468 mg/1 g próbki). Podobne wyniki TIA w mące pochodzącej z nasion fasoli otrzymali Carbonaro i wsp. [9].

W PBA i PBK obserwowano zmniejszenie (różnice statystycznie istotne) ilości IT (do 140 mg/ g próbki) w stosunku do mąki. Wyjątek stanowił PBA otrzymany z fasoli odmiany Wenta, który charakteryzował się nieznacznie większą zawartością IT w stosunku do mąki.

Ze względu na ograniczanie wartości odżywczej białek przez obecność inhibitorów proteaz uzyskane wyniki zawartości IT przeliczono na 1 g białka (tab. 1). Stwierdzono, że w stosunku do białka we wszystkich preparatach białkowych proces izolacji białka przyczynił się do zmniejszenia zawartości IT w porównaniu z mąką, w stopniu statystycznie istotnym. Największe zmniejszenie jego ilości uzyskano w obu preparatach białkowych otrzymanych z fasoli odmiany Prosna (o około 92%), natomiast najmniejsze w PBA otrzymanym z nasion fasoli odmiany Wenta (o 65%). W PBK otrzymanych z fasoli odmiany Mela i Wenta uzyskano większe zmniejszenie zawartości IT o 86 i 73% niż w PBA, gdzie zmniejszenie wynosiło odpowiednio 84 i 65%.

Zmniejszanie zawartości IT w preparatach białkowych znajduje potwierdzenie w literaturze [2, 15] i może być spowodowane wieloma czynnikami. Zawartość inhibitorów zależy od ich rozpuszczalności i stabilności w zastosowanych warunkach podczas odzyskiwania białek. Badania prowadzone przez Borowską i Kozłowską [6] w mące z soi wykazały, że w środowisku o pH 9,2, stosowanym do ekstrakcji białek amorficznych, rozpuszcza się około 55% inhibitora, natomiast w pH 5,5, stosowanym do ekstrakcji białek krystalicznych w niniejszej pracy – 70%. Podczas wytrącania białek w pH 4,2 w supernatancie pozostaje około 50% wyekstrahowanego inhibitora. Ponadto w środowisku kwaśnym jest on stabilny, natomiast w pH 8,0 i powyżej ulega inaktywacji [11], co spowodowane jest destrukcją cystyny, która działa ochronnie na inhibitor trypsyny [13].

Tabela 1

Aktywność inhibitora trypsyny w mąkach oraz preparatach białek amorficznych i krystalicznych z fasoli odmiany Mela, Prosna i Wenta.
Activity of trypsin inhibitors in flour and protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wenta varieties of bean).

Odmiana fasoli Bean variety	Rodzaj próbki Type of sample		TI [mg/g s.m. próbki] TI [mg/g d.m.]	TI [mg/g białka s.m] TI [mg/g protein d.m].
Mela	Mąka Flour	nieogrzewana/ non-heated	0,301 ^{j} (± 0,006)	1,375
		ogrzewana/ heated	0,148 ^{g} (± 0,002)	0,677
	PBA	nieogrzewana/ non-heated	0,172 ^{i} (± 0,001)	0,224
		ogrzewana/ heated	0,158 ^{h} (± 0,001)	0,205
	PBK	nieogrzewana/ non-heated	0,157 ^{h} (± 0,001)	0,190
		ogrzewana/ heated	0,136 ^{d} (± 0,003)	0,165
Prosna	Mąka Flour	nieogrzewana/ non-heated	0,468 ^{k} (± 0,014)	2,253
		ogrzewana/ heated	0,126 ^{c} (± 0,001)	0,684
	PBA	nieogrzewana/ non-heated	0,143 ^{ef} (± 0,002)	0,21
		ogrzewana/ heated	0,121 ^{b} (± 0,001)	0,179
	PBK	nieogrzewana/ non-heated	0,140 ^{de} (± 0,001)	0,187
		ogrzewana/ heated	0,146 ^{fg} (± 0,001)	0,195
Wenta	Mąka Flour	nieogrzewana/ non-heated	0,159 ^{h} (± 0,001)	0,636
		ogrzewana/ heated	0,114 ^{a} (± 0,001)	0,457
	PBA	nieogrzewana/ non-heated	0,172 ^{i} (± 0,002)	0,224
		ogrzewana/ heated	0,149 ^{g} (± 0,002)	0,194
	PBK	nieogrzewana/ non-heated	0,141 ^{e} (± 0,002)	0,173
		ogrzewana/ heated	0,110 ^{a} (± 0,001)	0,135

Objaśnienia: / Explanatory notes:
± odchylenie standardowe / standard deviation,
a-k grupy jednorodne wyznaczone testem Duncana ($p \geq 0,95$) / homogeneous groups determined using a Duncan test ($p \geq 0.95$).

Dlatego na zmniejszenie zawartości IT w PBA największy wpływ miało doprowadzenie przy ekstrakcji białek pH środowiska do 9,2, natomiast w przypadku otrzymywania PBK w przyjętych warunkach ekstrakcji wykazywał on wysoką rozpuszczalność, ale nie ulegał wytrąceniu podczas ochładzania ekstraktów białkowych. Niewielka aktywność może być spowodowana „zamykaniem" niskocząsteczkowych inhibitorów w kryształach białkowych wraz z cieczą macierzystą.

Działanie temperatury (100^{o}C) powodowało znaczne obniżenie TIA (o 28-73%) w mąkach wszystkich badanych odmian fasoli (różnice statystycznie istotne).

Natomiast w preparatach białkowych wpływ temperatury był mniejszy - obserwowano jedynie niewielkie zmniejszenie zawartości IT, z wyjątkiem PBK z odmiany Prosna, w którym stwierdzono nieznaczny jego wzrost. Temperatura powoduje częściową inaktywację inhibitorów proteaz [3, 9, 13, 14]. Stopień inaktywacji zależy od typów inhibitorów występujących w badanych próbkach Większe zmniejszenie zawartości IT pod wpływem temperatury w mące niż preparatach można tłumaczyć jego interakcjami ze związkami występującymi w mące, które prowadzą do jego inaktywacji [14].

W mąkach i preparatach białkowych przeprowadzono oznaczenia zawartości oligosacharydów metodą HPLC. W wyniku rozdziałów zidentyfikowano sacharozę oraz cukry z rodziny rafinozy tj. stachiozę, rafinozę oraz werbaskozę. Ponieważ w mące stwierdzono śladowe ilości werbaskozy i nie obserwowano jej obecności w preparatach białkowych, w tabelach nie uwzględniano tego cukru. Ogólna zawartość oligosacharydów w mące trzech badanych odmian fasoli kształtowała się na zbliżonym poziomie i wynosiła 4,8% w mące z odmiany Prosna, 5,6% z odmiany Wenta i 5,8% z odmiany Mela (tab. 2).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dominującymi oligosacharydami w nasionach fasoli były sacharoza i stachioza, natomiast rafinoza występowała w znacznie mniejszych ilościach. Zawartość sacharozy w mące była na zbliżonym poziomie i wynosiła od 2,3% (Wenta) do 3,0% (Mela). Różnice zawartości stachiozy między odmianami fasoli były większe i jej ilość wahała się w granicach 2,1% (Prosna) do 3,1% (Wenta). Duże różnice stwierdzono w zawartości rafinozy (0,11–0,32%). Ogólnie zawartość galaktocukrów była mniejsza od ilości sacharozy w mące otrzymanej z nasion fasoli odmiany Mela i Prosna, natomiast w Wencie zależność ta była odwrotna.

Otrzymane wyniki potwierdziły wcześniejsze prace, że dominującym galaktocukrem w nasionach fasoli była stachioza, której zawartość zależała od odmiany nasion i wahała się w granicach 1,8–3,4%. Rafinoza występowała w znacznie mniejszych ilościach 0,09–0,65%. Zawartość sacharozy wahała się w granicach 1,4–2,9% [8]. Znacznie mniejszą zawartością oligosacharydów charakteryzowały się PBA (0,42–2,4%) i PBK (0,62–1,6%). Porównując zawartość sacharozy w PBA i PBK stwierdzono, że tylko w przypadku preparatów otrzymanych z fasoli odmiany Prosna różnice były statystycznie istotne. Zmniejszenie zawartości sacharozy w preparatach białkowych z fasoli odmian Mela i Wenta wynosiło około 90%, natomiast w PBA i PBK z odmiany Prosna odpowiednio 52 i 77%.

Tabela 2

Zawartość oligosacharydów [g/100 g sm.] w mąkach i preparatach białkowych z nasion fasoli Mela, Prosna i Wenta.

Content of oligosaccharides [g/100 g d. m.] in flour and protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wenta varieties of bean).

Odmiana fasoli Bean variety	Rodzaj próbki Type of sample		Sacharoza Sucrose	Galaktocukry Galacto-saccharides		Ogółem galakto – cukry Total galacto-saccharides	Oligosacharydy ogółem Total oligosaccharides
				Rafinoza Raffinose	Stachioza Stachyose		
Mela	mąka flour	nieogrzewana / non-heated	2,97 ^{g} (± 0,048)[2]	0,32 ^{gh} (± 0,018)	2,46 ^{f} (± 0,170)	2,78	5,75
		ogrzewana / heated	2,32 ^{e} (± 0,039)	0,27 ^{ef} (± 0,002)	2,43 ^{f} (± 0,079)	2,70	5,02
	PBA	nieogrzewana / non-heated	0,24 ^{a} (± 0,046)	0,02 ^{a} (± 0,001)	0,16 ^{a} (± 0,028)	0,18	0,42
		ogrzewana / heated	0,28 ^{ab} (± 0,011)	0,05 ^{ab} (± 0,011)	0,28 ^{ab} (± 0,016)	0,33	0,61
	PBK	nieogrzewana / non-heated	0,31 ^{ab} (± 0,028)	0,06 ^{ab} (± 0,004)	0,25 ^{ab} (± 0,040)	0,31	0,62
		ogrzewana / heated	0,31 ^{ab} (± 0,036)	0,09 ^{bc} (± 0,011)	0,22 ^{ab} (± 0,035)	0,31	0,62
Prosna	mąka flour	nieogrzewana / non-heated	2,56 ^{f} (± 0,038)	0,11 ^{c} (± 0,048)	2,08 ^{e} (± 0,181)	2,19	4,75
		ogrzewana / heated	3,68 ^{h} (± 0,219)	0,37 ^{i} (± 0,048)	3,40 ^{h} (± 0,407)	3,77	7,45
	PBA	nieogrzewana / non-heated	1,23 ^{d} (± 0,044)	0,18 ^{d} (± 0,048)	1,00 ^{d} (± 0,067)	1,18	2,41
		ogrzewana / heated	1,28 ^{d} (± 0,040)	0,22 ^{de} (± 0,048)	1,06 ^{d} (± 0,085)	1,28	2,56
	PBK	nieogrzewana / non-heated	0,58 ^{c} (± 0,038)	0,39 ^{i} (± 0,048)	0,60 ^{c} (± 0,075)	0,99	1,57
		ogrzewana / heated	0,64 ^{c} (± 0,050)	0,27 ^{ef} (± 0,048)	0,40 ^{b} (± 0,057)	0,67	1,31
Wenta	mąka flour	nieogrzewana / non-heated	2,31 ^{e} (± 0,029)	0,22 ^{de} (± 0,013)	3,09 ^{g} (± 0,129)	3,31	5,62
		ogrzewana / heated	2,93 ^{g} (± 0,135)	0,56 ^{k} (± 0,026)	4,08 ^{i} (± 0,233)	4,63	7,56
	PBA	nieogrzewana / non-heated	0,28 ^{ab} (± 0,004)	0,18 ^{d} (± 0,024)	0,68 ^{c} (± 0,029)	0,86	1,14
		ogrzewana / heated	0,37 ^{b} (± 0,022)	0,29 ^{fg} (± 0,035)	0,71 ^{c} (± 0,042)	1,00	1,37
	PBK	nieogrzewana / non-heated	0,21 ^{a} (± 0,005)	0,35 ^{hi} (± 0,040)	0,26 ^{ab} (± 0,031)	0,61	0,82
		ogrzewana / heated	0,23 ^{a} (± 0,047)	0,49 ^{j} (± 0,034)	0,37 ^{ab} (±0,050)	0,86	1,09

Objaśnienia: Explanatory notes:
± odchylenie standardowe / standard deviation,
a-k te same litery w kolumnie oznaczają brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi ($p \geq 0.95$) / the same letters in column show no statistically significant differences among mean values ($p \geq 0.95$).

Różnice zawartości poszczególnych galaktocukrów pomiędzy preparatami białkowymi otrzymanymi z fasoli odmiany Mela były statystycznie nieistotne, a stopień zmniejszenia zawartości galaktocukrów wynosił około 90% w stosunku do mąki. Natomiast w preparatach z fasoli odmian Prosna i Wenta sposób izolacji miał

istotny wpływ na zawartość galaktocukrów. W obu odmianach stwierdzono większe zmniejszenie ich całkowitej zawartości w PBK.

Zmniejszenie zawartości oligosacharydów w preparatach białkowych związane jest z procesem technologicznym. Ekstrakcja białek powoduje, że duża część sacharydów przechodzi do ekstraktów białkowych, a część zostaje usunięta. Wytrącanie białka powoduje, że większość oligosacharydów pozostaje w supernatancie [17].

Analizując udział poszczególnych galaktocukrów stwierdzono, że w preparatach białkowych z fasoli odmian Prosna i Wenta zmniejszyła się ilość stachiozy, przy czym obniżenie jej ilości było większe w PBK (o 80 i 88%) niż w PBA (o 52 i 78%). Porównując zawartość rafinozy stwierdzono, że kierunek zmian uzależniony był od odmiany fasoli. W preparatach z Meli zmniejszyła się jej zawartość, natomiast zaobserwowano wzrost zawartości tego cukru w odniesieniu do mąki w obu preparatach z fasoli odmiany Prosna oraz PBK z fasoli odmiany Wenta. Zwiększenie zawartości rafinozy w preparatach białkowych może być spowodowane zmianami w strukturze białka zachodzącymi podczas izolacji, które powodują uwolnienie sacharydu z cząsteczek białka, w wyniku czego zwiększa się jego ilość w ekstrakcie.

W próbkach mąki poddanych działaniu temperatury stwierdzono istotne zmiany zawartości oligosacharydów, przy czym kierunek zmian uzależniony był od odmiany nasion. W mące z fasoli odmiany Mela stwierdzono zmniejszenie zawartości oligosacharydów o 12%, natomiast w próbkach z pozostałych odmian obserwowano wzrost ich ilości o 34–57%. Porównując zawartość poszczególnych oligosacharydów w preparatach białkowych nieogrzewanych i poddanych działaniu temperatury nie stwierdzono istotnych różnic w ich ilości w PBA i PBK z fasoli odmiany Mela oraz PBA z fasoli odmiany Prosna. W sposób statystycznie istotny zmniejszyła się ilość rafinozy i stachiozy w PBK z fasoli odmiany Prosna po ogrzaniu. Natomiast w preparatach otrzymanych z fasoli odmiany Wenta zaobserwowano po ogrzaniu istotny, 33–63-procentowy wzrost zawartości rafinozy. Otrzymane wyniki nie są zgodne z danymi literaturowymi, według których w nasionach poddanych gotowaniu następuje zmniejszenie zawartości galaktocukrów [3]. Różnice są prawdopodobnie spowodowane zastosowanymi warunkami obróbki cieplnej. We wszystkich pracach poddawano badane nasiona ogrzewaniu w roztworze. Dlatego zmniejszenie zawartości galaktocukrów było spowodowane głównie wymyciem ich z nasion. Cukry te zaliczają się do związków termostabilnych i podczas obróbki cieplnej obserwowano tylko niewielki wzrost zawartości produktów ich rozkładu. W niniejszej pracy mąka i preparaty białkowe ogrzewane były w postaci suchej w zamkniętych fiolkach. Dlatego wzrost zawartości oligosacharydów może być spowodowany zmianami zachodzącymi w białkach pod wpływem temperatury. Częściowe rozfałdowanie łańcuchów polipeptydowych może powodować uwalnianie cząsteczek sacharydów zamkniętych wewnątrz molekuł białkowych.

W mąkach i preparatach białkowych przeprowadzono oznaczenia zawartości fosforu fitynowego, który przeliczano na kwas fitynowy i podano w g/100 g s.m. próbki w tab. 3. W mąkach zawartość kwasu fitynowego wahała się w granicach od 1,6 % (odmiana Mela) do 2,0% (odmiana Wenta). Natomiast w PBA obserwowano wzrost zawartości kwasu fitynowego w stosunku do mąki o 41% w fasoli odmiany Mela, o 35% w fasoli odmiany Prosna i o 16% w fasoli odmiany Wenta. Odwrotną zależność obserwowano w PBK, gdzie zawartość kwasu fitynowego zmniejszyła się w stosunku do mąki o 38–62%. Wzrost ilości kwasu fitynowego stwierdzili w izolatach i koncentratach białkowych otrzymanych z nasion bobu i grochu Carnovale i wsp. [10] oraz z soi Anderson i Wolf [2]. Uzyskana zróżnicowana zawartość kwasu fitynowego w preparatach białkowych może wynikać z zastosowanych warunków ekstrakcji białek, a zwłaszcza pH ekstrahenta. Badania rozpuszczalności kwasu fitynowego mąki bobu przeprowadzone przez Carnovale i wsp. [10] wykazały, że w środowisku o pH 8 rozpuszcza się około 90% kwasu fitynowego, a w środowisku o pH 4,5 w supernatancie pozostaje tylko 30% kwasu fitynowego. Natomiast w roztworze o pH 5,5, stosowanym do ekstrakcji białek krystalicznych, kwas fitynowy wykazuje mniejszą rozpuszczalność wynoszącą około 60%. Podobne wyniki rozpuszczalności kwasu fitynowego z soi uzyskały Borowska i Kozłowska [6].

Ali i Baker [1] badali wpływ pH roztworu kwasu cytrynowego stosowanego do ekstrakcji białek na zawartość kwasu fitynowego. Autorzy podają, że najmniejszą ilość kwasu fitynowego uzyskano w białkach ekstrahowanych kwasem cytrynowym o pH 5,5, natomiast obniżanie pH powodowało wzrost ilości kwasu fitynowego w końcowym produkcie. Związane jest to z dysocjacją kompleksu białko-fityna, która występuje w największym stopniu w środowisku o pH 5,5 i uwolniony kwas fitynowy pozostaje w supernatancie. Ponadto zastosowane warunki ekstrakcji (pH, temperatura) mogą przyczyniać się do częściowej degradacji fitynianów [18]. Ponieważ kwas fitynowy może tworzyć kompleksy z białkiem, przez co ogranicza jego wartość odżywczą, zawartość fosforu fitynowego przeliczono na 100 g białka w suchej masie. Porównując uzyskane wyniki (tab. 3) stwierdzono, że we wszystkich preparatach następowało zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego w porównaniu z mąką. Jednak największe zmniejszenie (82–88%) zawartości fosforu fitynowego obserwowano w PBK otrzymanych z fasoli wszystkich badanych odmian, podczas gdy w PBA zmniejszenie wynosiło 60–62%. Potwierdza to fakt, że zastosowanie kwasu cytrynowego o pH 5,5 do ekstrakcji białek powoduje dysocjację kompleksu białko – fityna i przyczynia się do zmniejszenia ilości kwasu fitynowego w preparatach białek krystalicznych.

Tabela 3

Zawartość fosforu fitynowego i kwasu fitynowego w mące i preparatach białkowych otrzymanych z fasoli odmiany Mela, Prosna i Wenta.
Content of phytate phosphorus and phytic acid in flour and protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wenta varieties of bean).

Odmiana fasoli Bean variety	Rodzaj próbki Type of sample		Fosfor fitynowy [g/100 g s.m.] Phytate-P [g/100g d.m.]	Fosfor fitynowy [g/100 g białka s.m.] Phytate-P [g/100 g protein d.m.]	Kwas fitynowy [g/100 g s.m.] Phytic acid [g/ 100 g d.m.]
Mela	mąka flour	nieogrzewana / non-heated	0,464 (±0,007)	2,116	1,645 [i]
		ogrzewana / heated	0,437 (±0,010)	1,996	1,551 [h]
	PBA	nieogrzewana / non-heated	0,651 (±0,008)	0,846	2,310 [o]
		ogrzewana / heated	0,594 (±0,006)	0,773	2,110 [m]
	PBK	nieogrzewana / non-heated	0,284 (±0,006)	0,344	1,008 [e]
		ogrzewana / heated	0,262 (±0,006)	0,318	0,932 [d]
Prosna	mąka flour	nieogrzewana / non-heated	0,500 (±0,005)	2,702	1,775 [j]
		ogrzewana / heated	0,410 (±0,005)	2,214	1,454 [g]
	PBA	nieogrzewana / non-heated	0,697 (±0,004)	0,999	2,412 [r]
		ogrzewana / heated	0,621 (±0,011)	0,913	2,205 [n]
	PBK	nieogrzewana / non-heated	0,358 (±0,009)	0,478	1,270 [f]
		ogrzewana / heated	0,246 (±0,006)	0,328	0,873 [c]
Wenta	mąka flour	nieogrzewana / non-heated	0,567 (±0,006)	2,275	2,019 [l]
		ogrzewana / heated	0,534 (±0,005)	2,138	1,898 [k]
	PBA	nieogrzewana / non-heated	0,660 (±0,006)	0,86	2,342 [p]
		ogrzewana / heated	0,567 (±0,005)	0,74	2,012 [l]
	PBK	nieogrzewana / non-heated	0,215 (±0,010)	0,264	0,762 [b]
		ogrzewana / heated	0,160 (±0,008)	0,196	0,568 [a]

Objaśnienia: / Explanatory notes:
± odchylenie standardowe / standard deviation;
a-k grupy jednorodne wyznaczone testem Duncana ($p \geq 0,95$) / homogeneous groups determined using a Duncan test ($p \geq 0.95$).

Działanie wysokiej temperatury powodowało zmniejszenie zawartości kwasu fitynowego we wszystkich badanych próbkach (różnice statystycznie istotne). Największe zmniejszenie zawartości kwasu fitynowego w mąkach pod wpływem temperatury obserwowano w mące otrzymanej z fasoli odmiany Prosna (18%). W PBA zmniejszenie było niższe (11–16%) w porównaniu z próbkami nie poddanymi działaniu wysokiej temperatury. W PBK największe zmniejszenie zawartości, o 22%, uzyskano z fasoli odmiany Prosna, natomiast w przypadku odmian fasoli Mela i Wenta wynosiło odpowiednio 5 i 9%. Niewielkie zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego pod wpływem ogrzewania w nasionach obserwowali Barampama i Simard [3] oraz znacznie większe podczas ogrzewania w temp. powyżej 120°C – Rehman i Shah [27].

Jednak wzrost temperatury powoduje tylko częściową degradację fitynianów ze względu na trwałość wiązań estrowych między inozytolem a kwasem fosforowym.

Wnioski

1. Zastosowanie procesu krystalizacji do otrzymywania preparatów białkowych wpłynęło na większe zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego, aktywności TI niż w PBA oraz znaczne zmniejszenie zawartości galaktocukrów w porównaniu z mąką, do poziomu takiego samego bądź niższego niż w PBA.
2. Pod wpływem obróbki termicznej preparatów białek krystalicznych stwierdzono zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego, natomiast zmiany ilości inhibitora trypsyny i galaktocukrów zależały od odmiany nasion.

Literatura

[1] Alli I., Baker B.E.: Constitution of leguminous seeds. A note on protein- phytic acid interactions during isolation of acid-soluble protein from *Phaseolus* beans. J. Sci. Food Agric, 1981, **32**, 588-592.
[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] Barampama Z., Simard R.E.: Oligosaccharides, anti-nutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. J. Food Sci., 1994, **59, (4)**, 833-838.
[4] Beal L., Metha T.: Zinc and phytate distribution in peas. Influence of heat treatment, germination, ph, substrate, and phosphorus on pea phytate and phytase. J. Food Sci*.,* 1985, **50**, 96-100 i 115.
[5] Birk Y.: Protein Proteinase Inhibitors in Food. Proceeding of the International Conference Euro Food Tox IV, 1994, Olsztyn, pp. 202-213.
[6] Borowska J., Kozłowska H.: Isolates from faba bean and soybean with lowered content of phytic acid and activity of the trypsin inhibitors. Die Nahrung, 1986, **30**, 11-18.
[7] Buera M.P., Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B.: Kinetics of tripsin inhibitory activity loss in heated flour from bean, *Phaseolus Vulgaris* J. Food Sci., 1984, **49**, 124-126, 136.
[8] Burbano C., Muzquiz M., Ayet G., Cuadrado C., Pedrosa M. M.: Evaluation of anti-nutritional factors of selected varieties of *Phaseolus vulgaris.* J. Sci. Food Agric*.*, 1999, **79**, 1468-1472.
[9] Carbonaro M., Grant G., Cappelloni M., Pusztai A.: Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins: anti-nutritional compounds or storage proteins? J. Agric. Food Chem., 2000, **48**, 742-749.
[10] Carnovale E., Lugaro E., Lombardi-Boccia G.: Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. Cereal Chem., 1988, **65, (2)**, 114-117.
[11] Chan K.C., de Lumen B.O.: Properties of trypsin inhibitor from winged bean *(Psophocarpus tetragonolobus)* seed isolated by affinity chromatography. J. Agric. Food Chem., 1982, **30**, 42-46.
[12] Cheryan M.: Phytic acid interaction in food system. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1980, **13**, 297-335.
[13] Dhurandhar N.V., Chang K.C.: Effect of cooking on firmness, trypsin inhibitors, lectins and cystine/cysteine content of navy and Red Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci., 1990, **55**, 470-474.
[14] DiPietro Ch. M., Liener I. E.: Heat inactivation of the Kunitz and Boman-Birk soybean protease inhibitors. J. Agric. Food Chem., 1989, **37**, 39-44.
[15] DiPietro Ch.M., Liener I.E.: Soybean Protease Inhibitors in Foods. J. Food Sci., 1989, **54**, 606-609.

[16] Frias J., Zieliński H., Piskuła M.K., Kozłowska H., Vidal-Valverde C.: Inositol phosphate content and trypsin inhibitor in ready-to-eat cruciferous sprouts. Food Chem. 2005, **93**, 331-336
[17] Gueguen J., Quemener B., Valdebouze P.: Elimination des facteurs antinutritionnels de la feverole (*Vicia faba* L.) et du pois (*Pisum sativum* L.) au cours de la preparation des isolats proteiques. Lebsum-Wiss. u.-Technol., 1980, **14**, 72-77.
[18] Gustafsson E-L., Sandberg A-S.: Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). J. Food Sci., 1995, **60**, 149-152, 156.
[19] Hamerstrand G.E., Black L.T., Glover J.D.: Trypsin inhibitors in soy products, modification of the standard analytical procedure. Cereal Chemistry, 1981, **58 (1)**, 42-45.
[20] Jacórzyński B.: Czynniki antyżywieniowe występujące w nasionach roślin strączkowych. Przem. Spoż., 1988, **42**, 251-254.
[21] Jacórzyński B.: Galaktocukry nasion roślin strączkowych i możliwości ich eliminacji. Przem. Spoż. 1988, **42**, 323-325.
[22] Kosson R.: Oznaczanie cukrów typu rafinozy w nasionach roślin strączkowych metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej - HPLC. Roczn. PZH, 1992, **43**, 179-185.
[23] Liener I.E.: Possible adverse effects of soybean anti-carcinogens. J. Nutr., 1995, **125**, 744S-750S.
[24] Piecyk M,. Klepacka M: Właściwości funkcjonalne preparatów białkowych otrzymanych z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*). Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2004, **4 (41)**, 54-65.
[25] Piecyk M., Worobiej E., Klepacka M.: Digestibility of crystalline proteins from *Phaseolus* bean*s*. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2000, **9/50**, 29-33.
[26] Porzucek H., Duszkiewicz-Reinhard W., Piecyk M., Klepacka M., Gniewosz M.: Changes of flatulence-causing sugars in legume protein samples by high hydrostatic pressure. Electr J. Pol. Agr. Univ**.**, Food Sci. Tech., 2002, **5 (2).**
[27] Rehman Z., Shah W. H.: Thermal heat processing effects on anti-nutrients, protein and starch digestibility of food legumes. Food Chem., 2005, **91**, 327-331.
[28] Shing B, Bhat T.K., Shing B. Potential therapeutic applications of some anti-nutritional plant secondary metabolites. J. Agric. Food Chem., 2003, **51**, 5579-5597.
[29] Sosulski F.W., McCurdy A.R.: Functionality of flours, protein fractions and isolates from Field peas and Faba bean. J. Food Sci. 1987, **52**, 1010-1014.
[30] Thiese W.: Determination of the phytic acid esters in seeds of rapeseed and selection of genotypes whit reduced concentrations of these compounds. Fat. Sci. Technol., 1991, **93**, 49-52.

THE CONTENT OF TRYPSIN INHIBITORS, OLIGOSCCHARIDES, AND PHYTIC ACID IN THE BEAN SEED *(PHASEOLUS VULGARIS)* PREPARATIONS OBTAINED BY CRYSTALLIZATION AND CLASSICAL ISOLATION

S u m m a r y

In this paper, the comparison was made between the content of oligosccharides, phytic acid, and trypsin inhibitors contained in protein preparations manufactured from bean seeds with the use of two

methods: classical isolation and crystallization under acidic conditions. During the classical isolation process, proteins were reclaimed from alkaline extracts at a minimum solubility; they had an amorphous form (PBA). The second method consisted in the utilization of the ability of bean proteins to create crystalline structures at acidic conditions (PBK).

The investigations performed showed that when the crystallization method was applied, it was possible to obtain preparations of lower contents of phytic acid and inhibitors compared to the classical isolation process. In the preparations obtained, the content of oligosaccharides was also decreased compared to the bean flour. The crystallization process caused a decrease in the content of galactosaccharides and their content was either at levels similar or lower than the respective levels of their content obtained using the classical isolation method. A thermal processing applied (100^{o}C, t = 30 min) produced a decrease in the content of phytic acid, whereas the change in the contents of oligosaccharides and trypsin inhibitors depended upon the variety of seeds used.

Key words: bean, amorphous and crystalline proteins, phytic acid, oligosaccharides, trypsin inhibitor

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 105 - 112

ANDRZEJ TYBURCY, EWELINA TOSZEK, ANETA CEGIEŁKA

PORÓWNANIE SKŁADU SUROWCOWEGO I WSKAŹNIKÓW CHEMICZNYCH PARÓWEK DROBIOWYCH I WIEPRZOWYCH OFEROWANYCH W SPRZEDAŻY DETALICZNEJ W WARSZAWIE

S t r e s z c z e n i e

Celem pracy było porównanie wybranych wyróżników jakości 5 sortymentów parówek (2 drobiowych i 3 wieprzowych) wytwarzanych przez polskich producentów. Badania wykonano po wprowadzeniu w Polsce nowych przepisów odnośnie znakowania artykułów spożywczych (w tym nowej definicji mięsa). Oceniono 4 partie produkcyjne każdego wyrobu. W parówkach oznaczono zawartość wody, białka, tłuszczu, NaCl, kolagenu oraz pH. Na podstawie składu chemicznego obliczono ich wartość energetyczną.

Przetwory wytwarzane z mięsa wieprzowego charakteryzowały się większą zawartością tłuszczu i wartością energetyczną (23-25%, 1094-1198 kJ/100g) niż ich odpowiedniki drobiowe (ok. 19%, 934-989 kJ/100g). Wskaźnik udziału kolagenu w białku ogółem w większości parówek nie przekraczał poziomów określonych przez definicje mięsa wieprzowego i drobiowego (odpowiednio 25% lub 10% białka ogółem). W przypadku jednego z produktów drobiowych wartość większa od dopuszczonej była uzasadniona deklaracją dodatku białka kolagenowego. Mimo zniesienia obowiązku stosowania Polskich Norm w składzie chemicznym ocenianych parówek nie stwierdzono przekroczeń określonych w nich wymagań.

Słowa kluczowe: parówki, mięso wieprzowe, mięso drobiowe, skład chemiczny

Wprowadzenie

Jakość przetworów mięsnych i drobiowych kształtowana jest przez wiele czynników, w tym także przez obowiązujące prawo żywnościowe. W Polsce nastąpiły w ostatnich latach istotne zmiany w tym zakresie. Od początku 2003 r. stosowanie Polskich Norm nie jest już obligatoryjne [7]. Z tym faktem mogą być związane obawy o pogorszenie jakości przetworów mięsnych. Z drugiej strony wprowadzone od niedawna akty prawne dotyczące znakowania artykułów spożywczych wymagają od

Dr inż. A. Tyburcy, mgr inż. E. Toszek, dr inż. A. Cegiełka, Zakład Technologii Mięsa, Katedra Technologii Żywności, SGGW, ul. Nowoursynowska 159C, 02-787 Warszawa

producentów podawania procentowej zawartości mięsa w przetworach przeznaczonych bezpośrednio dla konsumenta [15]. Zapis ten jest bardzo ogólny i pozostawia możliwość różnych interpretacji [4]. Wydaje się jednak, że dotyczy on takich przetworów jak parówki, które mogą znacznie różnić się składem recepturowym. Wytwarzanie parówek stwarza dla producentów okazję do zagospodarowania tańszych surowców tłuszczowych i kolagenowych, jak również mięsa oddzielonego mechanicznie (MOM). Wykorzystanie MOM ma szczególnie duże znaczenie ekonomiczne w zakładach drobiarskich.

Od przystąpienia Polski do UE obowiązuje w naszym kraju nowa definicja mięsa, która ogranicza w takim surowcu zawartość tłuszczu i tkanki łącznej do poziomu odpowiednio 30% i 25% w przypadku mięsa wieprzowego oraz 15% i 10% w mięsie ptaków. Mięso oddzielone mechanicznie musi być deklarowane w przetworach osobno [12]. Zmiany te są bardzo korzystne z punktu widzenia konsumenta [4].

Zgodnie z nową definicją mięso drobiowe charakteryzuje się mniejszą zawartością tłuszczu i kolagenu niż mięso wieprzowe. Taka zależność nie musi jednak przenosić się na cechy przetworów z udziałem mięsa drobiowego, w których stanowi ono tylko część składu surowcowego (obok składników tłuszczowych i kolagenowych).

Celem niniejszej pracy było porównanie składu surowcowego i wskaźników chemicznych kilku sortymentów parówek drobiowych i wieprzowych wytwarzanych przez polskich producentów i oferowanych w sprzedaży detalicznej w Warszawie, po wprowadzeniu nowych przepisów prawa żywnościowego.

Materiał i metody badań

Parówki drobiowe i wieprzowe kupowano w dwóch warszawskich sklepach (supermarkecie i hipermarkecie) w ostatnim kwartale 2004 r. Oceniono 5 produktów nazywanych dalej: D1, D2, W1, W2 i W3 (D oznacza parówki z udziałem mięsa drobiowego, a W z mięsem wieprzowym). Były one wytwarzane przez różnych producentów. Składniki tych wyrobów przedstawiono w tab. 1. Proporcja liczby ocenianych produktów drobiowych i wieprzowych (2:3) wynikała z przeprowadzonej wcześniej analizy oferty kilku warszawskich hipermarketów. Oceniono 4 partie produkcyjne każdego z wyrobów.

W parówkach oznaczano zawartość: wody metodą suszenia [8], białka metodą Kjeldahla [6], tłuszczu metodą Gerbera [8], NaCl metodą potencjometryczną przy użyciu zautomatyzowanego aparatu 702 SM Titrino firmy Metrohm (wyposażonego w zestaw do oznaczania chlorków - elektrodę i zbiornik 0,1 M $AgNO_3$) oraz kolagenu metodą hydroksyprolinową [11], przyjmując 8 jako przelicznik ilości hydroksyproliny na kolagen. Wymienione wyżej oznaczenia wykonywano dwukrotnie w każdej ocenianej partii produkcyjnej, przyjmując średnią jako wynik w danej partii. Na

podstawie średniej zawartości wody, tłuszczu, białka i NaCl w poszczególnych produktach oraz przyjętej średniej zawartości substancji mineralnych, innych niż NaCl – 0,6%, oszacowano zawartość węglowodanów i wartość energetyczną parówek. Przyjęto współczynniki przeliczeniowe w przypadku białka, tłuszczu i węglowodanów odpowiednio 17 kJ (4 kcal)/g, 37 kJ (9 kcal)/g i 16 kJ (4 kcal)/g [13]. Oznaczano także pH kiełbas [8].

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statgraphics Plus 4.1, stosując jednoczynnikową analizę wariancji. Do szczegółowego porównania średnich użyto testu Duncana.

Wyniki i dyskusja

Analiza informacji dotyczących składu surowcowego ocenianych parówek (tab. 1) podanych na etykietach pozwoliła stwierdzić, że nie wszyscy producenci stosowali się do nowych przepisów o znakowaniu. W produktach D2 i W3 nie zadeklarowano dodatku wody, która bez wątpienia jest składnikiem tego rodzaju przetworów mięsnych. Ponadto w wyrobach D2 i W3 nie podano ilościowej zawartości mięsa w składzie surowcowym.

Parówki wieprzowe charakteryzowały się wyraźnie wyższą ceną niż ich odpowiedniki drobiowe (tab. 1). W przypadku produktu D1 wynikało to z użycia do jego produkcji mięsa oddzielonego mechanicznie. W przypadku wyrobu D2 składnikiem obniżającym cenę były prawdopodobnie skórki drobiowe. González-Viñas i wsp. [3] stwierdzili również znaczne (nawet dwukrotne) różnice w cenie parówek oferowanych na rynku hiszpańskim. Większość przebadanych przez nich 10 wyrobów wytwarzana była ze składu surowcowego obejmującego mieszankę mięsa drobiowego i zwierząt rzeźnych. Porównanie cen podanych przez cytowanych autorów z cenami polskich parówek nie było możliwe, ponieważ nie podali oni ceny jednostki masy wyrobów.

Zawartości wody, białka, tłuszczu i NaCl w parówkach ocenianych w niniejszej pracy (tab. 2) były zgodne z wymaganiami odpowiednich Polskich Norm [9, 10]. Wskazuje to, że mimo zniesienia obowiązku stosowania tych przepisów wybrani przez nas producenci nie odeszli od standardów wymaganych w latach ubiegłych (przed rokiem 2003). Parówki z mięsa wieprzowego charakteryzowały się istotnie większą zawartością tłuszczu i w większości przypadków istotnie mniejszą wody niż wyroby drobiowe. Zawartość białka w przetworach nie była istotnie zróżnicowana. Ilość tłuszczu w parówkach drobiowych była większa niż określona w definicji mięsa ptaków (15%). W przypadku obu wyrobów ich producenci deklarowali jednak dodatek tłuszczu wieprzowego.

Według Dudy [2], typowe parówki wytwarzane z mieszaniny mięsa wieprzowego i wołowego zawierają ok. 11% białka i 29% tłuszczu, natomiast analogiczne przetwory

z mięsa kurcząt lub indyków 13–15% białka i 17–18% tłuszczu. Oceniane w niniejszej pracy parówki drobiowe charakteryzowały się mniejszą zawartością białka, a wieprzowe tłuszczu w porównaniu do przytoczonych danych.

Tabela 1

Skład surowcowy i cena parówek.
Formulas and prices of the frankfurters assessed.

Produkt Product	Skład surowcowy Formula	Cena [zł/kg] Price [zl/kg]
D1	mięso drobiowe oddzielone mechanicznie z kurcząt, tłuszcz wieprzowy, woda, skrobia, białko roślinne, sól, cukry, przyprawy, askorbinian sodu, azotan(III) sodu	7,99
D2	mięso i skórki drobiowe, tłuszcz wieprzowy, białko kolagenowe, cytrynian sodu, izoaskorbinian sodu, glutaminian monosodowy	8,69
W1	mięso wieprzowe (62%), woda, tłuszcz wieprzowy, sól, białko sojowe, skrobia ziemniaczana, skrobia modyfikowana, syrop glukozowy, glutaminian sodu, trifosforany, karagen, cukry, przyprawy, ekstrakty przypraw, askorbinian sodu, azotan(III) sodu	19,96
W2	mięso wieprzowe (70,7%), woda, skrobia ziemniaczana, sól, białko sojowe, białko kolagenowe wieprzowe, hydrolizat białka roślinnego, przyprawy naturalne i ich ekstrakty, cukry, karagen, skrobia modyfikowana, askorbinian sodu, kwas askorbinowy, glutaminian monosodowy, azotan(III) sodu	15,96
W3	mięso wieprzowe, sól, przyprawy naturalne, cytrynian sodu, glutaminian monosodowy, izoaskorbinian sodu, azotan(III) sodu	17,96

Tabela 2

Skład chemiczny parówek.
Chemical composition of the frankfurters assessed.

Produkt Product	Woda [%] Water [%]	Białko [%] Protein [%]	Tłuszcz [%] Fat [%]	Sól kuchenna [%] Sodium chloride [%]
D1	62,1 ±2,4^{b}	11,8 ±0,5^{a}	19,1 ±1,8^{a}	2,2 ±0,3^{a}
D2	66,0 ±1,4^{c}	11,9 ±1,8^{a}	19,4 ±1,1^{a}	2,0 ±0,1^{a}
W1	58,9 ±1,8^{a}	11,5 ±0,8^{a}	25,0 ±1,2^{bc}	2,5 ±0,2^{b}
W2	58,1 ±0,7^{a}	11,5 ±1,1^{a}	26,0 ±0,7^{c}	2,2 ±0,1^{a}
W3	60,7 ±2,8^{ab}	13,4 ±1,6^{a}	23,0 ±2,8^{b}	2,0 ±0,1^{a}

a,b,c – wartości średnie oznaczone tą samą literą w indeksie nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$)
a,b,c – mean values designated by the same superscripted letter are not statistically significantly different ($p > 0.05$)

W parówkach oferowanych na rynku hiszpańskim wytwarzanych z różnych surowców zawartość białka wahała się od 11 do 16%, a tłuszczu od 11 do 22%, przy czym większość tych produktów (9 na 10) miała zawartość tłuszczu poniżej 20%; w połowie z nich zawartość tego składnika nie przekraczała 15% [3]. Można zatem stwierdzić, że hiszpańskie parówki charakteryzowały się mniejszą zawartością tłuszczu niż analogiczne przetwory wytwarzane przez polskich producentów. Na podstawie danych przedstawionych przez Dudę [2], większość produktów hiszpańskich mogłaby być uznana za wyroby niskotłuszczowe.

Średnia ilość NaCl w ocenianych parówkach zawierała się w granicach 2,0–2,5%. Tylko jeden wyrób (W1) charakteryzował się istotnie większą zawartością tego składnika niż pozostałe parówki.

Zawartość tłuszczu wpłynęła na większą wartość energetyczną parówek z mięsa wieprzowego niż drobiowych (tab. 3). Potwierdza to opinię [5], że przetwory drobiowe charakteryzują się mniejszą kalorycznością niż ich odpowiedniki wytwarzane z mięsa wieprzowego. Według innego autora [2] wartość energetyczna parówek drobiowych waha się z reguły w zakresie 226–257 kcal/100 g, natomiast w przypadku podobnych przetworów z mięsa wieprzowego i wołowego od 320 do 325 kcal/100 g. Kaloryczność wyrobów drobiowych oszacowana w niniejszej pracy była zbliżona, a wieprzowych niższa od cytowanych danych.

Tabela 3

Udział kolagenu w białku ogółem, wartość energetyczna oraz pH parówek.
Collagen to crude protein ratio, energy value and pH of the frankfurters assessed.

Produkt Product	pH	Kolagen [% białka ogółem] Collagen [% of crude protein]	Wartość energetyczna [kJ(kcal)/100 g] Energy value [kJ (kcal)/100 g]
D1	6,5 ±0,1^{b}	10,7 ±2,0 ^{a}	989 (236)
D2	6,6 ±0,2^{b}	14,8 ±0,6 ^{b}	934 (223)
W1	6,3 ±0,1^{ab}	17,1 ±3,4	1160 (277)
W2	6,1 ±0,2^{a}	22,8 ±2,0 ^{c}	1198 (286)
W3	6,1 ±0,3^{a}	16,0 ±0,4 ^{b}	1094 (261)

a,b,c – wartości średnie oznaczone tą samą literą w indeksie nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$)
a,b,c – mean values designated by the same superscripted letter are not statistically significantly different ($p > 0.05$)

Stosunek zawartości kolagenu do białka ogółem w produkcie końcowym jest taki sam jak w surowcu, o ile w zestawie surowcowym nie ma innych składników zawierających białka (np. izolatów lub koncentratów sojowych) [16]. Zawartość kolagenu w stosunku do białka ogółem w parówkach wieprzowych nie wykraczała poza dopuszczony w mięsie wieprzowym poziom 25% (tab. 3). Na obniżenie

wyznaczonego stosunku w przypadku parówek W1 i W2 mogła wpłynąć obecność białka sojowego. Największym udziałem kolagenu w białku ogólnym charakteryzował się produkt W2. Zawierał on w składzie surowcowym dodatek białka kolagenowego (tab. 1). W parówkach D2 udział kolagenu w białku ogólnym był większy niż dopuszczony w przypadku mięsa ptaków (10%). Ich producent deklarował jednak również dodatek białka kolagenowego. Analizę statystyczną w przypadku zawartości kolagenu przeprowadzono z pominięciem wyrobu W1, który charakteryzował się zbyt dużą wariancją (uniemożliwiającą wykonanie analizy wariancji wszystkich produktów). Parówki D2 i W3 tworzyły pod względem tej cechy grupę jednorodną. Wynika z tego, że pomimo mniejszej zawartości kolagenu w mięsie drobiowym niż w mięsie zwierząt rzeźnych, przetwory z jego udziałem nie zawsze charakteryzują się mniejszym udziałem kolagenu w białku ogólnym.

Zaobserwowano tendencję do wyższego pH parówek drobiowych w porównaniu z wytwarzanymi z mięsa wieprzowego (tab. 3). W przypadku produktu D1 można to tłumaczyć użyciem w recepturze mięsa oddzielonego mechanicznie, które ze względu na obecność szpiku kostnego charakteryzuje się wyższym pH niż mięso ręcznie wykrawane.

Podobieństwo pH (tab. 3) i ceny (tab. 1) produktów D1 i D2 może rodzić podejrzenie, że do parówek D2, mimo braku takiej deklaracji, dodano mięso oddzielone mechanicznie. Rozstrzygnięcie tych wątpliwości mogłaby przynieść jedynie kontrola procesu produkcyjnego w zakładzie lub zastosowanie zaawansowanych technik analitycznych. Domieszkę ponad 7,5% MOM z kurcząt do mięsa ręcznie wykrawanego można wykryć przy zastosowaniu kapilarnej elektroforezy na podstawie stosunku pola pod pikiem hemoglobiny do pola pozostałych pików uzyskanych podczas rozdziału białek [1]. Metodyka ta została jednak sprawdzona tylko w stosunku do mieszanki mięsa niepoddanej obróbce cieplnej; nie wiadomo czy jej zastosowanie byłoby możliwe w przypadku parówek. Inni autorzy [14] stwierdzili, że poddanie farszu mięsnego obróbce cieplnej utrudnia wykrywanie w nim domieszki mięsa oddzielonego mechanicznie na podstawie rozdziałów elektroforetycznych białek. Z przytoczonych informacji wynika, że udowodnienie producentowi naruszenia prawa związanego z deklaracją użycia mięsa oddzielonego mechanicznie w recepturze nie byłoby łatwe.

Wnioski

1. Parówki drobiowe charakteryzowały się większą zawartością wody, mniejszą ilością tłuszczu i mniejszą wartością energetyczną niż ich odpowiedniki wieprzowe.
2. Zawartość kolagenu w stosunku do białka ogółem w parówkach nie przekraczała poziomu określonego nową definicją mięsa lub była uzasadniona deklaracją użycia

w recepturze dodatku białka kolagenowego. Nie jest regułą, że parówki drobiowe charakteryzują się istotnie mniejszą zawartością kolagenu w stosunku do białka ogółem niż podobne przetwory z udziałem mięsa wieprzowego.

3. Mimo zniesienia obowiązku stosowania Polskich Norm, w składzie chemicznym ocenianych parówek drobiowych i wieprzowych nie zaobserwowano przekroczeń określonych w nich wymagań.

Literatura

[1] Day L., Brown H.: Detection of mechanically recovered chicken meat using capillary gel electrophoresis. Meat Sci., 2001, **57 (1)**, 31-37.

[2] Duda Z.: Zamienniki tłuszczu stosowane w przetwórstwie mięsa. Gosp. Mięs., 1998, **50 (2)**, 22-26.

[3] González-Viñas M.A., Caballero A.B., Gallego I., García Ruiz A.: Evaluation of the physico-chemical, rheological and sensory characteristics of commercially available frankfurters in Spain and consumer preferences. Meat Sci., 2004, **67 (4)**, 633-641.

[4] Gwiazda S., Dąbrowski K.: Nowy system znakowania przetworów mięsnych. Mięso i Wędliny, 2003, **6**, 18-22.

[5] Kijowski J.: Wartość żywieniowa mięsa drobiowego. Przem. Spoż., 2000, **54 (3)**, 10-11.

[6] Klepacka M. (red.): Analiza żywności. Wyd. Fundacja „Rozwój SGGW". Warszawa 1996.

[7] Kłossowska B.: Przegląd aktualnych norm z zakresu analityki chemicznej mięsa i przetworów mięsnych. Gosp. Mięsna, 2003, **55 (3)**, 20-25.

[8] Mroczek J. (red.): Ćwiczenia z kierunkowej technologii żywności – technologia mięsa i jaj. Wydawnictwo SGGW. Warszawa 2000.

[9] PN-A-82007:1996 ze zmianą A1: 1998. Przetwory mięsne. Wędliny.

[10] PN-A-86526: 1995. Produkty drobiarskie. Wędliny drobiowe. Wymagania wspólne.

[11] PN-ISO 3496: 2000. Mięso i przetwory mięsne – Oznaczanie zawartości hydroksyproliny.

[12] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 16 grudnia 2002 w sprawie znakowania środków spożywczych i dozwolonych substancji dodatkowych Dz. U. Nr 220, poz. 1856 oraz z Dz. U. 2004 Nr 58, poz. 563 i Nr 257, poz. 2577.

[13] Sampaio G.R., Castelluzzi C.M.N., Pintoe Silva M.E.M., Torres E.A.F.S.: Effect of fat replacers on the nutritive value and acceptability of beef frankfurters. J. Food Composition and Analysis, 2004, **17(3-4)**, 469-474.

[14] Savage A.W.J., Richardson R.I., Jolley P.D., Hargin K.D., Stewart C.A.: Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products – II. Gel Electrophoresis. Meat Sci., 1995, **40 (3)**, 303-317.

[15] Tyszkiewicz S.: Zmiany w sposobie jakościowego i ilościowego deklarowania składu przetworów mięsnych wynikające z przepisów obowiązujących w Unii Europejskiej. Materiały XXI Dni Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego, Warszawa 2004, s. 11-16.

[16] Tyszkiewicz S.: Szacunkowe określenie normatywnej zawartości mięsa i tkanki łącznej w produktach mięsnych. Gosp. Mięs., 2005, **57 (2)**, 20-26.

THE COMPARISON BETWEEN THE RAW MATERIAL COMPOSITION OF CHEMICAL CHARACTERISTICS OF POULTRY AND PORK FRANKFURTERS OFFERED FOR RETAIL SALES ON THE WARSAW MARKET

S u m m a r y

The objective of this study was to compare some selected quality attributes of five frankfurters (two poultry and three pork products) manufactured by Polish producers. The investigations were conducted after the new rules referring to labelling of the food products (including a new definition of meat) had been implemented in Poland. Four batches of the frankfurters were assessed. There were calculated the following frankfurter parameters: contents of water, protein, fat, NaCl, collagen, and pH were determined. Based on the chemical composition, the energy values of frankfurters were calculated.

Products manufactured from pork meat were characterized by a higher fat content and a higher energy value (23-25%, 1094-1198 kJ/100 g) if compared with the relevant poultry products (ca. 19%, 934-989 kJ/100 g). With regard to the majority of frankfurters, their collagen to crude protein ratio did not exceed the levels as provided by the definition of meat (25% as for pork and 10% as for poultry). In the case of one poultry product, the content of collagen in the total protein was higher than allowed, but this fact was explained and justified by its manufacturer declaration on having added some collagen protein. Although the requirement to obligatory apply the Polish Standards has been annulled, no facts of exceeding the permitted values were stated in the chemical composition of the frankfurters assessed.

Key words: frankfurters, pork meat, poultry meat, chemical composition

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 113 - 126

JAROSŁAWA RUTKOWSKA, ANNA ŻBIKOWSKA

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA MARGARYN PŁYNNYCH DO PRODUKCJI CIAST BISZKOPTOWO-TŁUSZCZOWYCH

S t r e s z c z e n i e

Tłuszcze są jednym z najważniejszych składników w produkcji ciast biszkoptowo-tłuszczowych.

Celem pracy było określenie wpływu margaryn płynnych na jakość ciast biszkoptowo-tłuszczowych i porównanie go z tłuszczami stosowanymi tradycyjnie w produkcji ciastkarskiej. Do przygotowania wypieków zastosowano: margaryny płynne, wybrane tłuszcze roślinne o stałej konsystencji (margaryna i emulsja tłuszczowa) oraz masło. W trzech margarynach płynnych (spośród czterech) zawartość substancji tłuszczowej wynosiła 70%, co determinowało ich korzystne właściwości funkcjonalne. Tłuszcze płynne charakteryzowały się mniejszą zawartością nasyconych oraz wyższych monoenowych kwasów tłuszczowych w porównaniu z tłuszczami stałymi. Jednak ich wielką zaletą była jednocześnie znacznie większa zawartość polienowych kwasów tłuszczowych i najmniejsza zawartość niekorzystnych izomerów trans (TFA) w porównaniu z tłuszczami stałymi.

Stwierdzono korzystny wpływ margaryn płynnych na objętość wyrobów i profil tekstury potwierdzony wysoką oceną sensoryczną tekstury. Natomiast ciasta z dodatkiem tłuszczów stałych przewyższały pod względem smaku ciasta z dodatkiem margaryn płynnych. Margaryny płynne z powodzeniem mogą zastąpić tradycyjnie stosowane tłuszcze stałe przy wytwarzaniu wyrobów biszkoptowo-tłuszczowych.

Słowa kluczowe: ciasta biszkoptowo-tłuszczowe, tekstura, objętość, margaryny płynne, skład kwasów tłuszczowych

Wprowadzenie

W produkcji ciastkarskiej tradycyjnie stosowane są tłuszcze stałe, najczęściej tzw. margaryny twarde. Niedogodnością ich stosowania jest konieczność roztopienia przed użyciem [12]. Ponadto, jak wykazano w ostatnich latach, stanowią one najpoważniejsze źródło niekorzystnych izomerów trans (TFA) w diecie [5, 6]. Tych wad nie mają margaryny ciekłe. Odznaczają się one wysoką wartością odżywczą, która wynika z faktu, że podstawowym składnikiem margaryn ciekłych jest olej [12]. Ponadto ich płynna konsystencja wpływa na łatwość dozowania i pozwala na

Dr inż. J. Rutkowska, Zakład Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, dr inż. A. Żbikowska, Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych, Wydział Technologii Żywności SGGW, ul. Nowoursynowska 159C 02-776 Warszawa

ograniczenie zużycia energii w procesie przygotowania ciasta. Natomiast w porównaniu z tłuszczami stałymi słabiej napowietrzają się i charakteryzują się gorszymi właściwościami kremotwórczymi [16]. Określając przydatność tłuszczu do produkcji ciastkarskiej należy uwzględniać jego właściwości technologiczne oraz żywieniowe stosując się do zaleceń Polskiego Konsensusu Tłuszczowego dotyczące spożycia tłuszczów w Polsce [14]. Wskazują one na maksymalne ograniczenie w spożyciu nasyconych kwasów tłuszczowych i izomerów trans kwasów nienasyconych, które w znacznych ilościach znajdują się w stałych tłuszczach przeznaczonych dla ciastkarstwa.

Celem pracy było określenie wpływu margaryn płynnych na jakość ciast biszkoptowo-tłuszczowych i porównanie go z tradycyjnie stosowanymi tłuszczami w produkcji ciastkarskiej. Ponadto badania miały również określić przydatność margaryn płynnych do produkcji ciast biszkoptowo-tłuszczowych.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły:

- cztery margaryny płynne oznaczone następująco: A-1, A-2, A-3, A-4,
- masło - M,
- tłuszcze przemysłowe: margaryna (S-1) oraz emulsja tłuszczowa (S-2)
- ciasta biszkoptowo-tłuszczowe upieczone z dodatkiem wymienionych tłuszczów.

Skład surowcowy i wypiek eksperymentalnych ciast

Ciasto biszkoptowo-tłuszczowe wykonano metodą „na zimno". Do jego sporządzenia użyto następujących składników: mąka pszenna poznańska typu 500 – 100 g, mąka ziemniaczana – 30 g, tłuszcz – 90 g, cukier puder – 95 g, jaja –140 g, proszek do pieczenia – 4 g, sok z cytryny – 10 g. Ciasta pieczono w piekarniku konwekcyjnym (Electrolux AR 85). Wypiek trwał 45 min, a temp. wynosiła 160^{o}C. Wypiek powtarzano 10-krotnie.

Metody badań

W celu zbadania jakości mąki oznaczono zawartość glutenu oraz oceniono jego jakość wg Jakubczyka i Habera, [11] i PN-91/A-74022 [19].

W tłuszczach wykonano oznaczenia zawartości: substancji tłuszczowej wg normy PN-A-86933 [21], fazy stałej metodą pulsacyjnego magnetycznego rezonansu jądrowego (PNMR) wg normy PN-EN-ISO 8292 [23], przy użyciu aparatu „Minispec PC 120" firmy Bruker. Pomiary przeprowadzono w temp. 10, 20, 30 i 35^{o} C. Analizę składu kwasów tłuszczowych wykonano wg normy PN-EN ISO 5508 [22], stosując chromatograf gazowy HP 6890.

Przeprowadzono ocenę jakościową upieczonych ciast biszkoptowo-tłuszczowych, w której zastosowano metody badań właściwości fizycznych i sensorycznych. Ocenę

wyrobów (10 ciast) przeprowadzano 24 h po wypieku. Wykonywano następujące pomiary instrumentalne:

– pomiar objętości w urządzeniu „Sa – Wy" oraz dokonywano pomiaru masy upieczonych ciast co pozwoliło na wyliczenie masy objętościowej [11],
– instrumentalne pomiary tekstury przy użyciu aparatu wytrzymałościowego Instron typ 4301, wykorzystując test cięcia. W teście cięcia mierzono następujące parametry: maksymalną siłę cięcia [N], energię ugięcia (płynięcia) próbki [J], energię potrzebną do przecięcia próbki [J], sumaryczną pracę cięcia [J].

Ocenę sensoryczną ciast przeprowadził przeszkolony zespół 10-osobowy zgodnie z normami ISO 4121:1987 [18] oraz PN-A-74252 [20]. Do oceny wyróżników sensorycznych ciasta, takich jak: wygląd zewnętrzny, zapach, smak, tekstura i barwa zastosowano metodę skalowania. Objętość ciast oceniano niestrukturowaną skalą graficzną.

Ponadto oceniono „łatwość" przygotowania półproduktu ciasta biszkoptowo-tłuszczowego z różnym dodatkiem tłuszczowym, mierząc czas jego wykonania.

Do interpretacji wyników zastosowano następujące metody statystyczne: jednoczynnikową analizę wariancji oraz normowanie statystyczne wg Stupnickiego [25]. Zastosowano do tego celu program komputerowy Statgraphics plus for Windows 2.1, arkusz kalkulacyjny Microsoft Excel. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Ocena jakości mąki

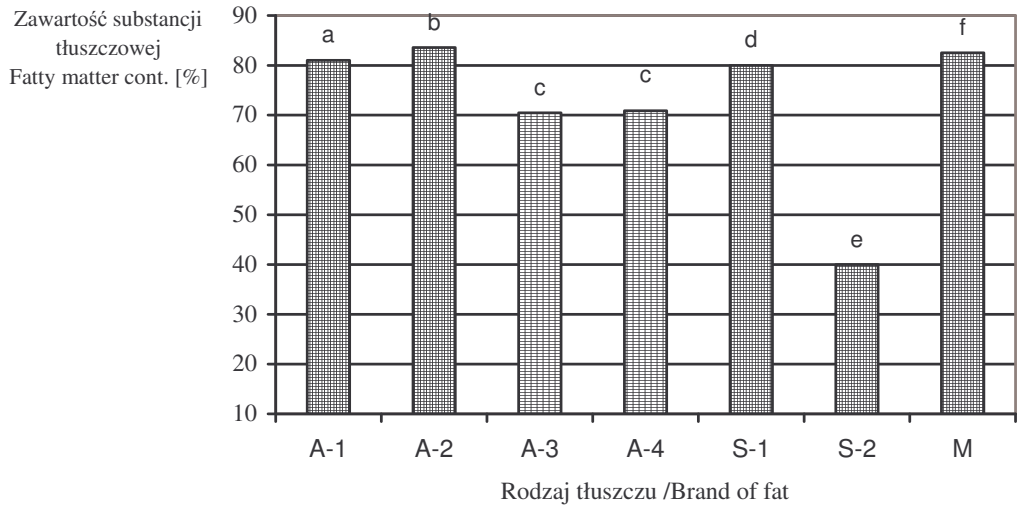
Badana mąka charakteryzowała się 28% zawartością glutenu. Cechy glutenu przedstawiały się następująco: elastyczność glutenu – 60 mm (2 stopień skali) – średnio elastyczny, rozpływalność glutenu: R = 6,5 mm. Wyniki te spełniały wymagania normy PN-91/A-74022 [19] dotyczące mąki pszennej typu 500. Ponadto liczba glutenowa mąki wynosiła LG = 44, co wskazuje na dobrą jej jakość.

Czas przygotowania półproduktu

Podczas przygotowania półproduktów ciasta biszkoptowo-tłuszczowego zmierzono czas konieczny do uzyskania pożądanej emulsji. Stwierdzono, że na przygotowanie półproduktu z masłem lub tłuszczami roślinnymi o konsystencji stałej potrzeba 12 min. W przypadku zastosowania margaryn płynnych czas ten można skrócić do 5 min. Jak zauważyła Hoffmann [10], jest to ogromna zaleta tych tłuszczów, ponieważ ich stosowanie szczególnie w przemysłowej produkcji ciast pozwala na ograniczenie zużycia energii. Krygier [12] podkreśla również, że płynna konsystencja tych tłuszczów eliminuje konieczność ich roztopienia przed użyciem i usuwa niebezpieczeństwo przegrzania i zniszczenia struktury emulsji, co jest dominującą wadą technologiczną margaryn twardych.

Oznaczenia tłuszczów

Badane tłuszcze były istotnie zróżnicowane ($p < 0,05$) pod względem zawartości substancji tłuszczowej (rys. 1). Największą zawartość substancji tłuszczowej – 83,56% oznaczono w margarynie płynnej A-2, a najmniejszą zawartością tłuszczu charakteryzowała się emulsja tłuszczowa S-2 (39,98%). Ze względu na fakt, że tłuszcze spełniają wiele korzystnych funkcji technologicznych wpływających na jakość ciast, pożądana jest wysoka zawartość substancji tłuszczowej w tłuszczach ciastkarskich. W niniejszych badaniach stwierdzono wysoką i dość wysoką zawartość substancji tłuszczowej we wszystkich badanych margarynach płynnych (nie niższą niż 70%). Można przewidywać, że takie tłuszcze będą charakteryzować się dobrymi właściwościami funkcjonalnymi [8, 27].



[a,b,c] Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p<0,05$ / Mean values designated by the same letters are not statistically significantly different at a level of $p<0,05$.

Rys. 1. Zawartość substancji tłuszczowej w badanych tłuszczach.
Fig. 1. Fatty matter content in fats studied.

Podobnie stwierdzili inni autorzy [24, 29], że wysoka zawartość substancji tłuszczowej (około 80%) korzystnie wpływała na porowatość miękiszu ciast biszkoptowo-tłuszczowych.

Jak należało oczekiwać, margaryny płynne charakteryzowała niska zawartość fazy stałej (SFC), która nie przekraczała 3,2% w temp. 10°C (margaryna A-4). Analizowane tłuszcze różniły się istotnie ($p < 0,05$) pod względem zawartości SFC w każdej badanej temperaturze (tab. 1). Jedynie tłuszcze A-2 i A-3 charakteryzowały się

tą samą zawartością SFC w temp. 10°C. Natomiast w tłuszczach stałych największą zawartość SFC oznaczono w margarynie S-1: od 44,6% w temp. 10°C do 6,2% w temp. 35°C. Jednocześnie margaryna S-1 charakteryzowała się najwyższym tempem spadku zawartości SFC wraz ze wzrostem temperatury spośród badanych tłuszczów. Drugim tłuszczem pod względem zawartości SFC, w temperaturze pomiaru, było masło (34,5% w 10°C i 5,2% w 35°C), a następnie emulsja tłuszczowa S-2, w której zawartość SFC w temp. 10°C wynosiła 25,6%. Zawartość fazy stałej jest ściśle związana z zawartością poszczególnych typów gliceroli i decyduje o jednej z podstawowych cech tłuszczów ciastkarskich, czyli plastyczności [27]. Szczególnie istotna jest zawartość SFC w temp. wyrobu ciasta, czyli około 25°C. Oczywiste jest że margaryny płynne nie spełniają wymogu plastyczności z powodu swojej ciekłej konsystencji (najniższy próg plastyczności to 5% SFC) [4, 9, 28].

Tabela 1

Zawartość fazy stałej – SFC w tłuszczach w zależności od temperatury pomiaru [%].
Solid fat content (SFC) of fats depending on the temperature when measuring [%].

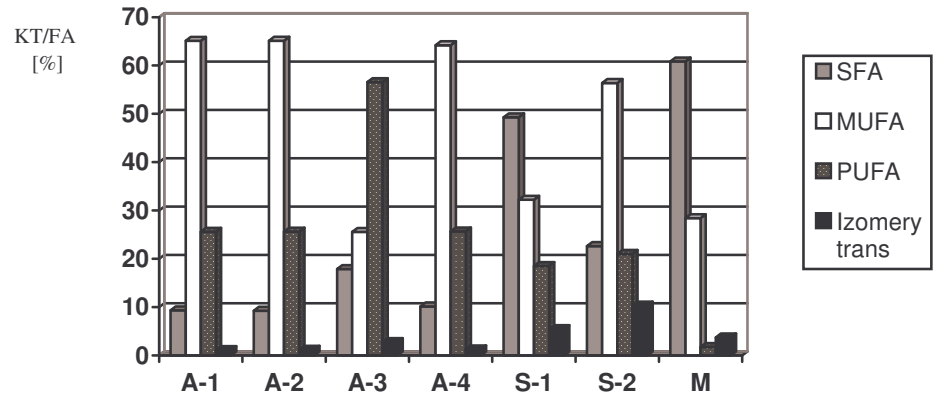
Zawartość fazy stałej - SFC [%]	Rodzaj tłuszczu / Brand of fat						
	A-1	A-2	A-3	A-4	S-1	S-2	M
SFC w temp. 10°C /at t = 10°C	2,4[a]	2,3[a]	2,3[b]	3,2[c]	44,6[d]	25,6[e]	34,5[f]
SFC w temp. 20°C //at t = 20°C	2,0[a]	1,9[a]	1,7[b]	2,6[c]	24,2[d]	13,2[e]	17,0[f]
SFC w temp. 30°C /at t = 30°C	1,7[a]	1,6[a]	1,2[b]	2,0[c]	10,4[d]	4,2[e]	7,11[f]
SFC w temp. 35°C /at t = 35°C	1,6[a]	1,6[a]	1,2[b]	1,8[c]	6,2[d]	1,1[b]	5,2[e]

Objaśnienia: / Explanatory notes:
[a,b,c] Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p<0,05$ / Mean values designated by the same letters are not statistically significantly different at a level of $p<0.05$.

Jednak zalecenia ostatnich lat, stawiające na pierwszym miejscu jakość żywieniową, wymagają obecności płynnych gliceroli niezależnie od wymogów funkcjonalnych (plastyczności i konsystencji), co wyjaśnia celowość stosowania margaryn płynnych w ciastkarstwie [12]. W pozostałych badanych tłuszczach stałych zawartość SFC w zakresie temperatury wyrobu surowego ciasta spełniała warunek plastyczności, wobec czego należy spodziewać się, że będą one charakteryzowały się dobrymi właściwościami funkcjonalnymi.

Szacując udziały grup kwasów tłuszczowych jako sumy kwasów nasyconych (SFA), monoenowych (MUFA), polienowych (PUFA) oraz izomerów trans (TFA) stwierdzono istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi tłuszczami płynnymi a stałymi (rys. 2). Stwierdzono mniejsze zawartości nasyconych (SFA) kwasów tłuszczowych w margarynach płynnych (od 9,25 do 17,89%) w porównaniu z tłuszczami stałymi (od 22,64 do 60,83%). Różnice w udziałach tych kwasów związane

były z konsystencją tych tłuszczów [13]. Jednak w tłuszczach ciastkarskich oprócz zawartości SFA ważny jest ich skład. W tłuszczach ciastkarskich pożądana jest obecność kwasu laurynowego (C 12:0), który powoduje, że tłuszcze są odporne na utlenianie i umożliwiają dobre uwolnienie aromatów podczas topnienia [2]. W badanych margarynach płynnych nie stwierdzono obecności tak ważnego funkcjonalnego kwasu nasyconego. Wyjątek stanowiła margaryna A-3 w której oznaczono 0,21% kwasu laurynowego. W pozostałych tłuszczach stwierdzono: 7,79% (S-1); 2,85% (S-3); 2,12% (S-2) kwasu laurynowego.



Rys. 2. Zawartość grup kwasów tłuszczowych w badanych tłuszczach.
Fig. 2. The content of fatty acids groups in the fats studied.

Średnia zawartość kwasów monoenowych (MUFA) występujących łącznie w formie cis i trans w tłuszczach wynosiła od 25,56 do 65,13% (rys. 2). Głównym przedstawicielem MUFA był kwas oleinowy C 18:1 występujący przede wszystkim w aktywnej biologicznie formie cis. Kwas oleinowy (18:1) cis wyraźnie dominował pod względem zawartości we wszystkich margarynach, za wyjątkiem margaryny płynnej A-3, ustępując wyraźnie kwasowi linolowemu w tej margarynie. Największą zawartością izomeru cis kwasu oleinowego cechowały się margaryny płynne A-1 (61,92%), A-2 (61,85%) i A-4 (60,98%), a najmniejszą margaryna płynna A-3 (25,11%) oraz masło (19,92%). Zawartości izomerów cis i trans kwasu oleinowego przedstawiono w tab. 2.

Średnia zawartość kwasów polienowych (PUFA) w badanych tłuszczach wynosiła od 56,55 (A-3) do 1,74% (M) (rys. 2). Stwierdzono, że margaryny płynne wyróżniała większa zawartość PUFA (nie mniejsza niż 25%) w porównaniu z tłuszczami stałymi. Oznaczono ważne żywieniowo kwasy polienowe: kwas linolowy (C18:2) oraz kwas linolenowy (C18:3) zaliczane do niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych – NNKT (tab. 2). Stwierdzono, że margaryny płynne wyróżniała bardzo wysoka zawartość kwasu linolowego (A-3 50%). Ponadto, aż trzy

badane margaryny płynne wyróżniały się zawartościami kwasu linolenowego (18:3) wynoszącymi ponad 7%.

Tabela 2

Zawartość wybranych kwasów nienasyconych w tłuszczach [%].
The content of some selected unsaturated fatty acids in fats [%].

Rodzaj tłuszczu Brand of fat	Zawartość kwasów nienasyconych Content of unsaturated fatty acids[%]			
	Kwas oleinowy Oleic fatty acid C 18:1		NNKT EFA	
	Izomery Isomers cis	Izomery Trans-isomers	Kwas linolowy Linoleic acid (18:2)	Kwas linolenowy Linolenic acid (18:3)
A-1	61,92	1,11	16,86	7,86
A-2	61,85	1,18	16,92	7,87
A-3	24,76	2,75	50,00	4,15
A-4	60,98	1,24	17,24	7,62
S-1	27,05	4,84	16,45	2,06
S-2	44,93	9,59	15,75	5,24
M	19,92	3,72	1,13	0,61

Suma izomerów trans nienasyconych kwasów tłuszczowych – TFA w margarynach wynosiła od 1,11 do 10,31% (rys. 2). W maśle oznaczono 3,72% TFA. Izomery trans pochodziły głównie z kwasu oleinowego (18:1 trans). Zawartość izomerów C 18:1 trans w margarynach wahała się od 1,11% (A-1) do 9,59% (S-2) i dominowała w tłuszczach stałych (tab. 2). Zawartość izomerów trans kwasu linolowego była bardzo niska i wahała się od 0,20% (A-2) do 0,88% (A-3). Zawartości izomerów kwasu linolenowego (18:3 trans) przeważały w margarynach płynnych i kształtowały się od 0,62% (A-1) do 1,52% (A-3). Stwierdzono, że margaryny płynne zawierały znacznie mniej izomerów trans niż tłuszcze stałe. Średnia zawartość TFA w margarynach płynnych wynosiła tylko 1,57%. Jest to aspekt pozytywny, świadczący o korzystnych cechach tych tłuszczów. Należy również zauważyć, że zawartość izomerów trans w tłuszczach stałych była również mniejsza (od 5,44 do 10,31%) niż w tłuszczach badanych przez innych autorów [1, 15].

Podsumowując analizę składu kwasów tłuszczowych, należy zauważyć, że badane margaryny płynne charakteryzowała wysoka zawartość MUFA, a w szczególności kwasu oleinowego – cis (około 61%). Jest to korzystne, ponieważ kwas oleinowy obniża zarówno poziom cholesterolu całkowitego, jak i frakcji LDL, natomiast nie obniża poziomu lipoprotein wysokiej gęstości (HDL) [7]. Ponadto w margarynach płynnych stwierdzono mniejszą zawartość niekorzystnych zdrowotnie nasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z tłuszczami stałymi [3, 17]. Jednak największą zaletą margaryn płynnych była jednocześnie znacznie wyższa zawartość polienowych kwasów tłuszczowych (nawet 56,55%) i najniższe zawartości kontrowersyjnych izomerów trans w porównaniu z badanymi tłuszczami stałymi.

Instrumentalna i sensoryczna ocena ciast upieczonych

W wyniku analizy statystycznej pomiarów objętości ciast wyróżniono trzy grupy jednorodne. Stwierdzono, że ciasta z udziałem margaryn płynnych A-1, A-2, oraz A-4 nie różniły się istotnie ($p < 0,05$) pod względem objętości. Odrębną grupą były ciasta z zawartością margaryny płynnej A-3 i masła, natomiast do trzeciej z grup należą ciasta z margarynami stałymi S-1 i S-2 (tab. 3). Interesujące jest, że ciasta z udziałem margaryn płynnych cechowała większa objętość niż ciasta z dodatkiem tłuszczów stałych. Średnia objętość ciast z dodatkiem tłuszczów płynnych wynosiła 1249 cm^3, a ciast z tłuszczami stałymi S-1 i S-2 – 1063 cm^3. Natomiast ciasta z dodatkiem tłuszczów stałych: S-1 i M - masła wyróżniała wyższa masa objętościowa (418 g/cm^3) (tab. 3).

Wyniki instrumentalnej oceny tekstury ciast biszkoptowo-tłuszczowych z dodatkiem różnych tłuszczów zamieszczono w tab. 4. Stwierdzono, że ciasta przygotowane z dodatkiem tłuszczów płynnych i stałych różniły się istotnie ($p<0,05$) twardością wyrażoną maksymalną siłą cięcia. Podobne wartości maksymalnej siły cięcia stwierdzono tylko w przypadku ciast wytworzonych na bazie margaryn płynnych A-1 i A-2. Wartości maksymalnej siły cięcia kształtowały się od 4,250 N do 7,763 N. Ciasta z zawartością masła charakteryzowały się maksymalną siłą cięcia wynoszącą 6,813 N. Stwierdzono, że ciasta sporządzone z dodatkiem tłuszczów stałych S-1 i M charakteryzowały się wyższymi wartościami maksymalnej siły cięcia niż te z dodatkiem margaryn płynnych oraz margaryny stałej S-2.

Wartości energii ugięcia ciast kształtowały się od 0,022 J (ciasta z dodatkiem margaryny płynnej A-3) do 0,038 J (ciasta z dodatkiem masła) i były wyższe w przypadku ciast z dodatkiem tłuszczów o konsystencji stałej. Ciasta z margarynami płynnymi charakteryzowały się podobnymi wartościami energii ugięcia (tab. 4).

Stwierdzono również, że wartości energii przecięcia zależały od rodzaju użytego dodatku tłuszczowego. W przypadku ciast z dodatkiem margaryn płynnych energia przecięcia wynosiła od 0,149 do 0,164 J. W przypadku ciast z dodatkiem tłuszczów stałych wartości energii przecięcia wynosiły od 0,181 J (ciasta z dodatkiem margaryny S-1) do 0,204 J (ciasta z dodatkiem masła) (tab. 4). Empiryczny parametr tekstury - sumaryczna energia cięcia informuje o takich cechach tekstury ciasta, jak: kohezyjność i przeżuwalność. Wyższe wartości sumarycznej pracy cięcia zanotowano w ciastach z dodatkiem tłuszczów stałych, natomiast płynna konsystencja dodatku tłuszczowego obniżała wartości tego parametru tekstury ciasta (tab. 4).

Tabela 3

Wartości instrumentalnego pomiaru i sensorycznej oceny objętości oraz masy objętościowej ciast.

Mean values of instrumentally measured values and of sensory assessed volume and volume mass of sponge cakes.

Rodzaj dodanego tłuszczu Brand of fat added	Wyróżnik jakościowy ciast / Quality factor of cakes		
	Objętość Volume [cm^3] $\overline{X}$ ± SD	Masa objętościowa Volume mass [g/cm^3] $\overline{X}$ ± SD	Objętość sensoryczna Sensory volume [0-100 mm] $\overline{X}$ ± SD
Margaryny płynne / Liquid margarines			
A-1	1269^a ± 31,4	415^a ± 9,4	85^a ± 13,8
A-2	1234^a ± 54,8	410^a ± 14,6	76^a ± 14,8
A-3	1229^b ± 26,4	412^b ± 10,5	70^b ± 14,1
A-4	1249^a ± 34,8	412^a ± 10,0	82^a ± 10,1
Tłuszcze stałe / Solid fats			
S-1	1051^a ± 32,7	418^c ± 7,5	43^c ± 7,2
S-2	1074^a ± 39,6	409^c ± 13,8	50^c ± 9,2
M	1200^b ± 29,3	418^b ± 8,8	62^b ± 8,0

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\overline{X}$ - wartość średnia / mean value, SD- odchylenie standardowe / standard deviation

^{a,b,c} Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p<0,05$ / Mean values designated by the same letters are not statistically significantly different at a level of $p<0.05$.

Podczas oceny sensorycznej ciast biszkoptowo-tłuszczowych stwierdzono wyższe noty tekstury ciast biszkoptowo-tłuszczowych sporządzonych z dodatkiem margaryn płynnych niż z dodatkiem margaryny stałej (S-1) lub emulsji tłuszczowej (S-2) (tab. 5). Teksturę ciast z dodatkiem margaryn płynnych oceniono równie wysoko, jak ciast z dodatkiem masła (4,20 pkt) lub wyżej, tak jak to miało miejsce w przypadku ciast z dodatkiem margaryny płynnej A-3. Jest to interesujące ze względów żywieniowych, ponieważ margaryna A-3 charakteryzowała się szczególnie wysoką zawartością PUFA, wynoszącą około 56%. Panel sensoryczny najwyżej ocenił smak ciast z dodatkiem masła (4,60 pkt) i emulsji tłuszczowej S-2 (4,0 pkt) (tab. 6). Korzystny wpływ masła na smak ciast biszkoptowo-tłuszczowych potwierdzają wcześniejsze prace [15, 24, 29]. Natomiast w prezentowanej pracy smak ciast z dodatkiem margaryny stałej (80% tłuszczu) został oceniony niżej niż w pracach innych autorów [8, 29].

Tabela 4

Wyniki instrumentalnego pomiaru tekstury ciast przy użyciu testu cięcia.
Results of the instrumentally measured texture values of sponge cakes using a shear test.

Rodzaj dodanego tłuszczu Brand of fat added	Parametry testu cięcia / Parameters of shear test			
	Maksymalna siła cięcia Max shear force [N] $\overline{X} \pm SD$	Energia ugięcia Energy to yield point [J] $\overline{X} \pm SD$	Energia przecięcia Energy to break point [J] $\overline{X} \pm SD$	Sumaryczna energia ciecia Total energy [J] $\overline{X} \pm SD$
A-1	$5{,}625^{a} \pm 0{,}1830$	$0{,}024^{a} \pm 0{,}0013$	$0{,}162^{a} \pm 0{,}0018$	$0{,}186^{a} \pm 0{,}0023$
A-2	$5{,}688^{a} \pm 0{,}1360$	$0{,}026^{a} \pm 0{,}0019$	$0{,}164^{a} \pm 0{,}0014$	$0{,}189^{a} \pm 0{,}0029$
A-3	$5{,}200^{b} \pm 0{,}1165$	$0{,}022^{a} \pm 0{,}0020$	$0{,}161^{a} \pm 0{,}0014$	$0{,}183^{a} \pm 0{,}0020$
A-4	$4{,}250^{c} \pm 0{,}1282$	$0{,}023^{a} \pm 0{,}0010$	$0{,}149^{b} \pm 0{,}0018$	$0{,}172^{d} \pm 0{,}0025$
S-1	$7{,}763^{d} \pm 0{,}1183$	$0{,}035^{b} \pm 0{,}0026$	$0{,}181^{c} \pm 0{,}0016$	$0{,}216^{c} \pm 0{,}0018$
S-2	$5{,}063^{b} \pm 0{,}1188$	$0{,}030^{c} \pm 0{,}0016$	$0{,}137^{d} \pm 0{,}0028$	$0{,}167^{d} \pm 0{,}0030$
M	$6{,}813^{e} \pm 0{,}1664$	$0{,}038^{e} \pm 0{,}0012$	$0{,}204^{e} \pm 0{,}0024$	$0{,}241^{e} \pm 0{,}0022$

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\overline{X}$ - wartość średnia / mean value, SD- odchylenie standardowe / standard deviation.

[a,b,c] Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p<0{,}05$ / Mean values designated by the same letters are not statistically significantly different at a level of $p<0.05$.

Wygląd zewnętrzny jest szczególnie ważnym wyróżnikiem atrakcyjności sensorycznej ciast. Szcześniak [26] podkreśla, że pierwszy opis ciasta zaczyna się od obserwacji wzrokowych i ich interpretacji na podstawie wcześniejszych odczuć i doświadczeń. Stwierdzono, że bez względu na rodzaj stosowanego dodatku wszystkie eksperymentalne ciasta otrzymały wysokie noty za wygląd zewnętrzny (od 4,20 do 4,50 pkt).

W celu całościowego porównania jakości ciast biszkoptowo-tłuszczowych z dodatkiem margaryn płynnych i tłuszczów stałych przeprowadzono statystyczne normowanie składowych jakości tych ciast. Normowaniu poddano następujące badane cechy jakościowe: instrumentalne wyróżniki tekstury i objętości, wyróżniki sensoryczne (smak, tekstura, ocena ogólna, objętość) oraz wybrane wyróżniki jakości tłuszczu: zawartość PUFA, zawartość TFA.

Statystyczne normowanie wymienionych składowych jakości przeprowadzono względem wartości średniej arytmetycznej każdej z cech, a za normujące odchylenie standardowe przyjmowano odpowiednie wartości z poszczególnych grup [25]. W tab. 6 przedstawiono unormowane wartości badanych składowych jakości ciast biszkoptowo-tłuszczowych oraz średnią arytmetyczną ze składowych jakości będącą wyróżnikiem jakości całkowitej.

Tabela 5

Wyniki oceny sensorycznej ciast biszkoptowo-tłuszczowych (n = 10).
Results of the sensory assessed parameters of sponge cakes (n = 10).

Rodzaj dodanego tłuszczu Brand of fat added	Wyróżniki sensoryczne [pkt] / Sensory attributes				
	Wygląd zewnętrzny Appearance	Barwa Colour	Zapach Odour	Tekstura Texture	Smak Flavour
A-1	$4,30^{a} \pm 0,675$	$4,35^{a} \pm 0,474$	$4,00^{a} \pm 0,782$	$4,20^{a} \pm 0,753$	$3,40^{a} \pm 0,316$
A-2	$4,40^{a} \pm 0,459$	$4,30^{a} \pm 0,422$	$4,00^{a} \pm 0.667$	$4,20^{a} \pm 0,753$	$3,35^{a} \pm 0,337$
A-3	$4,45^{a} \pm 0,497$	$3,60^{b} \pm 0,459$	$3.90^{a} \pm 0,699$	$4.40^{a} \pm 0,699$	$3,70^{b} \pm 0,35$
A-4	$4,40^{a} \pm 0,459$	$4,10^{a} \pm 0,459$	$4,00^{a} \pm 0,408$	$4,10^{a} \pm 0,568$	$3,50^{a} \pm 0,408$
S-1	$4,20^{a} \pm 0,350$	$4,25^{a} \pm 0.354$	$4,00^{a} \pm 0,624$	$4,00^{a} \pm 0,527$	$3,60^{b} \pm 0,394$
S-2	$4,50^{a} \pm 0,527$	$4,20^{a} \pm 0,422$	$4,35^{b} \pm 0,412$	$4,00^{a} \pm 0,236$	$4,00^{c} \pm 0,408$
M	$4,20^{a} \pm 0,422$	$4,60^{c} \pm 0,516$	$4,50^{b} \pm 0,527$	$4,20^{a} \pm 0,422$	$4,60^{c} \pm 0,516$

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\overline{X}$ - wartość średnia / mean value, SD- odchylenie standardowe / standard deviation.

^{a,b,c} Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p<0,05$ / Mean values designated by the same letters are not statistically significantly different at a level of $p<0.05$.

Analiza statystyczna wykazała korzystny wpływ margaryn płynnych na profil tekstury. Stwierdzono wyższe wartości unormowane instrumentalnych wyróżników tekstury ciast z dodatkiem tych tłuszczów niż ciast z dodatkiem tłuszczów stałych. Fakt, że ciasta z dodatkiem tych tłuszczów były bardziej miękkie i delikatniejsze, potwierdzają niższe wartości maksymalnej siły cięcia oraz energii przecięcia uzyskanych w teście cięcia (tab. 4) oraz unormowane wartości masy objętościowej. Analiza statystyczna potwierdziła również wysoką sensoryczną ocenę tekstury oraz objętości ciast z dodatkiem margaryn płynnych. Natomiast ciasta z dodatkiem tłuszczów stałych przewyższały ciasta z dodatkiem margaryn płynnych smakiem, co potwierdziło normowanie statystyczne.

Poważnym problemem żywieniowym jest wysokie spożycie izomerów trans występujących głównie w wyrobach ciastkarskich i pochodzących z tłuszczów utwardzonych [5, 6]. Stosowanie płynnych tłuszczów do przemysłowej produkcji ciast biszkoptowo-tłuszczowych, które stanowią około 30% produkcji ciastkarskiej, mogłoby ograniczyć to niekorzystne zjawisko, ponieważ margaryny płynne charakteryzuje bardzo niska zawartość izomerów trans.

Tabela 6

Unormowane statystycznie wartości wyróżników jakości ciast biszkoptowo-tłuszczowych.
Standardised values of quality factors of the sponge cakes.

Parametry jakości Quality factors	Rodzaj dodanego tłuszczu / Brand of fat added						
	A-1	A-2	A-3	A-4	S-1	S-2	M
Wyróżniki instrumentalne: Instrumental factors:							
Maksym. siła cięcia Max shear force	0,13	0,07	0,49	1,30	-1,70	0,61	-0,89
Energia ugięcia Energy to yield point	-0,70	-0,39	-1,05	-0,77	1,06	0,29	1,57
Energia przecięcia Energy to break point	0,17	0,08	0,18	0,77	-0,74	1,30	-1,76
Masa objętościowa Volume mass	0,73	0,67	0,53	0,74	-1,74	-1,11	0,16
Wyróżniki sensoryczne: Sensory attributes:							
Smak / Flavour	-0,77	-0,88	-0,08	-0,54	-0,31	0,60	1,97
Tekstura / Texture	0,31	0,31	1,74	-0,41	-1,12	-1,12	0,31
Ocena ogólna Overall sensory quality	-0,39	-0,39	-0,65	-0,59	-0,65	0,65	2,02
Objętość/ Volume	1,12	0,55	0,30	0,87	-1,51	-1,13	-0,20
Wyróżniki jakości tłuszczu: Quality factors of fats:							
PUFA	0,04	0,04	1,94	0,04	-0,39	-0,24	-1,42
TFA	0,77	0,75	0,28	0,73	-0,53	-1,99	-0,01
Jakość całkowita/ Overall quality	0,13	0,08	0,33	0,19	-0,69	-0,19	0,16

Wnioski

1. Wyroby z ciast biszkoptowo-tłuszczowych z dodatkiem margaryn płynnych charakteryzowała duża objętość. Stwierdzono również korzystny wpływ tłuszczów płynnych na instrumentalny profil tekstury, potwierdzony wysoką sensoryczną oceną tekstury. Jednak niekwestionowaną zaletą margaryn płynnych jest skład kwasów tłuszczowych w osnowie tłuszczowej, czyli duża zawartość polienowych kwasów tłuszczowych i jednocześnie mała zawartość izomerów trans.
2. Margaryny płynne z powodzeniem mogą zastąpić tradycyjnie stosowane tłuszcze stałe przy wytwarzaniu wyrobów biszkoptowo-tłuszczowych. Zastosowanie margaryn płynnych do wypieku ciast biszkoptowo-tłuszczowych pozwala na

skrócenie czasu na przygotowanie półproduktu, co w warunkach przemysłowych umożliwia oszczędności energii i zmniejsza koszty produkcji.

Literatura

[1] Balas J.: Kwasy tłuszczowe w rynkowych produktach spożywczych. Cz. I. Bezpieczna Żywność, 2001 **1**, 20-21.

[2] Bander R., Nauta J.: Bakery fats and margarines. Karlshamns Technical Bulletins. Food Techn. Int. Europe. 1995**, 97**, 101.

[3] Baryłko-Pikielna N., Osucha A.: Aktualne poglądy na żywieniową i profilaktyczną rolę kwasów tłuszczowych w pożywieniu człowieka. Przem Spoż., 1990, **4**, 88-91.

[4] Chrysam M.M.: Table spreads and shortenings. In: Baileys Industrial Oil and Fat Products. Chapt. 2 IV ed. John Wiley and Sons. New York 1985, pp. 54-125.

[5] Daniewski M., Mielniczuk E., Jacórzyński B., Balas J., Filipek A.,: Skład kwasów tłuszczowych, w szczególności izomerów trans nienasyconych kwasów tłuszczowych w produktach spożywczych. Żyw. Człow. Metab., 1998, **2**, 133-151.

[6] Erp-Baart Van M.A., Couet C., Cuadrado C., Kafatos A., Stanley J., Van Poppel.: Trans fatty acids in bakery products from 14 European Countries the TRANSFAIR Study. J. Food Comp. Analysis, 1998 **11,** 161-169.

[7] Grundy S.M., Hestel P.J.: Fat and cholesterol. Am J. Clin. Nutr., 1987, **45, 5**, 1037.

[8] Haber T., Lewczuk J., Wypych D.: Ocena wpływu różnych tłuszczów na cechy ciasta i jakość wyrobów typu sękacz. Przegl. Piek. Cuk., 1997, **7**, 40-42.

[9] Heertje I.: Micro-structural studies in fat research. Food Struct., 1993, **12**, 77.

[10] Hoffmann M.: Tłuszcz na każdą okazję. Przegl. Gastr., 1999, **9**, 6.

[11] Jakubczyk T., Haber T.: Analiza zbóż i przetworów zbożowych. Wyd. SGGW. Warszawa 1983, s. 136-142, 301-318.

[12] Krygier K.: Ciekłe margaryny w produkcji ciastkarskiej i piekarskiej. Przegl. Piek. Cuk., 1998, **5**, 20.

[13] Krygier K.: Podstawowa charakterystyka tłuszczów. Przegl. Piek. Cuk. 2003, **5**, 6.

[14] Krygier K.: Polski konsensus tłuszczowy. Przem. Spoż., 2001, **2**, **55**, 40.

[15] Krygier K., Żbikowska A.: Wpływ tłuszczu na wybrane cechy ciasta biszkoptowo-tłuszczowego. Żywność Nauka. Technologia. Jakość, 2002, **3 (32)**, 47-57.

[16] Lewczuk J., Sobczyk M., Krygier K.: Wykorzystanie margaryny płynnej w ciastkarstwie, Przegl. Piek. Cuk., 1998, **6,** 22.

[17] Nestel P.: Optimizing dietary fatty acids to prevent heart diseases. Proceedings of the 14th International Congress of Nutrition, Seul 1989, p. 133.

[18] PN-ISO 4121: 1988. Analiza sensoryczna. Ocena produktów żywnościowych przy użyciu metod skalowania.

[19] PN-91/A-74022. Przetwory zbożowe. Mąka pszenna.

[20] PN-A-74252: 1998. Wyroby i półprodukty ciastkarskie – metody badań.

[21] PN-A-86933: 1995. Tłuszcze roślinne jadalne. Metody badań. Określenie zawartości substancji tłuszczowej w margarynie.

[22] PN-EN ISO 5508: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.

[23] PN-EN ISO 8292: 1995. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości fazy stałej. Metoda pulsacyjnego rezonansu jądrowego.

[24] Rutkowska J.: Studies on the functional properties of bakery margarines. In: Culinary Arts and Sciences IV Ed. J.S.A Edwards I-B Gustafsson, Bournemouth University 2003, pp. 208-216.

[25] Stupnicki R.: Biometria – krótki zarys. Wyd. Margos, Warszawa 2000 s. 24-35.
[26] Szcześniak A.S.: Wpływ wymogów konsumentów na kierunki badań w nauce i technologii żywności. Przem. Spoż., 1993, **47, 4**, 102.
[27] Wasylik K., Krygier K.: Współczesne margaryny, szorteningi piekarskie i cukiernicze. Przegl. Piek. Cuk., 1995, **5**, 12-13.
[28] Zalewski S.: Tłuszcze w żywności wygodnej. W: Żywność wygodna i żywność funkcjonalna pod red. F. Świderskiego, WNT. Warszawa 1999, s. 178-190.
[29] Żbikowska A., Krygier K., Ziemska A.: Wpływ wybranych cech margaryny na jakość ciasta biszkoptowo-tłuszczowego. Przegl. Piek. Cuk. 1997, **3**, 8-10.

POSSIBILITIES OF APPLYING LIQUID MARGARINES TO PRODUCE SPONGE CAKES

S u m m a r y

Fat is one of the most important ingredients used in the production of sponge cakes. The main objective of the study was to determine the effect of liquid margarines on the quality of sponge-cakes and to compare it with fats traditionally used in households and in the production of cakes. The following components were used to make sponge cakes: liquid margarines, some selected plant fats of solid consistency (table margarine, fat emulsion, and butter. In the three liquid margarines (from the four margarines examined in total), the content of fatty substance was 70%, thus, their functional properties were useful. The liquid margarines had a lower content of saturated and a higher content of monounsaturated fatty acids if compared with the solid fats. On the other hand, the most beneficial quality of the liquid fats was a much higher content of PUFAs (polyenic fatty acids) along with the lowest content of unfavourable trans-isomers (TFAs) compared with the solid fats.

It was stated that the effect of liquid margarines on the volume and texture profile of sponge cakes baked was very favourable and this positive effect was confirmed by the considerably high results of the sensory assessment of texture. However, the cakes produced with solid fats showed a better taste that those made using liquid margarines. Liquid margarines can successfully replace solid fats traditionally used in manufacturing sponge cakes.

Key words: sponge cakes, texture, volume, liquid margarines, fatty acid composition

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 127 - 137

KAMILA MYSZKA, WOJCIECH BIAŁAS, KATARZYNA CZACZYK

KINETYKA TWORZENIA BIOFILMÓW BAKTERYJNYCH NA MATERIAŁACH TECHNICZNYCH W ZALEŻNOŚCI OD DOSTĘPNOŚCI SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH

S t r e s z c z e n i e

Celem badań było określenie wpływu dostępności składników odżywczych w środowisku wzrostu na adhezję mikroorganizmów do powierzchni użytkowanych w przemyśle spożywczym. W badaniach wykorzystano drobnoustroje, których naturalnym miejscem występowania jest woda (środowisko o ograniczonym dostępie składników odżywczych). Hodowle *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae* i *Enterococcus faecalis* prowadzono na pożywkach o optymalnej oraz zredukowanej dostępności składników odżywczych. Stopień adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni teflonu, szkła oraz stali nierdzewnej (typ 304L i 316L) oceniano techniką mikroskopii fluorescencyjnej wg 9-stopniowej skali.

Przeprowadzone badania wskazują na bezpośredni wpływ dostępności składników odżywczych oraz rodzaju badanego drobnoustroju na efektywność tworzenia się biofilmu bakteryjnego. W większości wariantów doświadczeń redukcja zawartości substratów metabolicznych w pożywce indukowała proces adhezji testowanych szczepów drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. Spośród przebadanych powierzchni użytkowych, najbardziej efektywną kolonizację obserwowano w przypadku stali nierdzewnej 304L.

Słowa kluczowe: biofilm, adhezja, teflon, szkło, stal nierdzewna

Wprowadzenie

Mikroorganizmy, osiedlając się na powierzchniach stałych, tworzą zróżnicowane gatunkowo zespoły komórek – biofilmy. Proces powstawania błon biologicznych rozpoczyna się w momencie, gdy pojedyncze komórki osiadają na płaszczyźnie. Zdarzenia fizykochemiczne, zachodzące w trakcie przyłączania się komórki bakteryjnej do powierzchni stałej, są odpowiedzią swoistą danego gatunku na warunki środowiskowe [5]. Interakcja pomiędzy komplementarnymi cząsteczkami powierzchniowymi komórki (adhezynami) a reaktywnymi grupami płaszczyzny kontaktu nadaje każdej błonie biologicznej stabilną strukturę [4]. Rozwój technik

Mgr inż. K. Myszka, mgr inż. W. Białas, dr inż. K. Czaczyk, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48, 60- 627 Poznań

inżynierii genetycznej umożliwił zarysowanie problemu tworzenia się biofilmów i przybliżenie jego biologii molekularnej. Komórki, które ulegają adhezji zmieniają swój metabolizm i ekspresję materiału genetycznego. Transformacje komórek mogą być powiązane z warunkami hodowli i mogą odgrywać istotną rolę w przekazywaniu informacji genetycznej w biofilmie [6].

Dostępność składników odżywczych w środowisku wzrostu jest bezpośrednim induktorem zjawiska tworzenia się biofilmów mikrobiologicznych na powierzchniach użytkowych [2]. Żyjąc w skupiskach, drobnoustroje wytworzyły wielopłaszczyznowe mechanizmy obrony przed degradacyjnym wpływem antybiotyków, środków dezynfekujących czy podwyższonej temperatury [3]. Biofilmy bakteryjne powodują trudne do oszacowania straty w zakładach przemysłu spożywczego. Powstając na powierzchniach produkcyjnych, błony biologiczne stanowią potencjalne zagrożenie mikrobiologicznego skażenia żywności przeznaczonej do spożycia. Problem powszechności i łatwości kolonizacji przez bakterie wszelkich nieosłoniętych powierzchni zainicjował więc poszukiwania skutecznych metod zapobiegających występowaniu tego zjawiska.

Celem badań było określenie wpływu dostępności składników odżywczych w środowisku wzrostu na kinetykę tworzenia się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach użytkowanych w przemyśle spożywczym (teflon, szkło oraz stal nierdzewna 304L i 316L).

Materiał i metody badań

Drobnoustroje

W badaniach wykorzystano następujące drobnoustroje:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145,
- *Escherichia coli* ATCC 4157,
- *Proteus vulgaris* ATCC 6380,
- *Enterobacter cloacae* ATCC 13047,
- *Enterococcus faecalis* ATCC 7080.

Przed przystąpieniem do badań drobnoustroje trzykrotnie pasażowano na odpowiednie podłoża płynne (bulion do namnażania *Enterobacteriaceae* wg Mossela [12], pożywka ABPG do namnażania *P. aeruginosa* wg Schuberta [17] oraz podłoże z azydkiem sodu i glukozą do namnażania *Enterococcus* spp. zaproponowane przez Burbiankę i wsp. [1].

Warunki hodowli

Hodowle mikroorganizmów prowadzono w temp. 35^{o}C w warunkach dynamicznych na podłożach o optymalnej oraz zredukowanej (o 90%) dostępności

składników odżywczych, przy pH = 7 pożywki. Czas prowadzenia hodowli wynosił 144 h.

Przygotowanie powierzchni płytek do badań

Przed przystąpieniem do badań płytki o wymiarach 10 x 65 x 1 [mm] przygotowywano następująco:

– płytki ze stali nierdzewnej (typ 304L oraz 316L) traktowano 50% roztworem HNO_3 w temp. 70^{o}C przez 10 min [13];
– powierzchnie płytek teflonowych czyszczono miękką gąbką;
– płytki szklane gotowano w płatkach szarego mydła (1 h), a następnie moczono w 0,1 N roztworze NaOH (24 h) oraz 0,2% roztworze Na_3PO_4 (24 h) [11].

Po dokładnym wypłukaniu w wodzie destylowanej, wszystkie badane płytki umieszczano w szklanych naczyniach i autoklawowano w temp. 121^{o}C przez 15 min.

Badanie adhezji

Badanie adhezji prowadzono przez pierwsze 8 h każdego eksperymentu. W płynnych hodowlach *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *E. cloacae* oraz *E. faecalis* umieszczano badane płytki. Po 2 i 8 h płytki ze stali nierdzewnej, płytki teflonowe i szklane wyjmowano i przemywano roztworem PBS (o pH 7,2) celem usunięcia komórek nietrwale związanych z daną powierzchnią. Powierzchnie zabarwiano następnie oranżem akrydyny (0,01%) i prowadzono obserwację pod mikroskopem fluorescencyjnym (CARL - ZEISS, Axiovert 200, Niemcy). Adhezję badanych drobnoustrojów do powierzchni szkła, teflonu oraz stali nierdzewnej określano na podstawie obserwacji preparatów w 50 polach widzenia. W doświadczeniach zastosowano metodę polegającą na przyporządkowaniu obrazów poszczególnych pól widzenia 9 stopniom adhezji, odpowiadającym następującym stadiom rozwojowym bakterii [10]:

1 stopień – od 0 do 5 komórek w polu widzenia;
2 stopień – od 5 do 50 komórek w polu widzenia;
3 stopień – tylko pojedyncze komórki, brak mikroskupisk;
4 stopień – pojedyncze komórki + małe mikroskupiska;
5 stopień – duże skupiska, ale nie łączące się + pojedyncze komórki;
6 stopień – łączące się mikroskupiska + pojedyncze komórki;
7 stopień – ¼ pola widzenia pokryta biofilmem;
8 stopień – ½ pola widzenia pokryta biofilmem;
9 stopień – całe pole widzenia pokryte biofilmem.

Do określenia efektywności kolonizacji danej płaszczyzny wybrano 4. i 7. stopień adhezji.

Każdy wariant eksperymentu powtórzono dwukrotnie.

Celem przybliżenia rozkładu badanych zmiennych do rozkładu normalnego, uzyskane wyniki przekształcono za pomocą funkcji y = arc sin(x) + 0,000001 (gdzie x

oznacza procentowy udział danego stopnia adhezji). Dane te następnie poddano wieloczynnikowej oraz wielowymiarowej analizie wariancji (MANOVA) w programie Statistica wersja 6.0 (PL). Oceniano wpływ następujących czynników doświadczalnych:

– dostępność składników pokarmowych w pożywce,
– badany gatunek mikroorganizmu,
– rodzaj badanej powierzchni użytkowej,
– czas prowadzenia eksperymentu.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badania wpływu dostępności składników pokarmowych w środowisku na kinetykę tworzenia się biofilmów: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *E. cloacae* i *E. faecalis*, przedstawiono na rys. 1 - 4.

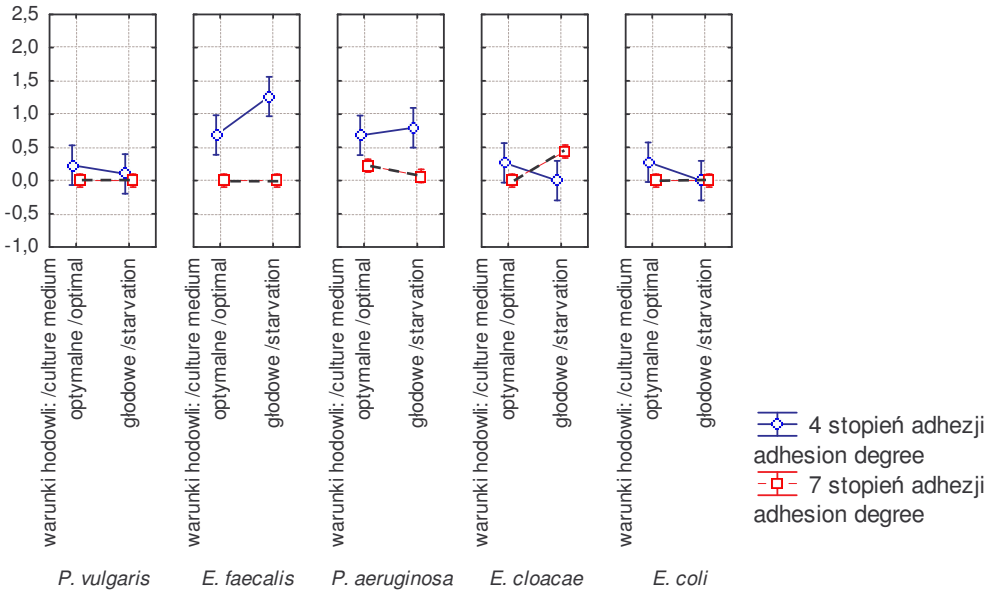
W obrębie analizowanego układu największy wpływ miał użyty w badaniach gatunek mikroorganizmu, następnie interakcje pomiędzy warunkami prowadzenia hodowli a zastosowanymi w doświadczeniach powierzchniami użytkowymi oraz interakcja pomiędzy wykorzystanym w badaniach szczepem bakterii a zastosowanym rodzajem powierzchni użytkowej ($p<0,0001$).

Na powierzchni szkła, w warunkach stresowych środowiska, jakim był deficyt substratów metabolicznych w pożywce, zaobserwowano wyraźną dominację 4. stopnia adhezji (rys 1 A i B). W większości wariantów tego eksperymentu, było to widoczne zarówno w 2., jak i w 8. h prowadzenia doświadczenia. Siódmego stopnia adhezji komórek *P. vulgaris*, *E. coli* oraz *E. faecalis* nie zaobserwowano i było to skorelowane z rodzajem analizowanej powierzchni użytkowej. Udział tej zaawansowanej formy kolonizacji powierzchni szkła przez badane drobnoustroje odnotowano jedynie u szczepów odznaczających się szybkim wzrostem (gatunki: *P. aeruginosa* i *E. cloacae*).

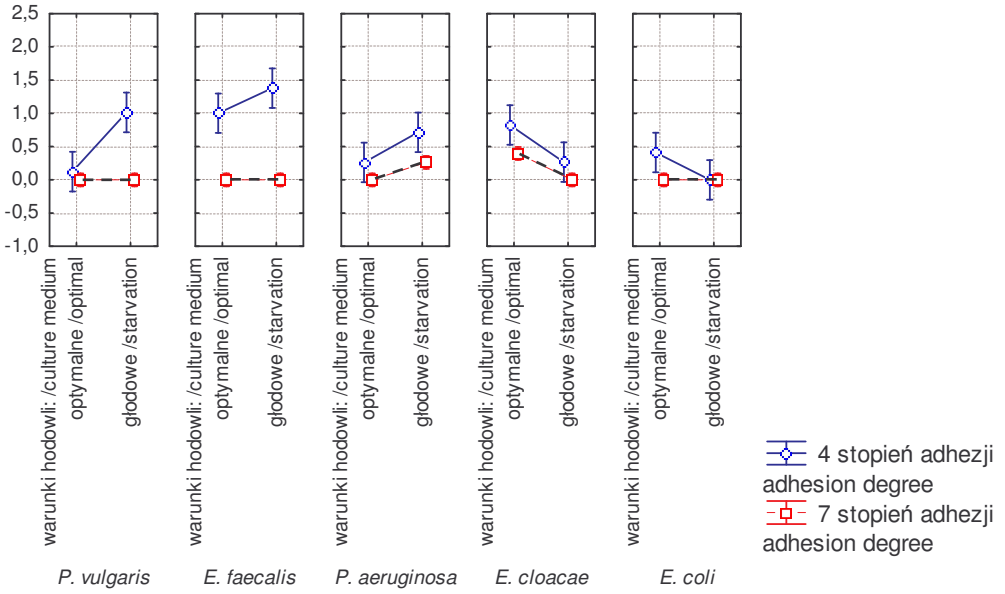
Analogiczne zależności zaobserwowano badając zjawisko tworzenia się biofilmów na powierzchni teflonu (rys. 2 A i B). Dominację 4. stopnia adhezji odnotowano w hodowlach: *P. vulgaris*, *E. faecalis* oraz *P. aeruginosa*, prowadzonych na pożywkach o silnie zredukowanej dostępności związków węgla i azotu. Dojrzałą matrycę biofilmu (7. stopień adhezji) utworzyły komórki *E. cloacae* narażone na oddziaływanie stresu głodowego już w 2. h doświadczenia.

Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach abiotycznych jest procesem, który zależy częściowo od właściwości podłoża, a częściowo od właściwości komórek, które go tworzą. Kolonizacja tych płaszczyzn użytkowych zależy od cech powierzchniowych komórek. Występująca w warunkach głodowych synteza egzogennych białek oraz polisacharydów inicjuje zjawisko autoagregacji komórek na powierzchniach

A



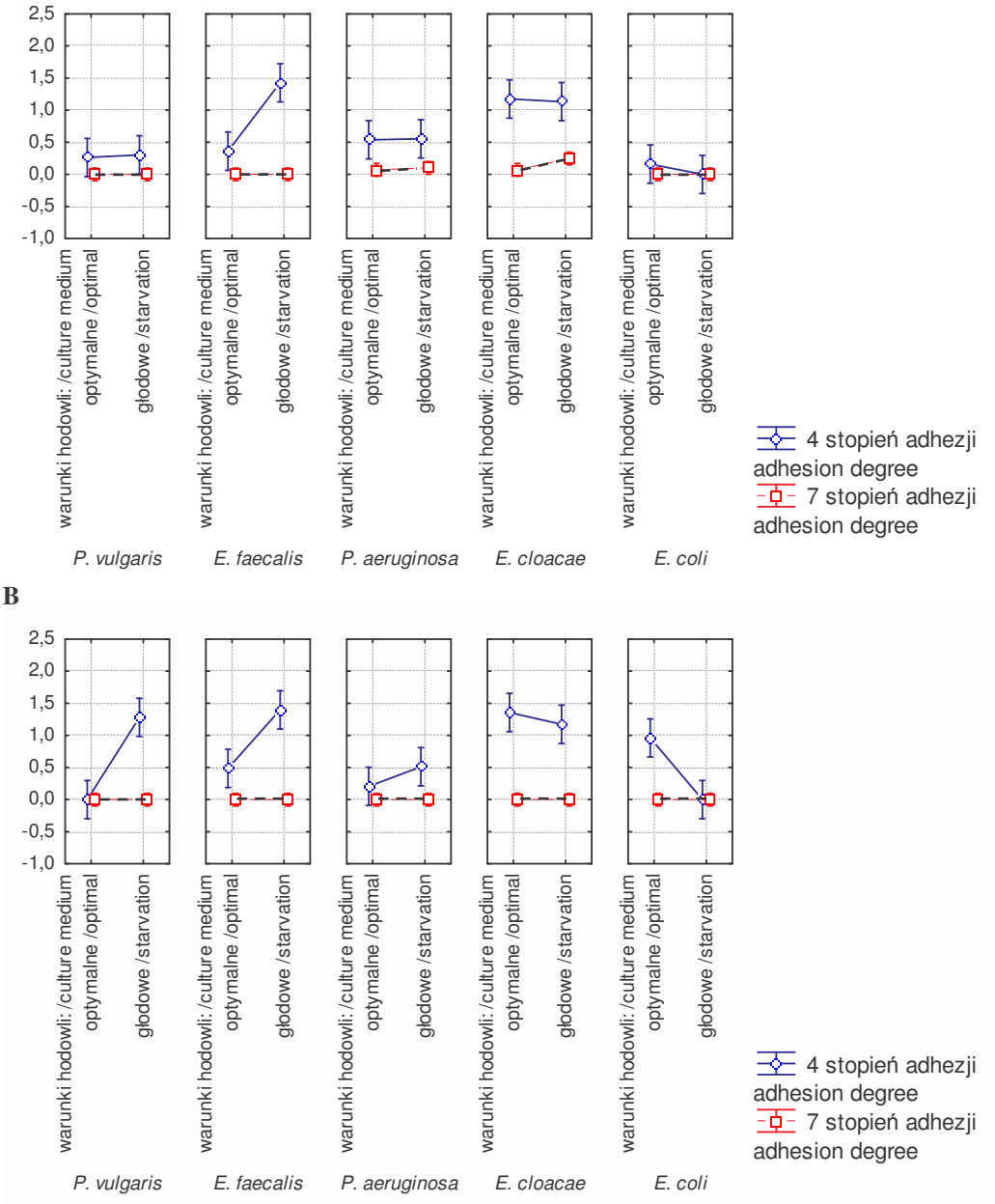
B



Rys. 1. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na kinetykę tworzenia się biofilmów na powierzchni szkła (A – po 2 h hodowli, B – po 8 h hodowli).

Fig. 1. The effect of nutrients availability in a culture medium on the kinetics of formation of a biofilm on the glass surface (A – after the 2 h incubation; B – after the 8 h incubation).

A



Rys. 2. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na kinetykę tworzenia się biofilmów na powierzchni teflonu (A – po 2 h hodowli, B – po 8 h hodowli).

Fig. 2. The effect of nutrients availability in a culture medium on the kinetics of formation of a biofilm on the teflon surface (A – after the 2 h incubation, B – after the 8 h incubation).

hydrofobowych [5]. Gilbert i wsp. [8] oraz Doyle i wsp. [7] wskazali na korelację pomiędzy hydrofobowością powierzchni komórek *Staphylococcus epidermidis* oraz

szczepów *Streptococcus* spp. a adhezją tych drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. Badania wskazują, że adsorpcja *Pseudomonas fluorescens* do powierzchni szkła jest blisko 5 razy wolniejsza niż komórek *Pseudomonas aeruginosa*, odznaczających się wysoką produkcją hydrofobowych egzopolisacharydów w warunkach głodowych środowiska wzrostu [15].

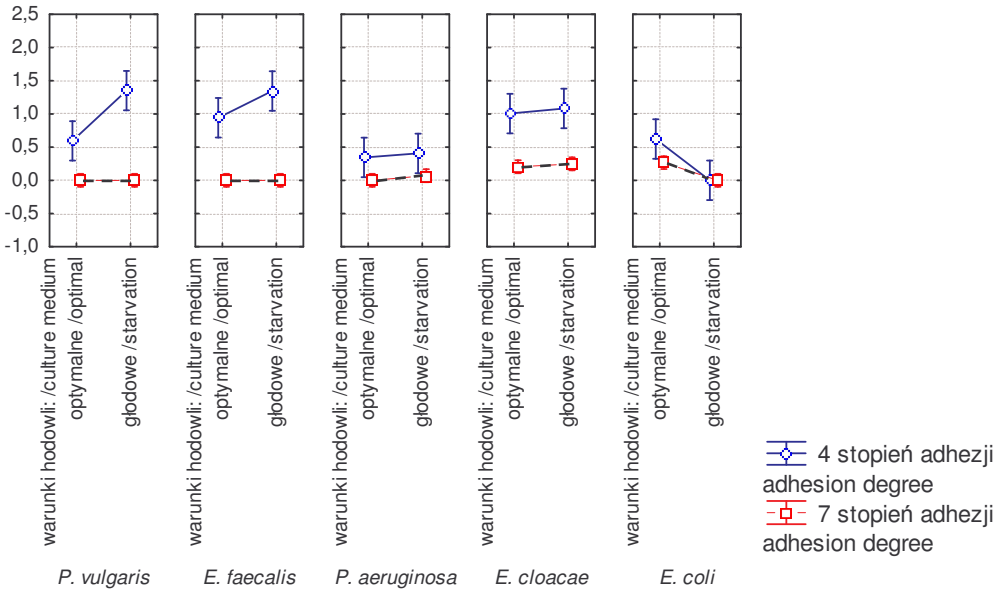
Wyniki badania wpływu dostępności składników pokarmowych na kinetykę tworzenia się biofilmów przez badane szczepy drobnoustrojów na powierzchni stali nierdzewnej, typ 304L oraz 316L, przedstawiono na rys. 3. i 4.

Powierzchnie ze stali nierdzewnej (typ 304L) efektywnie zasiedlane były przez komórki *E. coli* oraz *E. cloacae* w warunkach optymalnej podaży substancji odżywczych, a przez komórki *P. vulgaris*, *E. faecalis* i *P. aeruginosa* – w warunkach głodowych środowiska wzrostu (rys 3 A i B). W większości wariantów tego doświadczenia zaobserwowano dominację 4. stopnia adhezji. W 2. h trwania procesu zaawansowany etap kolonizacji stali nierdzewnej (typ 304L) odnotowany został w hodowlach: *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* oraz *E. cloacae*, prowadzonych na pożywkach o ograniczonej dostępności składników pokarmowych.

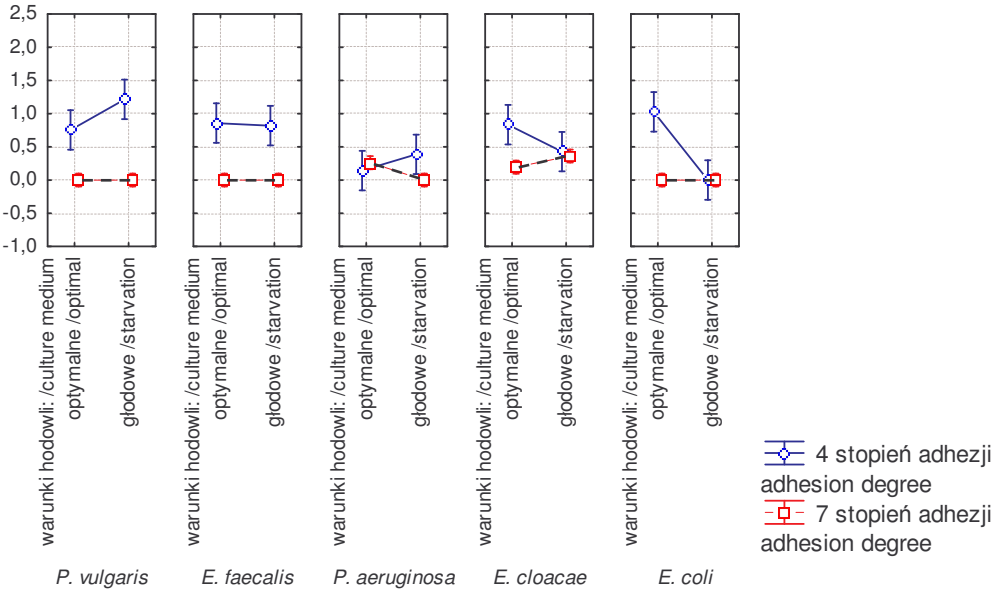
Warunki głodowe w środowisku wzrostu mikroorganizmów indukowały zjawisko adhezji pojedynczych komórek oraz tworzenie się małych mikrokolonii na powierzchniach wykonanych ze stali nierdzewnej typu 316L (rys. 4 A i B). Wyjątek stanowiły komórki *E. coli*, które trwale wiązały się z analizowanym modelem powierzchni użytkowej w warunkach optymalnej podaży substancji odżywczych. W tym wariancie doświadczenia zaobserwowano przewagę 4. stopnia adhezji w 2. h oraz 7. stopnia adhezji w 8. h trwania eksperymentu.

Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchni stali nierdzewnej zależy m.in. od jej porowatości i zdolności adsorpcji wody. Chropowatość oraz ułożenie ziaren stali kwasoodpornej determinuje ilość zatrzymywanej cieczy, stwarzając tym samym korzystniejsze warunki dla rozwoju drobnoustrojów [5]. Badania prowadzone przez Jullien i wsp. [9] wykazały, że nawet minimalna porowatość powierzchni wpływa na zjawisko adhezji komórek. Analogiczne zależności zaobserwowali Peng i wsp. [14], badając kinetykę tworzenia się biofilmu *Bacillus cereus* w warunkach głodowych na powierzchni stali nierdzewnej. Niska koncentracja składników pokarmowych w środowisku wzrostu zwiększała przeżywalność drobnoustrojów tworzących biofilm na powierzchniach produkcyjnych [16]. Wykazano, że zabieg mechanicznego polerowania tych płaszczyzn nie ograniczył występowania w produktach spożywczych drobnoustrojów chorobotwórczych [18].

A



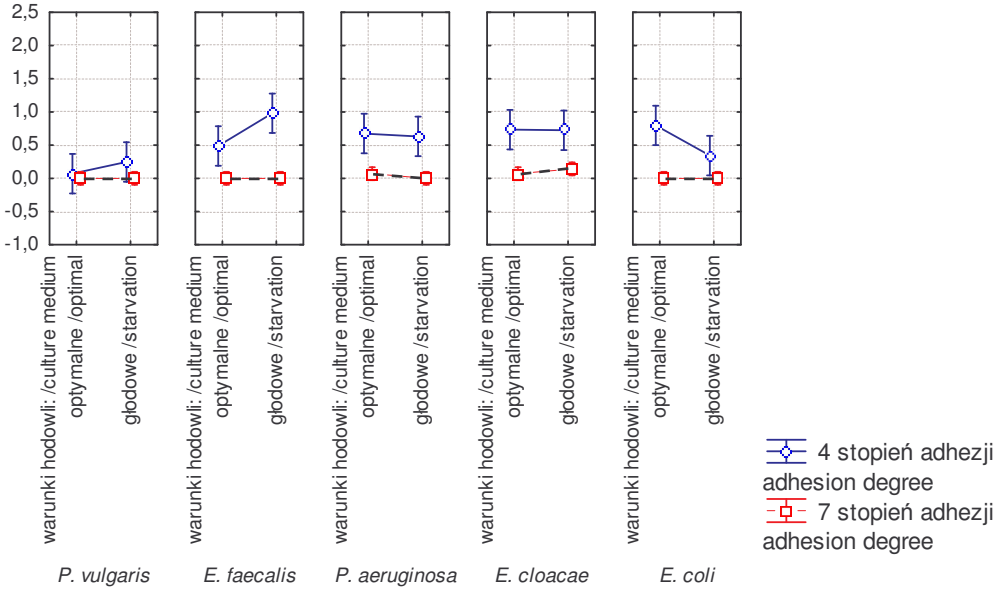
B



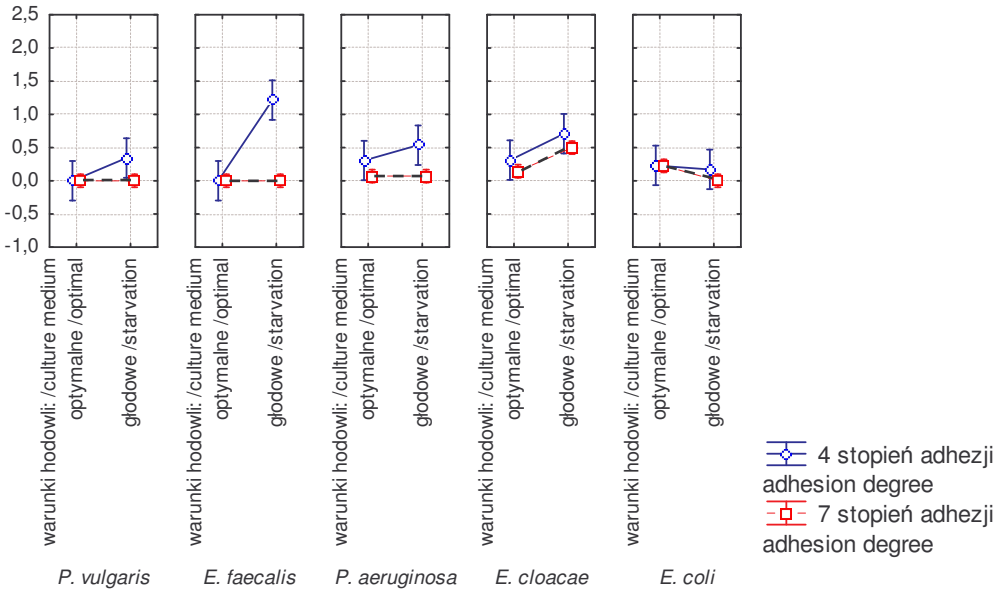
Rys. 3. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na kinetykę tworzenia się biofilmów na powierzchni stali nierdzewnej 304L (A – po 2 h hodowli, B – po 8 h hodowli).

Fig. 3. The effect of nutrients availability in a culture medium on the kinetics of formation of a biofilm on the stainless steel 304L surface (A – after the 2 h incubation, B – after the 8 h incubation).

A



B



Rys. 4. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na kinetykę tworzenia się biofilmów na powierzchni stal nierdzewnej 316L (A – po 2 h hodowli, B – po 8 h hodowli).

Fig. 4. The effect of nutrients availability in a culture medium on the kinetics of formation of a biofilm on the stainless steel 316L (A – after the 2 h incubation, B – after the 8 h incubation).

Wnioski

1. Przeprowadzone badania wskazują na bezpośredni wpływ rodzaju badanego drobnoustroju oraz dostępności składników odżywczych środowiska na efektywność tworzenia się biofilmu bakteryjnego.
2. Redukcja zawartości substratów metabolicznych w pożywce indukowała proces powstawania błon biologicznych *P. vulgaris*, *E. faecalis* i *P. aeruginosa*.
3. Trwała kolonizacja badanych powierzchni użytkowych występowała już w początkowych etapach hodowli (2. h).
4. Spośród przebadanych powierzchni użytkowych stal nierdzewna (typ 304L) była najefektywniej kolonizowana przez drobnoustroje.

Literatura

[1] Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia żywności. PZWL. Warszawa 1983.
[2] Castellanos T., Ascencio F., Bashan Y.: Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipofeum*. FEMS Microbiol. Ecol., 2000, **33**, 1-9.
[3] Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.: Bacterial biofilms: common cause of persistent infections. Science, 1999, **284**, 1318-1320.
[4] Cunliffe D., Smart C. A., Alexander C., Vulfson E. N.: Bacterial adhesion at synthetic surfaces. Appl. Environ. Microbiol., 1999, **11**, 4995-5002.
[5] Czaczyk K., Wojciechowska K.: Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. Biotechnologia, 2003, **62**, 180-192.
[6] Davey M. E., O'Toole G. A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2000, **64**, 847-867.
[7] Doyle R. J., Rosenberg M., Drake D.: Microbial cell surface hydrophpbicity. Am. Soc. Microbiol., 1990, **50**, 387-419.
[8] Gilbert P., Evans D.J., Duguid I.G., Brown M.R.S.: Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. J. Appl. Bacteriol., 1991, **71**, 72-77.
[9] Jullien C., Benezech T., Carpentier B., Lebret V., Faile C.: Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. J. Food. Eng., 2002, **56**, 77-87.
[10] Le Thi T.-T., Prigent–Combaret C., Dorel C., Lejeune P.: First stages of biofilm formation: Charakterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. Met. Enzymol., 2001, **336**, 152-159.
[11] Lydersen B.K., D'eila N.A.: Bioprocess engineering systems, equipment, and facilities. John Wiley and Sons. New York 1994.
[12] Mossel D. A. A.: Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of all *Enterobacteriaceae*. J. Bact., 1962, **84**, 381-386.
[13] Parkar S.G., Flint S.H., Palmer J.S., Brooks J.D.: Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. J. Appl. Microbiol., 2001, **90**, 901-908.
[14] Peng J., Tsai W., Chou Ch.: Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. Int. J. Food. Microbiol., 2001, **65**, 105-111.
[15] Pringle J.H., Fletcher M.: Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. Appl. Environ. Microbiol., 1986, **51**, 1321-1325.
[16] Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D.: Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. Process Biochem., 2003, **38**, 909-914.

[17] Schubert R.: The use of Arginine Brilliantgreen Glucose Peptone Broth (ABGP Medium) as a Primary Culture Medium for *Pseudomonas aeruginosa*. Zbl. Bakt. Hyg., 1989, **187**, 266-268.

[18] Valcarce M.B., Busalmen J.P., de Sanchez S.R.: The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. Inter. Biodeter. Biodegrad., 2002, **50**, 61-66.

THE KINETICS OF BACTERIAL BIOFILM FORMATION ON SOME TECHNICAL MATERIALS DEPENDING ON THE AVAILABILITY OF NUTRIENTS

S u m m a r y

The objective of the research was to determine the effect of availability of nutritious components in a growth environment on the microorganisms adhesion level to surfaces applied in food industry. There were investigated microorganisms whose natural habitat was water (i.e. an environment with a limited availability of nutrients). The following bacterial cultures were grown in special media showing an optimal and a reduced availability of nutrients: *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Enterobacter cloacae*, and *Enterococcus faecalis*. The levels of bacterial cells adhering to surfaces of teflon, glass, and stainless steel (type 304L and 316L) were assessed according to a 9-degree scale under the application of fluorescent microscopy technique.

The experiments performed indicate the direct influence of both the availability of nutrients and the type of a particular species of microorganisms investigated on the efficiency of the bacterial biofilm formation. In the majority of experiments, the reduction in the content of metabolic substrates in the culture medium induced the species examined to adhere to abiotic surfaces. Among the functional surfaces investigated, the stainless steel (type 304L) appeared to be the most efficiently colonized by the microorganisms examined.

Key words: biofilm, adhesion, teflon, glass, stainless steel