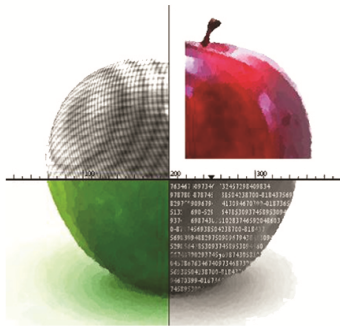


# NOWOCZESNE TECHNOLOGIE PRODUKCJI ŻYWNOSCI



POD REDAKCJĄ  
HANNY MARII BARANOWSKIEJ  
MICHAŁA PIĄTKA

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Poznań, 2016

# **NOWOCZESNE TECHNOLOGIE PRODUKCJI ŻYWNOŚCI**



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu



## SPONSORZY



Colian™



**Zeelandia**

stwarzamy możliwości

# **NOWOCZESNE TECHNOLOGIE PRODUKCJI ŻYWNOŚCI**

**Redakcja naukowa**

Hanna Maria Baranowska

Michał Piątek

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
**Poznań 2016**

## **Redakcja naukowa**

Dr hab. Hanna Maria Baranowska

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Dr inż. Michał Piątek

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

© Copyright by

Polskie Towarzystwo Technologów Żywności Oddział Wielkopolski

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań 2016

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany ani rozpowszechniany za pomocą urządzeń elektronicznych, kopiujących, nagrywających i innych bez pisemnej zgody Wydawcy.

**ISBN 978-83-7160-837-7**

## **Redakcja**

Joanna Le Thanh-Blicharz

Jacek Lewandowicz

## **Projekt okładki**

Przemysław Kowalczewski

## **Wydawca**

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 28

60-637 Poznań

Ark. wyd. 9,45

Wydanie I

Poznań 2016

## **Recenzenci**

Dr hab. Hanna Maria Baranowska

*Katedra Fizyki i Biofizyki*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Dr hab. Renata Cegielska-Radziejewska

*Katedra Zarządzania Jakością Żywności*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Prof. dr hab. inż. Danuta Górecka

*Katedra Technologii Żywienia Człowieka*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Dr inż. Joanna Le Thanh-Blicharz

*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych*

*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego*

Prof. dr hab. inż. Grażyna Lewandowicz

*Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Dr inż. Agnieszka Makowska

*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Dr hab. inż. Krzysztof Melski

*Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości*

*Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*

Dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska

*Katedra Biochemii i Analizy Żywności*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Dr inż. Michał Piątek

*Instytut Technologii Mięsa*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Prof. dr hab. inż. Edward Pospiech

*Instytut Technologii Mięsa*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Dr hab. inż. Dorota Walkowiak-Tomczak

*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

## **Autorzy**

Karina Baranowska  
*JK Packaging, Krotoszyn*

Róża Biegańska-Marecik  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Paulina Bierzuńska  
*Katedra Technologii Mleczarstwa  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Anna Bryła  
*Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej  
Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska*

Dorota Cais-Sokolińska  
*Katedra Technologii Mleczarstwa  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Sylwia Chudy  
*Katedra Technologii Mleczarstwa  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Katarzyna Czaczyk  
*Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Janusz Czapski  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Grzegorz Galiński  
*Katedra Higieny Żywienia Człowieka  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Tomasz Góral  
*Zakład Fitopatologii  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*

Danuta Górecka  
*Katedra Technologii Żywienia Człowieka  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Marzanna Hęś  
*Katedra Technologii Żywienia Człowieka  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Katarzyna Jaros-Koźlecka  
*TK Nano, Wrocław*

Leszek Jarosławski  
*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego*

Łukasz K. Kaczyński  
*Katedra Technologii Mleczarstwa*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Marcin Kidoń  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Dominik Kmiecik  
*Katedra Technologii Żywienia Człowieka*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Joanna Kobus-Cisowska  
*Katedra Technologii Żywienia Człowieka*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Przemysław Łukasz Kowalczewski  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Tomasz Koźlecki  
*Politechnika Wrocławska*

Danuta Kurasiak-Popowska  
*Katedra Genetyki Roślin*  
*Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Joanna Le Thanh-Blicharz  
*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych*  
*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego*

Grażyna Lewandowicz  
*Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Jacek Lewandowicz  
*Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości*  
*Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*

Agnieszka Makowska  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Artur Marciniak  
*Solvadis Polska Sp. z o. o., Wrocław*

Krzysztof Melski  
*Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości*  
*Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*

Jan Michniewicz  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Karolina Młynarczyk  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Anna Ostrowska-Kołodziejczak  
*Katedra Chemii*  
*Wydział Technologii Drewna Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Juliusz Perkowski  
*Katedra Chemii*  
*Wydział Technologii Drewna Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Michał Piegza  
*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

Krzysztof Przygoński  
*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych*  
*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego*

Elżbieta Radziejewska-Kubzdela  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Małgorzata Robak  
*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

Kinga Stuper-Szablewska  
*Katedra Chemii*  
*Wydział Technologii Drewna, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Jarosław Szafran  
*JK Packaging, Krotoszyn*

Dorota Walkowiak-Tomczak  
*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Karolina Wołyniec  
*Solvadis Polska Sp. z o. o., Wrocław*

Roman Zielonka  
*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych*  
*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego*

Barbara Żarowska  
*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

## SPIS TREŚCI

|                                                                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Streszczenie.....                                                                                                                                                            | 11  |
| Wstęp .....                                                                                                                                                                  | 14  |
| <i>Krzysztof Melski</i>                                                                                                                                                      |     |
| Innowacje opakowaniowe potencjalnym źródłem sukcesu żywności ogrzewanej mikrofalowo .....                                                                                    | 15  |
| <i>Tomasz Koźlecki, Katarzyna Jaros Koźlecka, Jarosław Szafran, Artur Marciniak, Karina Baranowska, Karolina Wołyniec, Michał Piegza, Barbara Żarowska, Małgorzata Robak</i> |     |
| Zastosowanie nanocząstek srebra w foliach spożywczych .....                                                                                                                  | 24  |
| <i>Barbara Żarowska, Michał Piegza, Katarzyna Jaros Koźlecka, Tomasz Koźlecki, Małgorzata Robak</i>                                                                          |     |
| Nanocząstki srebra (SNP) a hamowanie wzrostu mikroorganizmów .....                                                                                                           | 36  |
| <i>Anna Bryła, Grażyna Lewandowicz</i>                                                                                                                                       |     |
| Technologia liposomowa w przemyśle spożywczym .....                                                                                                                          | 48  |
| <i>Kinga Stuper-Szablewska, Anna Ostrowska-Kołodziejczak, Tomasz Góral</i>                                                                                                   |     |
| <i>Danuta Kurasiak-Popowska, Juliusz Perkowski</i>                                                                                                                           |     |
| Aktywacja nieenzymatycznych mechanizmów odpornościowych pszenicy w celu podniesienia wartości zdrowotnych produktów pszennych .....                                          | 61  |
| <i>Agnieszka Makowska, Przemysław Łukasz Kowalczewski, Grzegorz Galiński, Sylwia Chudy, Jan Michniewicz</i>                                                                  |     |
| Wartość żywieniowa ekstraktów pszenżytnich na podstawie badań <i>in vivo</i> .....                                                                                           | 70  |
| <i>Roman Zielonka, Leszek Jarosławski</i>                                                                                                                                    |     |
| Przebieg hydrolizy nieskleikowanej skrobi ziemniaczanej z udziałem różnych enzymatycznych układów amylolitycznych.....                                                       | 80  |
| <i>Leszek Jarosławski, Krzysztof Przygoński, Roman Zielonka</i>                                                                                                              |     |
| Przebieg procesu karmelizacji w warunkach przemysłowej produkcji karmelu amoniakalnego .....                                                                                 | 90  |
| <i>Joanna Le Thanh-Blicharz, Jacek Lewandowicz</i>                                                                                                                           |     |
| Właściwości reologiczne oraz tekstura kisieli zagęszczonych skrobią woskową różnego pochodzenia botanicznego .....                                                           | 100 |
| <i>Jacek Lewandowicz, Joanna Le Thanh-Blicharz</i>                                                                                                                           |     |
| Właściwości reologiczne oraz tekstura budyni zagęszczonych skrobią woskową różnego pochodzenia botanicznego .....                                                            | 109 |
| <i>Marzanna Hęś, Danuta Górecka, Dominik Kmiecik, Joanna Kobus-Cisowska</i>                                                                                                  |     |
| Wykorzystanie wybranych hydrokoloidów jako zamienników tłuszczu w emulsjach majonezowych .....                                                                               | 118 |
| <i>Róża Biegańska-Marecik, Elżbieta Radziejewska-Kubzdela, Janusz Czapski, Katarzyna Czaczyk, Marcin Kidoń, Dorota Walkowiak-Tomczak, Karolina Młynarczyk</i>                |     |
| Comparison of vacuum impregnation, dipping and blanching as treatment method maintaining quality of fresh-cut apple .....                                                    | 128 |
| <i>Łukasz K. Kaczyński, Paulina Bierzuńska, Dorota Cais-Sokolińska</i>                                                                                                       |     |
| Technologiczne uwarunkowania syntezy kwasu 2-hydroksypropanowego w fermentowanym mleku o obniżonej zawartości laktozy .....                                                  | 146 |

### STRESZCZENIE

Innowacyjność polskiego przemysłu spożywczego jest kluczowym elementem jego konkurencyjności w warunkach gospodarki rynkowej. Jej zapewnienie wymaga dobrej współpracy pomiędzy jednostkami naukowymi i badawczo - rozwojowymi a przedsiębiorcami. Jednym z elementów tej dobrej współpracy są wysokie kwalifikacje kadry technicznej zatrudnionej w produkcji, systematycznie śledzącej pojawiające się nowości technologiczne. Niniejsza monografia jest adresowana głównie do kadry naukowo - technicznej związanej z produkcją i przechowywaniem żywności. Może być również ciekawa dla szerszego grona czytelników zainteresowanych technologią żywności.

W monografii przedstawiono najintensywniej rozwijane aktualnie kierunki w zakresie wytwarzania i pakowania żywności. To ostatnie zagadnienie ma szczególne znaczenie dla trwałości produktów jak również dla łatwości ich przygotowywania. Innowacje opakowaniowe dla żywności ogrzewanej mikrofalowo zostały opisane w rozdziale otwierającym monografię. Zostały w nim przedstawione czynniki wpływające na jakość żywności ogrzewanej mikrofalowo, tendencje rozwoju „żywności wygodnej” przeznaczonej do ogrzewania w kuchenkach mikrofalowych, jak również opakowania aktywne i kompostowalne żywności ogrzewanej mikrofalowo.

Tematyka opakowań została poruszona również w rozdziale drugim opisującym folie spożywcze zawierające nanocząstki srebra. Ich zastosowanie nie tylko zapewnia czystość produktu, ale również pozwala wydłużyć czas przydatności do spożycia oraz ograniczyć straty finansowe wynikające ze zmian organoleptycznych zachodzących na skutek rozwoju mikroorganizmów. Przedstawione badania pozwalają na uzasadniony optymizm w stosunku do stosowania nanocząstek srebra, jako dodatków do produkcji folii na potrzeby pakowania produktów spożywczych. Udowodniono, że nie jest wymagane wysokie stężenie nanosrebra, a wręcz wskazany jest ich minimalny udział, nie tylko skutkujący lepszym działaniem, ale także niższym kosztem. Rola nanocząstek srebra w hamowaniu rozwoju drobnoustrojów została szczegółowo przedyskutowana w rozdziale trzecim wskazując na celowość ich stosowania w foliach służących do pakowania żywności czy też różnego rodzaju materiałach kompozytowych.

Nanotechnologia w produkcji żywności to nie tylko hamowanie wzrostu mikroorganizmów przez nanocząstki metali, ale również kapsułkowanie substancji bioaktywnych wewnątrz liposomów. Zostało ono opisane w rozdziale czwartym, w którym szczególną uwagę poświęcono podstawom fizykochemicznym tego procesu. Ponadto, opisano metody badania nanokapsulek liposomowych oraz sposoby ich wytwarzania na skalę laboratoryjną i przemysłową. Przedstawiono główne kierunki zastosowania technologii liposomowej w wytwarzaniu żywności oraz podkreślono jej zalety i ograniczenia.

Rozwój technologiczny mający na celu podwyższenie jakości żywności może być realizowany już na etapie uprawy. Podczas wegetacji, zboża narażone są bowiem na różnego rodzaju czynniki stresogenne, które wpływają na jakość i bezpieczeństwo zdrowotne ziarna. W rozdziale piątym opisano w jaki sposób stymulacja nieenzymatycznych mechanizmów odpornościowych wpływa na zwiększoną produkcję kwasów fenolowych oraz wzrost aktywności przeciwutleniającej ziarna pszenicy. Przekłada się to bezpośrednio na podwyższenie wartości zdrowotnych produktów spożywczych otrzymanych z ziarna pszenicy. Inny sposób zwiększania wartości odżywczej opisano w rozdziale szóstym. Polega on za zastosowaniu ekstruzji w wyniku, której surowce dotychczas stosowane jedynie do celów paszowych stają się konkurencyjne w stosunku do tradycyjnych produktów spożywczych.

Na znaczenie procesów enzymatycznych dla rozwoju technologii żywności zwrócono również uwagę w rozdziale siódmym. Wykazano, że pozwalają one na znaczące obniżenie kosztów produkcji, na skutek niskiej energochłonności, przy równoczesnym podniesieniu jakości produktów. Jest to możliwe przez precyzyjne sterowanie reakcjami katalizowanymi przez enzymy.

Rozwój technologiczny musi się odbywać nie tylko przez wdrażanie nowych technologii, ale przez doskonalenie już współcześnie egzystujących. Przykładem na tego typu działanie jest opisana w rozdziale ósmym modyfikacja procesu karmelizacji zrealizowana w firmie CHEMET sp. z o.o. z Plewisk k. Poznania. Dzięki odpowiednim zabiegom technologicznym uzyskano znaczące, do poziomu ośmiokrotnie niższego od wartości dopuszczonej prawem Unii Europejskiej, zmniejszenie zawartości substancji szkodliwej (4-metyloimidazolu).

Wśród współczesnych trendów rozwojowych technologii żywności poczesne miejsce zajmuje poszukiwanie niekonwencjonalnych surowców. Skrobia ziemniaczana woskowa to produkt od niedawna dopuszczony do obrotu w Unii Europejskiej. Może on stanowić konkurencję dla dotychczas stosowanej zwykłej skrobi. Tym zagadnieniom poświęcono rozdziały dziewiąty, dziesiąty oraz jedenasty w których porównano właściwości kisieli i budyni otrzymanych na bazie skrobi kukurydzianej woskowej i tradycyjnych surowców stosowanych do przyrządzania tych deserów. Niekonwencjonalne surowce zostały też zastosowane do wytwarzania majonezów niskotłuszczowych opisane w rozdziale jedenastym. Produkty tego typu są poszukiwane, jednak konsumenci bywają bardzo krytyczni w ocenie ich właściwości sensorycznych. Zostało wykazane, że rozwiązaniem tego problemu może być użycie tradycyjnych surowców, takich jak żelatyna, w niekonwencjonalnych zastosowaniach.

Żywność nisko przetworzona zdobywa coraz większą popularność wśród konsumentów. Właściwa technologia przy minimalnym przetworzeniu jest gwarantem wysokiej jakości oferowanego produktu. W rozdziale dwunastym wykazano, że nasączenie próżniowe może być korzystną alternatywą dla blanszowania w technologiach owoców niskopretworzonych.

Monografię zamyka rozdział poświęcony technologicznym uwarunkowaniom syntezy kwasu 2-hydroksypropanowego w fermentowanym mleku o obniżonej zawartości laktozy. Jest to zagadnienie ważne ze względu na fakt iż kwas 2-hydroksypropanowy wykazuje właściwości prozdrowotne. Hamuje potencjał elektrochemiczny membran komórkowych, denaturuje wewnątrzkomórkowe białka i obniża pH treści komórek mikroflory patogennej. Ponadto, przyspiesza trawienie białek w przewodzie pokarmowym, wzmacnia wydzielanie soków trawiennych, pobudza perystaltykę jelit oraz zwiększa wchłanianie jonów żelaza, wapnia i fosforu. Żywność zawierająca kwas 2-hydroksypropanowy jest klasyfikowana jako funkcjonalna. Produkty tego typu są poszukiwane na rynku a zainteresowanie nimi wykazuje stała tendencja wzrostowa.

**Słowa kluczowe:** ogrzewanie mikrofalowe, liposomy, nanocząstki srebra, hydroliza enzymatyczna, wartość odżywcza, surowce niekonwencjonalne

### WSTĘP

Sukces produktu w warunkach gospodarki rynkowej jest uwarunkowany przede wszystkim zastosowaniem właściwej technologii, umożliwiającej otrzymanie atrakcyjnego wyrobu przy jednoczesnym ponoszeniu jak najmniejszych nakładów. Dlatego też przedsiębiorcy branży spożywczej starają się wprowadzać systematycznie do swojej oferty nowe produkty, skutecznie konkurujące na rynku nie tylko ceną, ale również, a może przede wszystkim wartością odżywczą, atrakcyjnych smakiem, zapachem i wyglądem jak również trwałością. Taka działalność wzmacnia zapotrzebowanie na nowe technologie produkcji i przechowywania żywności. W odpowiedzi na takie zapotrzebowanie instytuty badawcze i jednostki naukowe uczelni wyższych prowadzą szeroko zakrojone badania. Są to badania podstawowe a także innowacyjno-wdrożeniowe. W tym aspekcie największe zainteresowanie koncentruje się wokół możliwości zastosowania nanotechnologii. Ten ostatni kierunek budzi nie tylko nadzieje konsumentów, ale również mniej lub bardziej uzasadnione obawy. Przykładowo – wśród społeczeństwa dość powszechna jest znajomość przeciwdrobnoustrojowego działania nanocząstek srebra. Niemniej jednak, obawy budzą długofalowe skutki ich stosowania, zarówno dla zdrowia człowieka jak i dla środowiska. Nanotechnologia w produkcji żywności to nie tylko hamowanie wzrostu mikroorganizmów przez nanocząstki metali, ale również kapsułkowanie substancji bioaktywnych wewnątrz liposomów. Badania podstawowe w zakresie nanotechnologii pozwalają na określenie zarówno możliwości jej zastosowania jak i ograniczeń w produkcji żywności.

Współczesny konsument jest nie tylko coraz bardziej wymagający, ale również ma coraz mniej czasu na przygotowywanie posiłków. W tym aspekcie niezwykle ważne jest rozwijanie technologii tzw. żywności wygodnej, której przygotowanie wymaga niewiele wysiłku. Jest sprawą oczywistą, że ta kategoria produktów powinna również charakteryzować się wysoką wartością odżywczą. Bardzo użyteczne w przygotowywaniu tego typu posiłków jest ogrzewanie mikrofalowe. Aby jednak jego stosowanie nie wiązało się z obniżeniem jakości produktów konieczne jest zastosowanie odpowiedniej technologii produkcji opakowań.

Niemniej ważnym kierunkiem rozwojowym w wytwarzaniu żywności jest doskonalenie technologii już wdrożonych do praktyki przemysłowej. Największą rolę do spełnienia mają tu instytuty branżowe, powołane do tego typu działania i mające ogromne, wieloletnie doświadczenie we współpracy z przemysłem. Niestety ostatnio ta ich rola jest kwestionowana co zmniejsza konkurencyjność polskiego wytwórcy w stosunku do wielkich koncernów spożywczych dysponujących własnym zapleczem badawczym. Kolejną barierą hamującą konkurencyjność polskiego przemysłu spożywczego jest jego rozdrobnienie, co powoduje iż poszczególni przedsiębiorcy nie są w stanie udźwignąć ryzyka ekonomicznego związanego z innowacyjnością.

*Hanna M. Baranowska, Michał Piątek*

KRZYSZTOF MELSKI

*Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości*

*Wydział Towaroznawstwa*

*Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*

*k.melski@ue.poznan.pl*

### **INNOWACJE OPAKOWANIOWE POTENCJALNYM ŹRÓDŁEM SUKCESU ŻYWNOSCI OGRZEWANEJ MIKROFALOWO**

#### **Abstrakt**

Opakowanie stanowi element nierozzerwalnie związany z opakowanym produktem, będąc równocześnie jednym z czynników determinujących jego sukces rynkowy. Rosnące wymagania wobec wyrobów, w połączeniu ze złożonymi systemami ich dystrybucji oraz finalnego wykorzystania sprawiają, że coraz częściej opakowanie staje się integralną częścią wyrobu, bez której jego funkcjonowanie na rynku nie byłoby możliwe. Znaczenie marketingowe opakowań oraz szerokie spektrum obszarów innowacji sprawia, że to właśnie branża opakowaniowa jawi się jedną z najbardziej innowacyjnych. Znaczący potencjał w omawianym zakresie posiadają opakowania żywności przeznaczonej do ogrzewania w kuchenkach mikrofalowych, stanowiącej sztandarowy przykład tzw. żywności wygodnej. Specyfika ogrzewania mikrofalowego sprawia, że pożądany efekt w postaci równomiernego lub strefowego ogrzania produktu, wymaga specyficznych rozwiązań, często różnych dla poszczególnych grup produktów. W artykule omówiono wybrane kierunki rozwoju opakowań żywności ogrzewanej mikrofalowo oraz ich potencjał w zakresie rozwiązań innowacyjnych.

**Słowa kluczowe:** opakowanie, ogrzewanie mikrofalowe, żywność wygodna

#### **Wstęp**

Wraz z nastaniem epoki globalnej gospodarki rynkowej do historii przeszły czasy, kiedy produkt mógł „sprzedawać się sam” bez mniej lub bardziej zaawansowanych działań marketingowych. Ostra, międzynarodowa konkurencja sprawia, że sfera podejmowanych działań obejmuje nie tylko sam produkt lecz także jego opakowanie, które oprócz tradycyjnych funkcji: ochronnej, informacyjnej i logistycznej coraz częściej realizuje szereg funkcji o charakterze marketingowym.

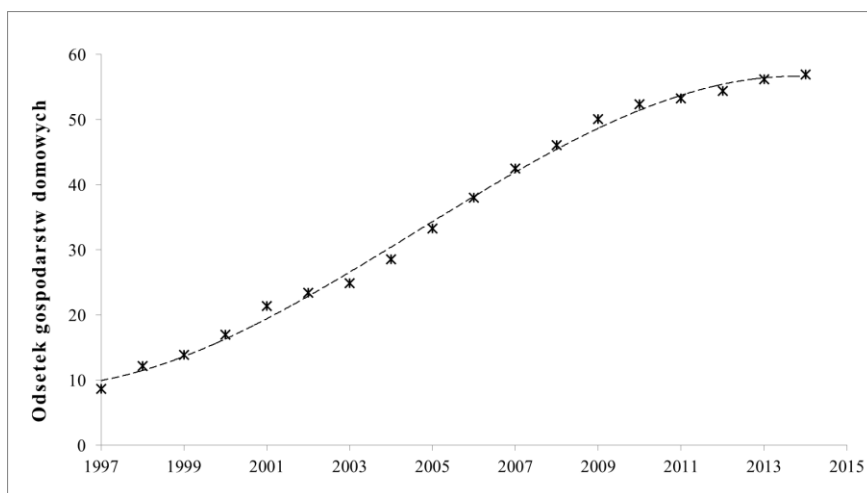
Przemysł opakowaniowy zaliczany jest do grupy dynamicznie rozwijających się sektorów gospodarki, także w zakresie wykazywanej różnorodności w zakresie innowacji. Dotyczą one głównie: zwiększenia funkcjonalności, ergonomiczności, walorów ekologicznych, ekonomicznych, a także szaty graficznej opakowania. Rozwój w opakownictwie przebiega w trzech zasadniczych kierunkach: technologicznym, materiałowym oraz konstrukcyjnym [Korzeniowski i in., 2011].

Rosnące wymagania wobec wyrobów i sposobów ich finalnego wykorzystania, zaawansowane systemy logistyczne oraz techniki sprzedaży sprawiają, że coraz częściej opakowanie staje się niejako częścią wyrobu tworząc wraz z nim tzw. produkt zintegrowany.

Niespotykane dla żadnego produktu rynkowego spektrum funkcji realizowanych przez opakowania kreuje szerokie pole do opracowania i wdrażania innowacyjnych rozwiązań. Sytuacja taka stwarza wyjątkową szansę dla średnich i małych firm opakowaniowych oraz produkcyjnych, które we wzajemnej współpracy mogą opracować i wdrożyć innowacyjne rozwiązania będące źródłem sukcesu rynkowego ich produktu. Celem niniejszego opracowania jest prezentacja wybranych kierunków rozwoju opakowań żywności ogrzewanej mikrofalowo, posiadających znaczący potencjał innowacyjny.

### Kuchenki mikrofalowe w gospodarstwach domowych

W zakresie nasycenia kuchenkami mikrofalowym i sytuacja polskich gospodarstw domowych jest odmienna w porównaniu z ich odpowiednikami w krajach wysokorozwiniętych. W Stanach Zjednoczonych odsetek gospodarstw domowych posiadających kuchenkę mikrofalową przekroczył 90% pod koniec XX wieku [Liegey, 2001]. W Wielkiej Brytanii podobny poziom osiągnięto w roku 2006 [Self 2008; Swain, 2008]. W Polsce, pomimo ponad siedemdziesięcioprocentowego wzrostu liczby gospodarstw posiadających kuchenki mikrofalowe w ostatniej dekadzie (2005-14), nasycenie tego typu sprzętem wynosiło w roku 2014 niespełna 57%. Jak pokazano na rys.1 w ostatnich latach nastąpiło znaczące wyhamowanie dynamiki wzrostu liczby gospodarstw posiadających kuchenkę mikrofalową. Jeśli nie nastąpi odwrócenie trendu 60% nasycenia stanowić będzie poziom maksymalny.

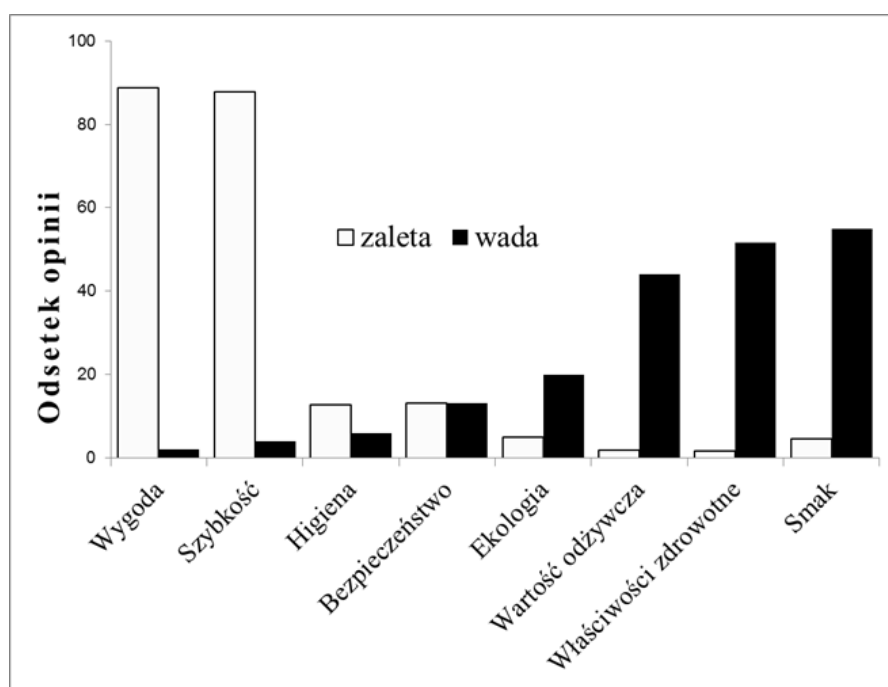


**Rysunek 1.** Odsetek polskich gospodarstw domowych posiadających kuchenkę mikrofalową  
Opracowano na podstawie roczników statystycznych GUS

Specyficzny jest także sposób wykorzystania kuchenek mikrofalowych. W roku 2011 ok. 83 % z przebadanych 172 gospodarstw domowych używało kuchenki mikrofalowej do podgrzewania wcześniej przygotowanych potraw. Rozmrażanie prowadzone było w 61 % gospodarstw, podgrzewanie zestawów obiadowych w 46 %, przygotowanie przekąsek typu fast food w 35 %, a gotowanie w 13% [Melski, 2012]. Relatywnie niski udział operacji prowadzonych z użyciem gotowych produktów przeznaczonych do nadania gotowości

kulinarnej w kuchence mikrofalowej z jednej strony świadczy o konserwatyzmie polskich konsumentów, z drugiej o znaczącym potencjale rynku produktów dedykowanych do ogrzewania mikrofalowego. Należy przypuszczać, że rosnące tempo życia, dążenie do wygody wraz z wzrastającym poziomem zamożności społeczeństwa stymulować będą rozwój rynku tego typu produktów.

W zaistniałej sytuacji niezwykle istotne jest, aby producenci żywności zaoferowali produkty łączące w sobie przyzwyczajenia kulinarne rodzimych konsumentów z zaletami, jakie oferuje ogrzewanie mikrofalowe. Nie mniej ważna jest zmiana postrzegania kuchenek mikrofalowych i przygotowanych w nich posiłków przez potencjalnych konsumentów. Oprócz szybkości procesu i oferowanej wygody, w pewnym stopniu jako zaleta postrzegany jest także aspekt higieniczny procesu. Odmienne wygląda sytuacja w odniesieniu do właściwości zdrowotnych, wartości odżywczych oraz smaku gotowych posiłków, które oceniane są negatywnie (rys. 2). Jednym z obszarów zmiany wizerunku żywności ogrzewanej mikrofalowo jest poprawa właściwości sensorycznych. Działania w tym obszarze wymagają znajomości czynników wpływających na cechy gotowego produktu, w szczególności te wynikające ze specyfiki ogrzewania mikrofalowego.



**Rysunek 2.** Postrzeganie przez konsumentów ogrzewania żywności w kuchenkach mikrofalowych

Źródło: [Melski, 2012]

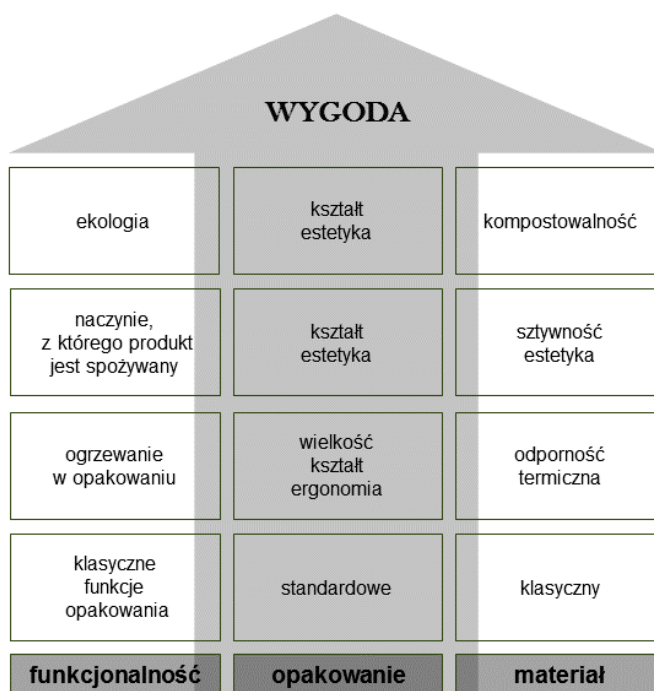
Interesującym zjawiskiem jest też postrzeganie „ekologii” procesu ogrzewania mikrofalowego jako jego wady, pomimo znacznie większej efektywności energetycznej ogrzewania mikrofalowego w stosunku do klasycznego [de Almeida i in., 2011]. Decydującą rolę w negatywnym postrzeganiu procesu odgrywa powszechne zastosowanie opakowań

jednorazowych z tworzyw sztucznych oraz nagłaśniane często w mediach niekorzystne oddziaływanie promieniowania mikrofalowego na ludzi i środowisko [Balmori, 2009]. Negatywne postrzeganie środowiskowego aspektu ogrzewania mikrofalowego stanowić może czynnik ograniczający popyt na gotowe produkty przeznaczone do ogrzewania mikrofalowego.

Nie ulega wątpliwości, że produkty ogrzewane mikrofalowo zaliczyć możemy do tzw. żywności wygodnej, co potwierdza powszechna opinia o szybkości i wygodzie ogrzewania mikrofalowego (rys. 2). Popularność tego typu produktów idzie w parze ze zmianami stylu życia współczesnego społeczeństwa. Coraz częściej spotykane jednoosobowe gospodarstwa domowe, osoby posiadające nienormowany czas pracy lub samotnie wychowujące dzieci, żyjące w „biegu” nie mając czasu na przygotowanie posiłków w tradycyjny sposób chętniej sięgają po tego typu produkty [Agriculture and Agri-Food Canada, 2012]. Można przyjąć, że w pewnym zakresie pozwalają na spożywanie produktów o zadawalających właściwościach sensorycznych, świeżości i wydłużonym okresie przydatności do spożycia przy zastosowaniu możliwie łagodnych technik konserwacji [Dainelli i in., 2008].

Rozwój żywności wygodnej ściśle związany jest w aplikacją innowacyjnych rozwiązań dodających produktom kolejnych funkcjonalności lub rozszerzających już istniejące. W omawianej grupie wyrobów jest on nierozdzielnie związany z zastosowanymi rozwiązaniami w obrębie opakowania. Poza klasycznymi funkcjami opakowania powinno ono pozwalać na ogrzanie produktu w swoim wnętrzu oraz łatwe i bezpieczne operowanie nim wraz z gorącą zawartością. Dalsze zwiększenie wygody oraz bezpieczeństwa procesu nadania gotowości kulinarnej można osiągnąć poprzez przystosowanie opakowania do roli naczynia, z którego produkt jest spożywany. Znacznie wyższe wymagania w zakresie funkcjonalności i estetyki spełnione mogą być poprzez zastosowanie innowacyjnych rozwiązań konstrukcyjnych połączonych z atrakcyjną formą oraz materiałami. Takie podejście znacząco rozszerza pole rozwiązań konstrukcyjnych i stosowanych materiałów w kierunku udoskonalenia funkcjonalności i estetyki opakowania-naczynia.

Kolejny, wyższy poziom zaspokojenia potrzeb współczesnego konsumenta może łączyć dalsze zwiększenie wygody z troską o ochronę środowiska naturalnego. Trend ten jest niezwykle istotny w świetle negatywnego postrzegania ekologicznych aspektów ogrzewania mikrofalowego (rys. 2). Pożądanym kierunkiem zmian może być zastosowanie w miejsce klasycznych tworzyw sztucznych ich biodegradowalnych odpowiedników pozwalających na wyrzucenie opakowania/naczynia wraz z pozostałościami posiłku do odpadów poddawanych przeróbce biologicznej. Opakowanie kompostowalne istotnie zwiększa również wygodę konsumenta, gdyż nie musi on oczyszczać pojemnika z resztek posiłku, oszczędzając w ten sposób czas, wodę, detergenty oraz energię, przez co po raz kolejny, pośrednio przyczynia się do ochrony środowiska. Zastosowanie kompostowalnych materiałów opakowaniowych wytworzonych z surowców odnawialnych czyni opakowanie jeszcze bardziej „ekologicznym”. Przedstawione rozwiązanie wpisuje się w nurt „proekologicznych” zachowań konsumentów, wynosząc wartość dodaną do funkcjonalności żywności wygodnej (rys. 3).



**Rysunek 3.** Tendencje rozwoju „żywności wygodnej” przeznaczonej do ogrzewania w kuchenkach mikrofalowych

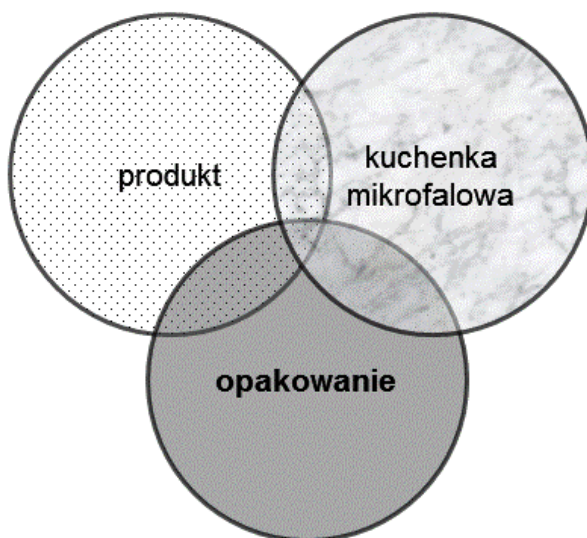
### Czynniki wpływające na jakość żywności ogrzewanej mikrofalowo

Na przebieg procesu ogrzewania mikrofalowego żywności wywierają wpływ trzy wzajemnie powiązane elementy: produkt, kuchenka mikrofalowa i naczynie, w którym proces jest prowadzony (rys. 4). Każdy z nich posiada określony potencjał innowacyjny, jak również istotne ograniczenia wynikające ze swojej specyfiki. Dla produktu są nimi: skład, kompozycja, właściwości sensoryczne, wartość odżywcza, wielkość porcji itp.

Mikrofale są powszechnie wykorzystywane przez systemy radiolokacyjne oraz komunikacyjne: telefonię komórkową, telekomunikację, telewizję itp., co skutkuje ścisłą reglamentacją dostępnych częstotliwości. W urządzeniach służących do ogrzewania mikrofalowego stosowane są dwie częstotliwości 915 MHz i 2,45 GHz, przy czym pierwsza najczęściej w instalacjach przemysłowych do rozmrażania produktów głęboko zamrożonych [Van Loock, 2001; Ku i in., 2002]. Ściśle określona, daleka od optymalnej, częstotliwość pracy kuchenek mikrofalowych – 2,45 GHz istotnie ogranicza zakres możliwych modyfikacji urządzenia. Poprawa efektywności, funkcjonalności oraz jakości pracy kuchenki osiągnięta być może poprzez zmiany w obrębie komory grzewczej.

Trzeci element jakim jest opakowanie, posiada największy potencjał w zakresie oddziaływania na jakość procesu ogrzewania mikrofalowego. Pomimo ograniczeń narzuconych przez wielkość porcji, brak negatywnego wpływu na ogrzewany produkt, barierowość i odporność termiczną, istnieje względnie szerokie pole manewru w zakresie kształtu opakowania oraz zastosowanego materiału. Ponad to opakowanie może

w specyficzny sposób oddziaływać z mikrofalami modyfikując rozkład pola elektromagnetycznego w produkcie bądź wchodząc w interakcję z mikrofalami generować ciepło w określonych obszarach opakowania [Łopacka i in., 2015].



**Rysunek 4.** Czynniki wpływające na jakość produktu ogrzewanego mikrofalowo

Rodzaj i skład chemiczny materiału oraz konstrukcja opakowania wpływają znacząco na rozkład przestrzenny temperatury. Poza rodzajem materiału opakowaniowego, jednym z głównych czynników wpływających na efektywność ogrzewania mikrofalowego jest kształt opakowania. Najbardziej optymalnym jest kształt okrągły lub owalny. Nie występuje wówczas charakterystyczny dla opakowań prostokątnych efekt brzegowy związany z występowaniem krawędzi i naroży, gdzie temperatura podczas ogrzewania jest wyższa niż w pozostałej części opakowania [Borowy i Kubiak, 2010].

Biorąc pod uwagę oczekiwania konsumentów dotyczące spożywanych produktów oraz wymagania formalne stawiane żywności, opakowaniom i kuchenkom mikrofalowym; należy stwierdzić, że największe możliwości w zakresie implementacji innowacyjnych rozwiązań związane są z opakowaniem wyrobu.

### **Opakowania aktywne żywności ogrzewanej mikrofalowo**

Unikalna zdolność promieniowania mikrofalowego do generowania ciepła wewnątrz ogrzewanego produktu skutkuje najistotniejszymi zaletami procesu – szybkością, jednoczesnym ogrzewaniem całej objętości oraz efektywnością energetyczną. Z drugiej strony niska temperatura powietrza w komorze kuchenki oraz niedogrzenie powierzchni produktu skutkuje gromadzeniem się na niej wody, czego efektem jest „papkowata” struktura powierzchni oraz brak kruchości i zbrązowienia powierzchni licznych produktów, np. pizzy [Galema, 1997; Melski, 2000]. W przypadku ogrzewania mikrofalowego zarówno naczynie jak i otaczające powietrze nie są ogrzewane, a ciepło generowane jest

w ogrzewanym produkcie. Jednakże intensywne chłodzenie zewnętrznych warstw przez otaczające, zimne powietrze sprawia, że wnętrze produktu posiada znacznie wyższą temperaturę niż jego warstwy zewnętrzne. W produkcie występuje niewielki gradient temperaturowy skierowany do zewnątrz [Galema, 1997]. To niekorzystne zjawisko stanowi podstawowy powód krytycznego postrzegania właściwości sensorycznych ogrzewanych produktów, co w omawianej wyżej ankiecie respondenci wyrazili w postaci krytycznej oceny smaku. Rozwiązanie problemu jakości (wymagana chrupkość, zbrązowienie) powierzchni ogrzewanych produktów stanowi klucz do sukcesu rynkowego znaczącej grupy wyrobów. Ze względu na skład i kompozycję produktów wymagających chrupkiej powierzchni praktycznie nie ma możliwości manewru w tym obszarze.

W konstrukcji kuchenek mikrofalowych osiągnięto połowiczne rozwiązanie, którym jest ogrzewanie hybrydowe realizowane jednocześnie przez mikrofałe i klasyczny element grzejny umieszczony w komorze grzejnej kuchenki. Stanowi ono krok wstecz, w kierunku klasycznych metod ogrzewania, co odbywa się kosztem szybkości oraz efektywności procesu, częściowo niwelując najważniejsze zalety ogrzewania mikrofalowego.

Najlepsze rezultaty w rozwiązaniu problemów chrupkości ogrzewanych produktów osiągnięto stosując innowacyjne rozwiązania w sferze opakowań. Ideą przewodnią jest umieszczenie elementu grzejnego wewnątrz opakowania, poprzez zastosowanie materiału oddziałującego z mikrofalami. Wykonanie określonego elementu opakowania z materiału aktywnego, nazywanego także receptorem lub susceptorem pozwala na przekształcenie części padającego na jego powierzchnię promieniowania mikrofalowego w ciepło. Wzrost temperatury opakowania w wybranych miejscach powoduje szybkie ogrzanie powierzchni produktu i nadanie jej pożądanej chrupkości. Równocześnie wnętrze dania ogrzewane jest mikrofalami, dzięki czemu gotowość kulinarna osiągana jest z szybkością charakterystyczną dla „mikrofalówki”. Oprócz susceptorów stosowane mogą być także reflektory odbijające mikrofałe w celu ochrony wybranych fragmentów dania przed nadmiernym nagrzanem, np. surówek w zestawach obiadowych [Lisińska-Kuśnierz i Ucherek, 2003; Robertson, 2006; Przetaczek-Rożnowska, 2010].

### **Opakowania kompostowalne**

Rosnąca świadomość ekologiczna konsumentów stymuluje wzrost wymagań ośrodków legislacyjnych oraz konsumentów w zakresie wpływu produktów rynkowych na środowisko naturalne. Względnie krótki czas wykorzystania, najczęściej jednorazowe zastosowanie oraz udział konsumenta w wytwarzaniu odpadów opakowaniowych sprawiają, że to właśnie opakowanie w znacznym stopniu determinuje postrzeganie produktu jako przyjaznego bądź nie dla środowiska naturalnego [Melski, 2012]. Rozwiązanie części problemów związanych z zagospodarowaniem odpadów opakowaniowych, przy jednoczesnej poprawie wizerunku zarówno opakowania, jak i zawartego w nim produktu możliwe jest przez zastosowanie opakowań podlegających rozkładowi biologicznemu w trakcie procesu kompostowania. Odpady tego typu mogą być przetwarzane biologicznie w instalacjach przemysłowych lub kompostownikach przydomowych [Rydz i in., 2015].

Wykorzystanie kompostowalnych opakowań produktów ogrzewanych mikrofalowo możliwe jest nie tylko w gospodarstwach domowych, lecz także w obiektach małej gastronomii. Zastosowanie opakowań/naczyni jednorazowych, które wraz z resztkami

pożywienia mogą być oddane do utylizacji generować może wymierne korzyści materialne i organizacyjne. W barach typu fast food zastosowanie recyklingu materiałowego jest problematyczne, gdyż większość odpadów stałych stanowią opakowania zanieczyszczone resztkami produktów spożywczych. Oczyszczanie i gromadzenie posegregowanych odpadów jest praktycznie niewykonalne, dlatego stopień odzysku w tego typu obiektach jest niewielki, a większość odpadów nadających się do przeróbki trafia na składowiska [Aarnio i Hämäläinen, 2008]. Za najbardziej efektywny ekonomicznie i środowiskowo sposób wykorzystania opakowań podlegających rozkładowi biologicznemu należy uznać ich zastosowanie do pakowania żywności wygodnej. Konkluzja powyższa nabiera szczególnego znaczenia w połączeniu z ograniczoną w dłuższej perspektywie czasowej dostępnością tego typu materiałów opakowaniowych.

### Podsumowanie

Ze względu na powszechność stosowania oraz coraz większe znaczenie opakowań na dzisiejszym rynku, branża opakowaniowa zajmuje szczególną pozycję, gdyż współczesny klient wchodzi w kontakt z opakowaniem o wiele wcześniej i częściej niż z produktem. Ze względu na szeroki zakres realizowanych funkcji opakowanie zawiera zwykle znacznie więcej rozwiązań innowacyjnych niż opakowany produkt, w związku z czym potencjalny nabywca, mniej lub bardziej świadomie, styka się z innowacjami opakowaniowymi. Jednym z obszarów implementacji innowacyjnych rozwiązań jest żywność przeznaczona do ogrzewania w domowych kuchenkach mikrofalowych. W ograniczonym zakresie nowe rozwiązania dotyczyć mogą zarówno urządzenia grzewczego, jak i ogrzewanego produktu. Elementem o największym potencjale innowacyjnym jest opakowanie, które w synergii z dwoma pozostałymi elementami może generować znaczące korzyści w obrębie ekonomii, technologii, diety, marketingu oraz ochrony środowiska naturalnego.

### Literatura

Aarnio, T., Hämäläinen, A., 2008, Challenges in packaging waste management in the fast food industry, *Resources, Conservation and Recycling*, 2008, 52, 612–621.

Agriculture and Agri-Food Canada, 2012, Consumer Trends, Chilled Foods in Poland, [http://publications.gc.ca/site/archivée\\_archived.html?url=http://publications.gc.ca/collections/collection\\_2014/aac-aafc/A74-1-117-2012-eng.pdf](http://publications.gc.ca/site/archivée_archived.html?url=http://publications.gc.ca/collections/collection_2014/aac-aafc/A74-1-117-2012-eng.pdf) (dostęp: styczeń 201).

Balmori, A., Electromagnetic pollution from phone masts. Effects on wildlife, *Pathophysiology*, 2009, 16, 191–199.

Borowy T., Kubiak M.S., Opakowania żywności stosowane w technologii mikrofalowej, *Gospodarka Mięsna*, 2010, 62 (06), 20–24.

Česnek J., Dobiáš J., Houšová J., Sedláček J., 2003, *Properties of thin metallic films for microwave susceptors*, *Czech Journal of Food Sciences*, 21, s. 34–40.

Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan–van den Beuken, E., Tobback, P., Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns, *Trends in Food Science & Technology*, 2008, 19, 103–112.

de Almeida, A., Fonseca, P., Schlomann, B., Feilberg, N., Characterization of the household electricity consumption in the EU, potential energy savings and specific policy recommendations, *Energy and Buildings*, 2011, 43, 1884–1894.

Galema S. A., *Microwave Chemistry*, Chemical Society Reviews, 1997, 26, 233–238.

Korzeniowski, A., Ankiel–Homa, M., Czaaja–Jagielska, N., *Innowacje w opakownictwie*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, 2011.

Ku, H.S., Siores, E., Taube, A., Ball, J.A.R., Productivity improvement through the use of industrial microwave technologies, *Computers & Industrial Engineering*, 2002, 42, 281–290.

Liegey, P.R., 2001, Hedonic Quality Adjustment Methods For Microwave Ovens In the U.S. CPI, U.S. Bureau of Labor Statistic, <http://qz.com/187743/the-slow-death-of-the-microwave/> (dostęp: styczeń 2016).

Lisińska-Kuśnierz M., Ucherek M., *Postęp techniczny w opakownictwie*, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Krakowie, 2003.

Łopacka J., Lipińska A., Rafalska U., Zmiany zachodzące w materiale opakowaniowym i w żywności w trakcie obróbki mikrofalowej, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2015, 96 (1), 77–83.

Melski K., *Opakowania do kuchenek mikrofalowych*, Packaging Polska, 2000, 3, 36–37.

Melski K., *Towaroznawcza ocena opakowań żywności stosowanych w technice mikrofalowej*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, 2012.

Przetaczek-Rożnowska, I., *Opakowania żywności do ogrzewania w kuchenkach mikrofalowych*, *Przemysł Spożywczy*, 2010, 64 (1), 40–43.

Robertson G.L., *Food Packaging. Principales and Practice*, wyd. 2, CRC Press, 271–284, 2006.

*Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej*, Główny Urząd Statystyczny, roczniki od 1998 do 2015, <http://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/>.

Rydz j., Sikorska W., Kyulavska M., Christova D., Polyester-Based (Bio)degradable Polymers as Environmentally Friendly Materials for Sustainable Development, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 564–596.

Self, A (red.), *Social Trends No 38*, 2008 Editon, 2008, Office for National Statistic, UK.

Swain, M.J., James, S.J., Swain, M.V.L., Effect of power output reduction of domestic microwave ovens after continuous (intermittent) use on food temperature after reheating, *Journal of Food Engineering*, 2008, 87, 11–15.

Van Loock, W., European regulations of the radio spectrum, ISM use and safety, *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 2001, 36 (4), 199–215.

TOMASZ KOŹLECKI<sup>1</sup>, KATARZYNA JAROS-KOŹLECKA<sup>2</sup>, JAROSŁAW SZAFRAN<sup>3</sup>,  
ARTUR MARCINIAK<sup>4</sup>, KARINA BARANOWSKA<sup>3</sup>, KAROLINA WOŁYNYEC<sup>4</sup>,  
MICHAŁ PIEGZA<sup>5</sup>, BARBARA ŻAROWSKA<sup>5</sup>, MAŁGORZATA ROBAK<sup>5</sup>

<sup>1</sup>*Politechnika Wrocławska*

*tomasz.kozlecki@pwr.wroc.pl*

<sup>2</sup>*TK Nano, Wrocław*

<sup>3</sup>*JK Packaging, Krotoszyn*

<sup>4</sup>*Solvadis Polska Sp. z o. o., Wrocław*

<sup>5</sup>*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

## ZASTOSOWANIE NANOCZĄSTEK SREBRA W FOLIACH SPOŻYWCZYCH

### Streszczenie

Folie z dodatkiem nanocząstek srebra (SNP) tworzą nową jakość w obrocie świeżą żywnością. Ich użycie nie tylko zapewnia czystość produktu, ale również pozwala wydłużyć czas przydatności do spożycia oraz ograniczyć straty finansowe wynikłe z psucia się towarów na skutek rozwoju mikroorganizmów. Zatem dzięki zastosowaniu folii z SNP w opakowanych produktach można liczyć na powstrzymanie wzrostu drobnoustrojów i psucia się żywności. Ostatecznie możemy zyskać czas, pieniądze oraz zapewnić szerszy rynek zbytu. Celem przeprowadzonych badań była ocena stopnia skuteczności dodatku SNP do folii spożywczych w hamowaniu wzrostu drobnoustrojów oraz określenie zawartości srebra ługującego się z folii.

Materiał badawczy stanowiła folia spożywcza przygotowana z SNP. Oceniano siedem wariantów folii, które przygotowano z dodatkiem SNP lub bez (folie kontrolne). Do polimeryzacji folii LDPE VII dodatkowo dodano 0,5% barwnika. Materiałem badawczym było też świeże mięso wieprzowe przechowywane w foliach w warunkach chłodniczych. W pracy oceniano przeciwdrobnoustrojową aktywność folii wobec: *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* oraz wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych w zapakowanym mięsie przechowywanym w warunkach chłodniczych przez cztery tygodnie.

W stosunku do folii kontrolnej (bez SNP) obserwowano znaczne (82-85%) zahamowanie wzrostu *S. aureus* w obecności folii wytłoczonej już przy najmniejszym stężeniu dodawanego roztworu SNP. Wzrost szczepu *E. coli* został nieznacznie zahamowany (13%) przy najwyższych stężeniach SNP. W analizie wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych z przechowywanych prób mięsa największą ich liczbę w 1g, świadczącą o najmniejszym działaniu ochronnym folii i SNP, wyznaczono dla mięsa opakowanego w folię LDPE IV. W pierwszym tygodniu mięso opakowane w poszczególne folie i przechowywane w warunkach chłodniczych nie wykazywało oznak zepsucia. W drugim tygodniu pojawił się zapach (folia LDPE VII) i wyciek oraz utrata koloru mięsa. W oparciu o uzyskane wyniki rozpoczęto testowanie innych polimerów opakowaniowych zawierających SNP i badania nad ustaleniem stężenia SNP hamującego wzrost drożdży oraz bakterii.

**Słowa kluczowe:** aktywność przeciwdrobnoustrojowa, folia spożywcza, nanocząstki srebra, SNP.

### Wprowadzenie

W dobie nowoczesnych technologii, w tym także tych dotyczących opakowań i ich roli w przechowywaniu żywności poszukiwanie możliwości wydłużenia trwałości skłania do wykorzystywania nietypowych materiałów, a za takie uznać można nanomateriały, struktury o jednym z wymiarów mieszczącym się w granicach 1-100 nm, czyli na poziomie zbliżonym do atomów i cząsteczek [Sionkowski i Kaczmarek, 2015]. Dzięki rozdrobnieniu cząstki w skali nano, np. metale szlachetne zyskują właściwości, istotnie różniące się od makrostruktur tego samego związku chemicznego. Jednym z możliwych do wykorzystania nanomateriałów jest srebro, metal, któremu już starożytności przypisywano właściwości lecznicze i biobójcze. Później zapomniane i dopiero rozwój nanotechnologii oraz możliwość syntetyzowania nanocząsteczek srebra ponownie zwróciły uwagę na możliwość jego zastosowania [Mroczek-Sosnowska i in., 2013]. Wodne roztwory zawierające nanocząstki srebra (Silver Nano Particles, SNP) uważane są za jedne z najskuteczniejszych środków dezynfekcyjnych [Wzorek i Konopka, 2007; Kruthyakow i in., 2008; Rai i in., 2009; Sharma i in., 2009; Chmielowska-Korzeniowska i in., 2013]. Ich zastosowanie powoduje likwidację ponad 90% bakterii i grzybów. SNP, jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy, z powodzeniem może być zastosowany do dezynfekcji powietrza, wody oraz różnego rodzaju powierzchni np. materiałów i ubrań stosowanych w medycynie, opakowań plastikowych [Tran i in., 2013]. Od kilku lat prowadzone są badania nad wprowadzeniem nanocząstek srebra do opakowań, w tym folii przeznaczonej do przechowywania żywności [Eschegoyen i Nevin, 2013; Metak i Ajaal, 2013]. Celem pracy była ocena stopnia skuteczności dodatku SNP w różnych stężeniach do folii spożywczych. Skuteczność tę oceniano poprzez ograniczenie wzrostu wybranych drobnoustrojów w obecności folii (hodowle płynne i stałe), zmian w wyglądzie mięsa zapakowanego w dane folie i wpływie na ogólną liczbę drobnoustrojów zawartą w opakowanym mięsie przechowywanym przez 4 tygodnie. W pracy badano także, w jakim stopniu srebro jest wymywane (ługowane) z folii.

### Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiła folia spożywcza przygotowana z nanocząstkami srebra. Jednowarstwowe folie, o grubości 80 µm przygotowano z polietylenu o małej gęstości LDPE (Malen E FABS 23-D022) wytłoczonego przy temperaturze masy tworzywa 180°C i stopniu rozdmuchu 1:2,5. Badano także oddziaływanie folii EVOH zawierającej żywice kopolimerową etylenu i alkoholu winylowego, otrzymaną. Oceniano 7 wariantów wyprodukowanej folii. Folie LDPE IV-VII oraz EVOH z Ag, które zostały przygotowane z 1-2% dodatkiem roztworów nanocząstek srebra o stężeniu od 1 do 10% oraz dwie folie kontrolne bez Ag EVOH i LDPE (tabela 1). Dodatkowo do polimeryzacji folii nr LDPE VII, o najwyższej zawartości SNP, dodano 0,5% barwnika AquaBlue w celu zamaskowania barwy wynikającej z dodatku SNP. Folie te wykorzystano do opakowania mięsa wieprzowego. Natomiast nanocząstki srebra (SNP) zostały otrzymane przez redukcję

azotanu srebra w roztworze wodnym, zawierającym surfaktant niejonowy i polimer stabilizujący; reduktorem był kwas askorbinowy [Koźlecki i in. 2011].

**Tabela 1.** Wykorzystane folie oraz wybrane parametry nanocząstek srebra (SNP)

| Folia          | Stężenie roztworu<br>SNP<br>[%] | Ilość roztworu<br>SNP dodana do<br>polimeryzacji<br>[%] | Stężenie SNP<br>w mieszaninie do<br>polimeryzacji<br>[mg%] |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| EVOH z Ag*     | 5                               | 1                                                       | 50                                                         |
| EVOH bez Ag    | 0                               | 0                                                       | 0                                                          |
| LDPE IV        | 1                               | 2                                                       | 20                                                         |
| LDPE V         | 5                               | 1                                                       | 50                                                         |
| LDPE VI        | 10                              | 1                                                       | 100                                                        |
| LDPE VII       | 10                              | 2                                                       | 200                                                        |
| LDPE Kontrolna | 0                               | 0                                                       | 0                                                          |

\* srebro jest tylko po jednej stronie folii i warstwa z SNP jest grubości maksymalnie 20 µm.

Kawałki mięsa pochodzącego bezpośrednio z uboju, zostało zapakowane i zgrzane w siedmiu różnych foliach: EVOH z Ag, EVOH bez Ag, LDPE z Ag o numerach IV, V, VI i VII (z niebieskim barwnikiem) oraz folii zwykłej, bez Ag (LDPE Kontrolna). Otrzymane próby były przechowywane w warunkach chłodniczych przez 2 tygodnie i poddawane ocenie makroskopowej co kilka dni. Po 2 tygodniach opakowania otwarto i pobrano mięso do badań mikrobiologicznych, czyli oznaczeniu ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych.

Przygotowanie materiału do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych polegało na odważeniu 5g mięsa z każdej próby i rozdrobnieniu w 45 mL soli fizjologicznej w aparacie Stomacher przez 15 minut. Z tak otrzymanej zawiesiny sporządzono szereg dziesiętnych rozcieńczeń. Do oznaczania liczby drobnoustrojów wykorzystano podłoże z agarem odżywcym i wykonano posiew wgłębny 1 mL z każdego rozcieńczenia. Po zestaleniu zaszczipione płytki inkubowano w 30°C przez 24-48 godzin i następnie obliczano ilość jednostek tworzących kolonie (jtk).

Aktywność przeciwdrobnoustrojową poszczególnych folii oceniano w hodowlach w podłożu płynnym i stałym. W płynnym oceniano efekt folii względem *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, szczepów pochodzących z Kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wzrost bakterii oceniano przez pomiar OD 600nm w podłożu Luria Bertanii (LB) i bulionie odżywcym (NB), odpowiednio dla *E. coli* i *S. aureus*. Do hodowli dodawano wycięte kwadraty folii o boku 1cm. W hodowlach na podłożu stałym aktywność przeciwdrobnoustrojową oceniano wobec trzech drobnoustrojów: *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus*. Badanie przeprowadzono na agarze odżywcym. Wyjściowo w masie agaru danej płytki (szczepienie wgłębne, 1mL inokulum) umieszczono następujące ilości komórek : *P. fluorescens*  $1,71 \times 10^9$ , *S. aureus*  $1,74 \times 10^9$  oraz *E. coli*  $4,1 \times 10^9$ . Po 6 godzinach na powierzchnię agaru wykładano 1cm<sup>2</sup> określonej folii. Po inkubacji

w temperaturze 30° C, przez 24 godziny od momentu wyłożenia folii, obserwowano wzrost bakterii.

W celu określenia zawartości srebra ługującego się do otoczenia, przygotowano roztwory wody demineralizowanej, w której umieszczono kawałki folii. Dla wszystkich próbek masa folii i wody była jednakowa. Próbkę były przechowywane w temperaturze pokojowej, a folia była usuwana z roztworów odpowiednio po 48 godzinach, po 14 i 21 dniach. W celu określenia zawartości srebra w poszczególnych roztworach wykonano pomiary ilościowe i jakościowe z wykorzystaniem spektrometru emisyjnego ze wzbudzeniem próbki w plazmie argonowej ICP (model ARL 3410). Roztwory zostały zakwaszone kwasem azotowym (J.T. Baker Instra-Analyzed Plus 9368) do 1% HNO<sub>3</sub>. Pomiary przeprowadzono przy długościach fali  $\alpha$ : 328.08 nm (DL 0.002 mg/L) oraz 338.30 nm (DL 0.003 mg/L).

### Wyniki

Opakowane mięso nie wykazywało żadnych oznak zepsucia w ciągu pierwszego tygodnia od uboju. Po upływie tego czasu w niektórych próbach pojawił się zapach (folia LDPE VII i LDPE kontrola), a zewnętrznie obserwowano pojawienie się wycieku (lekko zielonego koloru) i oznaki utraty koloru przez fragmenty mięsa. Najwyraźniej takie zachowanie zaobserwowano dla próby mięsa opakowanego w folie LDPE VII, IV i V oraz LDPE kontrolną (rys.1).



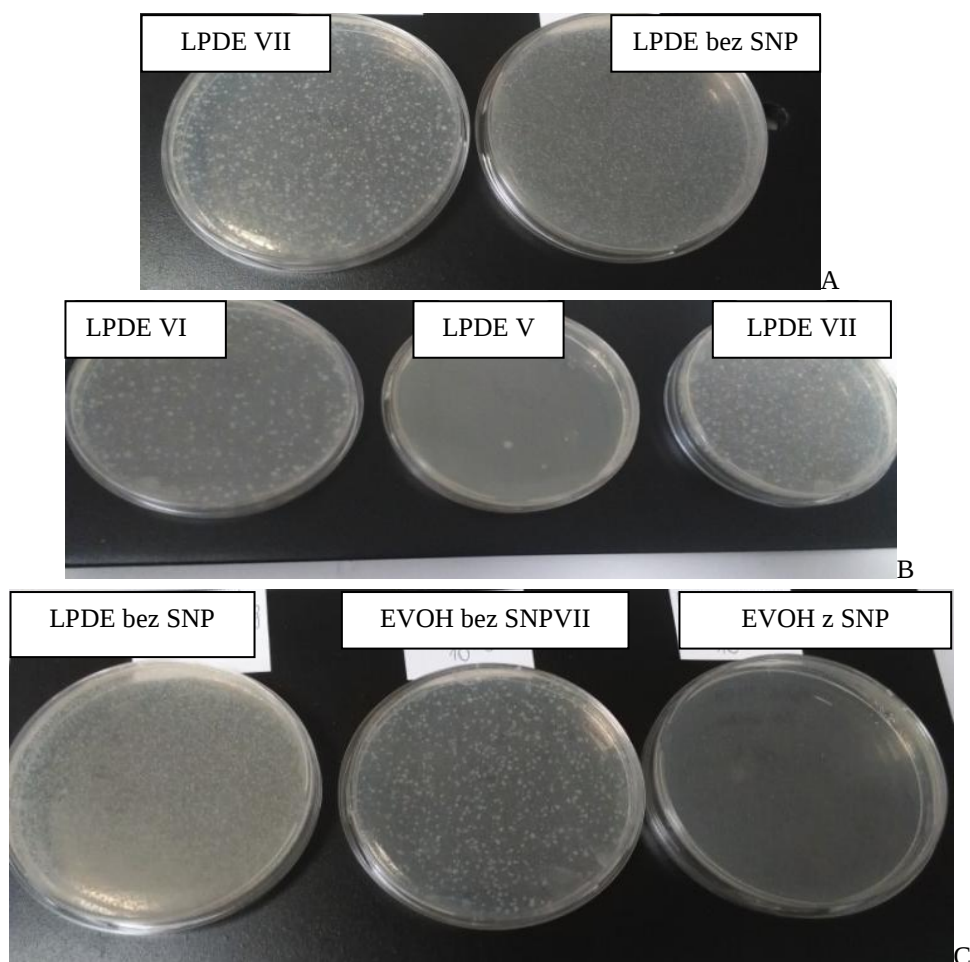
**Rysunek 1.** Próby mięsa opakowanego w folie, po dwóch tygodniach przechowywania

Przygotowując próbki do badań na zawartość ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych zaobserwowano, że w trakcie rozdrobnienia mięsa w homogenizatorze znaczne zmiękczenie próbek pochodzących z opakowania w folie EVOH (z Ag i bez Ag). Objawiało się to większym i szybszym procesem rozdrabniania w stosunku do folii opartych na LDPE. Natomiast największą liczbę jtk w 1g mięsa, świadczącą o największym rozwoju drobnoustrojów w przechowywanych próbach wyznaczono dla mięsa opakowanego w folię LDPE IV o najniższej zawartości SNP (tab. 2). Liczba drobnoustrojów obecna w 1g mięsa przechowywanego w tej folii była ponad 10-100 krotnie wyższa niż dla większości pozostałych prób, w tym kontrolnych. Najmniejszy wzrost drobnoustrojów w przechowywanym mięsie wykazano w mięsie z foli LDPE V. Ilość jtk/g mięsa była 10 razy mniejsza niż dla próby kontrolnej mięsa opakowanego w folię zwykłą (LPDE bez Ag) i prób mięsa przechowywanych w foliach EVOH (z Ag i bez Ag). Natomiast liczba drobnoustrojów w mięsie zapakowanym w folię o największej zawartości nanocząstek srebra (LPDE VII) z dodatkiem barwnika była wyższa niż w mięsie zapakowanym w folię kontrolną, czy o mniejszej zawartości SNP.

**Tabela 2.** Zawartość ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych wyznaczona jako uśredniona liczba jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1g mięsa po okresie przechowywania

| Próba mięsa przechowywana w | Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych<br>[jtk / 1g mięsa] |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------|
| EVOH bez AG                 | $3,9 \times 10^6$                                            |
| EVOH z Ag                   | $4,4 \times 10^6$                                            |
| LPDE IV                     | $475,7 \times 10^6$                                          |
| LPDE V                      | $0,27 \times 10^6$                                           |
| LPDE VI                     | $20,6 \times 10^6$                                           |
| LPDE VII                    | $10,3 \times 10^6$                                           |
| LPDE bez Ag                 | $3,9 \times 10^6$                                            |

W celu pełniejszego zobrazowania różnic w przyroście mikroorganizmów w mięsie zapakowanym w poszczególne folie porównano gęstości wzrostu drobnoustrojów z tego samego rozcieńczenia po 24 godzinach inkubacji. Przykład takiego porównania jest seria płytek Petriego (rys.2) z hodowli zaszczipionych 1 mL ( $10^{-3}$ ) zawiesiny komórek. Jak można zauważyć na płytce z próbą mięsa z LPDE V jest najmniejszy wzrost, a na płytce z folią zwykłą (LPDE bez SNP) jest on największy (rys. 2 A i B). Ciekawie wygląda także porównanie wzrostu drobnoustrojów z prób mięsa z foli EVOH i foli zwykłej, LPDE bez SNP (rys.2, C). Folia EVOH, w większości przypadków, lepiej zabezpieczyła mięso przed drobnoustrojami niż folia zwykła. Przy tym samym rozcieńczeniu próby ( $10^3$ ) największy wzrost obserwowano dla mięsa zapakowanego w folię LPDE bez SNP, EVOH bez SNP, a najmniejszy w przypadku foli EVOH z SNP.



**Rysunek 2.** Wzrostu drobnoustrojów na płytkach Petriego: rozcieńczenie  $10^{-3}$ , agar odżywczy

W stosunku do folii kontrolnej (bez SNP) obserwowano znaczne (82-85%) zahamowanie wzrostu *S. aureus* w obecności folii wytłoczonej już przy najmniejszym stężeniu dodawanego roztworu SNP. Wzrost szczepu *E. coli* został nieznacznie zahamowany (13%) przy najwyższych stężeniach SNP.

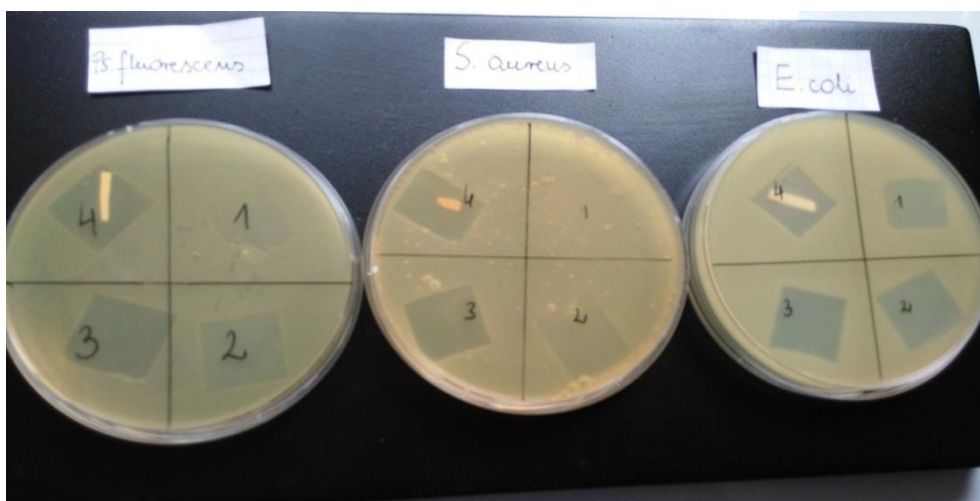
Oddziaływania SNP w foliach na wzrost trzech gatunków drobnoustrojów przeprowadzono w hodowlach płynnych i stałych. Po inkubacji w temperaturze  $30^{\circ}\text{C}$  przez 24 godziny (od momentu wyłożenia folii) obserwowano brak wzrostu *P. fluorescens*, *S. aureus* oraz *E. coli*, szczególnie w agarze przykrytym foliami EVOH (Rys. 3). Na płytce kontrolnej obserwowano jednolity wzrost drobnoustrojów w całej objętości agaru.



**Rysunek 3.** Wzrost bakterii w obecności foli LPDE bez nanocząstek srebra (1), folia LPDE V z nanocząstkami srebra (2), foli EVOH bez nanocząstek srebra (3), folia EVOH z nanocząstkami srebra po jednej stronie (4)

Obraz z 24 godzinnej inkubacji

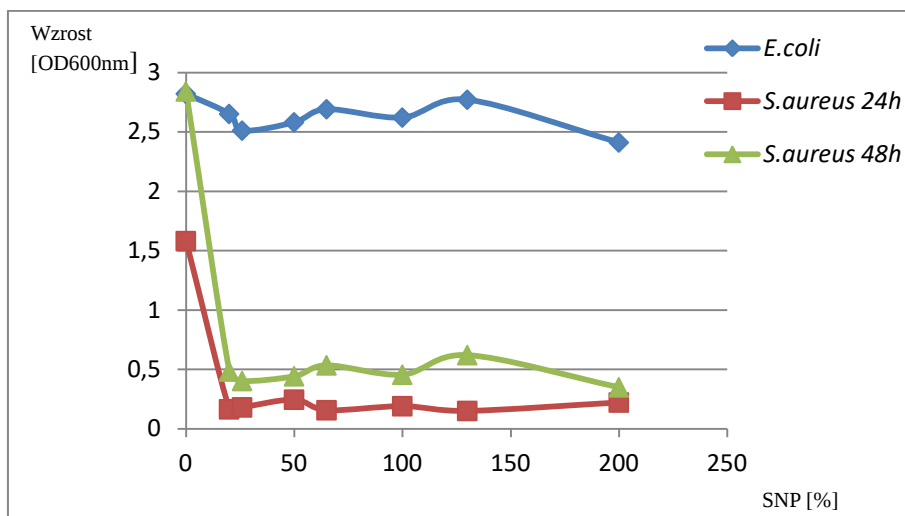
Po 48 godzinach inkubacji, wykazano hamowanie wzrostu bakterii *P. fluorescens* oraz *S. aureus* przez folie LPDE V, folie EVOH bez nanocząstek srebra oraz folie EVOH z nanocząstkami srebra po jednej stronie (rys. 4). Najmniejszy wzrost bakterii obserwowano dla foli EVOH z nanocząstkami srebra po stronie przylegającej do agaru, czyli najlepsze hamowanie rozwoju bakterii.



**Rysunek 4.** Wzrost bakterii w obecności foli zwykłej bez nanocząstek srebra (1), foli z nanocząstkami srebra (2), foli EVOH bez nanocząstek srebra (3), Folie EVOH z nanocząstkami srebra po jednej stronie (4)

Obraz z 48 godzinnej inkubacji

W przypadku *E.coli* potwierdzono wcześniej obserwowane nieznaczne zahamowanie wzrostu niezależnie od typu folii; nawet dla folii kontrolnej, LPDE bez SNP. Zatem testem powierzchniowym nie można wykazać czy nanosrebro działa na bakterie *E.coli*. Natomiast w hodowli płynnej udało się wyznaczyć zależność zawartości SNP i inhibicji wzrostu (pomiar OD 600nm). Dla *S. aureus* obserwowano znaczącą inhibicję wzrostu, a dla *E.coli* tylko nieznaczną (rys. 5). Komórki *E.coli* były zdecydowanie mniej wrażliwe na SNP.



**Rysunek 5.** Przeciwdrobnoustrojowa aktywność w zależności od zawartości SNP w mieszaninie do polimeryzacji folii

Hodowla płynna z dodatkiem 1cm<sup>2</sup> określonej folii LPDE, przez 24 i 48 godzin, w 30°C

W badaniach wykazano, że srebro nie dyfundowało z folii do otoczenia. Nie wykryto sygnału srebra w roztworach wody demineralizowanej, w której przechowywano folie przez 21 dni w temperaturze pokojowej. Mimo to wiadomo, że wykazana aktywność przeciwdrobnoustrojowa, szczególnie wobec *S. aureus* w obecności foliach zawierających nanocząsteczki srebra, była możliwa ze względu na nieznaczną dyfuzję nanosrebra do podłoża.

## Dyskusja

Song i in. [2011] prowadząc badania nad migracją nanocząstek srebra z kompozytu polietylenowego w różnej temperaturze (20, 30 i 70°C) i stosując stosowne substytuty żywności (3% kwas octowy i 95% etanol), wykazali że 3-5,6% nanocząstek srebra uwalnia się do roztworu kwasu i zaledwie 0,22-0,24% do roztworu alkoholu. Zatem zakładając, że uwalnia się maksymalnie 6% dodanych SNP, to z Foli LPDE VII (o najwyższej zawartości SNP), ilość uwolnionych nanocząstek srebra mogła maksymalnie wynosić 0,96 µg. Wg Li i in. [2010] nanocząstki srebra dopiero w stężeniu 10 µg/mL hamują wzrost *E.coli*, a wg Rai i in. [2009] dopiero w stężeniu 75 µg/mL. Yoon i in. [2007] obserwowali 90% zahamowania wzrostu *E. coli* przy stężeniu nanocząstek srebra wynoszącym 58,41 µg/mL, czyli ponad 50 razy wyższym niż potencjalne maksymalne stężenie

nanocząstek srebra dyfundujących do podłoża z badanych folii. Zatem otrzymane wyniki są zgodne z wynikami otrzymanymi przez wyżej wymienionych badaczy, bowiem do podłoża nie mogła przeniknąć większa ilość nanocząstek srebra.

W światowej literaturze istnieją doniesienia dotyczące wątpliwości czy nanocząstki srebra są toksyczne i czy dyfunduje między innymi z opakowań przygotowanych z ich udziałem [Song i in., 2011; Eschegoyen i Nerin, 2013; Matak i Ajaal, 2013; Roy i in., 2013;]. Ważnym elementem było wykazanie, że limit detekcji srebra w zamiennikach żywności (etanol, kwas octowy) wynosi 0,04 ng/mL, czyli 0,04 mg/L [2011]. Natomiast wyniki dotyczące ilości uwalnianego z opakowań srebra nie są tak jednoznaczne. Wg Eschegoyen i Nerin [2013] nanocząstki srebra uwalniane były w ilości od 1,66 do 31,5 ng/cm<sup>2</sup>, odpowiednio z folii o zawartości SNP od 20 do 390 µg/cm<sup>2</sup>. Uwolnione ilości SNP stanowiły zatem jedynie około 0,008% SNP zawartych w foliach, czyli zdecydowanie mniej niż wykazali w swoich badaniach Song i in. [2011]. Komisja Europejska (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks-SCENIHR), określiła dopuszczalny limit migracji srebra do żywności, z materiałów opakowaniowych to 0.05 mg/kg żywności [Saber i in., 2014].

W badaniach nad zastosowaniem opakowań z nanocząstkami srebra Metak i Ajaal [2013] wykazali pozytywny efekt dodatku SNP do opakowań. Przedstawili zahamowanie rozwoju pleśni na powierzchni zapakowanej marchwi. Podobny efekt uzyskano w tej pracy. Folia z dodatkiem nanocząstek srebra nie tylko hamowała wzrost *P.fluorescens* i *S.aureus*, ale chroniła zapakowane mięso przed nadmiernym rozwojem drobnoustrojów mezofilnych. Przy czym nie obserwowano ścisłej zależności pomiędzy stężeniem SNP a liczbą jtk/g mięsa. Natomiast obserwowane większe zmiękczenie mięsa opakowanego w folie EVOH może być spowodowane mniejszą wymianą gazową, która się charakteryzuje ten typ folii [Kluz A., 2007]. Jednocześnie wyjaśnienia wymaga 2-10 krotnie słabszy efekt przeciw drobnoustrojowy folii o największej zawartości nanocząstek srebra - do której jednocześnie dodano barwnik – LPDE VII w stosunku do folii o mniejszej zawartości SNP.

W podłożu płynnym wzrost bakterii monitorowano poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli (OD 600nm), czyli zmętnienia będącego wynikiem przyrostu liczby komórek. Pomiar OD 600nm jest najszybszą i najprostsza metodą pomiaru przyrostu drobnoustrojów, wykorzystywaną w mikroanalizatorach [Grabarczyk i in., 2013]. Niektórzy badacze wyznaczyli nawet zależność pomiędzy wartością OD 600nm a liczbą komórek. Wg Sondi i Salopek-Sondi [2004] OD 600nm równe 0,1 odpowiada stężeniu komórek 108/mL. Zastosowana technika analityczna -hodowla w podłożu płynnym-umożliwiła prawidłową ocenę wzrostu bakterii i właściwości anty-drobnoustrojowych danej folii. Gatunek *E.coli* jest reprezentantem bakterii G-ujemnych. Podobny wynik otrzymali Becano in. [2015], którzy również wykazali lepszą aktywność bójczą wobec *S. aureus*. Yoon i in. [2007] zaobserwowali większą inhibicję wzrostu *Bacillus subtilis* (Gram-dodatniego gatunku) niż *E.coli*. Niektórzy badacze uzyskali odmienne wyniki, wykazując hamowanie zarówno wobec bakterii G-dodatnich jak i G-ujemnych lub nawet większe działanie wobec tych drugich [Sondi i Salopek-Sondi 2004; Li in., 2010]. Niezgodność otrzymanych wyników może być wynikiem wielu czynników, poczynając od natury szczepu, zastosowanej technice, medium hodowlanym czy nawet ograniczeniem dostępu do składników odżywczych. W wielu przypadkach kluczowe jest wykonania stosownej

kontroli, opartej na folii bez dodatku NSP. Oddziaływanie jonów srebra zawartych w nanocząsteczkach między innymi polega na ich wnikięciu do komórki i zaburzeniu procesów metabolicznych. Zróżnicowany stopień hamowania wzrostu może wynikać z różnic w budowie ściany komórkowej bakterii G-dodatnich i G-ujemnych. Wielu autorów również podkreśla odmienną budowę ściany bakteryjnej starając się wykazać miejsce działania SNP. Sondi i Salopek-Sondi [Sondi i Salopek-Sondi 2004] przedstawiają mikroskopowe zdjęcia komórek *E.coli* z przyłączonymi nanocząsteczkami srebra. Pal i in. [2007] wskazują na zależność pomiędzy kształtem nanocząstek, a stopniem uszkodzenia błony. Stwierdzają, że nanocząstki w kształcie trójkątnym są najbardziej toksyczne.

### Wnioski

- Najlepiej przechowało się mięso opakowane w folie EVOH i LPDE V z nanocząstkami srebra.
- Najmniejszą ogólną liczbę drobnoustrojów mezofilnych obecną w próbach mięsa po wykazano opakowanego w folie LPDE V zawierającą nanocząstki srebra.
- Najintensywniejszą inhibicją wzrostu bakterii z gatunku *Pseudomonas fluorescens* cechowała się folia EVOH z nanocząstkami srebra, potem EVOH, następnie folia z nanocząstkami srebra, oznaczona przez producenta jako folia LPDE V.
- Najintensywniejszą inhibicją wzrostu bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus* cechowała się folia EVOH z nanocząstkami srebra, potem EVOH. Mniej intensywnie hamowała wzrost folia z nanocząstkami srebra, oznaczona przez producenta jako folia LPDE V.
- W przypadku bakterii z gatunku *Escherichia coli* zahamowanie wzrostu bakterii zaobserwowano dla wszystkich folii, w tym folii kontrolnej. Zatem nie można ocenić czy badane folie działają, hamują wzrost tego gatunku bakterii.
- Nie wykazano ługowania srebra z folii.
- Przeprowadzone badania pozwoliły na uzasadniony optymizm w stosunku do stosowania nanocząstek srebra, jako dodatków do produkcji folii na potrzeby pakowania produktów spożywczych. Udowodniono, że niewymagane jest wysokie stężenie nanosrebra, a wręcz wskazany jest ich minimalny udział, nie tylko skutkujący lepszym działaniem, ale także tańszym kosztem.

### Literatura

Becano A.A., Puti F.C., Correa D.S., Paris E.C., Marconcini J.M., Ferreira M.D., Polyethylene films containing silver nanoparticles for applications in food packaging: characterization of physicochemical and anti-microbial properties. *Journal of Nanosciences and Nanotechnology*, 2015, 15, 2148-2156.

Chmielowiec-Korzeniowska A., Krzosek Ł., Tymczyna L., Pyrz M., Drabik A., Bactericidal, fungicidal and virucidal properties of nanosilver. Mode of action and potential application. A review. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin - Polonia, Sectio EE XXXI* (2), 2013, 1–11.

Echegoyen Y., Nerin C., Nanoparticle release from-nano-silver antimicrobial food containers. Food and Chemical Toxicology 2013, 62, 16-22

Grabarczyk M., Mączka W., Winska K., Żarowska B., Anioł M., Antimicrobial activity of hydroxylactone obtained by biotransformation of bromo-and iodolactone with gem-dimethylcyclohexane ring. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2013, 24 (12), 1913-1922.

Kluz A., Kopolimer etylenu i alkoholu winylowego EVOH : charakterystyka i zastosowania. Zeszyty Naukowe Politechniki Poznańskiej. Budowa Maszyn i Zarządzanie Produkcją. 2007, 4, 129-136.

Koźlecki T., Teterycz H., Sokołowski A., Polowczyk I., Sawiński W., Maliszewska I., Szydło J., Sposób syntezowania nanocząstek srebra. Zgłoszenie patentowe. nr P 395979 z 16.08.2011.

Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A., Olenin A.Y., Lisichkin G.V., Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. Russisan Chememical Review, 2008, 77 (3), 233–257.

Li W-R., Xie X-B., Shi Q-S., Zeng H-Y., OU-Yang Y-S., Chen Y-B., Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. Applied of Microbiological Biotechnology 2010, 85, 1115-1122.

Metak A. M., Ajaal T.T., Investigation on Polymer Based Nano-Silver as Food Packaging Materials, International Scholarly and Scientific Research & Innovation, 2013, 7 (12), 772-778.

Mroczek-Sosnowska N., Jaworski S., Siennicka A., Gondek A., Unikalne właściwości nanocząstek srebra. Polskie Drobiarstwo, 2013, 6-8.

Pal S., Tak Y.K., Song J.M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 (6), 1712–1720.

Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances, 2009, 27, 76-83.

Roy N., Gaur A., Jain A., Bhattacharya S., Rani V., Green synthesis of silver nanoparticles: an approach to overcome toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013, 36, 807-812.

Saber A.T., Mikkelsen S.H., Lam H.R., Hougaard K.S., Larsen P.B., Christensen F., Vogel U., Hazard assessment of nanomaterials in consumer products. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR)-Environmental project No. 1637, 2015, Wyd. The Danish Environmental Protection Agency, Kopenhaga, 2015.

Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y., Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. Advances in Colloid and Interface Science, 2009, 145 (1-2), 83-96.

Sionkowski G., Kaczmarek H., Polimery z nanocząsteczkami srebra-wybrane układy – otrzymywanie, właściwości, zastosowania. *Polimery* 2010, 55, 7-8.

Sondi I., Salopek-Sondi B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Sciences*, 2004, 275, 177-182.

Song H., Li B., Wu H-J., Chen Y., Migration of silver from nanosilver-polyethylene composite packaging into food stimulants. *Food Additives and Contaminants*, 2011, 28 (12), 1758-1762.

Tran Q.H., Nguyen V.Q., Le A-T., Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv.Nat.Sci.: Nanoscience and Nanotechnology*, 2013, 4, 033001 (20 p); doi:10.1088/2043-6262/4/3/033001.

Wzorek Z., Konopka M., Nanosrebro – nowy środek bakteriobójczy. *Czasopismo Techniczne Chemia*, 2007, 1, 175–181.

Yoon K.Y., Byeon J.H., Park J.H., Hwang J., Susceptibility constraints of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 2007, 373, 572-575.

BARBARA ŻAROWSKA<sup>1</sup>, MICHAŁ PIEGZA<sup>1</sup>, KATARZYNA JAROS-KOŹLECKA<sup>2</sup>,  
TOMASZ KOŹLECKI<sup>3</sup>, MAŁGORZATA ROBAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

malgorzata.robak@up.wroc.pl

<sup>2</sup>TK Nano, Wrocław

<sup>3</sup>Politechnika Wrocławska

## NANOCZĄSTKI SREBRA (SNP) A HAMOWANIE WZROSTU MIKROORGANIZMÓW

### Streszczenie

Nanocząstki srebra (SNP) posiadają potwierdzone działania antybiotyczne. Nie ma natomiast pewności, co do minimalnego stężenia SNP, które skutecznie hamuje wzrost mikroorganizmów. Otrzymano zawiesinę SNP o stężeniu 107mg/L i scharakteryzowano wielkość nanocząstek. Z wykorzystaniem analizatora wzrostu drobnoustrojów Bioscreen C przeprowadzono badanie wzrostu wybranych szczepów bakterii i drożdży w obecności różnych stężeń SNP. Pozwoliło to na ustalenie minimalnego, hamującego wzrost stężenia SNP następujących wzorcowych szczepów drobnoustrojów: *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcusaureus* (o białej lub żółtej barwie kolonii) oraz *Candida albicans*. Do hodowli drożdży *C.albicans* wykorzystano odpowiednio stężone podłoże YM, bakterie *P. aeruginosa* i *S. aureus* hodowano natomiast w bulionie odżywczym. Do podłoża dodawano od 10 do 60 µl roztworu SNP o stężeniu 107 mg/L (ppm). Najwyższą wrażliwością na działanie cząstek nanosrebra cechowały się komórki bakterii *P. aeruginosa*, których wzrost całkowicie hamowany był już przy stężeniu 8,92 mg/L SNP. Nieco bardziej odporne na działanie tych cząstek okazały się drożdże *C. albicans* oraz bakterie *S. ureus*, w przypadku, których obserwowano długą, trwającą 32-40 godz. lag-fazę, po której mikroorganizmy rozpoczynały powolny wzrost.

**Słowa kluczowe:** nanocząstki srebra, SNP, aktywność przeciwdrobnoustrojowa, Bioscreen C

### Wprowadzenie

Nanotechnologia stanowi silnie rozwijającą się dziedzinę nauki, zmierzającą do maksymalnego, bezpiecznego zarówno dla człowieka jak i otaczającego go środowiska, wykorzystania nanocząstek metali o rozmiarach jednego z wymiarów nieprzekraczającego do 100 nm w bezpośrednim kontakcie, w szerokiej gamie produktów [Sionkowski i Kaczmarek, 2015]. Uznaje się, że nano struktury mogą znaleźć szerokie zastosowanie w takich dziedzinach jak medycyna, kosmetologia, odnawialne źródła energii, oczyszczanie środowiska i wielu innych [Tran i in., 2013]. Na szczególną uwagę zasługują nanocząstki srebra (SNP), dla których potwierdzono szerokie spectrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, szczególnie w kierunku bakterii zarówno Gram dodatnich jak i Gram ujemnych [Yoon i in., 2007; Jones i Hoek, 2010]. Mechanizm biobójczego oddziaływania SNP nie jest do końca wyjaśniony, jednakże najprawdopodobniej opiera się

ono na trzystopniowym procesie. Najpierw nanocząstki przyłączają się do powierzchni błony komórkowej naruszając jej podstawowe funkcje, takie jak półprzepuszczalność i oddychanie. Kolejnym etapem jest przeniknięcie do wnętrza komórki i kolejne uszkodzanie struktur wewnętrznych, głównie poprzez interakcje z siarką i fosforem. Ostatecznie nanocząstki wydzielają wolne jony srebra podkreślając efekt bójczy [Morones i in., 2005; Tran i in., 2013]. W prezentowanych badaniach skupiono się na wykazaniu minimalnego stężenia hamującego wzrost czterech wzorcowych szczepów drobnoustrojów: drożdży *Candida albicans* oraz bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (dwa szczepy różniące się barwą kolonii: biały i żółty) w mikrohodowlach prowadzonych w aparacie mikrobiologicznym Bioscreen C.

### Materialy i metody

Nanocząstki srebra (SNP) zostały zsyntezowane poprzez redukcję soli srebra w roztworze wodnym, zawierającym niejonowy związek powierzchniowo czynny (NZPC) i polimer pomocniczy (PEI). Reduktorem był wodny roztwór kwasu askorbinowego [Koźlecki i in., 2011]. W wyniku reakcji otrzymywano dyspersję o stężeniu 107 mg Ag/L roztworu (107 ppm). Nanocząstki zostały scharakteryzowane technikami TEM, DLS i UV-Vis.

Zdjęcia obrazujące nanocząstki wykonano metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) z wykorzystaniem urządzenia Zeiss EM 900. Próbkę nanoszono na siateczki niklowe 300 mesh, pokryte żywicą Formvar (SPI Supplies). Obserwacje standardowo prowadzono przy powiększeniu 86000×.

Pomiary techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) przeprowadzono na dwóch urządzeniach: Nicomp 380ZLS (ParticleSizing Systems), wyposażony w laser 532 nm/50 mW i 64-kanałowy autokorelator oraz aparacie PhotocorComplex (Photocor Instruments) z laserem 657.04 nm/36 mW i 288-kanałowym autokorelatorem, pracującym w trybie multi-tau. W przypadku urządzenia Nicomp pomiary prowadzono w standardowych kuwetach z czterema przejrzystymi ścianami, wykonanymi z PMMA (Kartell); kąt rozpraszania promieni wynosił 90°. Analiza wyników uzyskanych tą metodą przeprowadzona została przy pomocy oprogramowania ZPW388 1.71 (ParticleSizing Systems). W przypadku urządzenia Photocor, pomiary wykonywane były w cylindrycznych buteleczkach o średnicy 14.5 mm (Supelco); kąt rozpraszania promieni wynosił 110°, a analizę wyników przeprowadzono przy pomocy oprogramowania DynaLS 2.8.3 (Alango Ltd.). Pomiary spektrofotometryczne UV-Vis wykonano przy pomocy jednowiązkowego aparatu Helios γ (ThermoElectronCorporation), w kuwetach półmikro o drodze optycznej 10 mm, wykonanych z polistyrenu (Carl Roth GmbH).

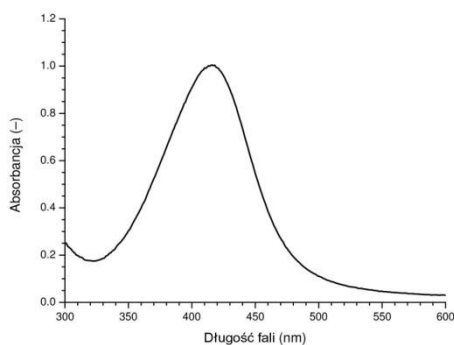
SNP o stężeniu 107 mg/L, dodawano do hodowli drobnoustrojów w ilości od 10-60 µL. W badaniach wykorzystano jeden szczep drożdży z gatunku *Candida albicans* oraz trzy szczepy bakterii: jeden z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* i dwa z gatunku *Staphylococcus aureus*. Wszystkie szczepy pochodziły z niemieckiej kolekcji kultur DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Leibniz-Institute) Mikrohodowle prowadzono w 4 powtórzeniach, w podłożu YM dla drożdży oraz bulionie odżywczym dla bakterii, komplementowanych zmiennym stężeniem roztworu SNP. Całkowita objętość płynu hodowlanego w mikrostudzienkach wynosiła 300 µL, a końcowe

stężenie dodawanych SNP wynosiło od 0 (kontrola) do 21,4 mg/L (maksymalnego stężenie). Hodowle zaszczepiano zawiesiną komórek (w objętości 20  $\mu$ L) wystandaryzowaną do stężenia  $10^8$  komórek/mL i inkubowano w analizatorze Bioscreen C, w temperaturze 28°C, przez 72 godziny stosując automatyczne wytrząsanie i pomiar zmian gęstości optycznej co 30 minut, przy długości fali światła widzialnego 560-600nm.

Po hodowli zawartość mikrostudzienek dotyczącą danego stężenia SNP i danego drobnoustroju, zebrano do sterylnej probówki typu Falconi badano na obecność nanosrebra. W celu usunięcia zanieczyszczeń, które mogłyby zakłócić pomiar DLS próbki oczyszczono przy pomocy wirowania i filtracji wirówkowej z wykorzystaniem filtrów hydrofilowych o porowatości 0.2  $\mu$ m, zapewniającej swobodny przepływ nanocząstek i niewielkich aglomeratów i stanowiących barierę dla biomasy pozostałej po wstępnym oczyszczaniu, przez wirowanie. Próbki po pomiarach w urządzeniu Bioscreen C przygotowywano według przedstawionej poniżej procedury. Około 1 ml próbki wirowano przez 10 minut z przyspieszeniem 2000 g, przy pomocy wirówki Spectrafuge™ Mini Centrifuge (Labnet International). Po odwirowaniu, pobierano 700  $\mu$ l supernatantu i przenoszono do filtra wirówkowego Costar® Spin-X z membraną poliamidową 0.2  $\mu$ m (Corning Inc.), po czym odwirowywano w analogiczny sposób. Następnie pobierano 500  $\mu$ l permeatu i rozcieńczano przy pomocy 1000  $\mu$ l wody dejonizowanej. Tak przygotowane próbki wykorzystywano do pomiarów UV-Vis, a następnie DLS wg procedury opisanej wyżej.

## Wyniki

Na rysunku 1 przedstawiono przykładowe widmo UV-Vis wodnej dyspersji nanocząstek srebra (SNP). Najbardziej charakterystyczną cechą widma jest szeroki pik o maksimum absorpcji około 416 nm, charakterystyczny dla rezonansu plazmonowego SNP.



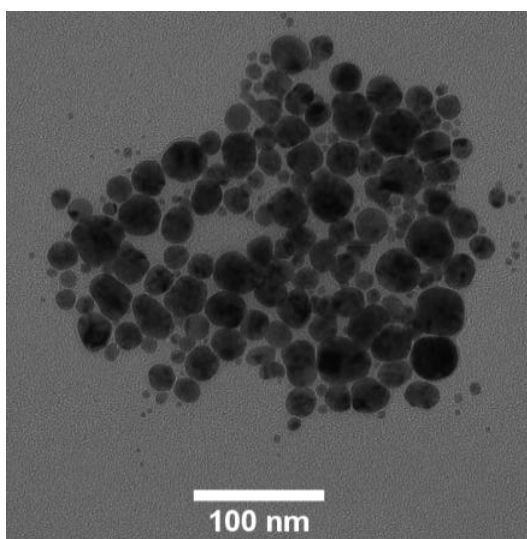
**Rysunek 1.** Widmo UV-Vis wodnej dyspersji nanocząstek srebra o stężeniu 10 ppm

Zjawisko to jest odpowiedzialne za żółtą barwę sferycznych nanocząstek srebra, która zobrazowano na rys. 2 i stanowi niekiedy problem w zastosowaniach praktycznych, na przykład w przemyśle farbiarskim lub kosmetycznym. Nie wydaje się jednak, żeby żółta barwa stanowiła jakąkolwiek przeszkodę w przemyśle spożywczym.



**Rysunek 2.** Dyspersja wodna nanocząstek srebra o stężeniu 27 ppm

Obecność sferycznych nanocząstek srebra potwierdzono przy pomocy pomiarów mikroskopowych. Reprezentatywne zdjęcie TEM przedstawiono na rysunku 3.

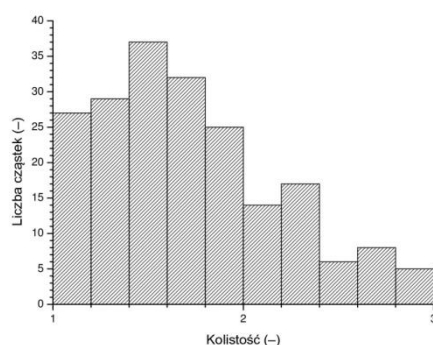


**Rysunek 3.** Obraz nanocząstek srebra wykonany metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)

Jak można zauważyć, kształt cząstek srebra jest zbliżony do sferycznego. Analiza obrazowa wykonana dla populacji 200 nanocząstek wykazała natomiast, że średnia sferyczność jest równa  $1.72 \pm 0.49$ , natomiast mediana ma wartość 1.70 (Rys.4), co oznacza że faktycznie cząstki mają kształt eliptyczny. Kolistość cząstek wyrażana była wzorem:

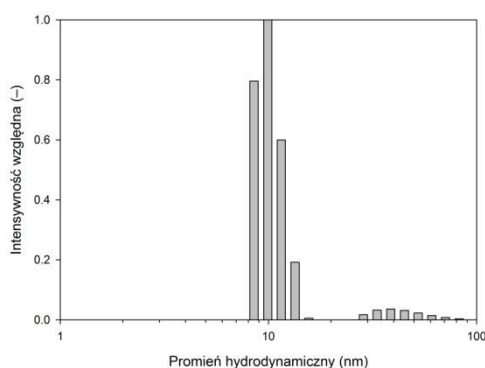
$$R = \frac{L^2}{4\pi A}$$

gdzie: R – kolistość, L – obwód cząstki, A – pole powierzchni cząstki.



**Rysunek 4.** Histogram rozkładu kulistości cząstek nanosrebra

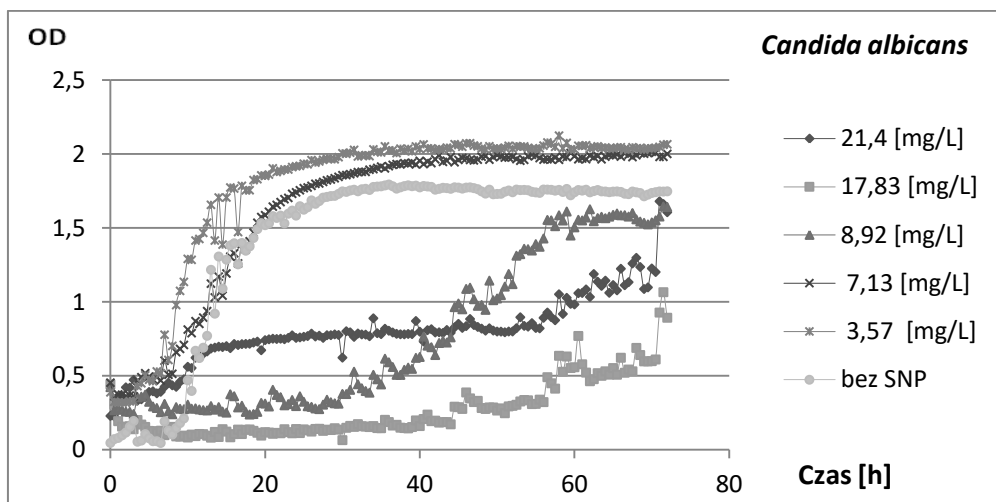
W pomiarach techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) uzyskano wyniki zbliżone. Na rysunku 5 przedstawiono wynik pomiarów dla cząstek zobrazowanych na rysunku 3. Dane uzyskane obydwoma metodami są porównywalne. Wynika z nich, że zsyntezowane nanocząstki mają promień hydrodynamiczny równy  $11.83 \pm 2.98$  nm (mediana rozmiaru  $\pm$  odchylenie standardowe). Próbkę zawiera też około 5% aglomeratów o rozmiarze około 100 nm.



**Rysunek 5.** Analiza użytych w eksperymencie nanocząstek srebra techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS)

Scharakteryzowane powyżej SNP w wyjściowym stężeniu 107 mg Ag/L wykorzystano w badaniach dotyczących określenia ich wpływu na wzrost drobnoustrojów w analizatorze mikrobiologicznym Bioscreen C. Badaniom poddano dwa izolaty bakterii z gatunku *S. aureus*, jeden szczep *P. aeruginosa* oraz jeden szczep drożdży *C. albicans*. Hodowle prowadzono w podłożu płynnym, odpowiednio bulionie odżywczym i YM. Analizując wpływ nanocząstek srebra na wzrost drożdży stwierdzono, że szczep *C. albicans* dobrze rósł w podłożu zawierającym 3,57 i 7,13 mg/mL SNP (Rys.6). Wyższe stężenie SNP, wynoszące 8,92 mg/L, wykazywało hamujące działanie na wzrost tych drożdży, jednakże tylko do 32 godziny hodowli. Po tym czasie komórki rozpoczynały wzrost. Całkowitą inhibicję wzrostu obserwowano przy stężeniach nanocząstek srebra, przekraczających

17 mg/L. Stężenie 8,92 mg/L powodowało całkowitą inhibicję wzrostu bakterii *P. aeruginosa* i znaczne wydłużenie czasu trwania lag fazy w hodowlach obu testowanych szczepów *S. aureus*. W obecności takiej dawki nanocząstek srebra w środowisku hodowlanym rozpoczynały one wzrost dopiero po 36-40 godzinie hodowli, a ich całkowitą inhibicję wzrostu, podobnie jak w przypadku badanych drożdży, obserwowano dopiero w obecności wyższych stężeń SNP (Rys. 7).

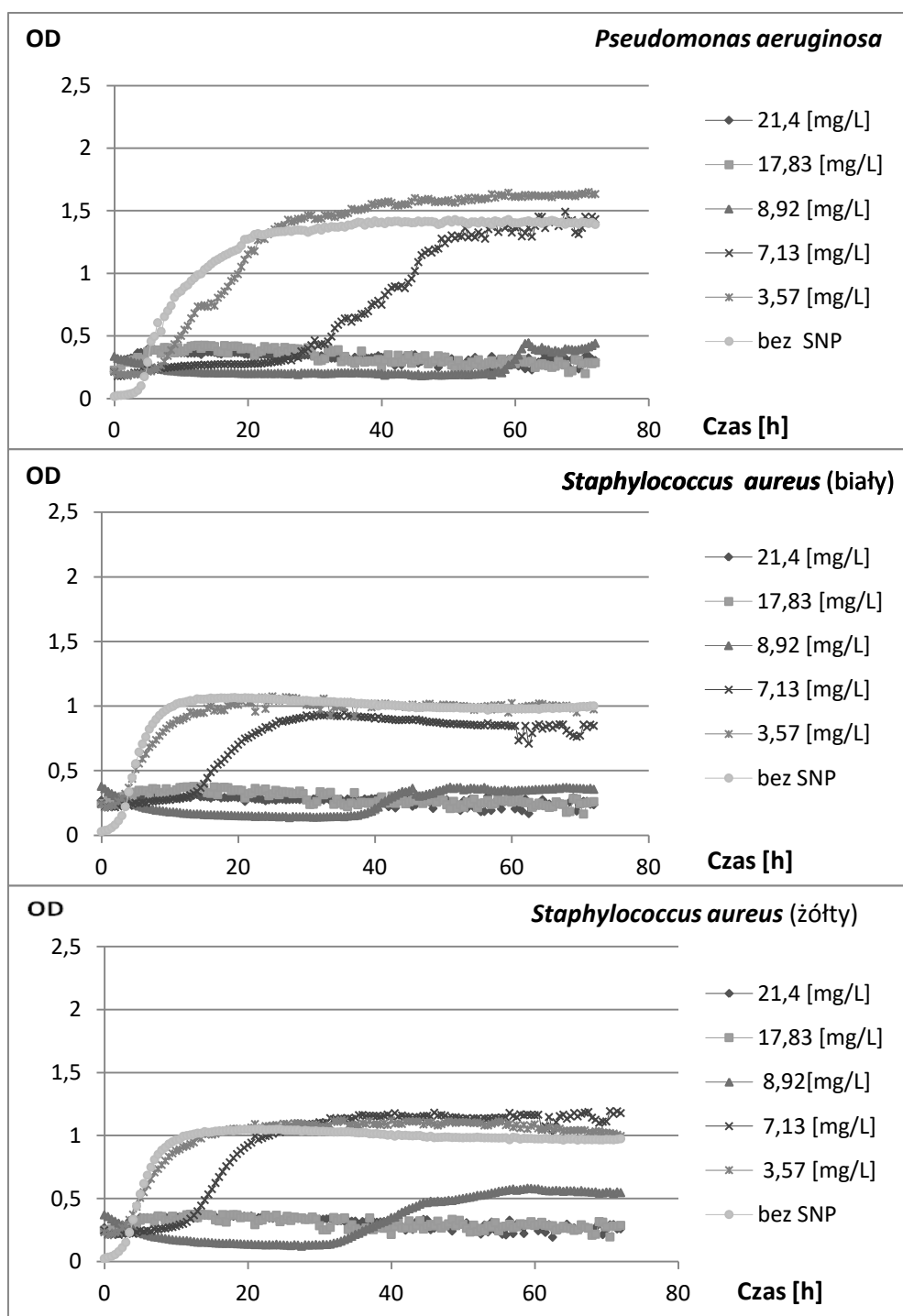


**Rysunek 6.** Wzrost *Candida albicans* w podłożu YM zawierającym różne stężenia cząsteczek nanosrebra

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że przyrost biomasy mierzony jako wartość OD w hodowlach wszystkich testowanych szczepów, prowadzonych w obecności SNP o stężeniu 8,92 mg/L był znacznie niższym niż w równocześnie biegnących hodowlach bez SNP lub zawierających niższe ich dawki, na poziomie 3,57 i 7,13 mg/L (Tab. 1). Przyrost biomasy w kolejnych dobach hodowli, obliczony jako wielokrotność początkowego zmętnienia, wynosił dla hodowli bez SNP od 34 (*C.albicans* po 24 h) do 80 (*P.aeruginosa* po 48 h), a dla hodowli z najniższą dawką SNP (3,57mg/L) od 2,6 (*C.albicans* po 24 h) do 7,5 (*P.aeruginosa* po 72h). Wzrost drobnoustrojów w hodowli z większymi dawkami SNP był zdecydowanie niższy, a przyrost OD w tych hodowlach, w stosunku do wartości początkowej był jedynie od 4 do około 6 krotny.

**Tabela 1.** Przyrost biomasy badanych szczepów drobnoustrojów

| Gatunek                  | Stężenie SNP<br>[mg/L] | Przyrost biomasy<br>[wielokrotność wyjściowego OD] |           |           |
|--------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|-----------|-----------|
|                          |                        | 24 h                                               | 48 h      | 72 h      |
| <i>P. aeruginosa</i>     | <b>0</b>               | <b>76</b>                                          | <b>81</b> | <b>80</b> |
|                          | 3,57                   | 6,2                                                | 7,1       | 7,5       |
|                          | 7,13                   | 1,4                                                | 5,5       | 6,6       |
|                          | 8,92                   | 0,6                                                | 0,6       | 1,3       |
|                          | 17,83                  | 1,8                                                | 1,3       | 1,3       |
|                          | 21,4                   | 1,6                                                | 1,4       | 1,4       |
| <i>S. aureus</i> (biały) | <b>0</b>               | <b>38</b>                                          | <b>35</b> | <b>36</b> |
|                          | 3,57                   | 4                                                  | 4,3       | 4,1       |
|                          | 7,13                   | 3,4                                                | 3,6       | 3,5       |
|                          | 8,92                   | 0,4                                                | 0,9       | 0,9       |
|                          | 17,83                  | 1,5                                                | 1,1       | 1,1       |
|                          | 21,4                   | 1                                                  | 0,9       | 0,9       |
| <i>S. aureus</i> (żółty) | <b>0</b>               | <b>44</b>                                          | <b>42</b> | <b>41</b> |
|                          | 3,57                   | 4,7                                                | 4,8       | 4,3       |
|                          | 7,13                   | 4,2                                                | 4,6       | 4,8       |
|                          | 8,92                   | 0,4                                                | 1,3       | 1,5       |
|                          | 17,83                  | 1,5                                                | 1,2       | 1,2       |
|                          | 21,4                   | 1,3                                                | 1         | 1         |
| <i>C. albicans</i>       | <b>0</b>               | <b>34</b>                                          | <b>38</b> | <b>38</b> |
|                          | 3,57                   | 2,6                                                | 5,2       | 5,3       |
|                          | 7,13                   | 3,8                                                | 4,4       | 4,4       |
|                          | 8,92                   | 0,7                                                | 2,3       | 3,9       |
|                          | 17,83                  | 0,3                                                | 0,6       | 2         |
|                          | 21,4                   | 3,3                                                | 3,6       | 7         |

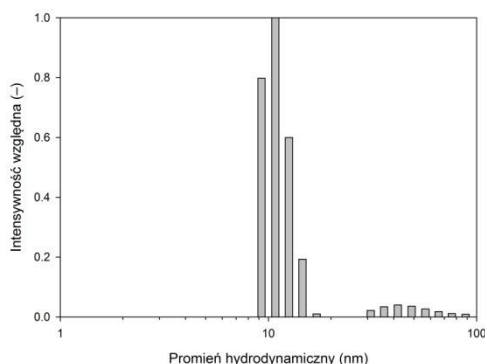


**Rysunek 7.** Wzrost bakterii w bulionie odżywczym z dodatkiem różnych stężeń nanocząstek srebra (SNP)

Kolejną interesującą obserwacją, wynikającą z analizy przebiegu krzywych wzrostu badanych bakterii jest długa lag-faza w hodowlach zawierających SNP w stężeniu 7,13 mg/L. Mimo, że taka dawka nanocząstek srebra nie wykazywała bójkowego działania wobec testowanych szczepów to jednak w porównaniu z hodowlami kontrolnymi (bez SNP), czy zawierających najniższą dawkę SNP, na poziomie 3,57 mg/L, czas trwania fazy adaptacyjnej wydłużał się o od 7 godzin w przypadku szczepu *S. aureus* o żółtej barwie kolonii do nawet o 27 godzin w hodowli szczepu *P. aeruginosa*.

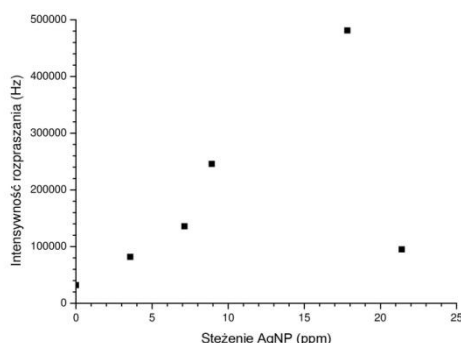
Postanowiono sprawdzić, czy w płynach po hodowli mikroorganizmów w mikroanalyzerze Bioscreen C nadal obecne są nanocząstki srebra. Wyniki uzyskane z analizy supernatantu potwierdziły obecność SNP. Na rysunku8 przedstawiono przykładowy wynik pomiarów uzyskanych techniką dynamicznego rozpraszania światła DLS dla próbki pochodzącej z hodowli *S. aureus* (o żółtej barwie kolonii), w której wyjściowe stężenie nanocząstek wynosiło 17.83 ppm. Na podstawie uzyskanych danych można przyjąć że nanocząstki nie uległy aglomeracji i nie zostały wykorzystane przez mikroorganizmy(rys. 9). Nie uległ też zmianie rozmiar nanocząstek, ich wielkość po hodowli mieściła się w zakresie 10.2–11.1 nm, a odchylenie standardowe równe było około 3 nm; liczba cząstek o większej średnicy była niewielka, a więc zmiana rozmiaru była statystycznie nieistotna. Oznacza to iż zastosowane preparaty podczas hodowli mikroorganizmów cechowały się stabilnością.

Rozmiary aglomeratów obecnych w wyjściowym roztworze nanosrebra oraz zawartych w płynie pohodowlanym bakterii były nieco inne. Po wzroście drobnoustrojów zamiast cząstek o promieniu równym około 100 nm, obecnych w preparacie wyjściowym, pojawiły się cząstki mniejsze, o promieniu wynoszącym około 60 nm. Wydaje się, że obecne początkowo aglomeraty 100 nm uległy dalszej aglomeracji, zwiększając swój rozmiar tak, że pozostały w retencji filtra membranowego, zaś obecne aglomeraty były wynikiem koagulacji pierwotnych cząstek o promieniu 11.5 nm.



**Rysunek 9.** Analiza nanocząstek srebra techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) obecnych w płynie pohodowlanym bakterii *S. aureus* o żółtej barwie kolonii (stężenie SNP w próbie równe 17.83 ppm)

Interesująca jest zależność intensywności rozpraszania światła od wyjściowego stężenia nanocząstek srebra. Wielkość ta jest wyrażona w hercach, jako liczba zliczeń autokorelatora na sekundę pomiaru. Można się więc spodziewać że będzie ona funkcją liczby cząstek i będzie rosła wraz z ich zawartością w roztworze. W przypadku czystych pożywek wielkość tego parametru wzrasta wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek, co było wynikiem spodziewanym. Zaskakujący był więc znaczący spadek intensywności rozpraszania światła dla próbek zawierających najwyższe stężenie wyjściowe nanosrebra (Rys. 10).



**Rysunek 10.** Intensywność rozpraszania światła w funkcji początkowego stężenia nanocząstek

Zjawisko to jest trudne do wyjaśnienia, być może dochodzi do intensywniej agregacji cząstek. Warto wspomnieć, że pomiary OD 600nm przeprowadzone w analizatorze Bioscreen C dla prób kontrolnych (podłoże + SNP, bez drobnoustrojów) również wskazują na możliwość oddziaływania SNP i składników podłoża. W obecności najwyższego stężenia SNP, niezależnie od podłoża (YPG czy bulion odżywczy) wartość OD 600nm w początkowej godzinie hodowli (czas 0) wynosiła 0,61, po 2 godzinach zmalała dwukrotnie i wynosiła 0,23.

## Dyskusja

Przedmiotem niniejszej pracy była ocena przeciwdrobnoustrojowej aktywności nanocząstek srebra. Mimo, że aktywność biologiczna takich preparatów jest względem niektórych bakterii G-dodatnich jak i G-ujemnych była już badana i wykazana [Sondi i Salopek-Sondi, 2004; Yoon i in., 2007; Li i in., 2010; Becano i in., 2015], to jednak temat ten nadal budzi duże zainteresowanie naukowców na całym świecie.

W podłożach płynnych monitorowanie wzrostu mikroorganizmów możliwe jest poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli przy długości fali świetlnej równej 560-600nm. Wzrost zmętnienia środowiska jest wynikiem przyrostu liczby komórek. Pomiar OD 600nm jest najszybszą i najprostszą metodą określania pomiaru przyrostu drobnoustrojów, którą z powodzeniem można wykorzystać w mikroanalizatorach mikrobiologicznych [Grabarczyk i in., 2013]. Niektórzy badacze, dla określonych szczepów bakterii wyznaczyli nawet zależność pomiędzy wartością OD 600nm, a liczbą komórek. Wg Sondi i Salopek-Sondi [2004] wartość OD 600nm równa 0,1 odpowiada stężeniu komórek  $10^8$ /mL.

Zastosowana technika analityczna -hodowla mikroorganizmów w podłożu płynnym, w analizatorze BioscreenC umożliwiła ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych SNP i określenie stężenia hamującego wzrost testowanych bakterii oraz drożdży.

Najwyższą wrażliwością na działanie cząstek nanosrebra cechowały się komórki bakterii *P. aeruginosa*, których wzrost całkowicie hamowany był już przy stężeniu 8,92 mg/L SNP. Bardziej odporne na działanie tych cząstek okazały się drożdże *C. albicans*, w przypadku których całkowite hamowanie wzrostu drożdży obserwowano w obecności najwyższych z badanych stężeń preparatu na poziomie 17,83 oraz 21,4 mg/mL. Stężenie SNP wynoszące 8,92 mg/L powodowało długą, trwającą 32 godz. lag-fazę, po której komórki drożdży rozpoczynały wzrost. Podobną obserwację poczyniono dla obydwu testowanych izolatów *S. aureus*. W obecności takiego stężenia nanocząstek srebra bakterie zaczynały rosnąć po bardzo długiej, trwającej 36-40 godz. fazie adaptacyjnej. Zjawisko to można tłumaczyć m.in. tym, że komórki w ten sposób reagują na stres środowiskowy i tak długo dostosowują się do niekorzystnych warunków wywołanych obecnością nanocząstek srebra.

Analiza nanocząstek srebra techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) obecnych w płynie pohodowlanym bakterii *S. aureus* wykazała, że nanocząstki nie uległy aglomeracji i nie zostały wykorzystane przez mikroorganizmy. Nie pozwoliła on jednak na stwierdzenie, czy cząstki te nie zostały one opłaszczane metabolitami mikroorganizmów, co mogłoby wpłynąć na zmianę ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej, co również mogłoby stanowić przyczynę wzrostu wspomnianych mikroorganizmów w drugiej dobie hodowli.

Na podstawie uzyskanych wyników można przyjąć, że graniczne stężenie SNP wpływające na znaczące ograniczenie wzrostu badanych mikroorganizmów wynosi 9 mg/L. Wartość ta jest porównywalna z rezultatami wcześniejszych badań Żarowskiej i in. [2015], w których testowano mikroorganizmy należące do tych samych rodzajów lub gatunków. Wykazane minimalne stężenie SNP wykazujące działanie przeciwdrobnoustrojowe jest znacznie niższe (7-14 razy) niż sugerowane przez innych badaczy względem różnych gatunków bakterii [Sondi i Salopek-Sondi, 2004; Rai i in., 2009].Warto również podkreślić, że wykazane we wcześniejszych badaniach hamujące wzrost grzybów strzępkowych stężenie SNP jest również niskie, wynosi tylko 5,1 mg/L [Żarowska i in., 2015].

### Wnioski

Przeprowadzone badania potwierdzają pozytywny, czyli przeciwdrobnoustrojowy wpływ uzyskanych wodnych roztworów nanocząsteczek srebra (SNP) oraz zachęcają do dalszych badań nad zastosowaniem SNP w różnego rodzaju materiałach, np. folii służącej do pakowania żywności czy innych kompozytów.

Potwierdzono także trwałość nanocząstek srebra w warunkach hodowli drobnoustrojów.

*Badanie finansowano z projektu NCBR No PBS 3/B1/10/2015*

## Literatura

- Becano A.A., Puti F.C., Correa D.S., Paris E.C., Marconcini J.M., Ferreira M.D., Polyethylenefilmscontaining silvernanoparticles for applications in food packaging: characterization of physicochemical and anti-microbialproperties. *Journal of Nanosciences and Nanotechnology*. 2015,15, 2148-2156.
- Grabarczyk M., Mączka W., Winska K., Żarowska B., Anioł M., Antimicrobialactivity of hydroxylactoneobtained by biotransformation of bromo-and iodolactone with gem-dimethylcyclohexane ring. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2013, 24 (12), 1913-1922.
- Jones C. M., Hoek E. M. V., A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 12 (5), 1531-1551.
- Li W-R., Xie X-B., Shi Q-S., Zeng H-Y., OU-Yang Y-S., Chen Y-B., Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology* 2010, 85, 1115-1122.
- Koźlecki T., Teterycz H., Sokołowski A., Polowczyk I., Sawiński W., Maliszewska I., Szydło J., Sposób syntezowania nanocząstek srebra. Zgłoszenie patentowe nr P 395979 z 16.08.2011.
- Morones J.R., Elechiguerra J.E., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacaman M.J., The bactericidaleffect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 2005, 16 , 2346–2353.
- Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 2009, 27, 76-83.
- Sionkowski G., Kaczmarek H., Polimery z nanocząsteczkami srebra-wybrane układy – otrzymywanie, właściwości, zastosowania. *Polimery* 2010, 55, 7-8.
- Sondi I., Salopek-Sondi B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for gram-negative bacteria, *Journal of Colloid and Interface Sciences*, 2004, 275, 177-182.
- Tran Q.H., Nguyen V.Q., Le A-T., Siver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and petrpectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2013, 4, 1-21.
- Wilson J.J., Khachatourians G.G., Ingledew W.M.: Schwanniomycetes: SCP and ethanol from starch, *Biotechnology Letters* 1982,4 (5), 333-338.
- Yoon K.Y., Byeon J.H., Park J.H, Hwang J., Susceptibility constraints of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science Total Environment*, 2007, 373, 572-575.
- Żarowska B., Piegza M., Jaros-Koźlecka K., Koźlecki T., Robak M., Antimicrobial activity of silver nanoparticles, *Materiałykonferencyjne BRIA: Biotechnology–Research and Industrial Applications*, Wrocław, 17-18 September 2015, 55.

ANNA BRYŁA

*Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej*

*Wydział Technologii Chemicznej*

*Politechnika Poznańska*

GRAŻYNA LEWANDOWICZ

*Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

*gralew@up.poznan.pl*

### TECHNOLOGIA LIPOSOMOWA W PRZEMYSŁE SPOŻYWCZYM

#### Streszczenie

Wzrost zainteresowania konsumentów żywnością funkcjonalną stworzył konieczność zapewnienia trwałości substancjom bioaktywnym występującym w gotowych produktach. Można to uzyskać przez zamykanie labilnych materiałów w kapsułkach. W technologii żywności standardowo kapsułkuje się związki hydrofobowe, na przykład z wykorzystaniem technik emulsyjnych i suszenia rozpyłowego. Cały czas wyzwaniem jest skuteczne zabezpieczanie substancji hydrofilowych. Ze względu na powyższe ograniczenia procesu kapsułkowania oraz potencjalnie niekorzystny wpływ samych mikrokapsulek na właściwości organoleptyczne produktu coraz częściej poszukuje się rozwiązań w skali nano. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat nanokapsułkowania związków bioaktywnych wewnątrz liposomów. Szczególną uwagę poświęcono podstawom fizykochemicznym tego procesu, ponadto, opisano metody badania nanokapsulek liposomowych oraz sposoby ich wytwarzania na skalę laboratoryjną i przemysłową. Przedstawiono główne kierunki zastosowania technologii liposomowej w wytwarzaniu żywności oraz podkreślono jej zalety i ograniczenia.

**Słowa kluczowe:** liposom, nanokapsułkowanie, żywność

#### Wprowadzenie

Wśród trendów rozwojowych współczesnej technologii żywności szczególną uwagę zwracają prace zmierzające do otrzymywania nowych produktów o charakterze prozdrowotnym. Niestety znaczna część substancji bioaktywnych jest nietrwała i ulega degradacji w toku przetwórstwa i magazynowania, wskutek utleniania bądź interakcji z matrycą produktu spożywczego. Zachowanie aktywności biologicznej składników prozdrowotnych można uzyskać poprzez zamknięcie ich wewnątrz liposomów. Liposomy mogą być formowane z naturalnych surowców będących budulcem komórek ludzkich. W konsekwencji, są one w pełni biokompatybilne, a ich stosowanie w technologii spożywczej jest akceptowane [Gibbs i in., 1999; Mozafari i in., 2006a]. Obecność liposomów zaobserwowano nawet w mleku ludzkim - naszym pierwszym pokarmie [Keller i in., 2001].

Liposomy po raz pierwszy opisano w latach 60 ubiegłego stulecia. Zaobserwowano wówczas, że w wyniku interakcji między lecytyną żółtka jaja kurzego a wodą następuje spontaniczne formowanie struktur pęcherzykowatych [Bangham i in., 1965]. Zostały one kilka lat później nazwane liposomami [Sessa i Weissmann, 1968]. Od tamtej pory rozwój technologii liposomowej dotyczył głównie zastosowań w farmacji i medycynie [Kozubek, 2004]. Równocześnie rozwijano badania w kierunku zastosowania liposomów w produkcji żywności jako nanokapsulek dla labilnych lub trudnodostępnych składników takich jak aromaty, enzymy, minerały, antyoksydanty itp. [Mozafari i in., 2008a; Malheiros i in., 2010]. O znaczeniu tej tematyki dla rozwoju technologii żywności świadczy systematycznie narastająca liczba zgłoszeń patentowych [Haynes in., 1991; Lengerich i in., 1991; De Paoli i in., 1996a; De Paoli i in., 1996b].

### Struktura i właściwości liposomów

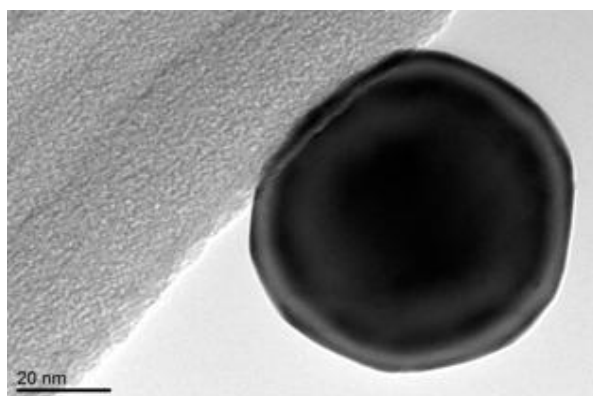
Liposomy są to pęcherzykowate struktury o rozmiarach od 30 nm do kilku mikrometrów, zbudowane z jednej lub kilku dwuwarstw lipidowych zamykających roztwór wodny [Lasic, 1991; Ulrich, 2002]. Ich formowanie jest uwarunkowane termodynamicznie i związane jest z oddziaływaniem z wodą emulgatorów o niskich wartościach HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) standardowo stosowanych do tworzenia emulsji typu woda w oleju. Powstaje wówczas uprzywilejowana energetycznie, zakrzywiona, zamknięta struktura zbudowana z dwuwarstwy lipidowej [Kozubek, 2004]. W zależności od materiału użytego do formowania liposomów, jak również metody i warunków ich wytwarzania, otrzymuje się różne struktury. Ich charakterystykę zebrano w tabeli 1 [Mozafari i in., 2008a].

Zawieszone w środowisku wodnym pęcherzyki liposomowe stanowią pod względem fizykochemicznym (podobnie jak emulsje) koloidalne układy zdyspergowane. Ich zaletą w stosunku do emulsji jest możliwość kapsułkowania nie tylko substancji hydrofobowych (rozpuszczonych w fazie olejowej miceli), ale również substancji hydrofilowych rozpuszczonych w fazie wodnej. Uniwersalność liposomów jako kapsulek substancji bioaktywnych polega na możliwości zamykania substancji hydrofilowych rozpuszczonych w fazie wodnej wnętrza kapsułki oraz hydrofobowych związanych z dwuwarstwą fosfolipidową. Dyspersje liposomowe posiadają jednak, w porównaniu do emulsji, duże wady. Przede wszystkim stabilizowanie emulsji jest możliwe przez dodatek hydrokoloidów zwiększających lepkość fazy rozproszonej. W przypadku dyspersji liposomowych ich stabilność jest uwarunkowana wyłącznie oddziaływaniami elektrostatycznymi. Obecność ładunku elektrycznego (z reguły ujemnego) na powierzchni pęcherzyków liposomowych chroni je przed flokulacją i agregacją [McClements, 2015]. Ocenę stabilności dyspersji liposomowych przeprowadza się poprzez pomiar potencjału  $\zeta$  (zeta). Uważa się, iż bezwzględne wartości potencjału  $\zeta$  powyżej 30 świadczą o zadowalającej stabilności dyspersji liposomowej. Wartości powyżej 60 świadczą o doskonałej stabilności [Wagner i in., 2002].

**Tabela 1.** Systematyka liposomów

| Nazewnictwo               | Skrót | Średnica  | Liczba dwuwarstw            | Schemat                                                                             |
|---------------------------|-------|-----------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Small UnilamellarVesicles | SUV   | 20-100 nm | 1                           |  |
| GiantUnilamellarVesicles  | GUV   | >100 nm   | 1                           |  |
| Double-BilayerVesicles    | DBV   | >100 nm   | 2                           |  |
| MultilamellarVesicles     | MLV   | >0,5 µm   | 5-20                        |  |
| OligolamellarVesicles     | OLV   | 0,1-2 µm  | Ok. 5                       |  |
| MultivesicularVesicles    | MVV   | >1 µm     | Struktura wielu pęcherzyków |  |

Liposomy ustępują micelom również ze względu na fakt, iż zakapsułkowana substancja aktywna może przenikać na zewnątrz pęcherzyka wg mechanizmu odpowiadającemu transportowi pasywnemu w komórkach. Bardzo często obserwuje się też niższą niż w przypadku micel wydajność kapsułkowania [McClements, 2015]. Oznaczenie wydajności kapsułkowania przeprowadza się różnymi metodami w zależności od zakapsułkowanego związku. Zazwyczaj w pierwszej kolejności oddziela się liposomy od niezakapsułkowanego związku na drodze sączenia molekularnego. Wszystkie frakcje otrzymane po sączeniu molekularnym bada się np. spektrofotometrycznie przy długości fali równej maksymalnej wartości absorbancji związku kapsułkowanego. Sumę absorbancji wszystkich frakcji rozważa się jako 100%. Do 100% odnosi się sumę absorbancji frakcji bogatych w liposomy otrzymując % wydajności procesu.

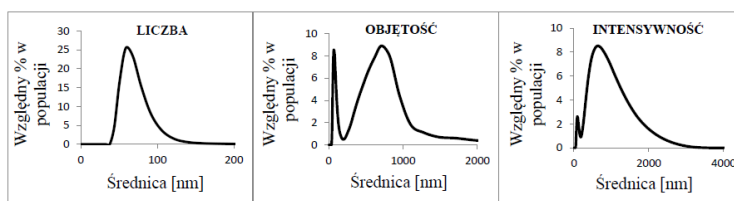


**Rysunek 1.** Mikrofotografia cryo-TEM liposomu typu SUV otrzymanego metodą Banghama

Charakterystyka liposomów jest bardzo trudna ze względu na ich niewielkie rozmiary. Utrudnia to obserwację mikroskopową. Ze względu na zbyt niską zdolność rozdzielczą oraz intensywne ruchy Browna, którym podlegają nanocząstki, wykluczone jest stosowanie mikroskopów optycznych. Rekomendowane jest stosowanie techniki cryo-TEM, czyli transmisyjnej mikroskopii elektronowej zamrożonej dyspersji. Na rys. 1 przedstawiono zdjęcie mikroskopowe liposomu zarejestrowane techniką cryo-TEM. Liposom podchodził

z populacji otrzymanej metodą Banghama. Liposomy poddano 10. cyklom zamrażania w ciekłym azocie i rozmrażania w łaźni wodnej w celu ujednolicenia rozmiaru i redukcji liczby dwuwarstw fosfolipidowych.

Do wyznaczania rozmiarów nanocząstek, jakimi są liposomy, bardzo przydatną okazała się metoda dynamicznego rozpraszania światła DLS (Dynamic Light Scattering). Wykorzystuje się tu różnice w dynamice ruchów Browna cząstek o różnym rozmiarze [ISO 22412, 2008]. Jako wynik pomiaru uzyskuje się wykres rozkładu wielkości cząstek. Może być on podany jako rozkład liczby, objętości bądź intensywności rozpraszania światła cząstek o danej średnicy. Ilustruje to rys. 2.



**Rysunek 2.** Rozkład wielkości tej samej populacji liposomów uzyskanej metodą Banghama przedstawiony w odniesieniu do liczby, objętości oraz intensywności rozpraszania światła

Ponieważ mierzy się intensywność rozpraszania światła, która jest proporcjonalna do szóstej potęgi średnicy cząstek, bezpośrednio uzyskany wynik pomiaru bardzo silnie faworyzuje cząstki o największych rozmiarach. Dlatego oprogramowanie aparatów umożliwia przedstawienie uwzględniające objętość cząstek (proporcjonalne do trzeciej potęgi średnicy) lub ich liczbę.

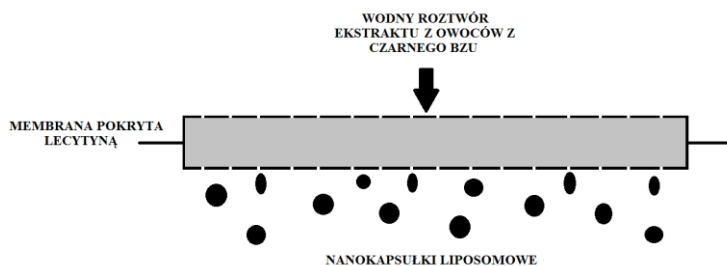
Do charakterystyki liposomów można wykorzystać technikę cytometrii przepływowej. Jest ona co prawda adresowana do badania mikroorganizmów, które są obiektami większymi niż liposomy, niemniej jednak można przy jej zastosowaniu uzyskać informacje na temat jednorodności (bądź niejednorodności) populacji liposomów zarówno pod względem rozmiarów jak i struktury [Sato i in., 2006].

O właściwościach i strukturze liposomów decydują materiał, z którego zostały zbudowane, środowisko, w którym występują oraz metoda wytwarzania. Dwóm pierwszym aspektom poświęcono szczególnie dużo prac o charakterze podstawowym. Ponieważ naturalne lecytyny stanowią mieszaniny różnych związków, badania te prowadzone są z użyciem związków czystych lub modelowych, różniących się strukturą i właściwościami fizykochemicznymi. Ta strategia umożliwia formułowanie ogólnych wniosków dotyczących korelacji pomiędzy strukturą a właściwościami liposomów. W badaniach stosuje się najczęściej L- $\alpha$ -fosfatydylocholinę (PC; L- $\alpha$ -PhosphatidylCholine); dipalmitynianfosfatydocholinę (DPPC; i PalmitoylPhosphatidylCholine). Udowodniono, że cholesterol powszechnie występujący w naturalnych błonach komórkowych wpływa na temperaturę przejścia krystalicznego dwuwarstwy, a pośrednio na przepuszczalność membrany. Wpływ ten jest zależny od stężenia cholesterolu w membranie [Dwiecki i in., 2004; Dwiecki i in., 2005; Dwiecki i in., 2007a]. Szczególny wpływ na strukturę i właściwości membran mają związki powierzchniowo czynne, zdolne do zaburzania równowagi hydrofilowo-lipofilowej dwuwarstwy [Dwiecki i in., 2007b]. Negatywny wpływ

surfaktantów można zredukować poprzez wbudowanie w strukturę membrany antyoksydantów takich jak daidzeina [Dwiecki i in., 2009], genisteina [Dwiecki i in., 2010] czy witamina E [Neunert i in., 2010]. Rolę antyoksydantów świetnie spełniają też składniki naparu kawy, kwasy: kawowy, chlorogenowy i ferulowy [Neunert i in., 2015].

### Wytwarzanie liposomów

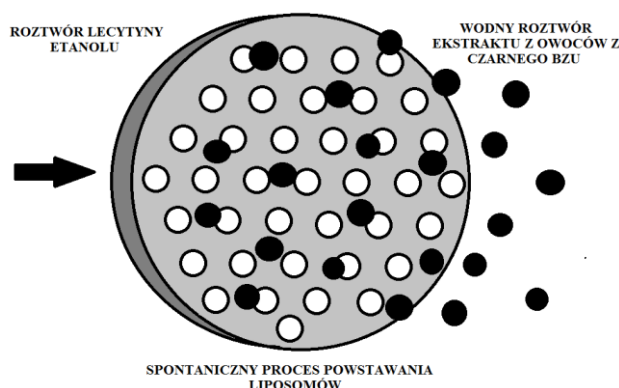
Rozwój technologii liposomowej doprowadził do opracowania szeregu metod wytwarzania liposomów. Do konwencjonalnych metod zalicza się metody: uwadniania cienkiego filmu (Banghama), usuwania detergentów, wstrzykiwania roztworu lecytyny do nierozpuszczalnika i odparowania odwróconych faz, [Meure i in., 2008]. Metoda Banghama, jest najstarszą i najczęściej stosowaną techniką wytwarzania liposomów. Proces polega na rozpuszczeniu lipidu w rozpuszczalniku organicznym, usunięciu rozpuszczalnika w celu otrzymania suchego, cienkiego filmu fosfolipidowego. Ostatecznie, film dysperguje się (uwadnia) w roztworze wodnym. Metoda Banghama jest stosunkowo prosta i szybka, jednak jej głównymi ograniczeniami są niskie wartości wydajności kapsułkowania, skala laboratoryjna procesu, pozostałości rozpuszczalników organicznych w produkcie, niejednorodny produkt. Z wykorzystaniem konwencjonalnych metod uzyskuje się liposomy typu MLV. W celu uzyskania pożądanego rozmiaru, liczby dwuwarstw fosfolipidowych oraz jednorodnego rozkładu danych cech w populacji proponuje się sonikację, ekstruzję, wysokociśnieniową homogenizację, zamrażanie-rozmrażanie, hydratację-dehydratację [Madden i in., 1990; Bolotin i in., 1994; Fan i in., 2007; Takahashi i in., 2007].



**Rysunek 3.** Schemat modułu membranowego do formowania liposomów wg mechanizmu uwadniania cienkiego filmu

Większy potencjał w kierunku produkcji liposomów na skalę przemysłową wykazują procesy membranowe. Charcosset i współpracownicy proponują przepływ przez membranę roztworu fosfolipidu w temperaturze poniżej punktu topnienia. Według autorów, metodą tą otrzymuje się cząstki o rozmiarach 70-215 nm [Charcosset i in., 2005]. Alternatywnie, możliwe jest otrzymywanie liposomów z wykorzystaniem membrany mikrofiltacyjnej, pokrytej cienką warstwą fosfolipidu. Pęcherzyki tworzą się podczas przepływu roztworu wodnego przez membranę. Technika umożliwia jednoetapową produkcję stabilnych liposomów o rozmiarach 300-450 nm z wydajnością kapsułkowania związków hydrofilowych na poziomie 30-40% [Bryła i in., 2014a].

Wykorzystując procesy membranowe wytwarzano również większe pęcherzyki ( $d=530$  nm), ale o wysokim stopniu jednorodności uzyskując wydajności kapsułkowania związków hydrofilowych na poziomie 30%. Technika polega na przepływie roztworu etanolowego fosfolipidów przez membranę. Po stronie permeatu membrana jest obmywana przez roztwór wodny związku kapsułkowanego. Liposomy tworzą się spontanicznie w momencie przejścia roztworu fosfolipidów przez membranę [Bryła i in., 2014b].



**Rysunek 4.** Schemat modułu membranowego do formowania liposomów wg mechanizmu wstrzykiwania roztworu lecytyny do nierozpuszczalnika

#### Zastosowanie liposomów w technologii żywności

Początkowo liposomy wykorzystywano jako modele błon biologicznych do badań adhezji, przepuszczalności i mechanizmów transportu. Do teraz, ze względu na ograniczenia technologii liposomowej, związanych głównie z trudnością otrzymywania ich na dużą skalę w sposób ekonomicznie opłacalny, główny kierunek rozwoju technologii liposomowej związany jest z medycyną i farmacją. Niemniej jednak opracowano, na potrzeby produkcji żywności, szereg metod kapsułkowania wewnątrz liposomów substancji bioaktywnych zarówno hydrofilowych takich jak np. witamina C, żelazo czy wapń jak i hydrofobowych takich jak np. witaminy A, D, E, karetonoidy czy koenzym Q10 [McClements, 2015]. Ogromny potencjał aplikacyjny wykazano dla zastosowania enzymów zamkniętych wewnątrz liposomów w przemyśle mleczarskim [Mozafari, 2008a; Mozafari, 2008b], przeciwdrobnoustrojowych peptydów [Malheiros, 2010], ale przede wszystkim związków polifenolowych [Fang, 2010].

#### Nanokapsułkowanie przeciwutleniaczy i witamin

Przeciwutleniacze w ograniczonym stopniu przenikają przez błonę komórkową i stosunkowo szybko są przez komórkę wydalone [Mozafari i in., 2006b]. Dodatkowo, mogą ulegać degradacji w nieprzyjnym środowisku żołądka [Malkki i in., 2001; Paradkar i in., 2004]. Zabezpieczanie antyoksydantów, a tym samym zwiększenie ich biodostępności jest możliwe dzięki technologii liposomowej [Stone i in., 2004]. Dowiedziono, że jednowarstwowe pęcherzyki o średnicy  $1\ \mu\text{m}$  i mniej korzystnie wpływają na absorpcję jelitową związków aktywnych [Um i in., 2003].

W 2011 roku Lu i współpracownicy zaproponowali metodę zabezpieczania w liposomach polifeonoli z zielonej herbaty dla zastosowań w żywności. Liposomy wytwarzano metodą uwadniania cienkiego filmu z procesem sonikacji uzyskując około 60% wydajność kapsułkowania. Otrzymano stabilne ( $\zeta$ -potencjał = -67,2) pęcherzyki o rozmiarach 160 nm. Testy *in vitro* wykazały zwiększoną biodostępność polifenoli zakapsułkowanych względem niezakapsułkowanych, a testy przechowalnicze, stabilność systemu w warunkach obniżonej temperatury (3-5°C) [Lu i in., 2011].

Podjęmowano również próby zamykania w liposomach ekstraktów roślinnych, bogatych w antyoksydanty. Gibis i współpracownicy opisali metodę wytwarzania wielowarstwowych liposomów z międzyfazowymi warstwami chitozanu i pektyny. W pęcherzykach zamykano bogaty w antocyjany ekstrakt z hibiskusa. Wykazano stabilność układu przez 145 dni przechowywania. Dowiedziono, że systemy liposomowe stanowią odpowiedni nośnik dla antocyjanów. Jednocześnie, zauważono, działanie ochronne ekstraktu z hibiskusa na kwasy tłuszczowe membrany liposomów [Gibis i in., 2014].

Badania wpływu rodzaju lecytyny zastosowanej do kapsułkowania ekstraktu z owoców czarnego bzu na charakterystykę otrzymanych liposomów nośników wykazały, że spośród lecytyn sojowej, słonecznikowej i z żółtka jaja kurzego, ta pierwsza, sojowa umożliwia otrzymanie najbardziej jednorodnej pod względem struktury i rozmiaru oraz stabilnej populacji liposomów [Bryła i in., 2015].

Wzbogacanie produktów spożywczych w witaminy jest utrudnione ze względu na ich podatność na utlenianie, działanie światła, niewielki stopień absorpcji przy podaży doustnej, krótki okres półtrwania oraz działanie cytotoksyczne przy zwiększonych dawkach. Dodatkowo, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach są wyjątkowo trudne do wprowadzenia do większości produktów spożywczych. Z powyższych względów, podejmuje się próby zabezpieczania witamin w liposomach. Obiecujące wyniki uzyskano przy zastosowaniu liposomowych nanonośników opłaszczonych chitozanem do kapsułkowania czterech form karotenoidów: likopenu,  $\beta$ -katoenu, luteiny, kantaksantyny. Próby poddawano działaniu temperatury, soków trawiennych oraz wirowaniu i obserwowano trwałość układu. Wykazano wysoką odporność nanokapsułek na działanie temperatury i dobre właściwości dyspersyjne. Dodatkowo, opłaszczenie chitozanem pozytywnie wpłynęło na kontrolowane uwalnianie karotenoidów. Jednak nanokapsułki liposomowe w większym stopniu chroniły  $\beta$ -katoen i luteinę niż luteinę i kantaksantynę [Tan i in., 2016].

Wykorzystując właściwości liposomów do zabezpieczenia związków hydro- i lipofilowych, Marsanasco i współpracownicy opracowali metodę jednoczesnego kapsułkowania witamin C i E. Nośniki były przeznaczone do wzbogacania soku pomarańczowego, pasteryzowanego. Wykazano stabilność obydwu witamin po procesie pasteryzacji oraz podczas przechowywania produktu przez 37 dni w 4°C. Ponadto, dodatek liposomowych form witamin nie wpływał na właściwości organoleptyczne soku [Marsanasco i in., 2011].

Zakapsułkowane witaminy wykorzystywano do stabilizacji produktów spożywczych. Fosfolipidową otoczkę liposomu wzbogacono alfa-tokoferolem, a rdzeń kapsułki stanowił regenerujący witaminę roztwór kwasu askorbinowego. Nanonośniki wprowadzono do emulsji spożywczej. W ten sposób otrzymano optymalną ochronę produktu przed procesami utleniania, minimalizując ryzyko interakcji kwasu askorbinowego z innymi składnikami formulacji [Pothakamury i in., 2000].

### **Nanokapsułkowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych**

Bakteriocyny stanowią obiecującą grupę biokonserwantów stosowanych w żywności. Ich aktywność może być jednak obniżona na skutek działania enzymów proteolitycznych, czy innych niekorzystnych interakcji ze składnikami produktu spożywczego. Potencjalną metodą zabezpieczania bakteriocyn jest kapsułkowanie w liposomach [Malheiros i in., 2010]. W literaturze opisano metody otrzymywania liposomowych form nizyny [Were i in., 2004; Taylor i in., 2007; Taylor i in., 2008], nizyny Z [Laridi i in., 2003; Colas i in., 2007], nizyny z kalceiną [Were i in., 2003], bakteriocynopodobnej substancji P40 [Teixeira i in., 2008] oraz pediocyne AcH [Degnan i Luchansky, 1992]. W większości prac wykorzystano metodę uwalniania cienkiego filmu lipidowego, a głównym budulcem otoczki lipidowej była fosfatydylocholina. Wykazano, że zamykanie bakteriocyn w liposomach chroni je przed warunkami środowiskowymi i umiarkowaną obróbką cieplną. Dodatkowo, proces zapewnia krótko - (uwalnianie zakapsułkowanej nizyny) i długoterminową (desorpcja immobilizowanej w błonie lipidowej nizyny), ochronę danego produktu [Benech i in., 2002; Taylor i in., 2008].

### **Nanokapsułkowanie enzymów**

Kapsułkowanie enzymów w technologii żywności jest pożądane w przypadku konieczności wywołania reakcji w określonym czasie podczas wytwarzania produktu, poprawiając jego właściwości. W serowarstwie, kapsułkowanie enzymów może wpływać na szybkość dojrzewania sera, wzmocnienie jego smaku i przedłużenie trwałości. Kluczowym etapem dojrzewania sera jest proteoliza, podczas której kształtowane są jego zapach, smak i strawność. Zabezpieczając w liposomach proteazy, peptydazy, lipazy, można zmniejszyć koszty produkcji sera przyspieszając jego dojrzewanie i chroniąc białka mleka przed przedwczesnym działaniem enzymów [Kheadr i in., 2002; Kheadr i in., 2003]. Z wykorzystaniem technologii liposomowej można wyprodukować ser skracając czas o połowę oraz aplikując 1/100 dawki enzymu w porównaniu do konwencjonalnego procesu [Kirby i in., 1987].

Zabezpieczanie enzymów w liposomach ma również na celu zapobieganie ich inaktywacji w wyniku interakcji z innymi składnikami produktu spożywczego, lub warunków jego obróbki. Przykład stanowi kapsułkowanie  $\beta$ -galaktozydazy w liposomach. Celem jest poprawa strawności laktozy w produktach mleczarskich. Enzym jest uwalniany pod wpływem zmiany pH wywołanej obecnością soli żółciowych [Rodriguez-Nogales i Lopez, 2006].

### Podsumowanie

Nanonośniki liposomowe otwierają przed technologią żywności nowe możliwości. Bezpieczne i wydajne nanokapsułkowanie enzymów może potencjalnie zrewolucjonizować część procesów technologicznych, na przykład wypiek pieczywa, produkcję mąki, dojrzewanie serów. Nanonośniki liposomowe mogą być kluczem dla szerokiego wykorzystania biokonserwantów. Ograniczeniem powszechnego zastosowania nanokapsułek liposomowych w produkcji żywności jest brak opłacalnych ekonomicznie metod ich wytwarzania. Największe możliwości rozwiązania tego problemu stwarzają udoskonalone techniki membranowe. Ponadto konieczna jest poprawa wydajności kapsułkowania oraz stabilności liposomów w matrycy produktu spożywczego.

### Podziękowania

*Składamy serdeczne podziękowania Pani dr Barbarze Peplińskiej z Centrum NanoBiomedycznego za wykonanie zdjęć techniką cryo-TEM oraz Panu dr Krzysztofowi Dwiekiemu z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu za udostępnienie aparatury Zeta SizerNanoseries, Malvern Instrument.*

### Literatura

Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 1965, 13, 1, 238-252.

Benech R. O., Kheadr E. E., Laridi R., Lacroix R., Fliss I., Inhibition of *Listeria Innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68, 3683-3690.

Bolotin E. M., Cohen R., Bar L. K., Emanuel N., Ninio S., Lasic D. D., Arenho Y. B. 1994: Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligand liposomes. *Journal of Liposome Research*, 1994, 4, 1, 455-479.

Bryła A., Fryczyńska K., Białas W., Lewndowicz G., An attempt to application of microfiltration membrane unit for encapsulation of elderberry extract into liposomes. W: Konieczny K., Korus I. (red), *Membranes and Membrane Processes in Environmental Engineering Committee*, Polska Akademia Nauk, 2014, 343-353.

Bryła A., Juzwa W., Białas W., Lewndowicz G., Nanoencapsulation of elderberry extract using a membrane contactor. W: Konieczny K., Korus I. (red), *Membranes and Membrane Processes in Environmental Engineering Committee*, Polska Akademia Nauk, 2014, 333-341.

Bryła A., Lewndowicz G., Juzwa W., Encapsulation of elderberry extract into phospholipids nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 2015, 167, 189-195.

Charcosset C., El-Harati A., Fessi H., Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *Journal of Controlled Release*, 2005, 108,1, 112-120.

Colas J. C., Shi W., Rao V. S. N. M., Omri A., Mozafari M. R., Singh H., Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 2007, 38, 841-847.

De Paoli Tomas, Hager Alfredo Adolfo. Liposomes containing aqueous iron (II) and reducing agent, their preparation and food products/milk containing them as a source of bioavailable iron. Pat. NZ 26465394, 1996b.

De Paoli, Tomas, Hager, Alfredo A. Liposomes containing bioavailable iron (II) and process for obtaining them. Pat. USA 5534268, 1996a.

Degnan A., J., Luchansky J. B., Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocinAcH and liposome encapsulated pediocinAcH. *Journal of Food Protection*, 1992, 55, 552-554.

Dwiecki K., Górnaś P., Nogala-Kałużka M., Witkowski S., Polewski K., Wpływ izomerów optycznych  $\alpha$ -tokoferolu na przepuszczalność membrany lipidowej. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2005, 2, 43, Supl., 30-40.

Dwiecki K., Górnaś P., Wilk A., Nogala-Kałużka M., Polewski K., Spectroscopic studies of D- $\alpha$ -tokoferol concentration induced transformation in egg phosphatidylcholine vesicles. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2007a, 12, 51-69.

Dwiecki K., Polewski K., Wpływy genisteiny i daidzeiny na process rozpuszczania membrany lipidowej w obecności detergent. *Nauka Przyroda Technologie*, 2010, 4, 2-15.

Dwiecki K., Sieger A., Górnaś P., Nogala-Kałużka M., Polewski K., Oddziaływania membrany lipidowej z D- $\alpha$ -tokoferolem w zależności od jego stężenia. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2004, 3, 40, Supl., 37-44.

Dwiecki K., Górnaś P., Jackowiak H., Nogala-Kałużka M., Polewski K., The effect of D-alpha-tocopherol on the solubilization of dipalmitoylphosphatidylcholine membrane by anionic detergent solution sodium dodecyl sulfate. *Journal of Food Lipids*, 2007b, 14, 50-61.

Dwiecki K., Neunert G., Polewski P., Polewski K., Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, 96, 242-248.

Fan M., Xu S., Xia S., Zhang X., Effect of different preparation methods on physicochemical properties of salidro-side liposomes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2007, 55, 3089-3095.

Fang Z., Bhandari B., Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science and Technology*, 2010, 21, 510-523.

Gibbs B. F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C. N., Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1999, 50, 213-224.

Gibis M., Zeeb B., Weiss J., Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multi-layered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 2014, 38, 28-39.

Haynes L., Levine H., Finley J., Liposome composition for the stabilization of oxidizable substances Pat. USA 5015483, 1991.

International Standard ISO22412 Particles Size Analysis-Dynamic Light Scattering. International Organisation for Standardisation (ISO), 2008.

Keller B. C., Liposomes in nutrition. Trends in Food Science and Technology, 2001, 12, 25-31.

Khaedr E. E., Vuillemand J. C., El-Deeb S. A., Acceleration of Cheddar cheese lipolysis by using liposome-entrapped lipases. Journal of Food Science, 2002, 67, 486-492.

Khaedr E. E., Vuillemand J. C., El-Deeb S. A., Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on Cheddar cheese ripening. Food Research International, 2003, 36, 241-252.

Kirby C. J., Brooker B. E., Law B. A., Accelerated ripening of cheese using liposome-encapsulated enzyme. International Journal of Food Science and Technology, 1987, 22, 355-375.

Kozubek A., Wstęp do technologii liposomowej, 2004, Wrocław.

Laridi R., Khaedr E. E., Benech R. O., Vuillemand J. C., Lacroix C., Fillis I., Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. International Dairy Journal, 2003, 13, 325-336.

Lasic D. D., Kinetic and thermodynamic effects on the structure and formation of phosphatidylcholine vesicles. Hepatology, 1991, 13, 5, 1010-1012.

Lengerich B., Haynes L., Levine H., Otterburn M., Mathewson P., Finley J., Extrusion baking of cookies having liposome encapsulated ingredients, Pat. USA 4999208, 1991.

Lu Q., Li D. C., Jiang J. G., Preparation of tea polyphenol nanoliposomes system and its physicochemical properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 13004-13011.

Madden T. D., Harrigan P. R., Tai L. C. L., Bally M. B., Mayer L. D., Redelmeier T. E., Loughrey H. C., Tilcock C. P. S., Reinish L. W., Cullis P. R., The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: A survey. Chemistry and Physics of Lipids, 1990, 53, 1, 37-46.

Malheiros P. S., Daroit J. D., Brandelli A., Food Applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. Trends in Food Science and Technology, 2010, 21, 284-292.

Malkki Y., Vitranen E., Gastrointestinal effects of oats bran and oat gum: a review. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 2001, 34, 6, 337-347.

Marsanasco M., Marquez A. L., Wagner J. R., Alonso A. V., Chiaramoni N. S., Liposomes as vesicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. Food Research International, 2011, 44, 3039-3046.

McClements D. J., Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advanced in Colloids and Interface Science*, 2015, 219, 27-53.

Meure L. A., Foster N. R., Dehghani F., Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2008, 9, 3, 789-809.

Mozafari M. R., Bioactive entrapment and targeting using nanocarrier technologies: an introduction. W: Mozafari M. R., *Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotechnology*. Wydawnictwo Springer: The Netherlands, 2006a, 1-16.

Mozafari M. R., Flanagan J., Merino-Matia L., Awati A., Omri A., Suntres Z., Singh H., Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 2006b, 86, 13, 2038-2045.

Mozafari M. R., Johnson C., Hatziantoniou S., Demetzos C., Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 2008b, 18, 309-327.

Mozafari M. R., Khosravi-Darani K., Borazan G. G., Cui J., Pardakhty A., Yurdugul S., Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 2008a, 11, 833-844.

Neunert G., Górnaś P., Dwiecki. K., Sieger A., Polewski K., Synergistic and antagonistic effects between alpha-tocopherol and phenolic acids in liposome system: spectroscopic study. *European Food Research and Technology*, 2015, 241, 749-757.

Neunert G., Polewski P., Markiewicz M., Walejko P., Witkowski S. Polewski K., Partition of tocopheryl glucopyranoside into liposome membranes studied by fluorescence methods. *Biophysical Chemistry*, 2010, 146 92-97.

Paradkar A., Ambike A. A., Jadhav B. K., Mahadik K. R., Characterization of curcumin-PVP solid dispersion obtained by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 271, 281-286.

Pothakamury U. R., Barbosa-Canovas G. V., Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 2000, 6, 397-406.

Rodriguez-Nogales J., Lopez A. D., A novel approach to develop  $\beta$ -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. *International Dairy Journal*, 2006, 16, 354-360.

Sato K., Obinata K., Sugawara T., Urabe I., Yomoto T., Quantification of structural properties of cell-sized individual liposomes by flow cytometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102, 3, 171-178.

Sessa G., Weissmann G., Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, 1968, 9, 310-318.

Stone W. L., Smith M., Therapeutic uses of antioxidant liposomes. *Molecular Biotechnology*, 2004, 27, 3, 217-230.

- Takahashi M., Inafuku K. I., Miyagi T., Oku H., Wada K., Imura T., Kitamoto D., Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *Journal of Oleo Science*, 2007, 56, 1, 35-42.
- Tan C., Feng B., Zhang X., Xia W., Xia S., Biopolymer-coater liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids. *Foods Hydrocolloids*, 2016, 52, 774-784.
- Taylor M. L., Gaysinsky S., Davidson P. M., Bruce B. D., Weiss J., Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by  $\zeta$ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2007, 2, 1-9.
- Taylor T. M., Bruce B. D., Weiss J., Davidson P. M., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *Journal of Food Safety*, 2008, 28, 183-197.
- Teixeira M. L., Santos J., Silveira N. P., Brandelli A., Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria Monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2008, 9, 49-53.
- Ulrich A. S., Biophysical aspects of using liposomes as delivery vesicles. *Bioscience Reports*, 2002, 22, 2, 129-150.
- Um J. Y., Chung H., Kim K. S., Kwon I. C., Jeong S. Y., In vitro cellular interaction and absorption of dispersed cubic particles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 253, 71-80.
- Wagner A., Vorauer-Uhl K., Katinger H., Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2002, 54, 2, 213-219.
- Were L. M., Barry D. B., Davidson M. P., Weiss J., Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 8073-8079.
- Were L. M., Bruce B., Davidson P. M., Weiss J., Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 2004, 67, 922-927.

KINGA STUPER-SZABLEWSKA<sup>1</sup>, ANNA OSTROWSKA-KOŁODZIEJCZAK<sup>1</sup>,  
TOMASZ GÓRAL<sup>2</sup>, DANUTA KURASIAK-POPOWSKA<sup>3</sup>, JULIUSZ PERKOWSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Chemii*

*Wydział Technologii Drewna*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

*kstuper@up.poznan.pl*

<sup>2</sup>*Zakład Fitopatologii*

*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*

<sup>3</sup>*Katedra Genetyki Roślin*

*Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

## **AKTYWACJA NIEENZYMATYCZNYCH MECHANIZMÓW ODPORNOŚCIOWYCH PSZENICY W CELU PODNIESIENIA WARTOŚCI ZDROWOTNYCH PRODUKTÓW PSZENNYCH**

### **Streszczenie**

Podczas wegetacji zboża narażone są na różnego rodzaju czynniki stresogenne: biotyczne i abiotyczne. Wpływają one w istotny sposób na ich odporność, a co za tym idzie na jakość i bezpieczeństwo zdrowotne ziarna. W badaniach metabolizmu roślin, w tym również zbóż, coraz większą rolę odgrywają związki fenolowe i flawonoidy. Ma to jednoznaczny związek z warunkowaną poligenicznie odpornością rośliny na patogeny ze szczególnym uwzględnieniem grzybów toksynotwórczych.

Celem niniejszych badań była próba przedstawienia wpływu wybranych czynników stresogennych na zawartość wybranych kwasów fenolowych ziarna pszenicy.

Materiał badany stanowiło ziarno pszenicy kontrolne wzrastające bez ingerencji oraz ziarno pszenicy poddane różnym czynnikom stresogennym (n=30, masa: 1000g): ochrona chemiczna oraz infekcja grzybicza. Rozpatrywano również wpływ czynników abiotycznych takich jak temperatura i suma opadów na zawartość kwasów fenolowych.

Przeprowadzono analizę zawartości kwasów fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej ekstraktów uzyskanych z ziarna pszenicy.

Wyniki wskazują na istotny wpływ nie tylko kwasu ferulowego, ale także pochodnych kwasu cytrynowego na mechanizmy odpornościowe pszenicy aktywowane podczas stresu biotycznego.

W przypadku stresu abiotycznego w postaci zmiennych czynników pogodowych oraz ograniczonego dostępu do wody stwierdzono, iż nieenzymatyczne mechanizmy odpornościowe w postaci zwiększonej produkcji niektórych kwasów fenolowych nie zostały aktywowane.

Stymulacja nieenzymatycznych mechanizmów odpornościowych wpływa na zwiększoną produkcję kwasów fenolowych oraz wzrost aktywności przeciwutleniającej ziarna pszenicy. Wszystkie te składniki wpływają na podwyższenie wartości zdrowotnych produktów spożywczych otrzymanych z ziarna pszenicy.

**Słowa kluczowe:** kwasy fenolowe, pszenica, stres biotyczny, stres abiotyczny

### Wprowadzenie

Podwyższenie wartości prozdrowotnych produktów spożywczych może następować poprzez dodatek do produktu składników bioaktywnych lub przez sterowanie jakością surowca na etapie jego produkcji. W przypadku zbóż odbywa się to podczas wegetacji roślin na polu oraz na etapie doboru materiału siewnego. W ostatnim czasie znacząco wzrasta zainteresowanie biologicznymi metodami mającymi na celu podnoszenie walorów prozdrowotnych surowców roślinnych takich jak: poszukiwanie starych odmian, tworzenie nowych linii i odmian, stosowanie mikroorganizmów oraz ich metabolitów. Wszystkie w/w zabiegi mają na celu indukcję mechanizmów odpornościowych roślin co zwiększa zarówno jakość jak i bezpieczeństwo produktów. Czynniki wpływające w istotny sposób na jakość ziarna zbóż można podzielić na biotyczne i abiotyczne. Do czynników biotycznych należy: infekcja mikroorganizmów patogennych, zasiedlanie mikroorganizmami saprofitycznymi, kontakt z metabolitami mikroorganizmów, obecność owadów i innych roślin. Czynniki abiotyczne to głównie: temperatura (wysoka, chłód, mróz), promieniowanie świetlne (wysokie, niskie), susza, niedobór tlenu, czynniki mechaniczne (wiatr, pokrywa śnieżna, pokrywa lodowa) oraz związki chemiczne (zasolenie, toksyny, niedobór minerałów). Działanie na roślinę w/w czynników biotycznych i abiotycznych określane jest mianem stresu. W pierwszej kolejności przejawia się on spadkiem aktywności fotosyntetycznej rośliny. Następuje zmniejszenie powierzchni liści, szybszy rozpad barwników fotosyntetycznych, zakłócona jest czynność aparatów szparkowych i zachodzą niekorzystne zmiany w intensywności wymiany gazowej. Zmiany te bezpośrednio mogą prowadzić do pogorszenia jakości ziarna. Występowanie stresów prowadzi również do indukcji naturalnych mechanizmów odpornościowych roślin [Fernandez i in., 2011]. W wyniku ich działania produkowane są w komórkach roślinnych związki o charakterze bioaktywnym. Wśród nich istotną rolę pełnią związki o charakterze antyoksydacyjnym, a ich obecność w ziarnie zbóż, zależy w istotny sposób od rodzaju zboża, preferencji odmianowych oraz adaptacji rośliny do warunków środowiskowych podczas wzrostu i rozwoju. Obecność mikroorganizmów zarówno saprofitycznych jak i patogennych prowadzi może do zaburzenia naturalnej równowagi roślin uprawnych. Dochodzi wówczas do dominacji reakcji wolnorodnikowych o charakterze utleniającym [Lemańska i in., 2001]. Stan taki występujący w komórkach roślinnych nazywany jest stresem oksydacyjnym, podczas którego rośliny wykształcają antyoksydacyjny mechanizm obronny: enzymatyczny i nieenzymatyczny. Pierwszy z nich mechanizm enzymatyczny opiera się na enzymach antyoksydacyjnych [Borkowski i in., 2005]. Drugi rodzaj opiera się na niskocząsteczkowych przeciwutleniaczach, do których należą głównie związki fenolowe, które mogą opóźniać fazę inicjacji lub przerywać łańcuch reakcji wolnorodnikowych [Lemańska i in., 2004]. Obecność kwasów fenolowych w surowcu a co za tym idzie w produkcie finalnym jest korzystna ze względu na ich prozdrowotne właściwości. Poprzez ograniczenie oksydatywnej modyfikacji frakcji LDL, hamują proces powstawania blaszek miażdżycowych w naczyniach wieńcowych. Kwasy ferulowy i kawowy poza wysoką aktywnością przeciwutleniającą, posiadają właściwości przeciwnowotworowe. 5,8-Dihydrobenzofurany pochodzące od tych kwasów wykazują efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek raka sutka, okrężnicy

i białaczki. Kwas chlorogenowy, chroni komórki wątroby przed skażeniem czterochlorkiem węgla oraz izotopami kobaltu i kadmu. Ponadto hamuje przemiany kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) w ośrodkowym układzie nerwowym. Znane są również właściwości żółciopędne kwasów kawowego, chlorogenowego, syringowego, 3,4-dimetoksycynamonowego. Kwasy kawowy, waniliowy, p-kumarowy i p-hydroksybenzoesowy działają przeciwbakteryjnie, a kwas galusowy dodatkowo ściągająco i przeciwpotnie [Kris-Etherton i in., 2002].

Celem niniejszych badań była ocena wpływu wybranych czynników stresogennych na zawartość najistotniejszych kwasów fenolowych ziarna pszenicy. Przeprowadzone analizy chemiczne i matematyczne mają zweryfikować hipotezę, iż czynniki abiotyczne są odpowiedzialne za indukowanie enzymatycznych mechanizmów odpornościowych i nie wpływają na zawartość kwasów fenolowych. Druga hipoteza jest przeciwstawna i zakłada, iż stresy biotyczne wpływają na zawartość kwasów fenolowych w ziarnie pszenicy co jest związane z aktywacją nieenzymatycznych procesów antyoksydacyjnych.

### **Material i metody**

Materiał badany stanowiło ziarno pszenicy uprawianej w 3 lokalizacjach (Dłoń, Strzelce, Krzeczowice) w trzech wariantach: kontrola (rośliny wzrastały bez ingerencji) (K), pełna ochrona chemiczna (fungicyd: Duet Ultra 497 SC w stężeniu 0.6 l/ha, oraz Capalo 337.5 SE w stężeniu 2 l/ha) (POCH) oraz pszenica, która poddana została zmasowanej infekcji mieszaniną grzybów mikroskopowych: *F. culmorum* oraz *F. graminearum*. Dwa ostatnie warianty doświadczenia traktowane były jako czynniki biotyczne.

Analizowanymi czynnikami abiotycznymi były warunki pogodowe (temperatura i liczba opadów), przez cały okres wegetacji w trzech lokalizacjach.

Dojrzałe ziarno pszenicy poddano analizie na zawartość kwasów fenolowych.

Do analizy kwasów fenolowych pobierano próby ziarna o masie 10g. Próby mielono za pomocą młynka laboratoryjnego (WŻ-1). Masa próby do analizy wynosiła 0,20g. Próby umieszczano w zakręcanych probówkach do kultur o pojemności 17ml, gdzie przeprowadzono w pierwszej kolejności hydrolizę zasadową, a następnie kwasową. W celu przeprowadzenia hydrolizy zasadowej do próbek dodano 1ml wody destylowanej oraz 4ml 2-molowego wodnego roztworu wodorotlenku sodu. Szczelnie zamknięte próbówki ogrzewano na łaźni wodnej w temp. 95°C przez 30 min. Po schłodzeniu (około 20 minut) próbki poddano neutralizacji za pomocą 2ml 6-molowego wodnego roztworu kwasu solnego (pH=2). Następnie próby chłodzono w wodzie z lodem. Kwasy fenolowe ekstrahowano z fazy nieorganicznej za pomocą eteru dietylowego (2x2ml). Uzyskane ekstrakty eterowe na bieżąco przenoszono do fiolki o pojemności 8ml.

Następnie przeprowadzano hydrolizę kwasową. W tym celu do fazy wodnej dodawano 3ml 6-molowego wodnego roztworu kwasu solnego. Szczelnie zamknięte próbówki ogrzewano na łaźni wodnej w temp. 95°C przez 30 min. Po schłodzeniu w wodzie z lodem próbki poddano ekstrakcji za pomocą eteru dietylowego (2x2ml). Uzyskane ekstrakty eterowe na bieżąco przenoszono do fiolki o pojemności 8ml, po czym odparowano do sucha w strumieniu azotu.

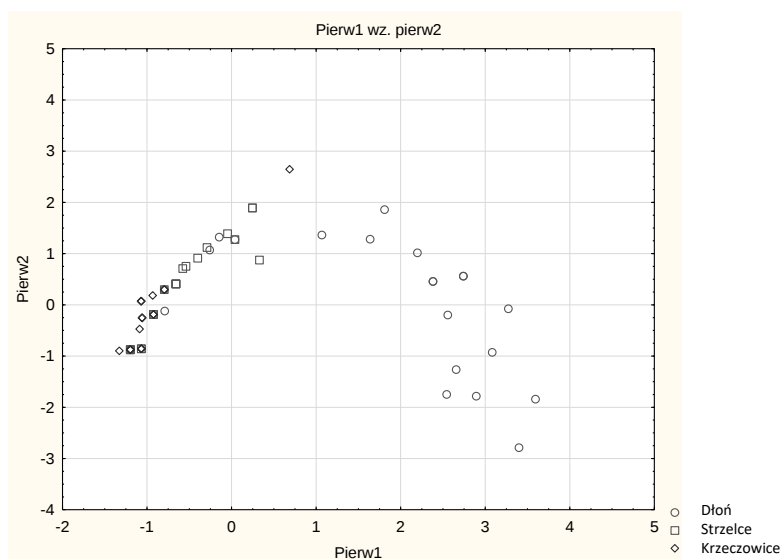
Przed rozpoczęciem analizy próby rozpuszczano w 1ml metanolu. Analizę przeprowadzono za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Waters SDS 501) z detektorem absorbcyjometrycznym (Waters 486 Tunable Absorbance Detector). Rozdział chromatograficzny odbywał się na kolumnie RP C-18, 250 x 4mm x 5µm, jako fazę wymywającą stosowano mieszaninę acetonitryl: 2% kwas octowy w wodzie (pH=2) (gradient). Pomiar stężenia kwasów fenolowych następował przy użyciu wzorca zewnętrznego przy długości fali  $\lambda=320$  nm. Identyfikacja związku odbywała się na podstawie porównania czasu retencji badanego piku (46,2 min) z czasem retencji standardu oraz poprzez dodanie do badanej próbki określonej ilości standardu i powtórna analizę. Poziom wykrywalności 1µg/g. Czasy retencji analizowanych kwasów wynoszą: galusowy: 8.85 min; 4-hydroksybenzoesowy: 19.46 min; wanilinowy: 24.11 min; kawowy: 26.19 min; syringowy: 28.05 min; wanilina; 33.20 min; p-kumarynowy: 40.20 min; benzoesowy: 44.50; ferulowy: 46.20 min; synapinowy: 48.00 min; t-cynamonowy: 52,40 min [Stuper-Szablewska i in., 2014].

Uzyskane wyniki poddano krokowej analizie dyskryminacyjnej mającej na celu ocenę wpływu poszczególnych czynników na profil badanych kwasów fenolowych.

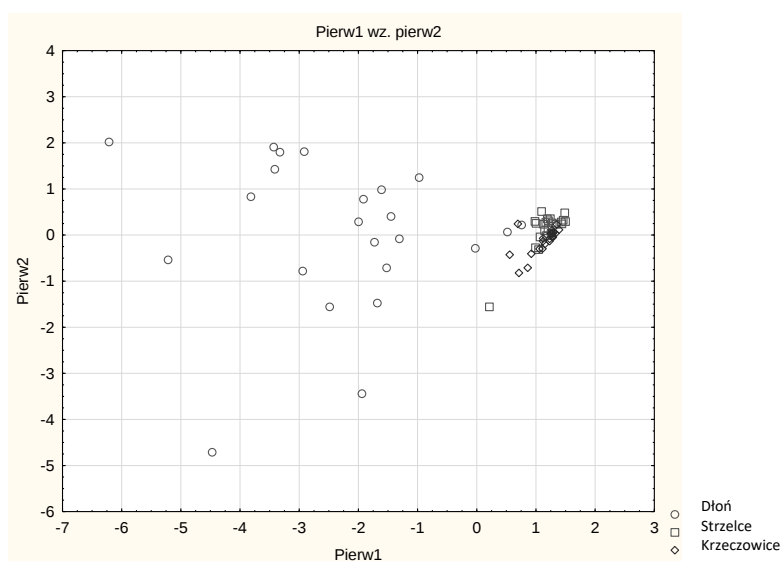
### Wyniki i dyskusja

Ziarno pszenicy pochodzące z 3 lokalizacji uprawiane w 3 wariantach doświadczalnych: kontrola (K), pełna ochrona chemiczna (POCH) oraz poddane infekcji grzybiczej (I) analizowano na zawartość kwasów fenolowych. Oznaczano stężenie następujących kwasów fenolowych: galusowego, 4 – hydroksybenzoesowego, wanilinowego, kawowego, syringowego, benzoesowego, p-kumarowego, ferulowego, synapowego i t- cynamonowego. Analizowane kwasy fenolowe należą do dwóch grup: kwasów fenylokarboksylowych (p-hydroksybenzoesowy, salicylowy, protokatechowy, wanilinowy, galusowy i elagowy) i kwasów fenylopropenowych (kawowy, p-kumarowy, ferulowy, synapinowy) [Boz, 2015].

Na podstawie uzyskanych wyników chemicznych wykonano analizę statystyczną mającą na celu zbadanie hipotez założonych w celu niniejszej pracy. W pierwszym etapie rozpatrywano wpływ warunków pogodowych zaliczanych do abiotycznych czynników stresogennych. Na rys.1. przedstawiono rozkład sumy kwasów fenolowych w analizowanych próbach w zależności od temperatury jaka panowała w danej lokalizacji. Stwierdzono brak istotnego wpływu tego parametru na profil badanych kwasów fenolowych. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku sumy opadów (Rys. 2).



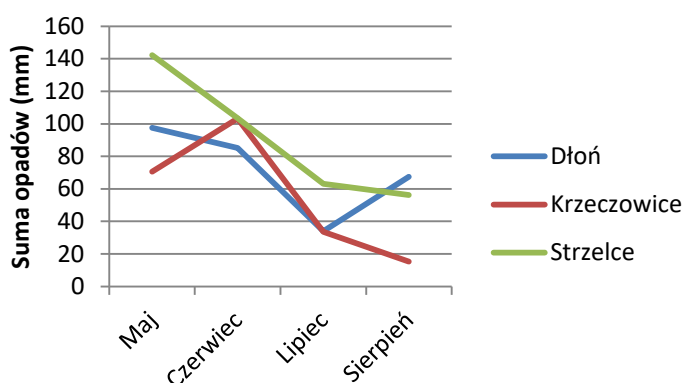
**Rysunek 1.** Wyniki krokowej analizy dyskryminacyjnej dla analizowanych kwasów fenolowych w zależności od lokalizacji i warunków temperatury



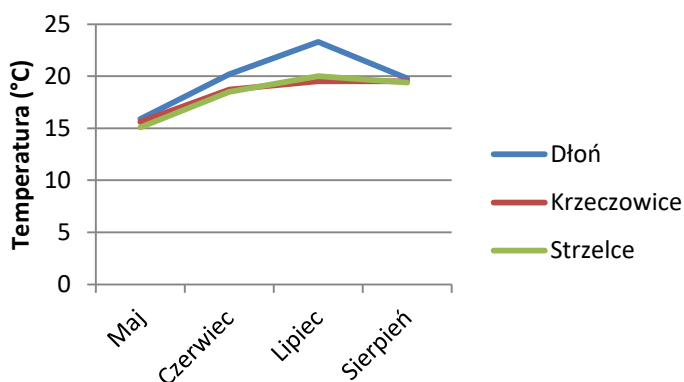
**Rysunek 2.** Wyniki krokowej analizy dyskryminacyjnej dla analizowanych kwasów fenolowych w zależności od lokalizacji i warunków sumy opadów

W ostatnim czasie wiele miejsca w literaturze przedmiotu zajmuje ustalenie dokładnych warunków meteorologicznych jakie są niezbędne do zajęcia fuzariozy kłosa oraz wzmożonej kumulacji toksyn w ziarnie. Podaje się, iż najistotniejsze są opady w czasie kwitnienia oraz podwyższona wilgotność w czasie wegetacji roślin [Stuper-Szablewska

i Perkowski, 2014]. Istotny wpływ na te czynniki wywiera również temperatura [Váňová i in., 2009]. Analizując warunki pogodowe, na podstawie danych uzyskanych z lokalnych stacji meteorologicznych można stwierdzić, iż w dwóch analizowanych lokalizacjach w miesiącu czerwcu suma opadów była istotnie większa (Rys. 3). Z kolei w lipcu zanotowano istotnie mniejsze opady. Dodatkowo we wszystkich analizowanych lokalizacjach w okresie najistotniejszym dla rozwoju patogena, tj. od końca maja do lipca zanotowano istotny wzrost temperatury. Analizując uzyskane wyniki dotyczące stężenia kwasów fenolowych stwierdzono, iż średnie ich wartości nie różnią się istotnie dla rozpatrywanych lokalizacji (na poziomie istotności  $\alpha=0,05$ ), co związane jest prawdopodobnie ze zbliżonymi warunkami pogodowymi przedstawiono na rysunku 3 i 4. Reasumując po bardzo wilgotnym maju i czerwcu nastąpił suchy lipiec co miało wpływ na niski poziom zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi ziarna pszenicy. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku analizowanych przez Perkowskiego i innych (2008) prób owsa. Uzyskane dane w niniejszej pracy są uzupełnieniem i potwierdzeniem prac Mesterhazego (2002) i Miedanera (1997) gdzie ukazali oni wpływ warunków pogodowych na rozwój fuzariozy.

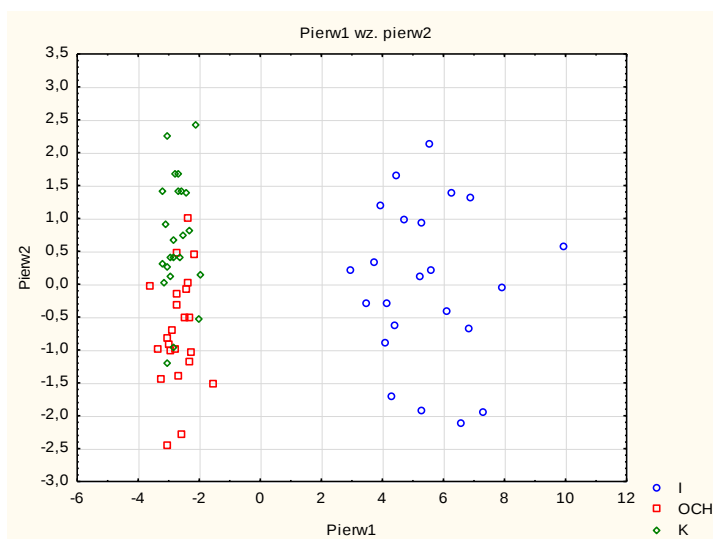


**Rysunek 3.** Suma opadów (mm) dla badanych lokalizacji



**Rysunek 4.** Średnia temperatura (°C) dla badanych lokalizacji

Drugim etapem analizy statystycznej uzyskanych wyników była krokowa analiza dyskryminacyjna (Rys. 5). Wykazała ona, iż biotyczne czynniki stresogenne, takie jak infekcja grzybicza oraz ochrona chemiczna mają istotny wpływ na profil kwasów fenolowych. Potwierdza to założoną tezę, iż stres biotyczny uruchamia nieenzymatyczny mechanizm antyoksydacyjny, natomiast czynniki abiotyczne nie mają istotnego wpływu na zawartość kwasów fenolowych. Indukowanie mechanizmów odpornościowych roślin jest niezwykle ważne, gdyż prowadzi do wytworzenia odpornych mieszańców, które nie wymagają ingerencji ochrony chemicznej, a co za tym idzie pozyskany w ten sposób surowiec jest bezpieczny dla konsumenta.



**Rysunek 5.** Wyniki krokowej analizy dyskryminacyjnej dla oznaczonych kwasów fenolowych w zależności od wariantu doświadczenia (I, K, OCH)

Przykładem wzrostu odporności rośliny na niekorzystne czynniki środowiskowe jest m.in. wywołanie u roślin indukowanej odporności nabytej (SAR) (LIT). W naturalnych warunkach pojawia się ona u roślin w wyniku działania patogenów (LIT). Jednym z mechanizmów, który odgrywa istotną rolę w odpowiedzi rośliny na czynniki stresogenne jest mechanizm antyoksydacyjny. Zaobserwowano tu istotny wpływ zmasowanej infekcji grzybów z rodzaju *Fusarium* na indukcję mechanizmu antyoksydacyjnego nieenzymatycznego, co również potwierdzają wyniki pomiaru zawartości kwasów fenolowych ogółem oraz aktywności przeciwutleniającej. Mechanizm biotransformacji kwasów fenolowych w wyniku działania grzybów mikroskopowych nie jest poznany. Prowadzone do tej pory badania związane były jedynie z wykorzystywaniem związków fenolowych przez bakterie na drodze ich metabolizmu. Badania prowadzone były w kulturach *in vitro*. Biokonwersja z kwasu ferulowego do waniliny została przebadana dla szeregu rodzajów i szczepów bakterii m.in. *Bacillus licheniformis* oraz *Streptomyces setonii* oraz *Amycolaptis* sp. Zazwyczaj akumulacja waniliny w badanych organizmach była niska, podobnie jak wydajność jej biotransformacji, co związane było z faktem, iż w etapie metabolizmu waniliny do kwasu wanilinowego poprzez dehydrogenazę wanilinową powstałe

związki traktowane były przez mikroorganizmy jako źródła węgla i energii. Dodatkowym efektem ubocznym jest toksyczny wpływ waniliny na mikroorganizmy w stężeniu wyższym, niż 1g/L. Kwas ferulowy wskazywany jest w literaturze jako najważniejszy kwas fenolowy występujący w ziarnie zbóż. Z prowadzonych badań literaturowych wynika, iż jest on biodegradowany przez mikroorganizmy obok waniliny również do kwasu syringinowego.

Stres wywołany działaniem ochrony chemicznej jest trudny do wytłumaczenia z uwagi na dwutorowe działanie środków ochrony chemicznej - wywołują one zmiany zarówno w roślinie, jak i w grzybach. W pracy wykorzystano związki z grupy triazoli (epoxyconazole); benzimidazoli (tiofanat metylu) i morfin (fenpropimorph). Mechanizm działania triazoli – największej grupy fungicydów systemicznych, polega na zamianie lanosterolu do ergosterolu w grzybach patogenicznych i ent-kaurenu do kwasu ent-kauronowego (prekursora giberelin) w roślinie [Rademacher, 1997]. Z kolei benzimidazole, które zakłócają podziały mitotyczne komórek grzybów, zaburzają też proces tworzenia  $\beta$ -tubuliny. W wyniku stresu wywołanego ochroną chemiczną mechanizm antyoksydacyjny nieenzymatyczny zostaje zmodyfikowany. Roślina mimo niewielkiej infekcji związanej z naturalnie występującymi mikroorganizmami poddana działaniu czynnika abiotycznego odpowiada wzmożoną produkcją kwasów fenolowych.

### Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż stresogenne czynniki abiotyczne (temperatura i suma opadów) nie wpływają w istotny sposób na profil kwasów fenolowych.

Czynniki biotyczne spowodowały wzmożoną produkcję kwasów fenolowych w ziarnie zainfekowanym oraz poddanym ochronie chemicznej w porównaniu z próbami kontrolnymi. Miało to miejsce w istotnie większym stopniu w przypadku prób zainfekowanych grzybami, w mniejszym natomiast, w przypadku ziarna poddanego pełnej ochronie chemicznej.

Przeprowadzone doświadczenia pozwalają na wyznaczenie naturalnych czynników odpowiedzialnych za indukowanie odporności nabytej roślin. Kompleksowe badania mechanizmów odpornościowych pozwalają na tworzenie nowych odmian, które są odporne na zmienne warunki środowiskowe oraz infekcje polowe. Efektem tego rodzaju prac jest pozyskiwanie bezpiecznych, bogatych w składniki odżywcze oraz bioaktywne surowców do wytwarzania wysokiej jakości produktów zbożowych.

*Badania finansowane w projekcie Narodowego Centrum Nauki 2012/07/B/NZ9/02385*

### Literatura

Borkowski T., Szumusiak H., Gliszczyńska-Świąło A., Rietjens I.M.C.M., Tyrakowska B., Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 5526-5534.

Boz H., Ferulic acid in cereals. *Czech Journal of Food Science*, 2015, 33 (1), 1-7.

Fernandez M.R., Sissons M.J., Conner R.L., Wang H., Clarke J.M., Influence of biotic and abiotic factors on dark discoloration of durum wheat kernels. *Crop Science*, 2011, 51 (3), 1205-1214.

Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Bioactive compounds in food: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 2002, 113, 71S-88S.

Lemańska K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Zieliński R., Rietjens I.M.C.M., The influence of pH on antioxidant properties and mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 31, 869-881.

Lemańska K., van der Woude H., Szymusiak H., Boersma M.G., Gliszczynska-Świgło A., Rietjens I.M.C.M., Tyrakowska B., The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin – a mechanistic insight. *Free Radical Research*, 2004, 38, 639-647.

Mesterhazy A., Theory and practice of the breeding for Fusarium head blight resistance in wheat. *Journal of Applied Genetics*, 2002, 43A, 289-302.

Miedaner T., Breeding wheat and rye for resistance to Fusarium diseases. *Plant Breeding*, 1997, 116, 201-220.

Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Szwajkowska-Michałek L., Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia*, 2008, 63, 542-547.

Stuper-Szablewska K., Kurasiak-Popowska D., Nawracała J., Perkowski J., Comparison of phenolic acids contents in various wheat genotypes. *Przemysł Chemiczny*, 2014, 93 (12), 2274-2278.

Stuper-Szablewska K., Perkowski J., Contamination of wheat grain with microscopic fungi and their metabolites in Poland in 2006–2009. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2014, 21 (3), 598–603.

Váňová M., Klem K., Matušinský P., Trnka M., Prediction model for deoxynivalenol in wheat grain based on weather conditions. *Plant Protection Science*, 2009, 45, 133–137.

AGNIESZKA MAKOWSKA<sup>1</sup>, PRZEMYSŁAW ŁUKASZ KOWALCZEWSKI<sup>1</sup>,  
GRZEGORZ GALIŃSKI<sup>2</sup>, SYLWIA CHUDY<sup>3</sup>, JAN MICHNIEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

*agmak@up.poznan.pl*

<sup>2</sup>*Katedra Higieny Żywienia Człowieka*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

<sup>3</sup>*Katedra Technologii Mleczarstwa*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

### WARTOŚĆ ŻYWIENIOWA EKSTRUDATÓW PSZENŻYTNICH NA PODSTAWIE BADAŃ *IN VIVO*

#### Streszczenie

Pszenżyto, to mieszańiec międzyrodzajowy, sztucznie wyhodowany przez człowieka poprzez skrzyżowanie pszenicy i żyta. Polska jest największym producentem tego zboża na świecie. Niestety, dotychczas wykorzystuje się je głównie na cele paszowe, wykazano jednak, że zboże to może być wykorzystane do produkcji żywności, w tym do wyrobów ekstrudowanych. Celem niniejszej pracy było określenie wartości żywieniowej ekstrudatów pszenżytnich w porównaniu z ekstrudatami pszennymi i żytnimi w badaniach *in vivo*.

Materiał badany stanowiły ekstrudaty pszenżytnie, pszenne i żytnie wytworzone przy użyciu ekstrudera jednoślismakowego TS-45 (Metalchem, Gliwice) oraz surowe pszenżyto jako materiał kontrolny (odniesienia).

Badania prowadzono na samcach szczurów rasy Wistar. Określono wskaźnik wykorzystania białka netto (NPU) badanych produktów oraz parametry ogólnozywieniowe i strawnościowe.

Pośród badanych ekstrudatów wyższymi wartościami wskaźnika NPU charakteryzowały się ekstrudaty żytnie niż pszenżytnie, najniższe wartości odnotowano dla ekstrudatów pszennych. Nie stwierdzono ujemnego wpływu procesu ekstruzji na wartość wskaźnika NPU. Najwyższy przyrost masy ciała odnotowano w grupie zwierząt karmionych ekstrudowanym pszenżytem. Również względny przyrost masy ciała i wydajność wzrostowa zwierząt karmionych dietą z pszenżyta ekstrudowanego były najwyższe. Niższe wartości badanych wskaźników niż dla diet ekstrudowanych, odnotowano w przypadku surowego pszenżyta.

**Słowa kluczowe:** badania *in vivo*, ekstruzja, parametry strawnościowe, pszenżyto.

#### Wprowadzenie

Pszenżyto jest mieszańcem rodzajowym pszenicy i żyta wyhodowanym przez człowieka pod koniec dziewiętnastego wieku [Skovmand i in., 1984]. Łączy ono w sobie

cechy obu rodzicielskich zbóż. Dawniej hodowane odmiany pszenżyta charakteryzowały się wprawdzie wysoką zawartością białka o korzystnym składzie aminokwasowym, lecz niestety małą stabilnością, co ograniczało możliwości jego zastosowania, m. in. w produkcji pieczywa [Haber, 1979]. Przez lata problemem była również wysoka aktywność enzymatyczna ziarna pszenżyta [Piasecka-Kwiatkowska i in., 2007]. Nastąpił jednak znaczący postęp w tym obszarze. Wśród obecnie uprawianych odmian są takie, które wykazują zmniejszoną podatność na porastanie [Peña, 2004] przy, w dalszym ciągu, wysokiej zawartości i korzystnym składzie jakościowym białek.

W Polsce pszenżyto zyskało dużą popularność w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych. Pod koniec dwudziestego wieku prace nad jego hodowlą i wykorzystaniem były prowadzone mniej intensywnie, ale na początku XXI wieku znów wzrosło zainteresowanie tym zbożem. Wśród krajów europejskich Polska jest liderem w jego produkcji. Aktualnie areał uprawy pszenżyta w Polsce jest porównywalny z areałem uprawy żyta [Łopaciuk, 2011].

Biorąc pod uwagę fakt, że w ostatniej dekadzie powierzchnia zasiewów pszenżyta wzrastała, przy zmniejszającym się areale uprawy żyta, wydaje się celowe kontynuowanie badań nad możliwością wykorzystania tego zboża nie tylko na cele paszowe, ale również jako surowca do produkcji żywności. Od lat prowadzone są badania w tym kierunku. Podejmowano próby zastosowania pszenżyta jako surowca do produkcji pieczywa, a także mąki do wyrobów cukierniczych, a nawet makaronów [Lorentz i in., 1972; Rakowska i Haber, 1991; Tsvetkov i Stoeva, 2003; Tohver i in., 2005; Achremowicz i in., 2014]. Wykazano, że z powodzeniem ziarno pszenżyta można też wykorzystywać jako surowiec do wytwarzania bioetanolu [Obuchowski i in., 2010]. Biorąc pod uwagę parametry jakościowe określające przydatność w przetwórstwie aktualnie hodowanych odmian pszenżyta, wydaje się, że jedyną przeszkodą ograniczającą zastosowanie produktów przemiału tego zboża do produkcji żywności może być gorsza jakość glutenu pszenżytniego i mniejsza jego wydajność w porównaniu z pszenicą chlebową. Ogranicza to w pewnym stopniu zastosowanie mąki pszenżytniej do produkcji pieczywa, ale stwarza możliwość wykorzystania ziarna tego gatunku do produkcji pieczywa cukierniczego trwałego, czy wafli. W tym przypadku mniejsza zawartość glutenu i gorsza jego jakość są cechami pożądanymi. Ze względu na słaby układ glutenowy można również podjąć próby wykorzystania tego zboża do produkcji wyrobów na drodze ekstruzji [Onwulata i in., 2000].

Zmiana stylu życia we współczesnym społeczeństwie, a także wzrastająca świadomość niebezpieczeństwa rozwoju chorób cywilizacyjnych sprawia, że konsument coraz częściej poszukuje wyrobów o właściwościach prozdrowotnych. Całozziarnowe produkty zbożowe, zawierające błonnik pokarmowy oraz substancje przeciwutleniające, ze względu na częstość ich spożywania, spełniają te wymagania [Zieliński i in., 2012]. Całozziarnowe produkty przekąskowe, wytwarzane metodą ekstruzji zwiększają asortyment produktów tego rodzaju. Ze względu na rosnącą popularność pszenżyta wydaje się celowe podjęcie badań mających na celu potwierdzenie tezy, że na bazie pszenżyta można wytworzyć pełnowartościowe produkty przekąskowe o wysokiej zawartości błonnika, oraz sprawdzenie w jaki sposób proces ekstruzji wpływa na ich wartość odżywczą.

## Material i metody

### Material badany

Material doświadczalny stanowiły ekstrudaty pszenżytnie - PŻE (z ziarna odmiany Baltiko), pszenne - PE (z ziarna odmiany Slade) i żytnie - ŻE (z ziarna odmiany Dankowskie Złote) oraz ziarno surowe pszenżyta - PŻS. Ekstrudaty wytwarzano w ekstruderze jednoślismakowym typu TS-45 (Metalchem, Gliwice), stosując wilgotność surowca 18% i temperaturę procesu 135/175/135°C. W tabeli 1 przedstawiono podstawowy skład chemiczny materiału badanego.

**Tabela 1.** Skład chemiczny ekstrudatów i surowca pszenżytniego użytych w doświadczeniach

|                      | Białko<br>[% s.m.] | Tłuszcz<br>[% s.m.] | Sacharydy<br>przyswajalne*<br>[% s.m.] | Błonnik<br>ogółem<br>[% s.m.] | Błonnik<br>rozpuszczalny<br>[% s.m.] |
|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| Ekstrudat pszenżytni | 13,1±0,1           | 1,46±0,02           | 69,2                                   | 14,4±0,3                      | 2,3±0,2                              |
| Ekstrudat żytni      | 10,8±0,2           | 1,51±0,03           | 67,9                                   | 18,5±0,2                      | 5,1±0,1                              |
| Ekstrudat pszenny    | 10,9±0,1           | 1,43±0,01           | 72,4                                   | 14,0±0,2                      | 2,0±0,2                              |
| Surowiec pszenżytni  | 13,0±0,0           | 1,48±0,02           | 70,92                                  | 14,6±0,2                      | 2,2±0,2                              |

\*- wyliczone na podstawie zawartości pozostałych składników

Badanie *in vivo* prowadzono wykorzystując w tym celu szczury laboratoryjne rasy Wistar (uchwała nr 82/2009 Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach). Doświadczenie przeprowadzono w zwierzętarni z oświetleniem sztucznym (w cyklu 12 godzin/12 godzin), w temperaturze 20-22°C i przy wilgotności względnej powietrza 55-60%.

### Określenie wartości wskaźnika wykorzystania białka netto - NPU

Badania prowadzono na samcach szczurów rasy Wistar w wieku 6 tygodni, o średniej początkowej masie 190 g. Wyodrębniono pięć grup zwierząt, liczących po sześć osobników oraz jedną grupę (kazeinowa), liczącą 4 osobniki. Szczury były karmione *ad libitum*, dietami przygotowanymi we własnym zakresie. Ich skład przedstawia tabela 2.

**Tabela 2.** Skład chemiczny diet testowych [g/kg diety]

| Składnik diety [g]        | Rodzaj diety |     |     |      |             |           |
|---------------------------|--------------|-----|-----|------|-------------|-----------|
|                           | PŻS          | PŻE | PE  | ŻE   | Bezbiałkowa | Kazeinowa |
| Skrobia pszenna           | 137          | 156 | 28  | 1    | 882         | 529       |
| Olej słonecznikowy        | 23           | 23  | 23  | 23   | 23          | 76        |
| Cukier                    |              |     |     |      |             | 200       |
| Skrobia ziemniaczana      |              |     |     |      | 50          | 50        |
| Mieszanka soli min.       | 35           | 35  | 35  | 35   | 35          | 35        |
| Mieszanka witaminowa      | 10           | 10  | 10  | 10   | 10          | 10        |
| Pszenny surowy (PŻS)      | 795          |     |     |      |             |           |
| Ekstrakt pszeniczny (PŻE) |              | 776 |     |      |             |           |
| Ekstrakt pszeniczny (PE)  |              |     | 904 |      |             |           |
| Ekstrakt żytni (ŻE)       |              |     |     | 931  |             |           |
| Kazeina                   |              |     |     |      |             | 100       |
| Suma                      |              |     |     | 1000 |             |           |

W celu scharakteryzowania pobrania diety przez zwierzęta, a następnie określenia ilości wbudowanego białka oznaczono: zawartość wody w tuszkach przed i po suszeniu [g], a następnie obliczono w nich:

- ilość azotu w tuszy N [g]:

$$N = \frac{2,95 + 0,025 * x}{100} * H_2O$$

gdzie: x – wiek szczurów [dni], H<sub>2</sub>O – zawartość wody w tuszy [g].

- ilość azotu spożytego N<sub>p</sub> [g]:

$$N_p = \left( \frac{R_d * sm_1}{100} - \frac{R_n * sm_2}{100} \right) * \frac{N\%}{sm_1}$$

gdzie: R<sub>d</sub> – reszta diety (nieskarmiona) (g), R<sub>n</sub> – niewyjadki (g), sm<sub>1</sub> – zawartość suchej masy w diecie (%), sm<sub>2</sub> – zawartość suchej masy w niewyjadkach (%), N% – zawartość azotu w diecie (%).

- wartość współczynnika wykorzystania białka netto NPU [%]:

$$NPU = \frac{N_t - N_{tdbb} + N_p dbb}{N_p} * 100$$

gdzie: N<sub>t</sub> – zawartość azotu w tuszkach zwierząt grupy żywionej dietą zawierającą badane białko (g), N<sub>t</sub> dbb – zawartość azotu w tuszkach zwierząt grupy żywionej dietą bezbiałkową (g), N<sub>p</sub> dbb – ilość azotu spożyta przez zwierzęta otrzymujące dietę bezbiałkową (azot pozabiałkowy) (g), N<sub>p</sub> – ilość azotu spożyta przez zwierzęta grupy otrzymującej dietę zawierającą badane białko (g).

W celu wyeliminowania wpływ warunków zewnętrznych na wartość NPU zastosowano współczynnik korekcyjny:

$$K = \frac{\text{standardowe NPU kazeiny}}{\text{NPU kazeiny w danym doświadczeniu}}$$

(standardowe NPU kazeiny = 70)

### Określenie parametrów ogólnożywnieniowych i strawnościowych

W doświadczeniu brały udział samce szczurów rasy Wistar, w wieku 10 tygodni, o początkowej masie ciała wynoszącej średnio 330 g. Szczury podzielono na 5 grup po 6 osobników i żywiono *ad libitum* następującymi dietami: Labofeed (dieta kontrolna) oraz 4ma innymi, wykonanymi we własnym zakresie.

Grupa 1 - kontrolna (dieta kontrolna Labofeed, zbilansowana)

Grupa 2 – pszenżyto surowe

Grupa 3 – pszenżyto ekstrudowane

Grupa 4 – żyto ekstrudowane

Grupa 5 – pszenica ekstrudowana

Skład chemiczny diet oznaczono wg obowiązujących norm. Energię metaboliczną diet obliczono w oparciu o równoważniki energetyczne Atwatera netto.

Dla scharakteryzowania pobrania i wykorzystania paszy przez zwierzęta określono:

- spożycie diety (w tym poszczególnych jej składników) [g/10 dni],
- pobranie energii z diety [MJ/10 dni] wg wzoru:

$$\text{pobranie energii} = \frac{(B * 4 + T * 9 + WP * 4 + SDF * 2) * 4,184}{1000}$$

gdzie: B – ilość spożytego białka, T – ilość spożytego tłuszczu, WP – ilość spożytych węglowodanów przyswajalnych, SDF – ilość spożytego błonnika rozpuszczalnego,

- przyrost masy ciała [g/10 dni],
- wydajność wzrostową diety [g/MJ],
- wydajność wzrostową diety wg wzoru:

$$\text{wydajność wzrostowa diety} = \frac{\text{przyrost masy ciała}}{\text{pobranie energii}}$$

- ilość wydalonego kału, a wraz z nim poszczególnych składników wchodzących w skład diety [ g/10 dni],
- strawność pozorną wymienionych składników [%] wg wzoru:

$$\text{wsp. strawności} = \frac{\text{ilość skł. spoż.} - \text{ilość skł. wydal.}}{\text{ilość skł. spożytego}} * 100$$

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy programu Statistica 10 (StatSoft). Inc., Tulsa, OK., USA). Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W przypadku wykazania istotnych różnic wykonano analizę post-hoc, stosując test Scheffé'go.

### Wyniki i dyskusja

Wartość biologiczna białka zawartego w zbożach nie jest wysoka. Uzależniona jest ona od zawartości aminokwasów egzogennych. W przypadku zbóż aminokwasem egzogennym, którego jest stosunkowo najmniej jest lizyna. Niska jej zawartość powoduje, że białko zawarte w zbożach nie może być w pełni wykorzystane przez organizm człowieka [Chrenková i in., 2000]. Poza tym proces ekstruzji, podczas którego (w bardzo krótkim czasie) panują drastyczne warunki, może prowadzić do zmniejszenia dostępności białka na skutek reakcji lizyny z cukrami prostymi (reakcje Maillarda).

W ramach doświadczenia mającego na celu określenie wartości biologicznej białka pszenżyta i wpływu na nią procesu ekstruzji, określono ilość spożytej diety przez poszczególne grupy zwierząt, przyrost masy ich ciała w czasie trwania doświadczenia, a także zawartość wody w tuszkach. Bardzo wysoka istotna korelacja między zawartością wody a ilością azotu w tuszkach zwierząt (dotyczy zwierząt w okresie 24-43 dni życia) pozwala, na podstawie określonej ilości wody w tuszkach, oszacować zawartość w nich azotu i jednocześnie obliczenie wartości współczynnika NPU [Rakowska i in., 1978].

**Tabela 3.** Wskaźniki żywieniowe służące określeniu NPU analizowanych diet

| Rodzaj diety         | Spożycie diety<br>[g/10dni] | Przyrost masy ciała<br>[g/10 dni] | Zawartość wody w tuszkach<br>[g] | Zawartość azotu w tuszkach<br>[g] | NPU skor.<br>[%] |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| Bezbiałkowa          | 125±23                      | -48±3                             | 103,9±4,7                        | 4,1±0,2                           |                  |
| Ekstrudat pszenżytni | 249±12                      | 22±5                              | 141,8±2,3                        | 5,6±0,1                           | 51±5             |
| Ekstrudat żytni      | 272±13                      | 41±4                              | 152,9±6,8                        | 6,1±0,3                           | 57±8             |
| Ekstrudat pszenny    | 242±15                      | 24±3                              | -                                | -                                 | -                |
| Surowe pszenżyto     | 247±27                      | 23±7                              | 144,7±8,7                        | 5,7±0,3                           | 49±5             |
| Kazeinowa            | 170±103                     | 21±18                             | 146,2±17,0                       | 5,9±0,7                           | 70±21            |

Ilość spożytej diety przez poszczególne grupy zwierząt różniła się (tab. 3). Największe ilości diety spożyły zwierzęta karmione dietą z ekstrudatem żytnim, natomiast ilość spożytej diety zawierającej surowe pszenżyto, pszenżyto ekstrudowane, jak i ekstrudat pszenny była taka sama. Przyrost masy ciała zwierząt doświadczalnych był najbardziej intensywny w przypadku diety zawierającej ekstrudat żytni (spożycie tej diety również było największe). Mniej intensywny wzrost odnotowano w przypadku pozostałych diet. Przyrost masy ciała nie jest jednak bezpośrednim wyznacznikiem jakości białka w diecie, wynika raczej z ilości spożytej diety. Na podstawie zawartości wody w tuszkach, obliczono w nich zawartość azotu, a następnie wartość NPU. Spośród badanych ekstrudatów, produkty żytnie

w porównaniu z pszenżytniami charakteryzowały się wyższymi wartościami NPU. Wynika to najprawdopodobniej z różnic w składzie aminokwasowym białka żytniego i pszenżytniego, a przede wszystkim z zawartości w nich lizyny. Żyto zawiera prawdopodobnie więcej lizyny. Wprawdzie Haber [1979] stwierdził, że skład aminokwasowy pszenżyta jest korzystniejszy od pszenicy, a nawet od żyta, to istnieją jednak również doniesienia twierdzące, że poziom lizyny w pszenżycie jest zbliżony do jej zawartości w pszenicy i niższy niż w życie. Wskazuje to na fakt, że uprawiane w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia odmiany pszenżyta rzeczywiście zawierały więcej białka (nawet do 18%) i miały korzystniejszy skład aminokwasowy białka, jednak w miarę postępu prac hodowlanych obecnie uprawiane odmiany zawierają mniej białka, oraz lizyny [Górny, 2005]. Pomimo istniejących różnic uzyskanych w tym doświadczeniu można mówić jedynie o pewnym trendzie, gdyż analiza statystyczna nie potwierdziła istotności różnic pomiędzy uzyskanymi wartościami NPU. Nie wykazano także wpływu procesu ekstruzji na wyznaczone wartości NPU. Z jednej strony wartości te mogą ulec zmniejszeniu, ze względu na reakcję lizyny z cukrami redukującymi (reakcje Maillarda), z drugiej natomiast może dojść do zniszczenia inhibitorów, które ograniczają trawienie białka. Wartość współczynnika NPU dla diety zawierającej surowe pszenżyto była niższa niż dla zawierającej ekstrudat pszenżytni, co może sugerować, że podczas ekstruzji prawdopodobnie uległy zniszczeniu obecne w surowym ziarnie substancje o charakterze inhibitorów [Singh i in., 2007].

W kolejnym doświadczeniu analizowano parametry ogólnozywieniowe i strawnościowe ekstrudatów pszenżytnich, żytnich i pszennych oraz surowego pszenżyta. Wpływ na strawność mogą mieć takie czynniki jak: skład chemiczny diety, sposób jej obróbki technologicznej, stopień rozdrobnienia, ilość zawartych w niej substancji niestrawnych, skład i ilość wydzielanych soków trawiennych, czy intensywność ruchów perystaltycznych [Gawęcki i Jeszka, 1995].

**Tabela 4.** Parametry ogólnozywieniowe i strawnościowe analizowanych diet

| Rodzaj diety           | Przyrost masy ciała |         | Wydajność wzrostowa diety [g/MJ] | Strawność pozorna [%] |                    |                   |                   |
|------------------------|---------------------|---------|----------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|                        | [g/10 dni]          | [%]     |                                  | diety                 | białka             | tłuszczu          | sachary-ów        |
| Kontrolna              | 26±4 <sup>b</sup>   | 7,6±0,4 | 9,7±0,8 <sup>c</sup>             | 78±0 <sup>a</sup>     | 77±1 <sup>b</sup>  | 82±3 <sup>c</sup> | 83±1 <sup>a</sup> |
| Pszenżyto surowe       | 12±4 <sup>a</sup>   | 3,7±1,1 | 4,8±1,3 <sup>a</sup>             | 91±0 <sup>b</sup>     | 83±1 <sup>c</sup>  | 81±2 <sup>c</sup> | 94±1 <sup>b</sup> |
| Pszenżyto ekstrudowane | 22±8 <sup>ab</sup>  | 6,5±2,1 | 7,3±2,1 <sup>b</sup>             | 91±1 <sup>b</sup>     | 81±1 <sup>bc</sup> | 76±2 <sup>b</sup> | 93±1 <sup>b</sup> |
| Żyto ekstrudowane      | 16±4 <sup>ab</sup>  | 4,7±1,3 | 5,8±1,3 <sup>ab</sup>            | 89±1 <sup>b</sup>     | 73±2 <sup>a</sup>  | 73±5 <sup>a</sup> | 92±1 <sup>b</sup> |
| Pszenica ekstrudowana  | 17±9 <sup>ab</sup>  | 5,2±2,8 | 5,5±2,3 <sup>ab</sup>            | 90±1 <sup>b</sup>     | 78±1 <sup>b</sup>  | 78±2 <sup>b</sup> | 93±1 <sup>b</sup> |

Różne litery w kolumnach wskazują na istotne statystycznie różnice (p<0,05)

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najwyższy przyrost masy ciała w ciągu całego doświadczenia odnotowano w grupie zwierząt karmionych ekstrudowanym pszenżycem (tab. 4). Również względny przyrost masy ciała i wydajność wzrostowa diety

z pszenżyta ekstrudowanego były najwyższe. Niższe wartości niż dla diet ekstrudowanych odnotowano w przypadku surowego pszenżyta.

Strawność pozorna wszystkich analizowanych diet była zbliżona (brak istotnych statystycznie różnic). Strawność zaś podstawowych jej składników była najwyższa dla surowego pszenżyta. Analiza statystyczna wykazała jednak, że istotne różnice występują tylko między strawnością pozorną białka i tłuszczu diet z surowego pszenżyta i ekstrudowanego żyta.

Analizując wpływ procesu ekstruzji na badane wyróżniki strawnościowe diety stwierdzono, że strawność pozorna białka, tłuszczu i węglowodanów diety z surowym pszenżytem jest wyższa w porównaniu do diety z pszenżytem ekstrudowanym. Różnice te są jednak istotne statystycznie tylko w przypadku strawności tłuszczu. W przypadku pozostałych różnic można mówić jedynie o trendzie. Niższa strawność pozorna tłuszczu prawdopodobnie wynika z faktu, że tłuszcze w drastycznych warunkach ekstruzji łączą się z frakcją amylozową skrobi, tworząc niedostępne dla enzymów trawiennych kompleksy [Bhatnagar i Hanna, 1994].

Analizując wpływ użytego do ekstruzji surowca, najwyższą strawność białka odnotowano w przypadku ekstrudatów pszenżytnich. W poprzednim doświadczeniu stwierdzono, że nieco wyższą wartość NPU odnotowano dla ekstrudatu żytniego. W tym przypadku stwierdzono jednak, że to właśnie z diety pszenżytniej więcej białka zostało strawione, a aminokwasy zostały wchłonięte. W niniejszym etapie strawność białka oznaczano na podstawie zawartości białka w diecie, ilości spożytej diety, ilości wydalonego kału i zawartości w nim białka.

Najwyższą strawność pozorną tłuszczu stwierdzono w przypadku ekstrudatu pszennego, nieznacznie niższą pszenżytniego, natomiast istotnie niższe wartości uzyskano w przypadku diety zawierającej ekstrudat żytni. Przyczyną tego prawdopodobnie jest większa niż w przypadku pszenicy i pszenżyta ilość frakcji rozpuszczalnych błonnika pokarmowego w diecie zawierającej żyto. Ziarno żyta bogate jest w arabinoksylany, główne składniki substancji pentozanowych [Michniewicz, 1995], które mogą ograniczać wchłanianie tłuszczu, poprzez wiązanie w świetle jelita soli kwasów żółciowych [Hasik i in., 1997].

### Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych badań *in vivo* nie wykazano istotnych różnic między oznaczonymi wartościami wskaźników NPU (wykorzystania białka netto) pszenżyta przed i po ekstruzji, jak również pomiędzy żytem i pszenżytem.
2. Analizując wpływ procesu ekstruzji na strawność diety z pszenżytem surowym i ekstrudowanym stwierdzono, że proces ten wpłynął na zmniejszenie strawności pozornej tłuszczu, nie wpłynął natomiast na strawność pozorną białka i sacharydów. Nie wykazano też wpływu ekstruzji na strawność pozorną diety. Proces ekstruzji natomiast istotnie wpłynął na zwiększenie wartości odżywczej, określonej jako wydajność wzrostowa diety.
3. Analizując wpływ ekstrudowanego rodzaju zboża wykazano, że dieta zawierająca ekstrudaty z pszenżyta charakteryzowała się najwyższą strawnością białka, natomiast z ekstrudatem pszennym najwyższą strawnością tłuszczu.

*Praca naukowa finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego nr 3669/B/P01/2009/37.*

### Literatura

Achremowicz B., Ceglińska A., Gambuś H., Haber T., Obiedziński M., Technologiczne wykorzystanie ziarna pszenżyta. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2014, 1, 113-120.

Bhatnagar S., Hanna M.A., Amylose-lipid complex formation during single-screw extrusion of various corn starches. *Cereal Chemistry*, 1994, 71 (6), 582-586.

Chrenková M., Čerešňáková Z., Sommer A., Gálová Z., Králová V., Assessment of nutritional value in spelt (*Triticum spelta* L.) and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by chemical and biological methods. *Czech Journal of Animal Science*, 2000, 45, 133-137.

Gawęcki J., Jeszka J., *Żywnienie człowieka. Ćwiczenia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1995.

Górny A.G., *Zarys genetyki zbóż. Tom. 2 Pszenżyto, kukurydza i owies*. Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, 2005.

Haber T., *Studia porównawcze nad charakterystyką biochemiczną i technologiczną niektórych rodów Triticale wyhodowanych w Polsce w porównaniu z pszenicami i żytem*. SGGW-AR, 1979.

Hasik J., Dobrzańska A., Bartnikowska E., *Rola włókna roślinnego w żywieniu człowieka*, SGGW, 1997.

Łopaciuk W., *Światowy rynek zbóż. Rynek zbóż – stan i perspektywy*, 2011.

Lorenz K., Dildaver W., Lough J., Evaluation of triticale for the manufacture of noodles. *Journal of Food Science*, 1972, 37, 764-767.

Michniewicz J., *Pentozany w technologii zbóż*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Poznań, 1995.

Obuchowski W., Banaszak Z., Makowska A., Łuczak M., Factors affecting usefulness of triticale grain for bioethanol production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90, 2506-2511.

Onwulata C.I., Konstance R.P., Strange E.D., Smith P.W., Holsinger V.H., High-fiber snacks extruded from triticale and wheat formulations. *Cereal Foods World*, 2000, 45, 470-473.

Peña R.J., Food uses of triticale. W: Mergoum M i Gómez-Macpherson H (red.), *Triticale improvement and production*. FAO Plant production and protection paper 179, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2004, 37-49.

Piasecka-Kwiatkowska D., Madaj D., Warchalewski J.R., The biological activity of wheat, rye and triticale varieties harvested in four consecutive years. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 2007, 5 (1), 55-66.

Rakowska M., Haber T., Baking Quality of winter triticale. In Proc. 2nd Int. Triticale Symp., Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil, 1991, 428-434.

Rakowska M., Szkiłłądziowa W., Kunachowicz H., Biologiczna wartość białka żywności. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1978.

Singh S., Gamlath S., Lara Wakeling L., "Nutritional aspects of food extrusion: a review. International Journal of Food Science & Technology, 2007, 42 (8), 2007, 916-929.

Skovmand B., Fox P.N., Villareal R.L., Triticale in commercial agriculture: progress and promise. Advances in Agronomy, 1984, 37, 1-45.

Tohver M., Kann A., Täht R., Mihhalevski A., Hakman J., Quality of triticale cultivars suitable for growing and bread-making in northern conditions. Food Chemistry, 2005, 89 (1), 125-132.

Tsvetkov M. Stoeva I., Bread making quality of winter hexaploid triticale (X Triticosecale Wittmack) in Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2003, 9, 203-208.

Zieliński H., Achremowicz B., Przygodzka, M., Przeciwtleniacze ziarniaków zbóż. Żywność. Nauka, Technologia, Jakość, 2012, 1 (80), 5-26.

ROMAN ZIELONKA, LESZEK JAROSŁAWSKI

*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych*

*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*

*im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*

*remi@man.poznan.pl*

### **PRZEBIEG HYDROLIZY NIESKLEIKOWANEJ SKROBI ZIEMNIACZANEJ Z UDZIAŁEM RÓŻNYCH ENZYMATYCZNYCH UKŁADÓW AMYLOLITYCZNYCH**

#### **Streszczenie**

W celu określenia działania enzymów amylolitycznych na nieskleikowaną skrobię, przeprowadzono hydrolizę z zastosowaniem skrobi ziemniaczanej w postaci wodnej zawiesiny ziarenek. Ziarenka poddawano działaniu jednego enzymu (dekstrynogeny UD) lub dwóch enzymów w postaci ich mieszanin (maltogeny UM, glukogeny UG). Oceniano aktywność układów enzymatycznych UM i UG za pomocą opracowanej metodyki kontrolnej. Wyniki hydrolizy odnoszono do odpowiednich warunków bez udziału enzymów (OO).

Próby prowadzono przy 25% stężeniu skrobi, w temperaturze 45°C, przy zachowaniu postaci ziarnistej skrobi, kontrolując przebieg reakcji po 2, 6, 24 i 48 godzinach. Określano wydajność procesu, stopień scukrzenia produktów, ich stopień polimeryzacji oraz skład cukrowy. Scharakteryzowano przebieg hydrolizy skrobi nieskleikowanej w funkcji czasu, przy stałym stężeniu reagentów i stałej temperaturze.

Po 48 godzinach hydrolizy enzymem dekstrynogenym (UD) uzyskano wydajność na poziomie 9,1%, enzymami maltogennymi (UM) 15,5% oraz glukogennymi (UG) 18,4%. Stopień polimeryzacji wynosił odpowiednio  $DP=3,01$ ;  $DP=2,04$  i  $DP=1,01$ . Pomimo zastosowania niekonwencjonalnej metody hydrolizy, skład cukrowy otrzymanych produktów był typowy dla zastosowanych enzymów.

**Słowa kluczowe:** enzymy amylolityczne, skrobia ziemniaczana nieskleikowana, hydroliza niskotemperaturowa.

#### **Wprowadzenie**

Skrobia ziemniaczana, stanowiąca energetyczny zapas rośliny, uzyskiwana jest przez wydobycie ziarenek skrobiowych z komórek bulwy ziemniaka. Zarówno skrobia naturalna (natywna), jak i przetworzona, wykazuje się właściwościami zagęszczająco-stabilizacyjnymi, stąd znajduje zastosowanie w wielu produktach spożywczych i technicznych.

Ze względu na sposób przetworzenia skrobi, wyróżnia się skrobie modyfikowane fizycznie, chemicznie lub enzymatycznie [Leszczyński, 2005]. W procesie przemysłowego, enzymatycznego przetwarzania skrobi otrzymuje się maltodekstryny, różnego rodzaju syropy, w tym maltozowe, a także glukozę krystaliczną. Hydrolizaty stanowią mieszaninę różnych cukrów, a ich skład zależny jest od użytych enzymów amylolitycznych. Enzymy

te wykazują się swoistymi, specyficznymi właściwościami, a ich odpowiednie wykorzystanie pozwala uzyskać nową jakość produktów.

Enzymatycznie przetwarzane skrobie naturalne w środowisku wodnym, w podwyższonej temperaturze, w pierwszym etapie poddawane są tzw. upłynnieniu (w obecności enzymu dekstrynującego). W taki sposób wytwarzane są maltodekstryny, natomiast, po wprowadzeniu drugiego enzymu, scukrzającego, można w drugim etapie otrzymać różne hydrolizaty skrobiowe: maltozowe, glukozowe czy inne.

Warunkiem skutecznego działania enzymów amylolitycznych na skrobię jest poddawanie jej procesowi kleikowania [Marrel i in., 2002]. Kleikowanie jest procesem hydrotermicznym, zachodzącym podczas ogrzewania wodnej zawiesiny ziarenek skrobi. W czasie kleikowania, uporządkowana cząsteczkowo krystaliczna struktura ziarenek skrobi przechodzi w stan nieuporządkowany - amorficzny; następuje rozrywanie wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami amylozy, tworzącymi fragmenty krystaliczne ziarenka skrobiowego. Woda wnika pomiędzy nie i tworzy nowe połączenia wodorowe z uwolnionymi łańcuchami tego sacharydu. Absorpcja wody prowadzi do pęcznienia i ewentualnego rozbicia ziarenek skrobi. W wyniku zmniejszania się stopnia uporządkowania makrocząsteczki skrobi, zmieniają się właściwości skrobi, która staje się rozpuszczalna. Proces ten jest zależny od temperatury i proporcji między skrobią i wodą [Maaruf i in., 2001]. Wartości temperatury kleikowania skrobi ziemniaczanej są już od dawna znane: początek wyraźnego pęcznienia - 46,2°C, zakres temperatury kleikowania - od 56 do 66°C [Nowotny, 1969; Tegge, 2010].

W ostatnich czasach, niektóre ośrodki podjęły badania nad hydrolizą nieskleikowanej skrobi, szczególnie ze względu na możliwość zmniejszenia zużycia energii w procesach. Sposób enzymatycznej hydrolizy skrobi ziemniaczanej prowadzi się w temperaturze 30°C÷45°C, stosując typowe, termostabilne enzymy amylolityczne, w wodnej zawieszynie ziarenek, w różnych stężeniach skrobi, w jedynym, wybranym czasie hydrolizy, 24 godzin. [Słomińska i in., 2012]. Przy stężeniu skrobi 10% uzyskiwano kilkunastoprocentową wydajność procesu.

W niskich temperaturach prowadzi się także badania wpływu enzymów amylolitycznych na skrobię różnego pochodzenia botanicznego, stosując preparaty enzymatyczne zawierające alfa-amylazę lub mieszaninę enzymów amylolitycznych (alfa-amylaza + glukoamylaza). Na skrobię kukurydzianą, uzyskaną z różnych frakcji zmielonego ziarna kukurydzianego, działa się w temperaturze 45°C preparatem enzymatycznym f-my Novozymes, Franklinton, NC, USA - GSHE NS50040, stanowiącym mieszaninę glukoamylazy i alfa-amylazy [Vidal i in., 2009]. Hydrolizę naturalnej skrobi (skrobi tapiokowej, skrobi ze słodkich ziemniaków) prowadzi się z udziałem handlowych preparatów alfa-amylazy i glukoamylazy o nazwie STARGEN 001™ f-my Genecor International, B.V., w temperaturze 35°C, przez 24 godziny [Shariff i in., 2009]. Stwierdzono, że efektywność działania enzymu można zwiększyć poprzez dodatkowe ogrzewanie skrobi w temperaturze 60°C przez 30 minut; w przypadku skrobi tapiokowej, wartość DE wzrosła z 36 do 50, a w przypadku skrobi ze słodkich ziemniaków - z 27 do 34. Działanie preparatu enzymatycznego STARGEN 001™ sprawdzano również wobec naturalnej skrobi kukurydzianej [Wang i in., 2007]. Inny zespół badawczy, także z udziałem preparatu STARGEN 001™, wykonał próby fermentacji w procesie jednoczesnej hydrolizy

i fermentacji etanolowej natywnej skrobi kukurydzianej metodą okresowo-dolewową, z dobrą wydajnością, przy temperaturze 35°C÷40°C [Szymanowska i Grajek, 2009]. W warunkach laboratoryjnych działano oczyszczoną alfa-amylazą na skrobię ziemniaczaną, w temperaturze 50°C, stwierdzając obecność ziarenek skrobi, po reakcji [Sujka i Jamroz, 2010]. Stosowano też świńską, trzuskową alfa-amylazę w hydrolizie skrobi pszennej, uzyskując 19% cukrów redukujących [Blazek i Copeland, 2010]. Prowadzono także hydrolizę skrobi naturalnej, różnego pochodzenia botanicznego (skrobia kukurydziana, ryżowa, tapiokowa, ziemniaczana), stosując częściowo oczyszczoną alfa-amylazę, uzyskaną z bakterii *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2, w temperaturze 50°C [Puspari i in., 2011]. Stwierdzono, że uzyskany produkt, stanowiący mieszaninę niskich oligosacharydów (od maltozy do maltoheksaozy, z niewielką ilością glukozy), może stanowić surowiec do produkcji bioetanolu.

Opisy powyższe wskazują, że nieskleikowana skrobia różnego pochodzenia botanicznego, traktowana różnymi preparatami enzymatycznymi, w różnych temperaturach, przy różnych czasach reakcji, podlega działaniu enzymów, lecz - opornie. Stąd, nadal należy poszukiwać nowych metod. Jedną z nich jest prowadzenie hydrolizy surowej skrobi kukurydzianej (stężenie zawiesiny - 5%, 15% i 31% s.s. skrobi), w temperaturze 61°C, w czasie 96 godzin, gdzie stosowano preparat alfa-amylazy (z *Anoxybacillus flavothermus*), wytwarzany przez firmę Novozymes, Dania – AFA [Tawil i in., 2012]. W próbie, o stężeniu 31% skrobi, po 2 godzinach reakcji, uzyskano 60% konwersji, a po 48 godzinach - 77%.

W wyżej przytoczonych pracach stosowano różne preparaty enzymatyczne. Założeniem niniejszych badań jest uzyskanie hydrolizatów w procesie hydrolizy skrobi ziemniaczanej w postaci nieskleikowanej. Ta metoda hydrolizy związana jest z innym sposobem traktowania skrobi enzymami. Tradycyjna metoda enzymatycznej hydrolizy jest metodą dwuetapową. W pierwszym etapie tradycyjnej metody realizuje się tzw. "upłynnianie" (kleikowanie i wstępna hydroliza) z udziałem enzymu dekskrynującego. W drugim etapie kontynuuje się hydrolizę z udziałem innego enzymu tzw. scukrzającego. Prowadzenie hydrolizy jednoetapowej (wprowadzenie jednocześnie dwóch enzymów) pozwala na uproszczenie i przyspieszenie procesu, bowiem równocześnie przebiega dekskrynowanie i scukrzanie. Trudność procesu jednoetapowego polega na, znalezieniu proporcji między enzymem dekskrynującym a scukrzającym. W związku z tym wykonano serię badań testowych, poszukując odpowiednich układów enzymatycznych. Wykorzystując właściwości danych enzymów - można modelować skład sacharydowy hydrolizatów i jednocześnie ich właściwości użytkowe. Przyjęto przy tym, że po uzyskaniu stanu równowagi hydrolizy, powinno się otrzymać produkty charakteryzujące się stopniem polimeryzacji (DP) ok. 3-4 (co odpowiada wysokoscukrzonym maltodekstrynom), DP ok. 2 (co odpowiada syropom wysokomaltozowym) oraz DP ok. 1 (co odpowiada glukozie). Przyjęte układy enzymatyczne mogą być zastosowane w procesach hydrolizy skrobi nieskleikowanej.

Celem niniejszej pracy jest ocena przebiegu hydrolizy skrobi ziemniaczanej nieskleikowanej, w środowisku wodnym, katalizowanej różnymi enzymami amylolitycznymi (dekstrynogennymi, maltogennymi, glukogennymi).

## **Materiały i metody**

### **Materiały**

Skrobia ziemniaczana (Superior Standard) firmy Nowamyl (Łobez, Polska), enzymy amylolityczne: dekstrynogeny (Liquozyme Supra), maltogeny (Maltogenase 4000L), glukogeny (AMG 300 L) firmy Novozymes (Dania).

### **Metoda prowadzenia hydrolizy skrobi**

Badania przebiegu hydrolizy prowadzono przy wielkości pojedynczej próbki 40,0g, o stężeniu skrobi 25% (10,0g. s. s. skrobi) i dawce układów enzymatycznych 0,1ml/100g. s.s. skrobi. Wcześniej przygotowano układy enzymatyczne: glukogeny (UG) jako mieszaninę Liquozyme Supra i AMG 300 L (w proporcji 2:3), maltogeny (UM) jako mieszaninę Liquozyme Supra i Maltogenase 4000 L (w proporcji 2:3), dekstrynogeny (UD) jako pojedynczy enzym Liquozyme Supra. Próbą kontrolną (OO) hydrolizy było zastosowanie wody destylowanej, zastępującej dawkę enzymu. Dla UG zastosowano pH 4,6, a dla UM, UD i OO zastosowano pH 5,3.

### **Metodyka kontroli aktywności układów enzymatycznych**

Pojedyncze enzymy, wymienione w materiałach, firmy Novozymes, powszechnie dostępne i stosunkowo tanie, charakteryzują się stabilną, standardową aktywnością. Zmieszane enzymy, w formie układów, są także tanie, można łatwo prowadzić hydrolizę jednoetapową - prosto i wygodnie. Znane metody oznaczania aktywności pojedynczych enzymów nie nadają się do oznaczania aktywności układów enzymatycznych, stąd zaproponowano specjalną, uniwersalną metodę kontroli aktywności układów enzymatycznych. Ta metoda pozwala określić aktywność układów enzymatycznych poprzez stopień polimeryzacji w produktach hydrolizy i stopień konwersji skrobi, w warunkach temperaturowych pełnego skleikowania skrobi ziemniaczanej (68°C). Zastosowano 10-krotnie większą dawkę enzymów w stosunku do badań wg „*Metody prowadzenia hydrolizy skrobi*”.

Do wytarowanej kolby odważano ilość skrobi ziemniaczanej, odpowiadającej 10,0g s.s. skrobi, korygowano pH, wprowadzano wybrany układ enzymatyczny w ilości 0,1ml, tj. 1ml/100g s.s. i uzupełniano próbkę wodą do 40,0g. Hydrolizę skrobi prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 68°C. Następnie, próbkę schładzano do temperatury 20°C, a na koniec uzupełniano wodą destylowaną do masy wyjściowej 40,0g i oznaczano stężenie rozpuszczalnych produktów hydrolizy (supernatant)  $c_e$  [%] oraz stężenie cukrów redukujących  $c_r$  [%]. Obliczano średni stopień polimeryzacji sacharydu  $DP = c_e/c_r$  oraz stopień konwersji  $K = c_e \times 100$  [%]/s, gdzie s - 25,0% s. s. skrobi.

Pozytywny wynik kontroli aktywności danych układów enzymatycznych określano wg wartości DP, gdzie dla UM wartość DP powinna wynosić  $1,9^{\pm 0,1}$  i  $K > 95\%$ , a dla UG wartość DP powinna wynosić  $1,1^{\pm 0,1}$  i  $K > 100\%$ . Pozytywny wynik dla niniejszych badań jest poprawny jedynie w przypadku ujemnej tzw. „próby jodowej”, świadczącej o braku obecności w próbce skrobi niehydrolizowanej.

### Metodyka oznaczania wydajności hydrolizy skrobi nieskleikowanej

Oznaczanie prowadzono poprzez hydrolizę skrobi przy wielkości próbki 400,0g, o stężeniu skrobi 25% (100,0g. s. s. skrobi) i dawce układów enzymatycznych 0,1ml/100g. s.s. skrobi. Hydrolizę prowadzono w temperaturze 45°C, a parametry oznaczano po czasie 48 godzin. Badania prowadzono ilościowo, mieszając skrobię w zawiesinie, ogrzewając próbkę w wybranej temperaturze, a na koniec hydrolizy, schładzano próbkę do 20°C. Następnie, wodą destylowaną uzupełniano ubytek odparowanej masy. Składniki zawiesiny rozdzielano w wirówce, ważono klarowny supernatant i oznaczano stężenie suchej substancji. Osad przenoszono ilościowo wodą, składniki zawiesiny rozdzielano na próżniowym lejku Buchnera, osad (placek filtracyjny) przepłukiwano wodą, a filtrat ważono i oznaczano stężenie suchej substancji. Obliczano, na podstawie wzoru, wskaźnik uzysku „ $w_u$ ”, jako ilość masy suchej substancji, powstałych rozpuszczalnych produktów hydrolizy, w stosunku do masy suchej substancji skrobi wyjściowej:

$$w_u = [m_{e1} \times c_{e1} + m_{e2} \times c_{e2}] / s [\%],$$

gdzie:

$m_{e1}$  - masa produktu rozpuszczalnego 1 [g],

$m_{e2}$  - masa produktu rozpuszczalnego 2 [g],

$c_{e1}$  - stężenie produktu rozpuszczalnego 1 [%],

$c_{e2}$  - stężenie produktu rozpuszczalnego 2 [%],

$s$  - wyjściowa masa suchej substancji skrobi [g].

Uwaga! stężenie produktów rozpuszczalnych ( $c_{e1}$ ,  $c_{e2}$ ) określano na podstawie oznaczeń refraktometrycznych.

Oznaczano: stężenie produktów hydrolizy [%], zawartość cukrów redukujących [%], pH, próbę jodową - zgodnie z PN-EN ISO 5377:2001.

Składy sacharydowe oznaczano z zastosowaniem wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Zestaw chromatograficzny (Waters Division of Millipore) wyposażony był w przepływowy detektor refraktometryczny (typ 410) i pompę (typ 501). Do rozdzielania używano kolumnę HPX42. Próbkę eluowano wodą z natężeniem przepływu 0,6 ml/min., w temp. 85°C. Czas trwania analizy - 30 min. Kolumnę testowano z użyciem standardów poszczególnych cukrów.

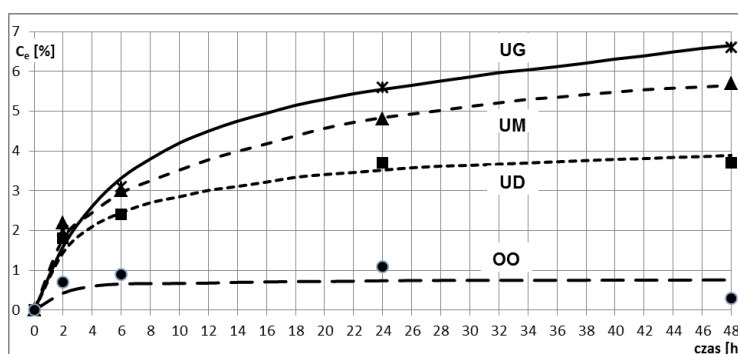
Badania prowadzono stosując jeden enzym UD lub dwa zmieszane enzymy, w dwóch różnych układach (układ dekstryno-maltogenny UM oraz układ dekstryno-glukogenny UG). Prowadzono hydrolizę jednoetapową, w temperaturze 45°C, tj. nieco poniżej temperatury pęcznienia skrobi ziemniaczanej. Określano parametry jakościowe i ilościowe otrzymanych hydrolizatów skrobiowych. Określano także stopień polimeryzacji produktów hydrolizy oraz zależności kinetyczne względem produktów.

## Wyniki i dyskusja

Wyniki, przedstawione w tabeli 1 i na rys.1 jednoznacznie wskazują na efektywne działanie zarówno pojedynczego enzymu dekstrynogenego, jak i w połączeniu z innymi enzymami (scukrzającymi).

**Tabela 1.** Przebieg hydrolizy skrobi nieskleikowanej i charakterystyka hydrolizatów

| Nr próby | kod | stężenie. skrobi [%] | dawka enz. [ml/10g ss skr.] | temp. [°C] | czas [h] | stęż. prod. hydr. $c_e$ [%] | zaw. cukr. reduk $c_r$ [%] | DP          |
|----------|-----|----------------------|-----------------------------|------------|----------|-----------------------------|----------------------------|-------------|
| 1.       | OO  | 25                   | 0,00                        | 45         | 2        | 0,71                        | 0,00                       | -           |
| 2.       | UD  | 25                   | 0,01                        | 45         | 2        | 1,82                        | 0,45                       | 4,00        |
| 3.       | UM  | 25                   | 0,01                        | 45         | 2        | 2,17                        | 0,89                       | 2,40        |
| 4.       | UG  | 25                   | 0,01                        | 45         | 2        | 1,96                        | 1,96                       | 1,00        |
| 5.       | OO  | 25                   | 0,00                        | 45         | 6        | 0,89                        | 0,00                       | -           |
| 6.       | UD  | 25                   | 0,01                        | 45         | 6        | 2,44                        | 0,63                       | 3,90        |
| 7.       | UM  | 25                   | 0,01                        | 45         | 6        | 2,99                        | 1,35                       | 2,20        |
| 8.       | UG  | 25                   | 0,01                        | 45         | 6        | 3,12                        | 2,75                       | 1,10        |
| 9.       | OO  | 25                   | 0,00                        | 45         | 24       | 1,06                        | 0,00                       | -           |
| 10.      | UD  | 25                   | 0,01                        | 45         | 24       | 3,69                        | 1,17                       | 3,10        |
| 11.      | UM  | 25                   | 0,01                        | 45         | 24       | 4,82                        | 2,56                       | 1,90        |
| 12.      | UG  | 25                   | 0,01                        | 45         | 24       | 5,56                        | 5,28                       | 1,10        |
| 13.      | OO  | 25                   | 0,00                        | 45         | 48       | 0,29                        | 0,00                       | -           |
| 14.      | UD  | 25                   | 0,01                        | 45         | 48       | 3,73                        | 1,24                       | <b>3,01</b> |
| 15.      | UM  | 25                   | 0,01                        | 45         | 48       | 5,70                        | 2,80                       | <b>2,04</b> |
| 16.      | UG  | 25                   | 0,01                        | 45         | 48       | 6,57                        | 6,50                       | <b>1,01</b> |

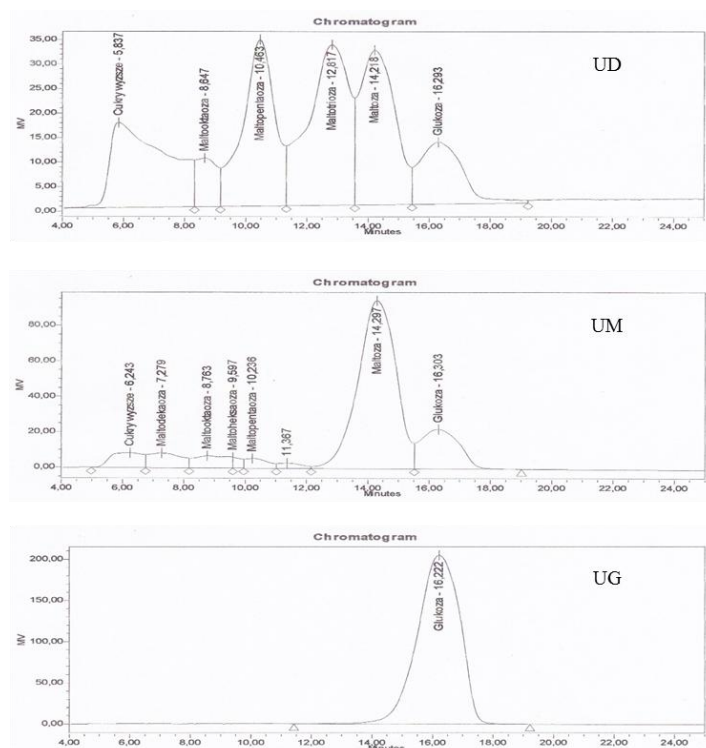


**Rysunek 1.** Stężenie produktów hydrolizy ( $c_e$ ) w zależności od czasu hydrolizy nieskleikowanej skrobi ziemniaczanej, dla różnych układów enzymatycznych

Stwierdzono również, że stężenia hydrolizatów, a także zawartość cukrów redukujących, szybko się zwiększały, natomiast przy dłuższym czasie (48 godzin), zbliżały się wolno do równowagi hydrolizy. Najwięcej cukrów rozpuszczalnych powstało w wyniku hydrolizy katalizowanej enzymami glukogennymi (6,57% s.s.), nieco mniej maltogennymi (5,70% s.s.), a najmniej enzymem dekstrynogennym (3,73% s.s.). Dla krótszych czasów reakcji (poniżej 6 godzin) odpowiednie wartości hydrolizatów są wyraźnie niższe, a różnice między nimi (UG, UM, UD) są znacznie mniejsze. Ziarenka skrobi ziemniaczanej, w środowisku wodnym, w temperaturze 45°C, bez obecności enzymów (OO), są rozpuszczalne w stopniu niewielkim (poniżej 1%), natomiast nie stwierdzono obecności

cukrów redukujących. Przy niewielkich stężeniach roztworów, poniżej 1%, opisane metody są mniej dokładne. Dlatego w dalszych badaniach wydajnościowych (tabela 2) nie uwzględniano wyników układu OO.

Po 48 godzinach hydrolizy, zawartość cukrów redukujących wynosiła odpowiednio: dla UD 1,24%, dla UM 2,80%, dla UG 6,50%, a stopień polimeryzacji (DP) wyniósł odpowiednio: 3,01; 2,04 i 1,01. Przebieg hydrolizy, w temperaturze 45°C, wskazuje, że po 48 godzinach, wydajności produktów zbliżają się do stanu równowagi. Dalsze wydłużenie czasu stało się mało efektywne.



**Rysunek 2.** Skład produktów hydrolizy skrobi katalizowanej enzymami (czas hydrolizy 48 godzin)

Potwierdzeniem poprawnego działania układów enzymatycznych: UD, UM, UG, w procesie jednoetapowej hydrolizy nieskleikowanej skrobi, jest analiza chromatograficzna (HPLC). Składy sacharydowe (rys. 2) były typowe dla zastosowanych enzymów, zbliżone do tych, które uzyskuje się w procesach dwuetapowych, w temperaturach wyższych, tj. w warunkach pełnego kleikowania skrobi [Jarosławski i in., 2000a; Jarosławski i in., 2000b; Jarosławski i Zielonka, 2000]. Posiłkując się składem sacharydowym, korzystając ze znanych właściwości funkcjonalnych produktów hydrolizy, istnieje możliwość wytworzenia różnych produktów spożywczych np.:

- maltodekstryn dla układu UD,
- syropów maltozowych dla układu UM,
- glukozy dla układu UG.

W niniejszych badaniach uzyskano hydrolizaty, charakteryzujące się stosunkowo niskim stężeniem suchej substancji, nawet po 48 godzinach hydrolizy ( UD 3,73%, UM 5,70%, 6,57%). Stąd, wytwarzanie produktów rynkowych wymaga dodatkowego zagęszczenia roztworów, natomiast bezpośrednio można je wykorzystać w procesach biotechnologicznych.

**Tabela 2.** Parametry wydajnościowe hydrolizy skrobi nieskleikowanej i wskaźnik uzysku, wg metodyk (czas hydrolizy 48 godzin)

| Produkty rozpuszczalne<br>otrzymane ze 100g s.s. skrobi |                     |                                       |
|---------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| kod                                                     | parametr            | wskaźnik uzysku<br>w <sub>u</sub> [%] |
| OO                                                      | m <sub>e1</sub> [g] | -                                     |
|                                                         | C <sub>e1</sub> [%] | -                                     |
|                                                         | m <sub>e2</sub> [g] | -                                     |
|                                                         | C <sub>e2</sub> [%] | -                                     |
| UD                                                      | m <sub>e1</sub> [g] | 238,35                                |
|                                                         | C <sub>e1</sub> [%] | 3,33                                  |
|                                                         | m <sub>e2</sub> [g] | 1428,45                               |
|                                                         | C <sub>e2</sub> [%] | 0,08                                  |
| UM                                                      | m <sub>e1</sub> [g] | 245,78                                |
|                                                         | C <sub>e1</sub> [%] | 5,09                                  |
|                                                         | m <sub>e2</sub> [g] | 1350,85                               |
|                                                         | C <sub>e2</sub> [%] | 0,22                                  |
| UG                                                      | m <sub>e1</sub> [g] | 254,17                                |
|                                                         | C <sub>e1</sub> [%] | 6,03                                  |
|                                                         | m <sub>e2</sub> [g] | 1274,56                               |
|                                                         | C <sub>e2</sub> [%] | 0,24                                  |

Określano wydajność hydrolizy poprzez wskaźniki uzysku „ $w_u$ ”, dla poszczególnych układów enzymatycznych, w temperaturze 45°C, przez 48 godzin, dla próbek o wielkości 400,0g (100g s.s. skrobi). Wyniki przedstawiono w tab. 2.

Wyliczony wskaźnik uzysku „ $w_u$ ”, wg podanego wcześniej wzoru, wskazuje na różnice działania układów enzymatycznych. Najwyższe wyniki (18,4% i 15,3%) uzyskano dla hydrolizy glukogennej (UG) i maltogennej (UM), a najmniejsze (9,1%) dla hydrolizy dekstrynogennej (UD).

### Wnioski

1. Nieskleikowana skrobia, w temperaturze 45°C, podlega działaniu zarówno jednego enzymu - dekstrynogenego (UD), jak i zmieszanych dwóch enzymów (UM i UG).
2. Średni stopień polimeryzacji produktów, po 48 godzinach hydrolizy, wynosi 3,0 dla enzymatycznego układu dekstrynogenego, 2,0 dla maltogenego i 1,0 dla glukogenego.

3. Prowadząc hydrolizę w czasie do 48 godzin, obserwuje się stabilizację parametrów, takich jak: stężenie suchej substancji, zawartość cukrów redukujących oraz stopień polimeryzacji produktów hydrolizy.
4. Wskaźniki uzysku, po 48 godzinach doświadczenia, wynoszą: dla enzymatycznego układu dekstrynogenego (UD)  $w_u=9,1\%$ , maltogenego (UM)  $w_u=15,5\%$ , dla glukogenego (UG)  $w_u=18,4\%$ .
5. Składy sacharydowe produktów hydrolizy świadczą o przewadze maltooligosacharydów w procesie dekstrynogenym UD, o przewadze maltozy w procesie maltogenym UM oraz przewadze glukozy w procesie glukogenym UG.
6. Uzyskiwane produkty hydrolizy nadają się do bezpośredniego wykorzystania w procesach fermentacyjnych, biotechnologicznych lub do dalszego przetworzenia.
7. Przebieg hydrolizy w temperaturze  $45^{\circ}\text{C}$  wskazuje, że po 48 godzinach, enzymatyczne reakcje hydrolizy zbliżają się do stanu równowagi. Dalsze wydłużanie czasu staje się mało efektywne.

### Literatura

Blazek J., Copeland L., Amylolysis of wheat starches. I. Digestion kinetics of starches with varying functional properties. *Journal of Cereal Science*, 2010, 51, 265-270.

Jarosławski L., Zielonka R., Piasecki M., Hydrolizaty skrobiowe a możliwości kształtowania pożądanych cech produktów spożywczych. *Cukiernictwo*, 2000, 2, 30-35.

Jarosławski L., Zielonka R., Piasecki M., Hydrolizaty skrobiowe – charakterystyka i zastosowanie. *Cukiernictwo*, 2000, 4, 32-36.

Jarosławski L., Zielonka R., Charakterystyka i możliwości zastosowania syropów maltozowych w wyrobach cukierniczych. *Cukiernictwo*, 2000, 5, 32-37.

Leszczyński W., Kierunki wykorzystania skrobi ziemniaczanej. *Ziemniak Polski*, 2005, 3, 31-38.

Maaruf A.G., Che ManY.B., Asbi B.A., Junainah A.H., Kennedy J.F., Effect of water content on the gelatinisation temperature of sago starch. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 46, 4, 331-337.

Marrel M.J.E.C.V.D., Veen B.V.D., Uitdehaag J.C.M., Leembuis H., Dijkhuizen L., Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 2002, 94, 137-155.

Nowotny F., Ogólne właściwości skrobi. W: Nowotny F., Skrobia. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 1969, 18-80.

Puspasari F., Nurachman Z., Noer A.S., Radjasa O.K., Maarel M.J.E.C., Dessy N., Characteristics of raw degrading  $\alpha$ -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 associated with soft coral *Sinularia* sp. *Starch/Stärke*, 2011, 63, 461- 467.

Shariffa Y.N., Karim A.A., Fazilah A., Zaidul I.S.M., Enzymatic Hydrolysis of granular native and mildly heat - treated tapioca and sweet potato starches and subgelatinization temperature. *Food Hydrocolloids*, 2009, 2 (23), 434-440.

Słomińska L., Zielonka R., Jarosławski L., Buszka M., Hydroliza nieskleikowanej skrobi ziemniaczanej preparatami enzymów amylolitycznych. *Biuletyn Instytutu i Aklimatyzacji Roślin*, 2012, 266, 151-161.

Sujka M., Jamroz J., Characteristics of pores in native and hydrolyzed starch granules. *Starch/ Stärke*, 2010, 62, 229–235.

Szymanowska D., Grajek W., Fed – Batch Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of native corn starch. *Acta Scientiarum Polonorum*, 2009, 8 (4), 5-16.

Tawil G., ViksØ-Nielsen A., Rolland-Sabatè A., Colonna P., Bulèon A., Hydrolysis of concentrated raw starch: A new efficient  $\alpha$ -amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87, 46-52.

Tegge G., Skrobia i jej pochodne, Wydanie I, Polskie Towarzystwo Technologów Żywności Oddział Małopolski, Kraków, 2010.

Vidal B.C., Rausch K.D., Tumbleson M.E., Singh V.: Kinetics of granular starch hydrolysis in corn dry-grind process. *Starch/Stärke*, 2009, 61, 448-456.

Wang P., Singh V., Johnston D.B., Ruch K.D., Tumbleson M.E., Comparison of raw starch hydrolyzing enzyme with conventional liquefaction and saccharification enzymes in dry-grind corn processing. *Cereal Chemistry*, 2007, 1 (84), 10-14.

LESZEK JAROSŁAWSKI, KRZYSZTOF PRZYGOŃSKI, ROMAN ZIELONKA  
*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych*  
*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*  
*im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie*  
*remi@man.poznan.pl*

## **PRZEBIEG PROCESU KARMElizACJI W WARUNKACH PRZEMYSŁOWEJ PRODUKCJI KARMElu AMONIAKALNEGO**

### **Streszczenie**

Karmel amoniakalny jest produktem powszechnie stosowanym do barwienia wyrobów spożywczych i paszowych. Dążąc do poprawy jakości karmelu amoniakalnego, w technice jego wytwarzania wprowadzono zmiany, umożliwiające podgrzewanie masy reakcyjnej (redukujące monosacharydy w formie zatężonego roztworu o stężeniu  $82^{\pm 0,5^\circ}\text{Bx}$ ) przy stosunkowo niskiej różnicy temperatur ( $10\text{--}20^\circ\text{C}$ ) między czynnikami: podgrzewanym i podgrzewającym.

Celem pracy była ocena przebiegu procesu karmelizacji w warunkach zmodernizowanej instalacji do produkcji przemysłowej. Ocenę tę prowadzono, oznaczając - w trakcie przebiegu procesu karmelizacji, realizowanego systemem szarżowym, w warunkach ciśnienia atmosferycznego, w temperaturze  $114\text{--}116^\circ\text{C}$  - następujące parametry: siłę barwienia, zawartość cukrów redukujących, stężenie suchej substancji, pH, 4-metyloimidazol (4-MeI). Stosując różne dawki reagenta, którym był roztwór amoniaku (25%) jako źródło jonu  $\text{NH}_4^+$ , uzyskano gotowe karmele o standardowej sile barwienia ( $0,30^{\pm 0,02}$ ), które poddano testowi z kwasem solnym jako kryterium ich przydatności do stosowania w produktach kwaśnych. Stwierdzono, że przydatnością odznaczały się karmele wytworzone przy stężeniu jonu  $\text{NH}_4^+$  na poziomie nie niższym niż 0,66%. Stąd, przeprowadzono dokładną ocenę przebiegu procesu karmelizacji dla tego stężenia jonu  $\text{NH}_4^+$ . Stwierdzono, że w miarę zaawansowania reakcji karmelizacji wzrastała siła barwienia i zawartość 4-MeI, przy czym przyrost siły barwienia wykazywał wyższą intensywność niż przyrost 4-MeI. W otrzymanych karmelach zawartość substancji szkodliwej (4-MeI) była około ośmiokrotnie niższa w od poziomu dopuszczonego prawem UE ( $\leq 200\text{ mg/kg}$ ).

**Słowa kluczowe:** karmelizacja, karmel amoniakalny, barwnik spożywczy, 4-metyloimidazol

### **Wprowadzenie**

Reakcja karmelizacji jest jedną z dróg prowadzących do brązowienia produktów spożywczych, której mechanizm zaliczany jest do tzw. nieenzymatycznego brązowienia żywności [Ziembka, 1966; Tomasik i in., 1989]. Karmelizacja polega na ogrzewaniu cukrów w temperaturze powyżej  $100^\circ\text{C}$  [Tomasik i in., 1989; Mitka i Nowak, 2005b]. Karmelizacji łatwiej ulegają cukry redukujące [Masłowska i Więdołcha, 2004]. W wyniku obróbki termicznej cukrów, najczęściej w formie zatężonych roztworów, obserwuje się stopniowe

nasilanie barwy od żółtej do ciemnobrązowej oraz narastanie charakterystycznego smaku i aromatu.

Reakcję karmelizacji, naturalnie zachodzącą w trakcie cieplnej obróbki produktów spożywczych, np. podczas prażenia kawy, wykorzystano do przemysłowej produkcji powszechnie stosowanego barwnika spożywczego, zwanego karmelem [Tomasik i in., 1989; Mitka i Nowak, 2005a; Szafulera, 2010]. Ze względu na stosowane reagenty, niekiedy określane mianem katalizatorów, wyróżnia się cztery klasy karmeli, których charakterystykę przedstawiono w tab. 1. [Rozporządzenie MZ, 2010; Compendium, 2011; Rozporządzenie Komisji (UE), 2012]. Karmel amoniakalny, zaliczany do klasy III, charakteryzuje się najkorzystniejszymi wyróżnikami sensorycznymi i dlatego znajduje tak wielorakie zastosowanie do barwienia różnych produktów spożywczych, między innymi napojów bezalkoholowych i alkoholowych, wyrobów cukierniczych i ciastkarskich, lodów i deserów mrożonych, ekstrudowanych lub ekspandowanych sneksów smakowych, a także produktów paszowych. Karmel, dawniej określany jako produkt naturalny, w świetle aktualnych przepisów [Compendium, 2011; Rozporządzenie Komisji (UE), 2012] uznawany jest jako dodatek do żywności i zaliczany jest do barwników o symbolu E 150, w tym karmel amoniakalny ma symbol E 150c. Karmel amoniakalny, tak jak inne dozwolone barwniki, może być stosowany na zasadzie *quantum satis*, czyli w dawce najniższej, niezbędnej do osiągnięcia zamierzonego skutku technologicznego.

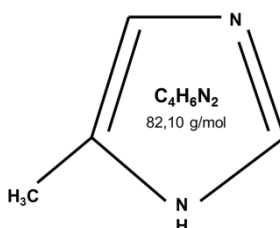
Oczekiwania konsumentów, związane z ogólnie rozumianą jakością, doprowadziły do wprowadzenia zmian w technice wytwarzania krajowego karmelu amoniakalnego, którego przemysłową produkcję w Polsce podjęto ponad 90 lat temu [Grot, 1966]. Zmiany te głównie polegały na zastosowaniu innego systemu wymiany ciepła, umożliwiającego podgrzewanie substratu przy stosunkowo niskiej (10-20°C) różnicy temperatur między czynnikiem podgrzewanym a podgrzewającym, co wraz z bezstopniowym sposobem zmiany intensywności mieszania masy reakcyjnej – zagwarantowało jej bardzo równomierną obróbkę cieplną. Dzięki temu wyeliminowano występowanie niekorzystnego, punktowego, znacznego przegrzewania substratu, co pogarszało niektóre parametry jakościowe karmelu (smak, zapach, rozpuszczalność w wodzie, zawartość substancji szkodliwej).

W związku tym, wyłoniła się potrzeba przeprowadzenia oceny przebiegu zmodernizowanego procesu karmelizacji. Ocenę tę postanowiono przeprowadzić na podstawie oznaczania - w trakcie prowadzenia procesu produkcyjnego - następujących parametrów: siły barwienia, zawartości cukrów redukujących, stężenia suchej substancji, pH, zawartości 4-metyloimidazolu (4-MeI), a także na podstawie próby testowej z kwasem solnym.

Siła barwienia jest wyróżnikiem charakteryzującym karmel jako barwnik i wraz z poziomem zawartości cukrów redukujących, stężeniem suchej substancji oraz pH masy reakcyjnej świadczy o stanie zaawansowania reakcji karmelizacji.

**Tabela 1.** Ogólna charakterystyka poszczególnych klas karmeli

| Klasa | Nr wg<br>oznacz.<br>UE | Nazwa w<br>j. polskim<br><br>Nazwa w<br>j. angielskim                       | Sposób otrzymywania                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Czystość                                                                                                                                                                                   | Zawartość<br>suchej<br>substancji<br>[%] |
|-------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| I     | E 150a                 | Karmel<br>Karmel<br>naturalny<br><br>Plain caramel                          | Kontrolowana obróbka cieplna węglowodanów. W celu ułatwienia karmelizacji można stosować kwasy, zasady, sole, z wyjątkiem związków amonowych oraz siarczynów.                                                                                                                                                                             | azot ogółem: nie więcej niż 0,1%<br>siarka ogółem: nie więcej niż 0,2%                                                                                                                     | 62 ÷ 77                                  |
| II    | E 150b                 | Karmel<br>siarczynowy<br><br>Caustic sulphite<br>caramel                    | Kontrolowana obróbka cieplna węglowodanów z dodatkiem kwasów lub zasad, lub bez tych dodatków, w obecności związków siarczynowych (kwas siarkawy, siarczyn potasu, disiarczyn potasu, siarczyn sodu, disiarczyn sodu). Związki amonu nie są stosowane.                                                                                    | azot ogółem: nie więcej niż 0,3%<br>siarka ogółem: 0,3 ÷ 0,35%<br>dwutlenek siarki: nie więcej niż 0,2%                                                                                    | 65 ÷ 72                                  |
| III   | E 150c                 | Karmel<br>amoniakalny<br><br>Ammonia<br>caramel                             | Kontrolowana obróbka cieplna węglowodanów z dodatkiem kwasów lub zasad, lub bez tych dodatków, w obecności związków amonu (wodorotlenek amonu, węglan amonu, wodorowęglan amonu, fosforan amonu). Związki siarczynowe nie są stosowane.                                                                                                   | azot ogółem: 0,7 ÷ 3,3%<br>azot amoniakalny: nie więcej niż 0,3%<br>siarka ogółem: nie więcej niż 0,2%<br>4-metyloimidazol (4MeI): nie więcej niż 200mg/kg                                 | 53 ÷ 83                                  |
| IV    | E 150d                 | Karmel<br>amoniakalno-<br>siarczynowy<br><br>Sulphite<br>ammonia<br>caramel | Kontrolowana obróbka cieplna węglowodanów z dodatkiem kwasów lub zasad, lub bez tych dodatków, w obecności zarówno związków amonu, jak i siarczynowych (kwas siarkawy, siarczyn potasu, disiarczyn potasu, siarczyn sodu, disiarczyn sodu, wodorotlenek amonu, wodorowęglan amonu, fosforan amonu, siarczyn amonu, wororosiarczyn amonu). | azot ogółem: 0,3 ÷ 1,7%<br>azot amoniakalny: nie więcej niż 0,6%<br>siarka ogółem: 0,8 ÷ 2,5%<br>dwutlenek siarki: nie więcej niż 0,2%<br>4-metyloimidazol (4MeI): nie więcej niż 250mg/kg | 40 ÷ 75                                  |



**Rysunek 1.** 4-Metyloimidazol [Wang i in., 2011]

4-metyloimidazol (4-MeI), którego wzór chemiczny przedstawiono na rys. 1, uważany jest za związek o potencjalnie szkodliwym oddziaływaniu na zdrowie człowieka [Oleksy, 2011; Rozporządzenie Komisji (UE), 2012]. Związek ten wytwarza się w trakcie złożonych reakcji karmelizacji, wskutek obecności jonu amonowego ( $\text{NH}_4^+$ ) jako reagenta przy produkcji karmelu amoniakalnego. W związku z tym, zawartość tej substancji w karmelu amoniakalnym jest kontrolowana i limitowana przez władze sanitarne. Aktualnie, prawo Unii Europejskiej dopuszcza zawartość 4-MeI w karmelu amoniakalnym na poziomie nie wyższym niż 200 mg/kg. [Compendium, 2011; Rozporządzenie Komisji (UE) 2012]. Stąd, parametr ten ma duże znaczenie jako kryterium jakości zdrowotnej tego powszechnie stosowanego produktu, a wytwórcy zobowiązani są do stopniowego, jak największego obniżania jego zawartości.

Próba testowa z kwasem solnym jest jedną z prób testowych, jakim poddawany jest karmel, celem określenia stabilności jego roztworu w warunkach danego zastosowania. Jednym z ważniejszych zastosowań karmelu amoniakalnego są produkty kwaśne, jak np. napoje bezalkoholowe, octy, musztardy. Dla określenia przydatności karmelu amoniakalnego do stosowania w produktach kwaśnych, szczególnie w napojach, stosuje się test z kwasem solnym.

Celem pracy była ocena przebiegu procesu karmelizacji w aktualnych warunkach przemysłowej produkcji karmelu amoniakalnego.

### Material i metody

Surowcem była mieszanina redukujących monosacharydów w postaci zatężonego roztworu ( $82^{\pm 0,5^\circ}\text{Bx}$ ). Jako reagent stosowano wodny roztwór amoniaku o zawartości 25%  $\text{NH}_3$ , będący źródłem jonu amonowego ( $\text{NH}_4^+$ ), zmieniając jego stężenie od 0,40 do 1,10% w stosunku do suchej substancji cukrów.

Przemysłowy proces karmelizacji, czyli wytwarzanie karmelu amoniakalnego prowadzono systemem szarżowym w warunkach ciśnienia atmosferycznego, utrzymując temperaturę  $114\div 116^\circ\text{C}$ . Uzyskany karmel surowy chłodzono (od  $116$  do  $100^\circ\text{C}$ ) sposobem przeponowym, a przez dodatek wody spożywczej (doprowadzenie do stężenia suchej substancji  $c=70,5^{\pm 0,5^\circ}\text{Bx}$ ) i filtrację (w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń stałych)

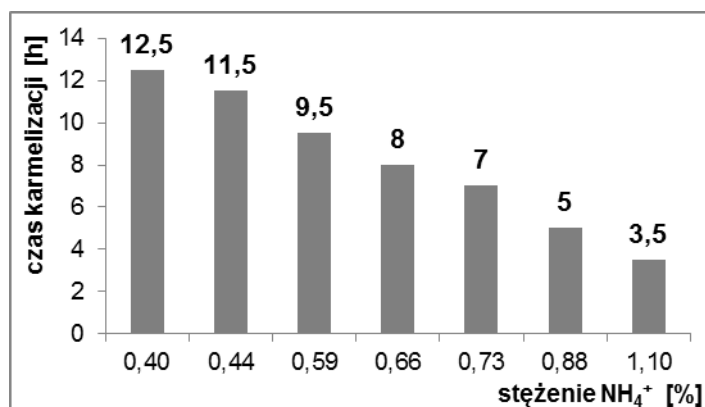
otrzymywano gotowy produkt – karmel handlowy (ok. 2 t) w postaci syropu o stężeniu suchej substancji  $70,5^{\pm 0,5}\text{°Bx}$  i o sile barwienia  $0,30^{\pm 0,02}$ .

Za czas karmelizacji [godz.] przyjmowano czas od momentu osiągnięcia temperatury  $114^{\circ}\text{C}$  przez masę reakcyjną do momentu rozpoczęcia chłodzenia.

Silę barwienia (E), zawartość cukrów redukujących (CR), stężenie suchej substancji (c), pH, próbę testową z kwasem solnym oznaczano zgodnie z PN-A-74722:1996 „Karmel” oraz PN-A-74701:1978 „Hydrolizaty skrobiowe (krochmalowe). Metody badań”. Jako wynik przyjmowano średnią arytmetyczną co najmniej dwóch oznaczeń, nie różniących się więcej niż o 2,5%.

Zawartość 4-metyloimidazolu (M) oznaczano metodą HPLC z detekcją fluorometryczną [Kim i in., 2003] po przeprowadzeniu w pochodną i oczyszczeniu techniką SPE/C18. Analizę chromatograficzną prowadzono na kolumnie firmy SUPELCO, Discovery C18HS 150-4,6, złożę  $3\text{ }\mu\text{m}$ . Fazę ruchomą stanowił zmieniający się układ dwuskładnikowy o przepływie  $1\text{ ml/min.}$ : A - 0,1% wodny roztwór kwasu octowego z acetonitrylem 50:50 (v:v); B - acetonitryl (100%). Temperatura rozdzału wynosiła  $30^{\circ}\text{C}$ . Jako wynik oznaczenia przyjmowano średnią arytmetyczną z 4 pomiarów. Wyznaczano współczynnik zmienności, który zawierał się w przedziale od 0,5 do 9,8%. Granica oznaczalności –  $3,0\text{ mg/kg}$ , granica wykrywalności –  $0,9\text{ mg/kg}$ .

## Wyniki i dyskusja



**Rysunek 2.** Wpływ stężenia jonu  $\text{NH}_4^+$  na czas karmelizacji

Stosując różne dawki jonu amonowego w stosunku do suchej substancji cukrów (0,40; 0,44; 0,59; 0,66; 0,72; 0,88; 1,10%) otrzymano karmele o standardowych parametrach ( $E = 0,30^{\pm 0,02}$ ,  $c = 70,5^{\pm 0,5}\text{°Bx}$ ), do uzyskania których wymagany czas karmelizacji był zróżnicowany i wynosił odpowiednio 12,5; 11,5; 9,5; 8; 7; 5; 3,5 godzin (rys. 2). Oznacza to, że zwiększenie stężenia jonu amonowego przyspieszało reakcję karmelizacji, jednocześnie skracając jej czas z 12,5 godzin (dla stężenia  $0,40\%$   $\text{NH}_4^+$ ) do 3,5 godzin (dla stężenia  $1,10\%$   $\text{NH}_4^+$ ), tj. ponad trzykrotnie. Możliwość skrócenia czasu reakcji karmelizacji jest korzystna ze względu na efektywniejsze wykorzystanie linii produkcyjnej, skutkujące wyższą wydajnością produkcji. Takie postępowanie jest racjonalne

z technicznego i ekonomicznego punktu widzenia. W przypadku produktu jakim jest karmel - należy koniecznie uwzględnić wymóg jego jakości zdrowotnej. W związku z tym, w uzyskanych przemysłowo partiach handlowego karmelu amoniakalnego - charakteryzujących się siłą barwienia (E) od 0,28 do 0,32 i stężeniem suchej substancji (c) od 70,0 do 71,0 °Bx - oznaczono zawartość substancji szkodliwej, jaką w karmelu amoniakalnym jest 4-metyloimidazol (M). Wpływ stężenia jonu  $\text{NH}_4^+$  na zawartość 4-MeI w karmelu amoniakalnym przedstawiono na rys. 3. Celem uzyskania porównywalnych wyników, zawartość 4-metyloimidazolu podano po przeliczeniu na karmel o sile barwienia  $E=0,30$  i stężeniu suchej substancji  $c=70,5^\circ\text{Bx}$ , kierując się wzorem:

$$4\text{MeI}_x = 4\text{MeI}_{xa} \cdot \frac{0,30}{E_x} \cdot \frac{70,5}{c_x},$$

gdzie:

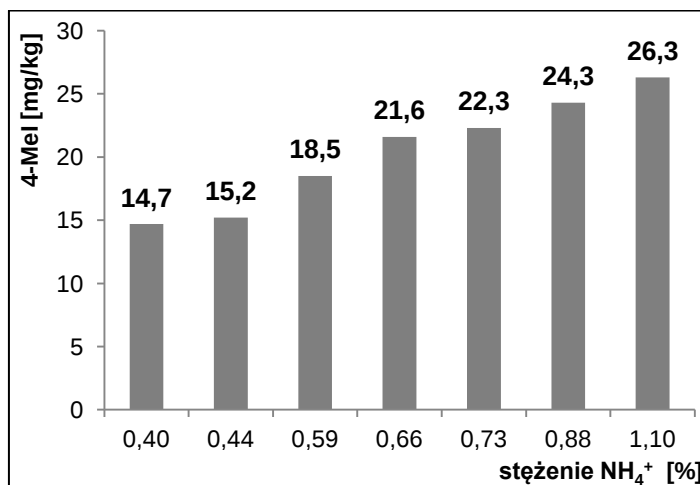
$4\text{MeI}_x$  - zawartość 4-MeI [mg/kg] w karmelu, otrzymanym przy zastosowaniu danego stężenia jonu  $\text{NH}_4^+$ , po przeliczeniu na karmel o sile barwienia  $E=0,30$  i stężeniu suchej substancji  $c=70,5^\circ\text{Bx}$ ;

$4\text{MeI}_{xa}$  - zawartość 4-MeI [mg/kg] w karmelu, otrzymanym przy zastosowaniu danego stężenia jonu  $\text{NH}_4^+$ ;

$E_x$  - siła barwienia karmelu, otrzymanego przy zastosowaniu danego stężenia jonu  $\text{NH}_4^+$ ;

$c_x$  - stężenie suchej substancji [°Bx] karmelu, otrzymanego przy zastosowaniu danego stężenia jonu  $\text{NH}_4^+$ .

Zawartość 4-MeI wynosiła od 14,7 mg/kg, dla karmelu otrzymanego przy stężeniu jonu  $\text{NH}_4^+=0,40\%$ , do 26,3 mg/kg, dla karmelu otrzymanego przy stężeniu jonu  $\text{NH}_4^+=1,10\%$ . Przebieg zmian zawartości 4-MeI charakteryzował się stopniowo zwiększającymi się wartościami w miarę zwiększania stężenia jonu amonowego w masie reakcyjnej. Wzrost stężenia jonu amonowego z 0,40 do 1,10% w masie reakcyjnej, tj. o 275%, spowodował zwiększenie zawartości 4-MeI o 179%.



Rysunek 3. Wpływ stężenia jonu  $\text{NH}_4^+$  na zawartość 4-MeI w karmelu amoniakalnym

Z kolei, otrzymane karmele poddano testowi z kwasem solnym (tab. 2), celem określenia ich przydatności do stosowania w produktach kwaśnych. Z danych przedstawionych w tab. 2 wynika, że przydatnością do stosowania w produktach kwaśnych odznaczały się karmele, które wytworzono stosując stężenie jonu amonowego nie niższe niż 0,66%. W związku z tym, postanowiono przeprowadzić dokładną ocenę przebiegu procesu karmelizacji dla stężenia jonu amonowego 0,66%, co wymagało czasu reakcji 8 godzin. Parametry procesu karmelizacji, prowadzonego przy stężeniu jonu amonowego 0,66%, przedstawiono w tab. 3.

**Tabela 2.** Próba testowa karmeli z kwasem solnym (dla różnych stężeń  $\text{NH}_4^+$ )

| Stężenie jonu $\text{NH}_4^+$ [%] | Wynik testu                      |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| 0,40                              | zauważalne wytrącanie się osadu  |
| 0,44                              | zauważalne wytrącanie się osadu  |
| 0,59                              | roztwór bez osadu, mało klarowny |
| 0,66                              | roztwór bez osadu, klarowny      |
| 0,73                              | roztwór bez osadu, klarowny      |
| 0,88                              | roztwór bez osadu, klarowny      |
| 1,10                              | roztwór bez osadu, klarowny      |

Z zamieszczonych danych w tab.3 wynika, że w miarę przebiegu procesu karmelizacji:

- Stopniowo wzrastała siła barwienia, która jest wyróżnikiem charakteryzującym karmel jako barwnik. Wzrost siły barwienia wynosił od 0,035 (po dodaniu całej porcji reagenta) do 0,368 (po 8 godzinach karmelizacji). Po przeliczeniu na stężenie suchej substancji karmelu handlowego ( $c=70,5^\circ\text{Bx}$ ) – wartości te wynosiły odpowiednio: 0,030 i 0,312.
- Stopniowo zmniejszała się zawartość cukrów redukujących, licząc od momentu zakończenia dozowania reagenta do końca czasu karmelizacji, z 67,9 do 56,5%, tj. o 16,8%. Zmniejszanie się zawartości cukrów redukujących jest charakterystyczne dla reakcji karmelizacji [Tomasik i in., 1989]. Stosunkowo wysoki poziom zawartości cukrów redukujących ( $> 50\%$ ) po 8 godzinach karmelizacji świadczy o istniejącym potencjale substratowym, umożliwiającym dalsze intensyfikowanie reakcji karmelizacji w celu uzyskania karmelu o jeszcze wyższej sile barwienia.
- Stopniowo zmniejszała się wartość pH masy reakcyjnej, od 7,3 (moment zakończenia dozowania reagenta) do 3,5 (po 8 godzinach karmelizacji). Jest to typowe dla przebiegu reakcji karmelizacji, w wyniku której pH karmelu handlowego wynosi najczęściej od 3 do 5.
- Stężenie substratu – po obniżeniu z poziomu ok.  $82^\circ\text{Bx}$ , skutkiem dodawania reagenta (25% wodny roztwór amoniaku) i ponownym wzroście w wyniku odparowania rozpuszczalnika – utrzymywało się na zbliżonym poziomie, tj.  $81-83^\circ\text{Bx}$ . Jest to przejaw pewnej równowagi między przebiegającą reakcją karmelizacji – w trakcie której następuje rozkład cukrów, któremu towarzyszy utrata cząsteczki wody [Tomasik i in., 1989], rozcieńczającej substrat – a powolnym jej

odparowywaniem, skutkiem utrzymywania masy reakcyjnej w stanie delikatnego wrzenia.

- Stopniowo wzrastała zawartość 4-MeI, która wynosiła od 12,3 (po dodaniu całej porcji reagenta) do 23,2 mg/kg (po 8 godzinach karmelizacji). Po przeliczeniu na siłę barwienia karmelu handlowego ( $E=0,30$ ), zawartość 4-MeI malała w miarę upływu czasu karmelizacji, od 32,0 do 18,9 mg/kg, co świadczy o większej intensywności przyrostu siły barwienia niż przyrostu 4-metyloimidazolu.

**Tabela 3.** Parametry przebiegu procesu karmelizacji ( $0,66\% \text{NH}_4^+$ )

| Parametr                                         | Po dodaniu reagenta | Czas karmelizacji [h] |       |       |       |       |       |       |
|--------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                                  |                     | 2                     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |
| Siła barwienia (E)                               | 0,035               | 0,176                 | 0,220 | 0,250 | 0,270 | 0,323 | 0,345 | 0,368 |
| Siła barwienia <sup>*/</sup> ( $E_1$ )           | 0,030               | 0,152                 | 0,190 | 0,214 | 0,230 | 0,274 | 0,293 | 0,312 |
| Zawartość cukrów redukujących (CR) [%]           | 67,9                | 61,0                  | 59,9  | 60,1  | 60,3  | 60,8  | 58,7  | 56,5  |
| Stężenie suchej substancji (c) [°Bx]             | 81,0                | 81,8                  | 81,8  | 82,4  | 82,8  | 83,0  | 83,0  | 83,0  |
| pH                                               | 7,3                 | 4,0                   | 3,9   | 3,8   | 3,7   | 3,6   | 3,5   | 3,5   |
| Zawartość 4-Mel (M) [mg/kg]                      | 12,3                | 18,8                  | 18,9  | 19,7  | 21,0  | 22,6  | 22,9  | 23,2  |
| Zawartość 4-Mel <sup>**/</sup> ( $M_1$ ) [mg/kg] | -                   | 32,0                  | 26,8  | 23,6  | 23,3  | 21,0  | 19,9  | 18,9  |

<sup>\*/</sup>po przeliczeniu na stężenie karmelu handlowego ( $c=70,5^\circ\text{Bx}$ ) wg wzoru:  $E_1=E \cdot 70,5/c$

<sup>\*\*/</sup>po przeliczeniu na siłę barwienia karmelu handlowego ( $E=0,30$ ) wg wzoru:  $M_1=M \cdot 0,30/E$

Proces karmelizacji zakończono po 8 godzinach. Uzyskany karmel surowy poddany został schłodzeniu, standaryzacji (dodatek wody spożywczej) i filtracji, skutkiem czego otrzymano karmel handlowy (ok. 2000 kg) o parametrach przedstawionych w tab. 4. Otrzymany karmel odznaczał się nieco wyższą siłą barwienia, nieco niższą zawartością cukrów redukujących i nieco wyższą zawartością 4-Mel w porównaniu z parametrami przedstawionymi w tab. 3 dla czasu karmelizacji 8 godzin, ponieważ w trakcie operacji końcowych, łącznie trwających ok. 2 godzin, reakcja karmelizacji jeszcze przebiegała.

**Tabela 4.** Parametry karmelu handlowego ( $0,66 \text{NH}_4^+$ )

| Parametr                               | Wynik |
|----------------------------------------|-------|
| Siła barwienia (E)                     | 0,320 |
| Zawartość cukrów redukujących (CR) [%] | 56,1  |
| Stężenie suchej substancji (c) [°Bx]   | 70,4  |
| pH                                     | 3,5   |
| Zawartość 4-Mel (M) [mg/kg]            | 20,4  |

W procesie karmelizacji, realizowanym w opisanych warunkach, przy stężeniu jonu amonowego w masie reakcyjnej wynoszącym 0,66%, przyrost siły barwienia charakteryzował się większą intensywnością niż przyrost 4-MeI, co wyrażało się zmniejszaniem – w miarę upływu czasu karmelizacji – zawartości 4-MeI, przeliczonej dla standardowej siły barwienia karmelu handlowego ( $E = 0,30$ ). Zawartość substancji szkodliwej, jaką jest 4-MeI, była kilkakrotnie niższa od wartości dopuszczanej prawem Unii Europejskiej (poniżej 200 mg/kg).

Celem określenia poziomu zawartości 4-MeI w karmelu handlowym, otrzymanym w warunkach opisanej produkcji przemysłowej, w stosunku do karmeli amoniakalnych oferowanych przez innych wytwórców, oznaczono zawartość tego związku w importowanych karmelach dostępnych na krajowym rynku (tab.5). Wyniki przedstawione w tab.5 wskazują na to, że pod względem zawartości substancji szkodliwej (4-MeI), karmel amoniakalny, otrzymywany w warunkach zmodernizowanej instalacji przemysłowej, nie ustępuje produktowi importowanemu.

**Tabela 5.** Zawartość 4-MeI w karmelach komercyjnych

| Klasa karmelu                         | Zawartość 4-MeI [mg/kg] |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Karmel amoniakalny E 150c             | 25,0                    |
| Karmel siarczynowo-amoniakalny E 150d | 102,3                   |

Z przeprowadzonych badań wynika, że – przy stosowaniu dawki jonu amonowego nas poziomie 0,66% w stosunku do suchej substancji cukrów – możliwe jest wytwarzanie karmelu amoniakalnego zawierającego nie więcej niż 25 mg/kg substancji szkodliwej (4-MeI).

### Wnioski

1. W miarę zwiększania stężenia jonu amonowego w substracie – reakcja karmelizacji przyspieszała, czego wyrazem było skrócenie czasu karmelizacji z 12,5 godzin (dla stężenia 0,40%  $\text{NH}_4^+$ ) do 3,5 godzin (dla stężenia 1,10%  $\text{NH}_4^+$ ).
2. Wzrost stężenia jonu amonowego w substracie powodował zwiększenie siły barwienia i zawartości 4-MeI w karmelu. Przyrost siły barwienia wykazywał większą intensywność niż przyrost zawartości 4-MeI, co wyrażało się spadkiem – w miarę upływu czasu reakcji karmelizacji – zawartości 4-MeI, przeliczonej dla standardowej siły barwienia karmelu handlowego ( $E = 0,30$ ).
3. Przydatnością do stosowania w produktach kwaśnych odznaczały się karmele, które uzyskano stosując stężenie jonu amonowego nie niższe niż 0,66%.
4. Zawartość substancji szkodliwej (4-MeI) - w trakcie przebiegu reakcji karmelizacji w warunkach przemysłowej produkcji karmelu amoniakalnego, a tym samym w produkcie handlowym – była ok. ośmiokrotnie niższa od poziomu dopuszczanego prawem Unii Europejskiej.

### Podziękowanie

*Firmie CHEMET sp. z o.o. z Plewisk k. Poznania autorzy składają podziękowanie za umożliwienie prowadzenia badań w warunkach typowej produkcji przemysłowej.*

### Literatura

Compendium of Food Additive Specifications, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 74th Meeting, 2011.

Grot K., 80 lat Zakładów Przemysłu Ziemniaczanego we Wronkach 1886-1966. Wydanie I, Zjednoczenie Przemysłu Ziemniaczanego, Poznań, 1966.

Kim J-W., Kim S-U., Lee H.S., Kim L., Ahn M.Y., Ryu K.S., Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus Alba* L. leaves by derivatization with 9-fluororenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2003, (1002), 93-99.

Masłowska J., Więdołcha M., Badanie miodu. *Cukiernictwo*, 2004, 6, 40-42.

Mitka K., Nowak K., Karmel (E 150) – Najstarszy barwnik spożywczy (1). *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2005a, 1 (49), 27-28.

Mitka K., Nowak K., Karmel (E 150) – najstarszy barwnik spożywczy (2). *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2005b, 2 (49), 32-34.

Oleksey K., Wyniki ponownej oceny barwników karmelowych. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2011, 3 (55), 44.

Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 231/2012 z dnia 9 marca 2012 r. ustanawiające specyfikacje dla dodatków do żywności. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*, L 83/1.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 grudnia 2010 r. w sprawie specyfikacji i kryteriów czystości substancji dodatkowych. *Dziennik Ustaw* Nr 2, 2011.

Szafulera W., Do jakich środków spożywczych można stosować barwniki: E 150a, E 150b, E 150c, E 150d ? *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, 2010, 5 (58), 8-9.

Tomasik P., Pałasiński M., Wiejak S., The thermal decomposition of carbohydrates. Part I. Decomposition of mono-, di-, and oligo-sacharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1989, 47, 203-278.

Wang J., Liu X., Pohl C.A., Schnute W.C., Simultaneous quantification of 2-and 4-methylimidazoles in carbonated beverages by ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA*, 2011.

Ziemia Z., Reakcje brunatnienia w żywności. *Przemysł Spożywczy*, 1966, 7 (20), 476-487.

JOANNA LE THANH-BLICHARZ

*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych*

*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego*

*lethanh@man.poznan.pl*

JACEK LEWANDOWICZ

*Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości*

*Wydział Towaroznawstwa*

*Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*

## **WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNE ORAZ TEKSTURA KISIELI ZAGĘSZCZONYCH SKROBIĄ WOSKOWĄ RÓŻNEGO POCHODZENIA BOTANICZNEGO**

### **Streszczenie**

Kisiel jest deserem przygotowywanym na bazie wody z dodatkiem cukru, sproszkowanego soku owocowego i/lub aromatów i barwników. Najczęściej stosowanym zagęstnikiem do produkcji tego typu deserów jest skrobia modyfikowana na drodze utleniania. Alternatywą dla skrobi modyfikowanych chemicznie mogą być skrobie natywne odmian woskowych, które charakteryzują się korzystnymi właściwościami reologicznymi.

Celem badań była ocena wpływu dodatku skrobi woskowych różnego pochodzenia botanicznego na właściwości reologiczne i uniwersalny profil tekstury kisieli.

Materiał do badań stanowiły handlowe skrobie: ziemniaczana, kukurydziana oraz ryżowa w odmianach zwykłych oraz woskowych. Materiał odniesienia stanowił zagęstnik „Skrobia Żelująca” (WPPZ Luboń). Badania reologiczne obejmowały: krzywe płynięcia, krzywe lepkości w czasie ścinania oraz temperaturowy profil lepkości. Pomiary prowadzono z użyciem reometru rotacyjnego RotoVisco1 (Haake, Niemcy) stosując układ pomiarowy Z20 DIN. Teksturę kisieli badano na teksturometrze TA.XT2 (Stable Micro Systems, Anglia) mierząc: twardość [N], adhezyjność [N·s], spójność [-], sprężystość [-] i gumowatość [N].

Badane kisiele pod względem reologicznym stanowiły płyny nienewtonowskie, pseudoplastyczne i tiksotropowe. Najsilniejszymi właściwościami zagęszczającymi i teksturotwórczymi charakteryzowały się skrobia ziemniaczana zwykła oraz ryżowa woskowa. Jednak ze względów technologicznych oraz ekonomicznych rekomendowane do produkcji kisieli są obie odmiany skrobi ziemniaczanej.

**Słowa kluczowe:** skrobia woskowa, reologia, tekstura, kisiel

### **Wprowadzenie**

Coraz silniejsza konkurencja wynikająca z surowych reguł gospodarki rynkowej oraz rozwój nowoczesnych technologii przetwórstwa spożywczego wymuszają stosowanie nowoczesnych, wysokoefektywnych i całkowicie bezpiecznych dla zdrowia środków pomocniczych. Wśród nich są m.in. skrobie, a ich wielofunkcyjna rola, jaką pełnią w produkcji żywności sprawia, że zakres ich stosowania rośnie z roku na rok. Pozwalają one

na stosowanie wysokowydajnych, nowoczesnych sposobów wytwarzania nowych wyrobów oraz kształtowanie interesujących i pożądaných cech sensorycznych. [Wurzburg, 1986; Tegge, 2004] Osiągnięcie najlepszych efektów technologicznych i sensorycznych jest ściśle związane z właściwym doбором skrobi, uwzględniającym zarówno funkcje, jakie ma ona spełniać w gotowym wyrobie, jak i warunki realizowanego procesu technologicznego [Walkowski i Olesienkiewicz, 2005]. Sceptycyzm konsumentów w stosunku do skrobi modyfikowanych spowodował w ostatnim czasie znaczne poszerzenie oferty rynkowej o tzw. skrobie woskowe, zbudowane wyłącznie z rozgałęzionych makrocząstek amylopektyny. Ponieważ nie zawierają one frakcji liniowego polisacharydu - amylozy, charakteryzują się unikalnymi właściwościami użytkowymi [Walkowski i in., 2004; Luo i in., 2009; Hunag i in., 2013]. Obecnie szeroko dostępne w handlu są skrobie woskowe pochodzące z ziemniaków, kukurydzy oraz ryżu. Ponadto zostały zidentyfikowane naturalne mutanty wśród innych gatunków roślin, które zawierają skrobię woskową m.in. jęczmień, sorgo, proso oraz amarantus. Z technologicznego punktu widzenia nie charakteryzują się one pożądanymi właściwościami, dlatego nie znajdują zastosowania w przemyśle. Skrobię kukurydzianą woskową, która została dość dobrze scharakteryzowana, stosuje się jako zagęstnik w produkcji szeregu produktów spożywczych [Lewandowicz i in., 2014], podczas gdy pozostałe skrobie woskowe (ziemniaczana oraz ryżowa) zostały skomercjalizowane dopiero niedawno. W połączeniu ze stosunkowo niewielką wiedzą aplikacyjną na ich temat, spektrum zastosowań dla tych zagęstników jest mocno ograniczone. Dlatego celem pracy była ocena wpływu dodatku skrobi woskowych różnego pochodzenia botanicznego na właściwości reologiczne i uniwersalny profil tekstury kisieli.

### Material i metody

Material do badań stanowiły natywne skrobie w odmianach zwykłych oraz woskowych:

- ziemniaczana Superior Standard (PPZ Trzemeszno, Polska),
- ziemniaczana woskowa "Eliane 100" (Avebe, Holandia),
- kukurydziana "Maisita 21.000" (Agrana, Austria),
- kukurydziana woskowa "Maisita 21.007" (Agrana, Austria),
- ryżowa "Remy DR" (Beneo, Belgia),
- ryżowa woskowa "Remyline XS" (Beneo, Belgia),
- ryżowa woskowa "Remyline AX-DR" (Beneo, Belgia).

Material odniesienia stanowiła utleniona skrobia ziemniaczana o zawartości grup karboksylowych 0,1% (WPPZ Luboń, Polska).

Kisiel przygotowywano na bazie: 20 g badanej skrobi, 12,5 g sacharozy, 1 g kwasu cytrynowego oraz 250 g wody, według metodyki zaproponowanej przez Lewandowicz i wsp. [2003]. Przygotowane próby do badań zakodowano następującymi oznaczeniami:

- **ŻEL** – kisiel z dodatkiem skrobi żelującej (odnośnika),
- **Z** – kisiel z dodatkiem skrobi ziemniaczanej zwykłej,
- **ZW** – kisiel z dodatkiem skrobi ziemniaczanej zwykłej woskowej,
- **K** – kisiel z dodatkiem skrobi kukurydzianej zwykłej,
- **KW** – kisiel z dodatkiem skrobi kukurydzianej woskowej,
- **R** – kisiel z dodatkiem skrobi ryżowej zwykłej,

- **RWS** – kisiel z dodatkiem skrobi ryżowej woskowej (XS),
- **RWA** – kisiel z dodatkiem skrobi ryżowej woskowej (AX-DR).

Badania właściwości reologicznych prowadzono przy użyciu reometru rotacyjnego RotoVisco1 firmy Haake (Niemcy) wyposażonego w zestaw termostatu DC30-K10 oraz układ pomiarowy Z20 DIN. Próbkki kisielu przed pomiarem były relaksowane oraz termostatowane w cylindrze pomiarowym przez 5 minut. Rejestracji wyników oraz obliczeń dokonywano przy użyciu programu RheoWin 3.40. Wyznaczono:

- **krzywe płynięcia:** w zakresie szybkości ścinania  $1-600-1 \text{ s}^{-1}$ , czasie 4 min oraz temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$ . Otrzymane krzywe opisano modelami równań reologicznych: Ostwalda de Waele'a  $[\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n]$  gdzie:  $\tau$  - naprężenie ścinające (Pa),  $K$  - współczynnik konsystencji  $[\text{Pa} \cdot \text{s}^n]$ ,  $\dot{\gamma}$  - szybkość ścinania ( $\text{s}^{-1}$ ),  $n$  - wskaźnik płynięcia (wielkość wskazująca na zbieżność z przepływem newtonowskim) oraz Casson'a  $[\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\eta_c \cdot \dot{\gamma}}]$  gdzie:  $\tau$  - naprężenie ścinające (Pa),  $\tau_0$  - granica płynięcia (Pa),  $\eta_c$  - lepkość plastyczna Casson'a,  $\dot{\gamma}$  - szybkość ścinania ( $\text{s}^{-1}$ ).

- **krzywe lepkości pozornej w zależności od temperatury:** w zakresie temperatury  $20-60^{\circ}\text{C}$ , przy prędkości ogrzewania  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  oraz szybkości ścinania  $100 \text{ s}^{-1}$ . Otrzymane krzywe opisano równaniem Arrhenius TTS  $[\eta_p = \eta_{\infty p} \cdot \exp(\frac{E}{R \cdot T})]$  gdzie:  $\eta_p$  - lepkość pozorna ( $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ),  $\eta_{\infty p}$  - stała materiałowa ( $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ),  $E$  - energia aktywacji płynięcia ( $\text{J}/\text{mol}$ ),  $R$  - stała gazowa ( $\text{J}/\text{K} \cdot \text{mol}$ ),  $T$  - temperatura (K).

- **krzywe lepkości pozornej** w trybie CR, w czasie 5 minut przy szybkości ścinania  $50 \text{ s}^{-1}$  i temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$ .

Analizę uniwersalnego profilu tekstury (TPA) wykonano przy użyciu teksturometru TA.XT2 firmy Stable Micro Systems (Wielka Brytania) wyposażonego w aluminiową cylindryczną sondę o średnicy 35 mm. Przeprowadzono test „podwójnego ugryzienia” - próbki kisielu były dwukrotnie penetrowane na głębokość 20 mm z prędkością  $0,5 \text{ mm/s}$ . Wyznaczono następujące wyróżniki tekstury: twardość (N), adhezynność ( $\text{N} \cdot \text{s}$ ), spójność, sprężystość i gumowatość (N).

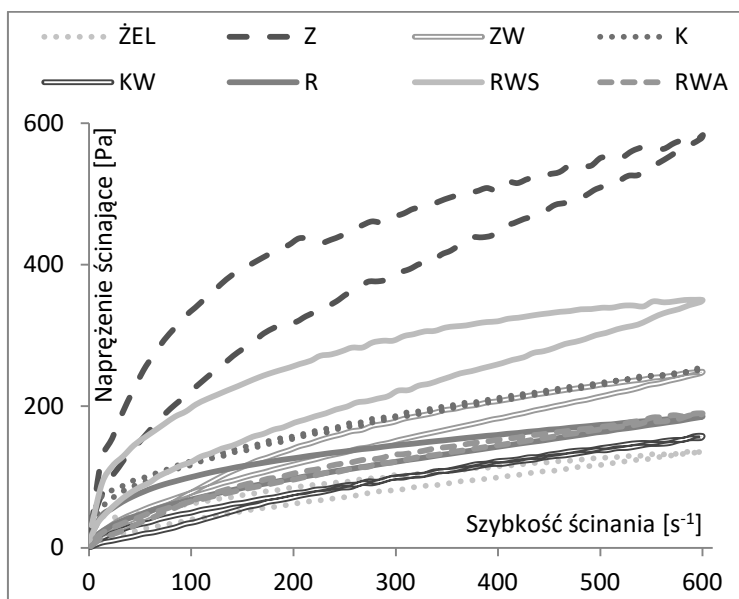
Statystyczną analizę danych wykonano w programie Statistica 12 (StatSoft). Prezentowane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem Tukey'a. Za graniczny poziom istotności przyjęto  $p=0,05$ . Grupy jednorodne oznaczono tą samą literą.

## Wyniki i dyskusja

Właściwości reologiczne stanowią podstawowy wyróżnik w ocenie jakości i atrakcyjności produktów takich jak kisiel [Zander i in., 2009]. Pomimo, że skład tego typu wyrobów jest stosunkowo prosty, to zaprojektowanie nowego produktu z wyłączeniem badań reologicznych jest praktycznie niemożliwe. Wynika to z faktu znaczącego wpływu podstawowych składników kisielu (cukrów oraz regulatorów kwasowości) na przebieg kleikowania skrobi [Le Thanh-Blicharz i in., 2014], a tym samym na charakterystykę reologiczną gotowego wyrobu.

Na rysunku 1 przedstawiono przykładowe krzywe płynięcia badanych deserów. Wszystkie badane kiese były płynami nienewtonowskimi, pseudoplastycznymi oraz charakteryzowały się zjawiskiem tiksotropii. Wartości naprężeń ścinających przy

maksymalnej zadanej szybkości ścinania mieściły się w zakresie od 135,4 Pa dla kisielu zagęszczonego skrobią żelującą do 583,1 Pa dla kisielu zagęszczonego skrobią ziemniaczaną zwykłą. W porównaniu do pozostałych badanych próbek, ten ostatni charakteryzował się znacznie większymi naprężeniami w całym zakresie szybkości ścinania. Stosunkowo wysokimi naprężeniami ścinającymi cechował się również kisiel z dodatkiem skrobi ryżowej woskowej (XS). Pozostałe desery można podzielić na trzy pary charakteryzujące się zbliżonym przepływem: są to próbki zagęszczone skrobią kukurydzianą zwykłą i ziemniaczaną woskową, ryżową woskową (AX-DR) i ryżową zwykłą oraz żelującą i kukurydzianą woskową.



**Rysunek 1.** Krzywe płynięcia badanych kisielu

W tabeli 1 zestawiono parametry równań Ostwala de Waele'a oraz Casson'a, którymi aproksymowano uzyskane dane eksperymentalne. Oba wykorzystane modele reologiczne charakteryzowały się bardzo dobrym dopasowaniem ( $R^2 > 0,95$ ), przy czym równanie Ostwala de Waele'a nieznacznie dokładniej opisywało uzyskane wyniki. Powyższa zależność została również zaobserwowana dla innych produktów (keczupu [Lewandowicz i in., 2014] i majonezu [Lewandowicz i in., 2015]) zagęszczonych skrobią woskową pochodzącą z różnych gatunków roślin.

Współczynnik konsystencji (**K**) przyjmował wartości w dość szerokim zakresie od 1,1 ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ) dla kisielu zagęszczonego skrobią kukurydzianą woskową do 66,7  $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$  w przypadku deseru na bazie skrobi ziemniaczanej zwykłej. Niezależnie od pochodzenia botanicznego zagęstnika, kisiele zagęszczone skrobią odmian zwykłych charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami parametru konsystencji. Jedynym wyjątkiem był kisiel przygotowany z dodatkiem skrobi ryżowej woskowej (XS), któremu przypisano drugą największą wartość parametru **K**. Desery przygotowane na bazie skrobi odmian woskowych charakteryzowały się przepływem bardziej zbliżonym do newtonowskiego (**n**), aniżeli

ich odpowiedniki przygotowane na skrobiach odmian zwykłych. Wyjątkiem tutaj był kisiel na bazie skrobi ryżowej woskowej (XS), podobnie jak w przypadku współczynnika konsystencji. Obserwowane różnice pomiędzy wartościami analizowanych parametrów dla odmian zwykłych oraz woskowych, w znaczącym stopniu mogły wynikać z tendencji skrobi zawierających amylozę do żelowania.

Między wartościami parametru granicy płynięcia ( $\tau_0$ ) wyliczonymi dla modelu Cassona'a oraz współczynnikami konsystencji w modelu Ostwalda de Waele'a występowała bardzo silna pozytywna korelacja ( $r$ -Pearsona=0,9981) o wysokiej istotności statystycznej ( $P<0,0001$ ). Z kolei dla parametru lepkości plastycznej Casson'a ( $\eta_c$ ) nie zaobserwowano zależności pomiędzy żadnym z parametrów równania Ostwalda de Waele'a. Najniższe wartości lepkości plastycznej Casson'a odnotowano dla kisielei zagęszczonych skrobią ryżową oraz żelującą, która stanowiła materiał odniesienia. Parametry równań reologicznych dla obu uprzednio wymienionych deserów, nie różniły się statystycznie istotnie.

W tabeli 2 umieszczono wartości pola powierzchni pętli histerezy tiksotropii. Zjawisko to jest niekorzystne i świadczy o braku stabilności reologicznej produktu [Sikora i in., 2011]. Poprawę właściwości reologicznych, w tym stabilności można uzyskać stosując mieszanki różnych hydrokoloidów [Sikora i in., 2008]. Jednak w dość skomplikowanych matrycach, jakimi są wyroby spożywcze, stanowi to wyjątkowo trudne zadanie. Kisiele o wysokiej lepkości cechowały się wyższymi wartościami pola powierzchni pętli histerezy, co po części może wynikać z metodyki badania. Wyjątkiem był kisiel zagęszczony skrobią kukurydzianą zwykłą, który charakteryzował się co najmniej 3 razy niższą wartością tiksotropii od skrobi zwykłych pozostałych gatunków. Podobnie w skrobiach woskowych, kisiel zagęszczony skrobią kukurydzianą charakteryzował się największą stabilnością reologiczną. Aczkolwiek w przypadku tego produktu odnotowano nieznaczne właściwości reopeksyjne.

**Tabela 1.** Wartości parametrów równań reologicznych Ostwalda de Waele'a oraz Casson'a zastosowanych do opisanie krzywych płynięcia badanych kisielei

| Skrobia    | Model Ostwalda de Waele'a |                     |                | Model Casson'a     |                     |                |
|------------|---------------------------|---------------------|----------------|--------------------|---------------------|----------------|
|            | K [Pa·s <sup>n</sup> ]    | n                   | R <sup>2</sup> | $\tau_0$ [Pa]      | $\eta_c$ [Pa·s]     | R <sup>2</sup> |
| <b>ŻEL</b> | 11,7 <sup>bc</sup>        | 0,392 <sup>b</sup>  | 0,99           | 32,0 <sup>bc</sup> | 0,069 <sup>a</sup>  | 0,99           |
| <b>Z</b>   | 66,7                      | 0,332 <sup>a</sup>  | 0,99           | 158,9              | 0,221 <sup>de</sup> | 0,96           |
| <b>ZW</b>  | 5,8 <sup>ab</sup>         | 0,601 <sup>c</sup>  | 0,99           | 24,4 <sup>b</sup>  | 0,245 <sup>e</sup>  | 0,98           |
| <b>K</b>   | 20,3 <sup>d</sup>         | 0,382 <sup>ab</sup> | 1,00           | 55,0 <sup>d</sup>  | 0,111 <sup>b</sup>  | 1,00           |
| <b>KW</b>  | 1,1 <sup>a</sup>          | 0,785               | 1,00           | 3,2 <sup>a</sup>   | 0,200 <sup>cd</sup> | 1,00           |
| <b>R</b>   | 17,5 <sup>cd</sup>        | 0,360 <sup>ab</sup> | 1,00           | 44,6 <sup>cd</sup> | 0,077 <sup>a</sup>  | 0,98           |
| <b>RWS</b> | 44,9                      | 0,325 <sup>a</sup>  | 0,99           | 105,9              | 0,136 <sup>b</sup>  | 0,96           |
| <b>RWA</b> | 5,0 <sup>ab</sup>         | 0,587 <sup>c</sup>  | 1,00           | 18,6 <sup>ab</sup> | 0,184 <sup>c</sup>  | 0,99           |

Kisiel jest produktem spożywanym w bardzo szerokim zakresie temperatur (wynika to z upodobań konsumenta). Niezależnie od temperatury konsumpcji, kisiel powinien charakteryzować się odpowiednimi właściwościami reologicznymi. Z tego względu, podczas projektowania produktu jakim jest kisiel, celowe jest stosowanie zagęstników charakteryzujących się wysoką odpornością reologiczną na zmiany temperatury. W tabeli 2

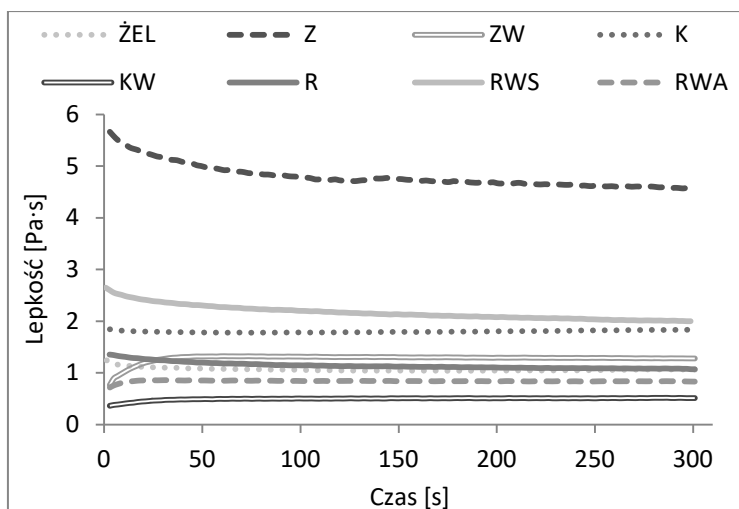
przedstawiono parametry równania Arrhenius TTS, którymi opisano krzywe zależności lepkości od temperatury badanych kisielei. Wykorzystany model charakteryzował się bardzo dobrym dopasowaniem do danych eksperymentalnych, a wartości współczynnika determinacji były większe niż 0,97. Na podstawie różnic obserwowanych między wartościami stałej materiałowej  $\eta_{sp}$ , można wyodrębnić dwie jednorodne grupy deserów o dość niskiej oraz wysokiej lepkości. Wyjątek stanowiły kisiele przygotowane na bazie obu odmian skrobi kukurydzianej, które nie zostały przypisane do żadnej z grup. Jednocześnie charakteryzowały się one skrajnymi wartościami tego parametru.

Najwyższymi wartościami energii aktywacji płynięcia (**E**) cechowały się wszystkie desery zagęszczone skrobią ziemniaczaną. Z kolei najniższą wartość parametru **E** obliczono dla kisielu zagęszczonego skrobią kukurydzianą zwykłą. Pozostałe desery przyjmowały wartości energii aktywacji płynięcia w zakresie 150,0 - 165,1 J/mol, a obserwowane różnice między nimi nie były statystycznie istotne. Do produkcji kisielu o wysokiej jakości, charakteryzującego się względnie stałą lepkością w szerokim zakresie temperatur, rekomendowane powinno być używanie skrobi produkowanej z ziemniaków. W szczególności korzystnie jest wykorzystanie skrobi ziemniaczanej woskowej, która pomimo niskiej lepkości charakteryzuje się wysoką wartością energii aktywacji płynięcia.

**Tabela 2.** Wartości parametrów równania Arrhenius TTS oraz tiksotropia badanych kisielei

| Skrobia    | Model Arrhenius TTS |                    |                | Tiksotropia<br>[Pa/s] |
|------------|---------------------|--------------------|----------------|-----------------------|
|            | $\eta_{sp}$ [Pa·s]  | E [J/mol]          | R <sup>2</sup> |                       |
| <b>ŻEL</b> | 0,279 <sup>a</sup>  | 208,3              | 0,98           | 10800 <sup>b</sup>    |
| <b>Z</b>   | 0,650 <sup>b</sup>  | 296,3              | 0,98           | 40590 <sup>c</sup>    |
| <b>ZW</b>  | 0,315 <sup>a</sup>  | 231,8              | 0,99           | 10148 <sup>b</sup>    |
| <b>K</b>   | 0,731               | 109,7              | 0,97           | 3349 <sup>a</sup>     |
| <b>KW</b>  | 0,175               | 161,0 <sup>a</sup> | 0,99           | -1922 <sup>a</sup>    |
| <b>R</b>   | 0,318 <sup>a</sup>  | 159,0 <sup>a</sup> | 0,98           | 11110 <sup>b</sup>    |
| <b>RWS</b> | 0,659 <sup>b</sup>  | 165,1 <sup>a</sup> | 1,00           | 36770 <sup>c</sup>    |
| <b>RWA</b> | 0,283 <sup>a</sup>  | 150,0 <sup>a</sup> | 0,99           | 3413 <sup>a</sup>     |

Podobnie jak większość płynów nienewtonowskich, kisiel nie jest produktem stabilnym reologicznie, a jego lepkość zależy od czasu działania sił ścinających. Na rysunku 2 przedstawiono krzywe zależności lepkości pozornej badanych deserów w zależności od czasu ścinania. W przypadku kisielei charakteryzujących się dużą lepkością (zagęszczonych skrobią ziemniaczaną zwykłą oraz ryżową woskową XS) lepkość pozorna ulegała relatywnie gwałtownemu obniżeniu na początkowym etapie badania, a następnie obserwowany był jej powolny progresywny spadek. W przypadku kisielei zagęszczonych skrobią woskową pochodzącą z ziemniaków oraz kukurydzy, widoczny jest wzrost lepkości w początkowym etapie ścinania. Następnie osiągana jest lepkość równowagowa. Z kolei lepkość pozorna pozostałych z badanych deserów ulegała nieznacznemu obniżeniu w początkowym etapie badania, osiągając plateau w czasie pierwszych 30 sekund ścinania. Tempo obserwowanych zmian w pewnym stopniu znajduje odzwierciedlenie w obliczonych wartościach tiksotropii (Tabela 2).



**Rysunek 2.** Krzywe lepkości pozornej w zależności od czasu ścinania

Między właściwościami reologicznymi a teksturą żywności obserwowana jest silna zależność [Lewandowicz i in., 2003]. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że badania reologiczne stanowią doskonałe narzędzie podczas projektowania nowych produktów czy opracowywania rekomendacji zastosowań dla zagęstników. Z kolei instrumentalne badania tekstury skorelowane z badaniami sensorycznymi pozwalają na obiektywną ocenę akceptowalności konsumenckiej deserów.

W tabeli 3 zestawiono analizowane parametry uniwersalnego profilu tekstury (TPA) badanych deserów. Wśród analizowanych parametrów tekstury największym zróżnicowaniem charakteryzowały się twardość, adhezyjność oraz gumowatość. Wartości sprężystości mieściły się w dość wąskim zakresie 0,86-1,00. W przypadku spójności nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między badanymi próbkami. Najsilniejszymi właściwościami teksturotwórczymi charakteryzowały się skrobie zwykłe: ziemniaczana oraz kukurydziana, kolejno skrobia ryżowa i skrobia woskowa (XS). Z kolei najsłabsze właściwości teksturotwórcze wykazywały pozostałe odmiany skrobi woskowych. Jednocześnie parametry uniwersalnego profilu tekstury kisieli przygotowanych z ich dodatkiem nie różniły się statystycznie istotnie.

**Tabela 3.** Wartości parametrów uniwersalnego profilu tekstury badanych kisieli

| Skrobia    | Twardość [N]       | Adhezyjność [N·s]  | Spójność [-]      | Sprężystość [-]     | Gumowatość [N]    |
|------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| <b>ŻEL</b> | 0,74               | -2,08              | 0,70 <sup>a</sup> | 0,94 <sup>bcd</sup> | 0,52              |
| <b>Z</b>   | 1,33 <sup>c</sup>  | -4,71              | 0,68 <sup>a</sup> | 0,93 <sup>bc</sup>  | 0,89              |
| <b>ZW</b>  | 0,37 <sup>a</sup>  | -0,04 <sup>a</sup> | 0,68 <sup>a</sup> | 1,00 <sup>d</sup>   | 0,25 <sup>a</sup> |
| <b>K</b>   | 1,19 <sup>bc</sup> | -12,58             | 0,67 <sup>a</sup> | 0,86 <sup>a</sup>   | 0,79              |
| <b>KW</b>  | 0,34 <sup>a</sup>  | 0,00 <sup>a</sup>  | 0,73 <sup>a</sup> | 1,00 <sup>d</sup>   | 0,25 <sup>a</sup> |
| <b>R</b>   | 0,39 <sup>a</sup>  | -0,34 <sup>a</sup> | 0,74 <sup>a</sup> | 0,99 <sup>cd</sup>  | 0,29 <sup>a</sup> |
| <b>RWS</b> | 1,05 <sup>b</sup>  | -3,58              | 0,63 <sup>a</sup> | 0,92 <sup>ab</sup>  | 0,66              |
| <b>RWA</b> | 0,36 <sup>a</sup>  | 0,00 <sup>a</sup>  | 0,73 <sup>a</sup> | 0,99 <sup>cd</sup>  | 0,26 <sup>a</sup> |

Kisiełe zagęszczane skrobiąmi mającymi tendencje do żelowania charakteryzował się wyższymi wartościami parametrów tekstury negatywnie postrzeganych przez konsumentów tj. adhezyjności oraz gumowatości. W szczególności skrobia kukurydziana zwykła charakteryzowała się niekorzystnymi proporcjami pomiędzy poszczególnymi wyznacznikami tekstury. Kisiele z dodatkiem skrobi woskowych charakteryzowały się znacznie delikatniejszą teksturą. Szczególnie korzystnie w tym aspekcie wypada skrobia ryżowa woskowa (XS), która równocześnie charakteryzuje się wysoką lepkością. Jednak ze względu na ponad dwukrotnie wyższą cenę tego gatunku skrobi w stosunku do skrobi ziemniaczanej woskowej, jej wykorzystanie jest ekonomicznie nieuzasadnione.

### Wnioski

Kisiełe wyprodukowane na bazie skrobi zwykłych oraz woskowych różnego pochodzenia botanicznego cechują się odmienną charakterystyką reologiczną. W znaczącej mierze wynika to ze zdolności skrobi odmian zwykłych do żelowania. Najsilniejszymi właściwościami zagęszczającymi tego typu deserów charakteryzują się skrobia ziemniaczana zwykła oraz ryżowa woskowa (XS). Przy czym zagęstnikiem pozwalającym otrzymać produkt o najwyższej jakości jest skrobia ziemniaczana woskowa. Mając na uwadze względy ekonomiczne, rekomendowanymi zagęstnikami do produkcji kisielu są obie odmiany skrobi ziemniaczanej.

*Autorzy pragną podziękować Panu Pawłowi Koniecznemu z firmy HORTIMEX PLUS oraz firmie AVEBE za przekazanie skrobi ziemniaczanej woskowej do badań.*

### Literatura

- Huang J., Chen Z., Xu Y., Li H., Liu S., Yang D., Schols H.A., Comparison of waxy and normal potato starch remaining granules after chemical surface gelatinization: Pasting behavior and surface morphology. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 102, 1001-1007.
- Le Thanh-Blicharz J., Walkowski A., Voelkel E., Bryła A., Lewandowicz J., Rheological properties of cross-linked E 1422 starches in high concentration sugars systems. *Towaroznawcze Problemy Jakości*, 2014, 3 (40), 62-70.
- Lewandowicz G., Wronkowska M., Sadowska J., Soral-Śmietana M., Błaszczak W., Walkowski A., Influence of potato starch oxidation on texture and rheological behavior of some sweet desserts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2003, 2 (53), 31-36.
- Luo F.X., Huang Q., Xiong F., Zhang L.X., Yu S.J., Preparation and characterisation of crosslinked waxy potato starch. *Food Chemistry*, 2009, 115, 563-568.
- Sikora M., Adamczyk G., Krystyan M., Tiksotropia miarą niestabilności ciekłych produktów żywnościowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 1 (74), 5-14.
- Sikora M., Krystyan M., Interakcje skrobi różnego pochodzenia botanicznego z nieskrobiowymi hydrokoloidami polisacharydowymi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 1(56), 23-40.

Tegge G., Stearke Und Stearkederivate, Behr's Verlag, 2004.

Walkowski A., Lewandowicz G., Balcerek W., Szymańska G., Voelkel E., Właściwości użytkowe wysokoamylopektynowej skrobi ziemniaczanej oraz preparatów z niej wytworzonych. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2004, 500, 513-524.

Walkowski A., Olesienkiewicz A., Kryteria doboru skrobi modyfikowanych w przetwórstwie żywności. Przemysł Spożywczy, 2005, 8, 59-61.

Wurzburg O.B., Modified Starches. Properties and Uses. CRS. Press. Inc., 1986.

Zander L., Zander Z., Haponiuk E., Charakterystyki płynięcia deserów skrobiowych. Inżynieria i aparatura chemiczna, 2009, 1 (48), 76-77.

JACEK LEWANDOWICZ

*Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości*

*Wydział Towaroznawstwa*

*Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*

*jacek.lewandowicz@ue.poznan.pl*

JOANNA LE THANH-BLICHARZ

*Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych*

*Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego*

## **WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNE ORAZ TEKSTURA BUDYNI ZAGĘSZCZONYCH SKROBIĄ WOSKOWĄ RÓŻNEGO POCHODZENIA BOTANICZNEGO**

### **Streszczenie**

Budyń jest deserem na bazie mleka z dodatkiem zagęstników (skrobi lub innych hydrokoloidów) oraz cukru i dodatków smakowo-zapachowych. Najczęściej stosowanym zagęstnikiem do produkcji budyni jest skrobia bielona. Alternatywą dla skrobi bielonych mogą być skrobie natywne odmian woskowych, które charakteryzują się konkurencyjnymi właściwościami reologicznymi.

Celem badań była ocena wpływu dodatku skrobi woskowych różnego pochodzenia botanicznego na właściwości reologiczne i uniwersalny profil tekstury budyni.

Materiał do badań stanowiły handlowe skrobie w odmianach zwykłych oraz woskowych: ziemniaczane, kukurydziane oraz ryżowe. Materiał odniesienia stanowiła ziemniaczana skrobia bielona. Badania reologiczne obejmowały: krzywe lepkości, zmianę lepkości w czasie ścinania oraz temperaturowy profil lepkości. Pomiary prowadzono z użyciem reometru rotacyjnego RotoVisco1 (Haake, Niemcy) stosując układ pomiarowy Z20 DIN. Teksturę budyni badano na teksturometrze TA.XT2 (Stable Micro Systems, Anglia) mierząc: twardość [N], adhezyjność [N·s], spójność [-], sprężystość [-] i gumowatość [N].

Badane budynie pod względem reologicznym stanowiły płyny nienewtonowskie, pseudoplastyczne i tiksotropowe. Najsilniejszymi właściwościami zagęszczającymi i teksturotwórczymi charakteryzowały się skrobie z tendencją do żelowania tj. kukurydziana zwykła oraz ziemniaczana zwykła. Jednak charakteryzowały się one małą stabilnością reologiczną. Z tego też względu rekomendowana jest produkcja budyni na bazie skrobi odmian woskowych.

**Słowa kluczowe:** skrobia woskowa, reologia, tekstura, budyń

### **Wprowadzenie**

Budynie to desery o półstałej teksturze na bazie mleka, skrobi i cukru [Lim i Narsimhan, 2006]. W handlu rosnącą popularnością cieszą się gotowe do spożycia po zalaniu wodą budynie typu instant, jednak do dyspozycji konsumentów są także budynie przeznaczone do samodzielnego przygotowania. W saszetkach znajdujemy proszek

składający się ze skrobi, hydrokoloidów, cukru, barwników i aromatów, a zadaniem konsumenta jest rozpuszczenie go w mleku i podgrzanie przygotowanej zawiesiny [Vélez-Ruiz i in., 2006].

Ważną rolę teksturotwórczą w tego typu deserach odgrywa rodzaj użytej do ich wytworzenia skrobi, która nadaje im takie cechy jak spójność czy sprężystość [Verbeken i in., 2006]. W literaturze odnajdujemy wiele prac na temat wpływu składu mlecznych deserów na ich właściwości reologiczne [Depypere i in., 2003; Lewandowicz i in., 2003; Verbeken i in., 2004; Mohammed i in., 2006; Tarrega i Costell, 2006; Verbeken i in., 2006; Vélez-Ruiz i in., 2006; Gonzalez-Tomas i in., 2007; Kersiene i in., 2008; Zander i in., 2009]. Połączenie skrobi z hydrokoloidami nieskrobiowymi powoduje zmiany właściwości reologicznych mieszanin w zależności od rodzaju i stężenia tych biopolimerów w układzie. Ponadto pochodzenie botaniczne skrobi może być źródłem zmienności właściwości reologicznych budyni.

Najpopularniejszym rodzajem skrobi stosowanym do produkcji tego typu deserów jest skrobia modyfikowana chemicznie na drodze utleniania [Lewandowicz i in., 2003]. Proces utleniania skrobi prowadzi do tworzenia się grup karboksylowych i karbonylowych oraz degradacji łańcucha skrobiowego. Z technologicznego punktu widzenia proces utleniania pozwala na uzyskanie produktu o obniżonej lepkości i tendencji do retrogradacji [Lewandowicz i Mączyński, 1990]. Ponadto skrobia bielona (o niskim stopniu podstawienia) charakteryzuje się ponadprzeciętną tendencją do żelowania [Lewandowicz i in., 2003].

Niechęć konsumentów w stosunku do skrobi modyfikowanych spowodował poszerzenie oferty rynkowej o tzw. skrobie woskowe, które mogą stanowić alternatywę dla stosowanych w przemyśle spożywczym skrobi modyfikowanych chemicznie. Skrobie woskowe nie zawierają amylozy (liniowej frakcji tego polisacharydu) i dlatego charakteryzują się unikalnymi właściwościami reologicznymi. Jednocześnie amyloza odpowiada za zdolność skrobi do żelowania, nadając charakterystyczną teksturę budyniu. Z tego względu możliwość wykorzystania skrobi woskowych do produkcji deserów mlecznych może być ograniczona. Dlatego celem niniejszej pracy była ocena właściwości reologicznych i tekstury budyni przygotowanych na bazie natywnych skrobi woskowych oraz weryfikacja przydatności technologicznej badanych skrobi do ich produkcji.

## **Materiał i metody**

Materiał do badań stanowiły natywne skrobie w odmianach zwykłych oraz woskowych:

- ziemniaczana Superior Standard (PPZ Trzemeszno, Polska),
- ziemniaczana woskowa "Eliane 100" (Avebe, Holandia),
- kukurydziana "Maisita 21.000" (Agrana, Austria),
- kukurydziana woskowa "Maisita 21.007" (Agrana, Austria),
- ryżowa "Remy DR" (Beneo, Belgia),
- ryżowa woskowa "Remyline XS" (Beneo, Belgia),
- ryżowa woskowa "Remyline AX-DR" (Beneo, Belgia).

Materiał odniesienia stanowiła ziemniaczana skrobia bielona „Skrobia Budyniowa” (WPPZ Luboń, Polska) o zawartości grup karboksylowych 0,04%.

Budyń przygotowywano na bazie: 18 g badanej skrobi, 20 g sacharozy, 250 g mleka o zawartości tłuszczu 3,2%, według metodyki zaproponowanej przez Lewandowicz i wsp. [2003]. Przygotowane próby do badań zakodowano następującymi oznaczeniami:

- **BUD** – budyń z dodatkiem skrobi bielonej „Skrobia Budyniowa”,
- **Z** – budyń z dodatkiem skrobi ziemniaczanej zwykłej,
- **ZW** – budyń z dodatkiem skrobi ziemniaczanej zwykłej woskowej,
- **K** – budyń z dodatkiem skrobi kukurydzianej zwykłej,
- **KW** – budyń z dodatkiem skrobi kukurydzianej woskowej,
- **R** – budyń z dodatkiem skrobi ryżowej zwykłej,
- **RWS** – budyń z dodatkiem skrobi ryżowej woskowej (XS),
- **RWA** – budyń z dodatkiem skrobi ryżowej woskowej (AX-DR).

Badania właściwości reologicznych prowadzono przy użyciu reometru rotacyjnego RotoVisco1 firmy Haake (Niemcy) wyposażonego w zestaw termostatu DC30-K10 oraz układ pomiarowy Z20 DIN. Próbkę budyniu przed pomiarem były relaksowane oraz termostatowane w cylindrze pomiarowym przez 5 minut. Rejestracji wyników oraz obliczeń dokonywano przy użyciu programu RheoWin 3.40. Wyznaczono:

- **krzywe lepkości pozornej zależności od szybkości ścinania**, w zakresie  $1-600-1\text{ s}^{-1}$ , czasie 4 min oraz temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$ . Otrzymane krzywe opisano modelem Ostwalda de Waele'a  $[\eta = K \cdot \dot{\gamma}^n]$  gdzie:  $\eta$  - lepkość ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ),  $K$  - współczynnik konsystencji [ $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ],  $\dot{\gamma}$  - szybkość ścinania ( $\text{s}^{-1}$ ),  $n$  - wskaźnik płynięcia (wielkość wskazująca na zbieżność z przepływem newtonowskim).

- **krzywe lepkości pozornej w zależności od temperatury**: w zakresie temperatury  $20-60^{\circ}\text{C}$ , przy prędkości ogrzewania  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  oraz szybkości ścinania  $100\text{ s}^{-1}$ . Otrzymane krzywe opisano równaniem Arrhenius TTS  $[\eta_p = \eta_{\infty} \cdot \exp(\frac{E}{R \cdot T})]$  gdzie:  $\eta_p$  - lepkość pozorna ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ),  $\eta_{\infty}$  - stała materiałowa ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ),  $E$  - energia aktywacji płynięcia ( $\text{J}/\text{mol}$ ),  $R$  - stała gazowa ( $\text{J}/\text{K}\cdot\text{mol}$ ),  $T$  - temperatura ( $\text{K}$ ).

- **krzywe lepkości pozornej w zależności od czasu ścinania**, w trybie CR, czasie 5 minut przy szybkości ścinania  $50\text{ s}^{-1}$  i temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$ .

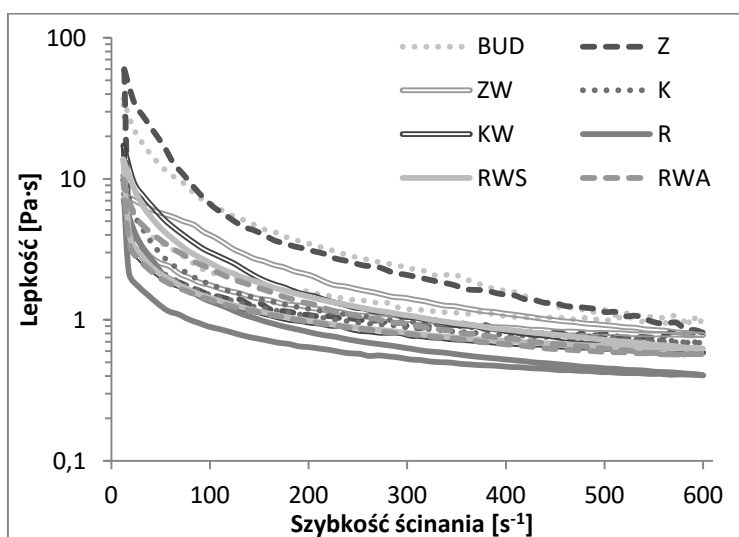
Analizę uniwersalnego profilu tekstury (TPA) wykonano przy użyciu teksturometru TA.XT2 firmy Stable Micro Systems (Wielka Brytania) wyposażonego w aluminiową cylindryczną sondę o średnicy 35 mm. Przeprowadzono test „podwójnego ugryzienia” - próbki budyniu były dwukrotnie penetrowane na głębokość 20 mm z prędkością  $0,5\text{ mm}/\text{s}$ . Wyznaczono następujące wyróżniki tekstury: twardość (N), adhezynność ( $\text{N}\cdot\text{s}$ ), spójność, sprężystość i gumowatość (N).

Statystyczną analizę danych wykonano w programie Statistica 12 (StatSoft). Prezentowane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem Tukey'a. Za graniczny poziom istotności przyjęto  $p=0,05$ . Grupy jednorodnie oznaczono tą samą literą.

## Wyniki i dyskusja

Desery typu budyń należy rozpatrywać jako kleik skrobiowy stabilizowany białkami mleka, dlatego ich właściwości reologiczne będą przypominały zarówno żele jak i płyny [Oakenfull i in., 1999; Chantrapornchai i McClements, 2002; Dierckx i Huyghebaert, 2002;

Luck i in., 2002; Dickinson, 2003]. Na rysunku 1 przedstawiono przykładowe krzywe lepkości badanych budyni. Wszystkie badane desery były płynami nienewtonowskimi, pseudoplastycznymi, tikotropowymi oraz charakteryzowały się granicą płynięcia. Podobnie zachowywały się produkty handlowe w badaniach przeprowadzonych przez Zander i wsp. [2009]. Najwyższymi wartościami lepkości w całym zakresie szybkości ścinania charakteryzowały się wszystkie budynie zagęszczone różnymi rodzajami skrobi ziemniaczanej. Obserwowane różnice między budyniami na bazie skrobi ziemniaczanej zwykłej oraz budyniowej były niewielkie. Z kolei deser przygotowany ze skrobi ziemniaczanej woskowej charakteryzował się wyraźnie mniejszą lepkością od pozostałych. Obserwowane różnice między pozostałymi budyniami były stosunkowo niewielkie. Jedyne wyjątek stanowił deser zagęszczony skrobią ryżową zwykłą, którego lepkość w całym badanym zakresie szybkości ścinania była najniższa.



**Rysunek 1.** Krzywe lepkości badanych budyni

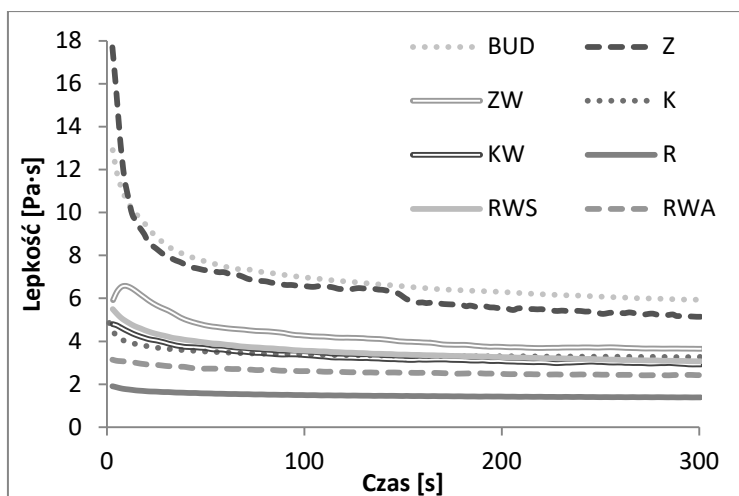
Parametry lepkościowego równania Ostwalda de Waele'a, którym opisano otrzymane krzywe lepkości, zestawiono w tabeli 1. Najwyższą wartością współczynnika konsystencji (**K**) cechował się budyń z dodatkiem skrobi ziemniaczanej zwykłej, jednocześnie wartość współczynnika wskazującego na zbieżność z przepływem newtonowskim (**n**) przypisana dla tego deseru była najniższa. Pozostałe skrajne wartości współczynników równania Ostwalda de Waele'a obliczono dla budyniu zagęszczonego skrobią ryżową woskową (XS), którego konsystencja była najniższa, a przepływ najbardziej zbliżony do newtonowskiego. Za wyjątkiem wspomnianego wcześniej budyniu przygotowanego na skrobi ryżowej woskowej (XS), oba parametry równania Ostwalda de Waele'a nie różniły się statystycznie istotnie w grupie deserów zagęszczonych skrobiami woskowymi. Zagęstnikami o podobnym wpływie na właściwości reologiczne budyniu (jak i w przypadku materiału odniesienia - skrobi budyniowej) były odpowiednio skrobia kukurydziana woskowa oraz ziemniaczana zwykła.

W badanych deserach wyraźnie widoczne było zjawisko tiksotropii, które na krzywych lepkości charakteryzuje się mniejszym wzrostem lepkości niż początkowy jej spadek na etapie, gdy szybkość ścinania jest obniżana [Schramm, 1988]. Tiksotropowa struktura produktu spożywczego jest niekorzystna, ponieważ świadczy o niestabilności reologicznej [Sikora i in., 2011]. Należy jednak zwrócić uwagę, że ze względu na aspekty sensoryczne całkowite wyeliminowanie struktury tiksotropowej budyniu jest niepożądane. W tabeli 1 zestawiono wartości pola powierzchni pętli histerezy tiksotropii. Wielkość tego parametru była wyraźnie dodatnio skorelowana z lepkością odczytaną z krzywych lepkości (rysunek 1). Budynie o wysokiej lepkości (zagęszczone różnymi rodzajami skrobi ziemniaczanej) cechowały się wysokimi wartościami tiksotropii. Podczas gdy najniższą wartość pola powierzchni pętli histerezy obliczono dla deseru o najniższej lepkości na bazie skrobi ryżowej. Jednocześnie wartości tiksotropii dla pozostałych deserów nie różniły się statystycznie istotnie.

**Tabela 1.** Wartości parametrów lepkościowego równania Ostwalda de Waele’a oraz tiksotropia badanych budyni

| Skrobia    | Model<br>Ostwalda de Waele’a (Lepkość) |                      |                | Tiksotropia           |
|------------|----------------------------------------|----------------------|----------------|-----------------------|
|            | K [Pa·s <sup>n</sup> ]                 | n                    | R <sup>2</sup> | [Pa/s]                |
| <b>BUD</b> | 321,6 <sup>b</sup>                     | 0,150 <sup>ab</sup>  | 1,00           | 183 700 <sup>d</sup>  |
| <b>Z</b>   | 700,6                                  | 0,016 <sup>a</sup>   | 1,00           | 209 800 <sup>d</sup>  |
| <b>ZW</b>  | 63,9 <sup>a</sup>                      | 0,361 <sup>de</sup>  | 0,95           | 72 015 <sup>c</sup>   |
| <b>K</b>   | 83,1 <sup>a</sup>                      | 0,247 <sup>bcd</sup> | 1,00           | 23 155 <sup>ab</sup>  |
| <b>KW</b>  | 110,5 <sup>ab</sup>                    | 0,213 <sup>bc</sup>  | 1,00           | 51 140 <sup>bc</sup>  |
| <b>R</b>   | 62,2 <sup>a</sup>                      | 0,169 <sup>b</sup>   | 1,00           | 19 580 <sup>a</sup>   |
| <b>RWS</b> | 32,9 <sup>a</sup>                      | 0,460 <sup>e</sup>   | 0,96           | 43 810 <sup>abc</sup> |
| <b>RWA</b> | 45,7 <sup>a</sup>                      | 0,332 <sup>cde</sup> | 0,99           | 25 375 <sup>ab</sup>  |

Jak wspomniano wcześniej, budyń należy do produktów niestabilnych reologicznie, a jego lepkość zależy od czasu działania sił ścinających. W pewnym stopniu wynika to z typowej dla budyniu żelowej struktury, która jest osiągana po ochłodzeniu. Na rysunku 2 przedstawiono krzywe zależności lepkości pozornej od czasu ścinania badanych deserów. Otrzymane wyniki dostarczają tożsamyh informacji o badanych zagęstnikach zarówno względem lepkości (Rys 1.) jak i stabilności (Tab 2.). Największym spadkiem lepkości charakteryzowały się próbki budyniu o wysokiej lepkości oraz tiksotropii (zagęszczone skrobiami ziemniaczanymi), z kolei najmniejsze zmiany odnotowano dla deseru zagęszczonego skrobią ryżową, który cechowała najniższa lepkość oraz tiksotropia.



**Rysunek 2.** Krzywe lepkości pozornej w zależności od czasu ścinania badanych budyni

Budyni należy do produktów, które mogą być spożywane na zimno i na gorąco. Zazwyczaj produkty typu instant, które charakteryzują się strukturą zolu konsumowane są na gorąco lub w temperaturze pokojowej, podczas gdy produkty tradycyjne o strukturze żelu podaje się w temperaturach chłodniczych. Temperatura ma znaczący wpływ na lepkość płynów, ponieważ wraz z jej wzrostem rośnie energia, jaka jest dostarczana do próbki, wskutek czego oddziaływania oraz tarcie międzycząsteczkowe podczas płynięcia jest zmniejszone [Juszczak i in., 2012]. Ma to szczególne znaczenie podczas projektowania nowych produktów, ponieważ temperatura serwowania będzie wpływała na wydajność użytego zagęstnika.

W tabeli 2 zestawiono parametry równania Arrhenius TTS, którym opisano krzywe zależności lepkości pozornej od temperatury badanych budyni. Wykorzystany model charakteryzował się bardzo dobrym dopasowaniem do uzyskanych danych empirycznych ( $R^2 > 0,98$ ). Najwyższymi wartościami stałej materiałowej ( $\eta_{\text{op}}$ ) charakteryzowały się budynie na bazie skrobi posiadających dużą zdolność do żelowania (budyniowa oraz kukurydziana zwykła). Kolejną co do wielkości wartość parametru ( $\eta_{\text{op}}$ ) przypisano deserowi na bazie skrobi ziemniaczanej zwykłej, która cechuje się nieco słabszą tendencją do tworzenia żelu. Różnice w wartościach stałej materiałowej pozostałych deserów nie różniły się istotnie statystycznie z wyjątkiem budyniu przygotowanego na bazie skrobi ryżowej zwykłej, który charakteryzował się najniższą lepkością. Najwyższą wartość energii aktywacji płynięcia ( $E$ ) (wynoszącą 229,2 J/mol) wyznaczono dla budyniu zagęszczanego skrobią ziemniaczaną zwykłą. Dobrą odpornością reologiczną na zmiany temperatury charakteryzowały się także desery przygotowane na bazie skrobi budyniowej oraz skrobi woskowych. Jednocześnie budynie na bazie skrobi odmian zwykłych cechowały się mniejszymi wartościami energii aktywacji płynięcia.

**Tabela 2.** Wartości parametrów równania Arrhenius TTS badanych budyni

| Skrobia    | Model Arrhenius TTS    |                    |                |
|------------|------------------------|--------------------|----------------|
|            | $\eta_{\infty}$ [Pa·s] | E [J/mol]          | R <sup>2</sup> |
| <b>BUD</b> | 1,306 <sup>d</sup>     | 201,7 <sup>b</sup> | 0,99           |
| <b>Z</b>   | 0,886 <sup>c</sup>     | 229,2              | 0,98           |
| <b>ZW</b>  | 0,802 <sup>bc</sup>    | 189,8 <sup>b</sup> | 0,98           |
| <b>K</b>   | 1,240 <sup>d</sup>     | 147,9 <sup>a</sup> | 0,99           |
| <b>KW</b>  | 0,641 <sup>a</sup>     | 203,8 <sup>b</sup> | 0,99           |
| <b>R</b>   | 0,405                  | 163,8 <sup>a</sup> | 0,99           |
| <b>RWS</b> | 0,670 <sup>ab</sup>    | 197,7 <sup>b</sup> | 1,00           |
| <b>RWA</b> | 0,787 <sup>abc</sup>   | 144,3 <sup>a</sup> | 0,99           |

Tekstura obok smakowitości stanowi jeden z najważniejszych wyróżników jakościowych budyniu. Metoda profilowania tekstury pozwala na obiektywny wieloparametrowy pomiar właściwości mechanicznych produktu spożywczego. Analizowane parametry uniwersalnego profilu tekstury zestawiono w tabeli 3. Wśród badanych wyróżników tekstury największym zróżnicowaniem charakteryzowały się twardość oraz adhezyjność. Wartości spójności i sprężystości nie różniły się istotnie statystycznie. Z kolei różnice w gumowatości, która jest iloczynem twardości i spójności, wynikały w znaczącej mierze ze zmian twardości. Podobną charakterystykę profilu tekstury otrzymali Lewandowicz i wsp. [2003], którzy analizowali budynie przygotowane na bazie skrobi utlenionych o różnym stopniu podstawienia.

Najwyższą twardością oraz adhezyjnością charakteryzowały się budynie z dodatkiem skrobi o dużej skłonności do żelowania (budyniowa, ziemniaczana zwykła oraz kukurydziana zwykła). Stosunkowo wysokimi wartościami wspomnianych parametrów tekstury cechował się także deser na bazie skrobi ryżowej woskowej (XS), którego lepkość pośród analizowanych próbek była najwyższa. Budynie przygotowane na bazie skrobi woskowych charakteryzowały się „sensorycznie” delikatniejszą teksturą. Pozwala to na rekomendowanie tych zagęstników do produkcji wariantu instant tego deseru.

**Tabela 3.** Wartości parametrów uniwersalnego profilu tekstury badanych budyni

| Skrobia    | Twardość [N]       | Adhezyjność [N*s]    | Spójność [-]      | Sprężystość [-]   | Gumowatość [N]     |
|------------|--------------------|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| <b>BUD</b> | 3,19 <sup>bc</sup> | -33,38 <sup>d</sup>  | 0,59 <sup>a</sup> | 0,91 <sup>a</sup> | 1,88 <sup>b</sup>  |
| <b>Z</b>   | 3,87 <sup>c</sup>  | -18,03 <sup>c</sup>  | 0,64 <sup>a</sup> | 0,92 <sup>a</sup> | 2,45 <sup>c</sup>  |
| <b>ZW</b>  | 0,59 <sup>a</sup>  | -1,35 <sup>a</sup>   | 0,68 <sup>a</sup> | 0,92 <sup>a</sup> | 0,40 <sup>a</sup>  |
| <b>K</b>   | 4,29 <sup>c</sup>  | -34,56 <sup>d</sup>  | 0,54 <sup>a</sup> | 0,91 <sup>a</sup> | 2,23 <sup>bc</sup> |
| <b>KW</b>  | 1,21 <sup>a</sup>  | -1,57 <sup>a</sup>   | 0,63 <sup>a</sup> | 0,90 <sup>a</sup> | 0,76 <sup>a</sup>  |
| <b>R</b>   | 0,85 <sup>a</sup>  | -5,53 <sup>ab</sup>  | 0,72 <sup>a</sup> | 0,96 <sup>a</sup> | 0,61 <sup>a</sup>  |
| <b>RWS</b> | 1,82 <sup>ab</sup> | -16,33 <sup>bc</sup> | 0,69 <sup>a</sup> | 0,96 <sup>a</sup> | 1,25               |
| <b>RWA</b> | 0,98 <sup>a</sup>  | -1,61 <sup>a</sup>   | 0,64 <sup>a</sup> | 0,92 <sup>a</sup> | 0,62 <sup>a</sup>  |

## Wnioski

Budynie przygotowane na bazie skrobi odmian zwykłych oraz woskowych różnego pochodzenia botanicznego cechują się odmienną teksturą oraz charakterystyką reologiczną. Najsilniejszą zdolnością zagęszczającą cechowały się obie odmiany skrobi ziemniaczanej, z kolei najsilniejsze właściwości teksturotwórcze wykazywały skrobie odmian zwykłych ziemniaczana oraz kukurydziana. Zagęstnikami pozwalającymi na otrzymanie produktu o najwyższej jakości są woskowe odmiany skrobi ziemniaczanej, kukurydzianej oraz ryżowej (XS).

*Autorzy pragną podziękować Panu Pawłowi Koniecznemu z firmy HORTIMEX PLUS oraz firmie AVEBE za przekazanie skrobi ziemniaczanej woskowej do badań.*

## Literatura

Chantrapornchai W., McClements D.J., Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 202, 16 (5), 467–476.

Depypere F., Verbeken D., Thas O., Dewettinck K., Mixture design approach on the dynamic rheological and uniaxial compression behaviour of milk desserts. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, 311-320.

Dickinson E., Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17 (1), 25-39.

Dierckx S., Huyghebaert A., Effects of sucrose and sorbitol on the gel formation of a whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16 (5), 489–497.

Gonzalez-Tomas L., Bayarri S., Taylor A. J., Costell E., Flavour release and perception from model dairy custards. *Food Research International*, 2007, 40, 520-528.

Juszczak L., Oczadły Z., Gałkowska D., 2012. Effect of Modified Starches on Rheological Properties of Ketchup. *Food and Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-012-0813-x

Kersiene M., Adams A., Dubra A., De Kimpe N., Leskauskaitė D., Interactions between flavour release and rheological properties in model custard desserts: effects of starch concentration and milk fat. *Food Chemistry*, 2008, 108, 1183- 1191.

Lewandowicz G., Wronkowska M., Sadowska J., Soral-Śmietana M., Błaszczak W., Walkowski A., Influence of potato starch oxidation on texture and rheological behaviour of some sweet desserts, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2003, 2 (53), 31-36.

Lewandowicz G., Mączyński M., Chemiczna modyfikacja skrobi. Cz. I. Modyfikacja skrobi ziemniaczanej, *Chemik*, 1990, 1, 9-14.

Lim H. S., Narsimhan G., Pasting and rheological behavior of soy protein-based pudding. *LWT Food Science and Technology*, 2006, 29, 343-349.

- Luck P.J., Lanier T.C., Daubert C.R., Kwanyuen P., Viscoelastic behavior of commercially processed soy isolate pastes during heating and cooling. *Journal of Food Science*, 2002, 67 (4), 1379–1382.
- Mohameed H. A., Abu-Jdayil B., Eassa A. M., Flow properties of corn starch-milk-sugar system prepared at 368.15 K. *Journal of Food Engineering*, 2006, 77, 958-964.
- Oakenfull D., Miyoshi E., Nishinari K., Scott A., Rheological and thermal properties of milk gels formed with  $\kappa$ -carrageenan. I. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 1999, 13 (6), 525–533.
- Sikora M., Adamczyk G., Krystyjan M., Tiksotropia miarą niestabilności ciekłych produktów żywnościowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 1 (74), 5-14.
- Tarrega A., Costell E., Effect of composition on the rheological behavior and sensory properties of semisolid dairy dessert. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20, 914-922.
- Tegge, G., Skrobia i jej pochodne, Polskie Towarzystwo Technologów Żywności Oddział Małopolski, Kraków, 2010.
- Vélez-Ruiz J., Hernando I., González-Tomás L., Pérez-Munuera I., Quiles A., Tàrrega A., Lluch M.A., Costell E., Rheology and microstructure of custard model systems with cross-linked waxy maize starch. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, 21, 30-36.
- Verbeken D., Bael K., Thas O., Dewettinck K., Interactions between  $\kappa$ -carrageenan, milk proteins and modified starch in sterilized dairy desserts. *International Dairy Journal*, 2006, 16, 482-488.
- Verbeken D., Thas O., Dewettinck K., Textural properties of gelled dairy desserts containing  $\kappa$ -carrageenan and starch. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18, 817-823.
- Zander L., Zander Z., Haponiuk E., Charakterystyki płynięcia deserów skrobiowych, *Inżynieria i aparatura chemiczna*, 2009, 1 (48), 76-77.

MARZANNA HEŚ, DANUTA GÓRECKA, DOMINIK KMIECIK,  
JOANNA KOBUS-CISOWSKA

*Katedra Technologii Żywienia Człowieka*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

*marzahes@up.poznan.pl*

## **WYKORZYSTANIE WYBRANYCH HYDROKOLOIDÓW JAKO ZAMIENNIKÓW TŁUSZCZU W EMULSJACH MAJONEZOWYCH**

### **Streszczenie**

Celem pracy była ocena wybranych hydrokoloidów, jako zamienników tłuszczu, do przygotowania emulsji majonezowych o obniżonej zawartości tłuszczu. Do badań wykorzystano preparaty inuliny HP i HPX, gumę arabską i ksantan, zasmażkę I stopnia bez tłuszczu oraz żelatynę. Zawartość fazy olejowej w majonezach z dodatkami obniżono o 50%. Przygotowane majonezy poddano ocenie sensorycznej metodą punktową, dodatkowo oceniono adhezyjność, gęstość, jednorodność, sprężystość, kleistość oraz lepkość.

Wyniki badań wskazują, że wykorzystane hydrokoloidy mogą być stosowane do produkcji majonezów o obniżonej zawartości tłuszczu. Wprowadzone dodatki nadały pożądane walory sensoryczne i odpowiednią lepkość emulsjom majonezowym. Najlepszą jakością charakteryzował się majonez z dodatkiem żelatyny. Zastosowanie tego zamiennika, oprócz obniżenia kaloryczności, pozwoliło na uzyskanie produktu o najwyższej lepkości oraz walorach sensorycznych lepszych od majonezu z pełną zawartością tłuszczu.

**Słowa kluczowe:** emulsja, hydrokoloidy, majonez, zamienniki tłuszczu

### **Wprowadzenie**

Stosowanie zamienników tłuszczu w produkcji żywności pozwala najskuteczniej obniżyć jej kaloryczność. Nie jest to proces łatwy, ponieważ zastąpienie tłuszczu innymi dodatkami lub całkowite wyeliminowanie go z produktu stanowi poważny problem technologiczny. Tłuszcz jest składnikiem kształtującym wiele cech sensorycznych produktów, np. teksturę i smakowość [Tyszkiewicz, 1992]. Produkcja żywności o obniżonej energetyczności wymaga zatem zastosowania dodatków o odpowiednich właściwościach, konsekwencją czego będzie uzyskanie zamierzonego efektu technologicznego. Ze względu na właściwości zamienniki tłuszczu dzieli się na substytuty (analogi) tłuszczu, mimetyki tłuszczu oraz substancje barierowe. Substytuty tłuszczu to substancje, których termiczne i fizyczne właściwości przypominają tłuszcz i mogą go całkowicie zastąpić we wszystkich zastosowaniach, nie wyłączając smażenia [Mleko i Achremowicz, 1994; Górecka i Krygier, 2004]. Przykład takiego substytutu stanowi olestra, która jest mieszaniną sześć-, siedmio- i ośmiostrów sacharozy z kwasami tłuszczowymi o długich łańcuchach. Drugą bardzo liczną grupą zamienników tłuszczu są mimetyki tłuszczu, które posiadają tylko niektóre technologiczne właściwości tłuszczów, np. teksturotwórcze, emulgujące. Należą do nich związki na bazie węglowodanów białek,

są więc to substancje charakteryzujące się odmiennym profilem smakowym niż tłuszcze i nie mogą być stosowane w procesie smażenia, ponieważ stosunkowo łatwo ulegają denaturacji lub karmelizacji. Mimetyki znalazły jednak zastosowanie jako zamienniki tłuszczu do produkcji emulsji majonezowych. Typowy majonez zawiera 70-80% tłuszczu i mimo wysokiej zawartości tłuszczu w stosunku do wody, jest emulsją typu olej w wodzie. W wyniku dużego stężenia fazy olejowej w stosunku do wodnej, czynnikiem stabilizującym emulsje majonezowe jest wysoka lepkość [Kowalska i in., 2011].

Węglowodanowe zamienniki tłuszczu są jedną z najbardziej popularnych grup, już od wielu lat można je spotkać w produktachiskoenergetycznych ze względu na funkcje jakie pełnią. Są to długołańcuchowe i wielkocząsteczkowe polimery, które są rozpuszczalne bądź zawieszalne w wodzie. Mają właściwości zagęszczające, żelujące, stabilizujące, stosuje się je w stęż. 0,1 – 0,5%, ponieważ już w tak niskim stężeniu mocno powiększają lepkość fazy wodnej oraz stabilizują emulsje [Tyszkiewicz, 1992; Słomińska, 1999; Borowy i Kubiak, 2010a; Borowy i Kubiak, 2010b]. Białkowe zamienniki tłuszczu są głównie pochodzenia mlecznego i jajecznego. Naturalnym białkowym zamiennikiem tłuszczu jest także żelatyna, która nie denaturuje cieplnie, ale upłynnia się w wysokiej temperaturze i żeluje w niskiej [Tyszkiewicz, 1992].

Celem pracy była ocena przydatności wybranych preparatów pochodzenia węglowodanowego i białkowego, jako zamienników tłuszczu, do otrzymania emulsji majonezowych o zmniejszonej zawartości tłuszczu oraz określenie wpływu tych dodatków na właściwości sensoryczne i wyróżniki fizykochemiczne przygotowanych emulsji majonezowych.

### **Materiał i metody badań**

#### **Materiał**

Materiał do badań stanowiły handlowe preparaty gumy arabskiej i ksantanu (Hortimex) oraz inuliny Raftiline® HP i HPX (Orafti). Inulina HP wykazuje wysoką lepkość i lekko słodki smak, inulina HPX natomiast jest fruktooligosacharydem bez smaku i zapachu, o wysokiej zdolności do żelowania oraz podwyższonej stabilności termicznej. W badaniach wykorzystano również żelatynę wieprzową (Winiary), mąkę pszenną wrocławską (Polskie Młyny) oraz Kujawski olej rzepakowy (ZT „Kruszwica” S.A.).

#### **Metody**

Emulsje majonezowe otrzymano wg receptur przedstawionych w Tab. 1.

**Tabela 1.** Receptury emulsji majonezowych o obniżonej zawartości tłuszczu otrzymanych z dodatkiem hydrokoloidów

| Zamiennik tłuszczu              | Olej (ml) | Pozostałe składniki                                                                 |
|---------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Bez dodatku (wzorcowy)          | 100       | musztarda sarepska (3 g), żółtko jaja (30 g), ocet 6% (1 ml), cukier i sól do smaku |
| Żelatyna                        | 50        | roztwór żelatyny (3 g) w wodzie (15 ml) + „baza”                                    |
| Inulina HP                      |           | żel inulinowy HP (12,5 g) + „baza”                                                  |
| Inulina HPX                     |           | żel inulinowy HPX (12,5 g) + „baza”                                                 |
| Guma arabska + ksantan          |           | roztwór gumy arabskiej (1g) i ksantanu (0,75 g) w wodzie (20 ml) + „baza”           |
| Zasmażka I stopnia bez tłuszczu |           | biała zasmażka (80 g) + „baza”                                                      |

#### **Sporządzenie majonezu:**

Do naczynia okrągłodennego włożono żółtko, dodano 1/3 ilości przewidzianej musztardy i całość rozmieszano. Następnie dodawano bardzo cienkim strumieniem (kroplami) olej, kierując go na ścianki naczynia i ucierano emulsję zachowując jeden kierunek ucierania. W chwili wytworzenia galaretowatej masy, zwiększono ilość dodawanego oleju, szybko mieszając. Po zużyciu oleju dodano resztę musztardy, sól i cukier i dalej szybko mieszając przewidzianą ilość hydrokoloidów. Majonez przełożono do szklanego naczynia.

„Bazę” stanowią następujące składniki: musztarda sarepska (3 g), żółtko jaja (30 g), ocet 6% (1 ml), cukier i sól do smaku.

#### **Przygotowanie roztworu żelatyny:**

3 g żelatyny rozpuszczono w 15 ml ciepłej wody (w/v). Przed zastosowaniem roztwór schłodzono.

#### **Przygotowanie żeli inulinowych:**

10 g inuliny HP lub HPX rozpuszczono na zimno w 10 ml wody (w/v). Otrzymane w ten sposób zole pozostawiono na 24 godz. w temp. 20°C w celu wytworzenia żelu. 4 g tłuszczu w majonezie zastąpiono 1 g żelu.

#### **Przygotowanie roztworu gumy arabskiej i ksantanu:**

1 g gumy arabskiej i 0,75 g ksantanu rozpuszczono w 20 ml zimnej wody (w/v).

### **Przygotowanie zasmażki I stopnia bez tłuszczu:**

Na patelnię wsypano 24 g mąki pszennej, którą ogrzewano bez zmian barwy tak, by łatwo przesuwiała się na patelni, a następnie schłodzono i dodano ok. 120 ml zimnej wody. Całość wymieszano i ogrzewając dokładnie rozklejono.

### **Metody badania emulsji majonezowych**

Przygotowane majonezy zostały poddane ocenie sensorycznej metodą punktową. Dokonano oceny konsystencji, barwy, smaku, zapachu, wyglądu majonezu, posługując się Tab. 2. Ocenę ogólną majonezów obliczono mnożąc średnie oceny dla każdego wyróżnika jakościowego przez ustalone współczynniki ważkości i zsumowanie wyników. Współczynnik ważkości dla smakowitości wynosił 0,4, dla barwy i zapachu 0,2, natomiast konsystencji i wyglądu ogólnego 0,1. Otrzymane próbki emulsji obserwowano także pod mikroskopem optycznym SM 102 A LED (Intraco Micro) przy powiększeniu  $10 \times 10$ . W tym celu na szkiełka podstawowe naniesiono igłą preparacyjną niewielką ilość badanej emulsji, lekko ją rozprowadzając i nie przykrywając szkiełkiem nakrywkowym. Na podstawie obserwacji mikroskopowych i wyciągnięto wnioski dotyczące wyglądu emulsji.

Zakres badań otrzymanych emulsji majonezowych obejmował również określenie ich adhezyjności (przylepność próbki do łyżeczki), gęstości (doustne odbieranie wrażenia lepkości), jednorodności (wrażenie gładkości i jednorodności próbki), sprężystości (elastyczne odkształcenie się próbki) i kleistości (stopień przylegania próbki do języka i podniebienia). Kleistość i jednorodność oceniono w zakresie ocen: brak, występuje, natomiast adhezyjność, gęstość i sprężystość w zakresie: zła, dopuszczająca, dostateczna, dobra, bardzo dobra/bardzo duża, zbyt duża. Oznaczono również lepkość majonezów z wykorzystaniem lepkościomierza rotacyjnego Fungilab EXPERT.

**Tabela 2.** Układ skali pięciopunktowej oceny majonezów

| Wyróżnik jakości | Skala punktowa                                                  |                                  |                                                                |                                                       |                                                                                          |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | 5                                                               | 4                                | 3                                                              | 2                                                     | 1                                                                                        |
| Barwa            | Ciemnokremowa, lekko żółtawa, całkowicie wyrównana, błyszcząca  | Żółta, wyrównana, błyszcząca     | Ciemnożółta lub zbyt biała, pojedyncze plamy, smugi, matowa    | Niejednorodna, widoczne duże plamy, nietypowa, matowa | Nienaturalna, odbiegająca od typowej, intensywnie niejednorodna                          |
| Zapach           | Obojętny, typowy, czysty aromat                                 | Delikatny, lekko wyczuwalny      | Wyczuwalny nietypowy                                           | Intensywny, o zdecydowanym nasileniu aromatu          | Wyczuwalny kwaśny aromat, drażniący                                                      |
| Konsystencja     | Puszysta, lekka, gładka, typowa, gęsta, jednorodna              | Puszysta, mało gęsta, jednorodna | Lekko oleista, mało puszysta lub wcale, widoczne grudki        | Wodnista, rozwarstwiająca się, niejednorodna          | Rozpływająca się, widoczne wydzielenie się kropelek tłuszczu, zdecydowanie niejednorodna |
| Wygląd ogólny    | Estetyczny, apetyczny, zachęcający                              | Estetyczny, zadowalający         | Poprawny, mało apetyczny                                       | Niezachęcający, dopuszczający                         | Zdecydowanie nieapetyczny, odrzucający                                                   |
| Smak             | Pożądaný, typowy, delikatny o umiarkowanym smaku słodko-kwaśnym | Typowy, przyjemny, słodko-kwaśny | Słabo lub zbyt mocno wyczuwalny kwaśny smak, lekki posmak obcy | Niepożądany, nietypowy, wyczuwalny obcy posmak        | Drażniący, gorzki, jełki, wyraźny obcy posmak emulgatora                                 |

## Wyniki i dyskusja

Wyniki oceny sensorycznej emulsji majonezowych o obniżonej zawartości tłuszczu i dodatkiem hydrokoloidów przedstawiono w Tab. 3.

**Tabela 3.** Zestawienie wyników przeprowadzonej oceny sensorycznej majonezów (pkt)

| Majonez                    | Barwa | Zapach | Smak | Konsystencja | Wygląd ogólny |
|----------------------------|-------|--------|------|--------------|---------------|
| wzorcowy                   | 3,7   | 4,3    | 3,8  | 3,7          | 3,4           |
| z żelatyną                 | 4,6   | 4,6    | 3,7  | 4,0          | 3,1           |
| z inuliną HP               | 3,3   | 2,9    | 2,3  | 2,8          | 2,6           |
| z inuliną HPX              | 3,9   | 3,4    | 2,4  | 2,6          | 3,0           |
| z gumą arabską i ksantanem | 3,4   | 4,3    | 3,8  | 3,3          | 3,1           |
| z zasmażką                 | 4,3   | 3,8    | 2,9  | 4,1          | 4,3           |

Pod względem barwy, zapachu i konsystencji wyższe noty w porównaniu z majonezem pełnotłustym otrzymał majonez z dodatkiem żelatyny. Emulsja ta charakteryzowała się najatrakcyjniejszą barwą i zapachem dla ocenianujących. W przypadku konsystencji i wyglądu ogólnego najwyższą ocenę otrzymał majonez z dodatkiem zasmażki, natomiast równie smaczny co majonez tradycyjny okazał się majonez z gumą arabską i ksantanem. Pod względem smaku i konsystencji najniżej ocenione zostały majonezy z dodatkiem żeli inulinowych. W ocenie ogólnej majonezów, z uwzględnieniem współczynników ważkości, najlepszy wynik otrzymał majonez z dodatkiem żelatyny (Tab. 4). Jędrzejkiewicz i Florkowska [2007] podają, że na jakość ogólną majonezów inulinowych najkorzystniej wpływa dodatek gumy guar, natomiast dodatek żelatyny powoduje znaczne obniżenie ocen tej cechy. W majonezie z dodatkiem żelatyny, odczuwano smak mdły, natomiast dodatek skrobi powoduje pojawienie się posmaku mącznego. Autorki wykazały, że majonezy z udziałem samej inuliny, bez dodatku hydrokoloidów, charakteryzowały się niską stabilnością. Dodatek gumy guar korzystnie wpłynął na stabilność produktu końcowego, co może świadczyć o synergistycznym oddziaływaniu inuliny i gumy guar.

**Tabela 4.** Ocena ogólna majonezów (pkt)

| Majonez                    | Ocena ogólna |
|----------------------------|--------------|
| wzorcowy                   | 3,83         |
| z żelatyną                 | 4,03         |
| z inuliną HP               | 2,70         |
| z inuliną HPX              | 2,98         |
| z gumą arabską i ksantanem | 3,70         |
| z zasmażką                 | 3,62         |

W aspekcie adhezyjności, gęstości, jednorodności, sprężystości i kleistości majonezów, najlepszy okazał się również majonez z dodatkiem żelatyny. Jego adhezyjność określono jako "bardzo dobrą", czyli lepszą od majonezu wzorcowego, którą oceniono na "dobrą". Pozostałe wyróżniki określające jakość majonezu z dodatkiem żelatyny oceniono na tym samym poziomie jak w przypadku majonezu tradycyjnego. Zbyt dużą adhezyjność wykazywała emulsja majonezowa z dodatkiem zasmażki. Z kolei emulsja z dodatkiem inuliny HPX miała niewłaściwą gęstość. Kleistość majonezu występowała tylko w próbce z dodatkiem gumy arabskiej i ksantanu (Tab. 5). Grodzka i in. [2005] wykazali, że pożądaną konsystencję emulsji majonezowych można otrzymać stosując celulozę mikrokrystaliczną. Najlepsze efekty uzyskano przy 1-procentowym dodatku celulozy Vivapur MCG 611. Emulsja z tym dodatkiem charakteryzuje się najbardziej zbliżoną wartością adhezji w stosunku do majonezu rynkowego. Emulsje z różnymi dodatkami celulozy mikrokrystalicznej mają zbliżoną gęstość do majonezu rynkowego, jednak mniejszą sprężystość.

Czynnikiem stabilizującym emulsje majonezowe jest wysoka lepkość. Na konsystencję majonezów wpływa m.in. zawartość oleju [Kowalska i in., 2011]. W Tab. 6 przedstawiono wyniki oceny lepkości przygotowanych majonezów. Wśród badanych emulsji najniższą lepkością charakteryzował się majonez pełnotłusty. Najwyższą zaś lepkość, ponad 6 razy większą w porównaniu do majonezu wzorcowego, miał majonez z dodatkiem żelatyny. Uzyskana lepkość emulsji z żelatyną wpłynęła na odpowiednią, pożądaną przez konsumentów konsystencję. Dużą lepkością, ok. 4,6 razy większą w porównaniu do majonezu z pełną zawartością tłuszczu, cechował się również majonez z dodatkiem gumy arabskiej i ksantanu,. Tak wysoka wartość może wynikać z obecności ksantanu, który wykazuje bardzo duże właściwości zagęszczające. Najmniejszą lepkość oznaczono w przypadku majonezów z dodatkiem zasmażki i inuliny HPX. Dodatek żelatyny, jako zamiennika tłuszczu, wpłynął na zwiększenie lepkości układu, co z kolei może zwiększyć stabilność emulsji majonezowej i wpłynąć na przedłużenie trwałości majonezu. Badania prowadzone przez Grodzką i in. [2005] wykazały, że dużą lepkość emulsjom majonezowym nadaje również celuloza mikrokrystaliczna. Każda emulsja z różnym poziomem dodatków celulozy charakteryzuje się większą lepkością w stosunku do majonezu rynkowego bez tego dodatku. Według autorów stabilność wszystkich emulsji majonezowych z dodatkiem celulozy mikrokrystalicznej wynosi 100%.

**Tabela 5.** Wyniki sensorycznej oceny konsystencji majonezów

| Majonez                    | Adhezyjność   | Gęstość     | Jednorodność | Sprężystość  | Kleistość |
|----------------------------|---------------|-------------|--------------|--------------|-----------|
| wzorcowy                   | dobra         | dobra       | występuje    | bardzo dobra | brak      |
| z żelatyną                 | bardzo dobra  | dobra       | występuje    | bardzo dobra | brak      |
| z inuliną HP               | dopuszczająca | odpowiednia | brak         | słaba        | brak      |
| z inuliną HPX              | dostateczna   | zła         | brak         | słaba        | brak      |
| z gumą arabską i ksantanem | dobra         | dobra       | występuje    | słaba        | występuje |
| z zasmażką                 | zbyt duża     | zbyt duża   | brak         | słaba        | brak      |

Lewandowicz i in. [2005] podają, że znaczne zróżnicowanie parametrów profilu tekstury oraz właściwości reologicznych wykazują majonezy wykonane na bazie różnych białek i różnych maltodekstryn, w zależności od tego, jakich surowców użyje się do ich przyrządzenia. Autorzy stwierdzili, że pod względem reologicznym majonezy są płynami rozrzedzanymi ścinaniem i ich lepkość można opisać za pomocą empirycznego równania Ostwalda de Waele'a.

**Tabela 6.** Wyniki oceny lepkości majonezów

| Majonez                    | Lepkość [mPa·s 10 <sup>5</sup> ] |
|----------------------------|----------------------------------|
| wzorcowy                   | 1,11                             |
| z żelatyną                 | 7,11                             |
| z inuliną HP               | 3,64                             |
| z inuliną HPX              | 2,68                             |
| z gumą arabską i ksantanem | 5,15                             |
| z zasmażką                 | 2,84                             |

W pracy dokonano również oceny wyglądu przygotowanych emulsji majonezowych pod mikroskopem. Oceniono rozproszenie kuleczek oleju z wodzie pod mikroskopem przy zastosowaniu powiększenia  $10 \times 10$ . Obserwacje mogą posłużyć do oceny stabilności emulsji. Właściwości emulgujące jaj polegają na zdolności otaczania rozproszonych kuleczek tłuszczu przez błonki białkowe, zabezpieczające przed łączeniem się tłuszczu w większe skupiska. W czasie ucierania zostaje wtłoczone powietrze, które znacznie zwiększa trwałość wytworzonej emulsji, masa staje się puszysta i bieleje [Stauffer, 2001]. Stabilność emulsji majonezowej może zależeć od wielkości i stopnia rozproszenia fazy rozpraszanej, czyli oleju. Podczas obserwacji obrazu emulsji majonezowej z dodatkiem inuliny długołańcuchowej stwierdzono, że kuleczki tłuszczu, czyli faza zdyspergowana jest dużej i średniej wielkości, podobnie jak w majonezie z dodatkiem żelatyny. W emulsji z dodatkiem inuliny HP fazę rozproszoną stanowią bardzo małe, regularne kuleczki tłuszczu jednakowej wielkości. W próbie majonezu z dodatkiem zasmażki zauważyć można

nieregularne elementy fazy zdyspergowanej, a w majonezie wzorcowym kuleczki tłuszczu są dość równo rozproszone, choć bardziej spłaszczone. W majonezie z dodatkiem gumy arabskiej i ksantanu obserwowano zróżnicowaną wielkość (średniej i małej wielkości kuleczki) rozproszonego oleju. Stabilność emulsji zależy od różnych czynników, m.in. od wielkości cząsteczek fazy rozpraszanej zawieszonej w fazie rozpraszającej. Gruczyńska i in. [2006] stwierdzili, że emulsje o mniejszej średniej wielkości cząstek nie ulegają destabilizacji podczas przechowywania. Najbardziej stabilne okazują się emulsje zawierające cząsteczki różnej wielkości. Kuleczki tej samej wielkości lub zbyt duże mogą łatwiej łączyć się w większe skupiska – agregaty, czyli może nastąpić koalescencja faz (łączenie się cząsteczek w większe zespoły) i w późniejszym czasie dojść do rozwarstwienia emulsji. W przypadku różnej wielkości kuleczek, małe kuleczki wypełniają przestrzenie między większymi, są wtedy ściśle upakowane, tworzą tym samym strukturę siatki przestrzennej. Nie dochodzi wtedy do ich samoistnego przemieszczania, czyli emulsja staje się bardziej stabilna [Gruczyńska i in., 2006]. Czynniki uzupełniającymi do utrwalania struktury majonezu mogą być również użyte dodatki (np. żelatyna lub skleikowana skrobia), lecz żółtko powinno pozostać głównym emulgatorem. Wprowadzone dodatki mogą stabilizować emulsję poprzez zagęszczanie układu (wbudowują się w fazę rozpraszającą i nie pozwalają łączyć się kuleczkom tłuszczu w większe agregaty, co destabilizuje układ emulsyjny). Tak więc w przypadku majonezów o obniżonej zawartości tłuszczu sprzyjać będzie obecność dodatkowych ilości emulgatorów i hydrokoloidów, optymalne, niewielkie (2,6–5,4  $\mu\text{m}$ ) średnice cząstek fazy rozproszonej oraz występowanie co najmniej dwóch frakcji fazy zdyspergowanej, zróżnicowanych pod względem wielkości cząstek [Gruczyńska i in., 2006].

## Wnioski

1. Majonezy o obniżonej zawartości tłuszczu wykonane z dodatkiem hydrokoloidów wykazywały znaczne zróżnicowanie pod względem walorów sensorycznych i lepkości.
2. Majonez z dodatkiem żelatyny uzyskał najwyższą ocenę jakości ogólnej, odpowiadającą pożądaności konsumenckiej.
3. Majonez z dodatkiem żelatyny charakteryzował się podobnymi wartościami wyróżników konsystencji jak majonez wzorcowy.
4. Majonezami o najniższej jakości okazały się emulsje z dodatkiem żeli inulinowych.
5. Każda spośród badanych emulsji majonezowych z dodatkiem hydrokoloidów charakteryzowała się większą lepkością niż majonez wzorcowy.
6. Spośród badanych hydrokoloidów największą lepkość emulsjom majonezowym nadała żelatyna.

### Literatura

- Borowy T., Kubiak M., Zamienniki tłuszczu stosowane w przemyśle spożywczym – cz. I. Cukiernictwo, 2010a, 10, 62-63.
- Borowy T., Kubiak M., Zamienniki tłuszczu stosowane w przemyśle spożywczym – cz. II. Cukiernictwo, 2010b, 11, 54-56.
- Górecka A., Krygier K., Zamienniki tłuszczu w produkcji żywności o obniżonej wartości energetycznej. Przemysł Spożywczy, 2004, 5, 36-42.
- Grodzka K., Maciejec A., Krygier K., Próby zastosowania celulozy mikrokrystalicznej jako zamiennika tłuszczu w emulsjach majonezowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość., 2005, 2 (43), 52-61.
- Gruczyńska E., Kowalski B., Kowalska M., Śmiechowski K., Charakterystyka wybranych majonezów oraz wpływ temperatury i czasu przechowywania na ich stabilność. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2006, 4 (49), 154-166.
- Jędrzejkiewicz K., Florkowska A., Stabilność i jakość bezcholesterolowych, niskotłuszczowych emulsji majonezowych zawierających inulinę. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2007, 5 (54), 346-359.
- Kowalska M., Żbikowska A., Górecka A., Wpływ wybranych zagęstników na rozkład kropeł oleju w emulsjach niskotłuszczowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2011, 4 (77), 84-93.
- Lewandowicz G., Prochalska K., Grajek W., Krzyżaniak W., Majchrzak A., Ciapa T., Właściwości użytkowe maltodekstryn w układach emulsyjnych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 1 (42), 35-47.
- Mleko S., Achremowicz B., Zamienniki tłuszczu otrzymane w procesie mikrokoagulacji koncentratów i izolatów białek serwatkowych. Przemysł Spożywczy, 1994, 6, 166-167.
- Słomińska L., Węglowodanowe zamienniki tłuszczu. Przemysł Spożywczy, 1999, 7, 12-15.
- Stauffer Clyde E., Emulgatory. Wydanie I, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2001.
- Tyszkiewicz I., Zamienniki tłuszczu w technologii żywności o obniżonej kaloryczności. Przemysł Spożywczy, 1992, 5-6, 132-134.

RÓŻA BIEGAŃSKA-MARECIK<sup>1</sup>, ELŻBIETA RADZIEJEWSKA-KUBZDELA<sup>1</sup>,  
JANUSZ CZAPSKI<sup>1</sup>, KATARZYNA CZACZYK<sup>2</sup>, MARCIN KIDOŃ<sup>1</sup>,  
DOROTA WALKOWIAK-TOMCZAK<sup>1</sup>, KAROLINA MŁYNARCZYK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Food Science and Nutrition*

*Institute of Plant Food Technology*

*Poznań University of Life Sciences*

*rozmarec@up.poznan.pl*

<sup>2</sup>*Department of Biotechnology and Food Microbiology*

*Poznań University of Life Sciences*

## **COMPARISON OF VACUUM IMPREGNATION, DIPPING AND BLANCHING AS TREATMENT METHODS FOR MAINTAINING QUALITY OF FRESH-CUT APPLE**

### **Abstract**

In the study the effect was investigated of vacuum impregnation, dipping and blanching with solutions containing inhibitors of enzymatic browning and tissue softening on the quality of fresh-cut apple. The research was conducted using the 5 varieties of apples: *Cortland*, *Elstar*, *Gloster*, *Jonagold* and *Szampion*. Apple slices after processing were vacuum packed in OPA/PE bags and stored during 15 days in 4°C. The effect of the applied methods was determined on the colour L\*, a\*, b\* parameters, texture, sensory quality (colour, texture, taste, aroma) of the product, on its microbiological quality. The application of dipping and vacuum impregnation of apple slices with solutions containing sucrose and inhibitors of enzymatic browning and tissue softening has made it possible to obtain products of very high quality, higher than using blanching. Vacuum impregnation of apple slices with a solution resulted in deterioration in texture, resulting in a reduction in the compression force of the sample (Fmax). Dipping and vacuum impregnation of apple slices had a slight effect on their microbiological quality, while blanching (60°C, 1 min) significantly reduced the level of contamination.

**Key words:** fresh-cut apple, texture; microbiology, vacuum impregnation, enzymatic browning

### **Introduction**

In recent years fresh-cut fruits, combining the advantages of fresh and convenience food, have become increasingly popular. Shelf life extension of fresh-cut products is achieved in different ways, except intensive thermal processing. Instead of the latter, a combination of various, rather mild, preservation agents is used. It is important that treatment applied to fresh-cut fruits help maintain their appearance, as this is the first characteristic a consumer perceives as quality of the product. Due to minimal treatment, microbiological and sensory quality factors such as appearance, texture and flavour are not stabilized and product deterioration may proceed rapidly. Moreover, cultivar selection is important consideration in fresh-cut fruits processing because cultivars can very greatly

in characteristics such as flesh texture, skin colour, and browning potential [Nguyen-The and Carlin, 1994; Amiot et al., 1995; Luna-Guzman and Barrett, 2000; Diamante et al., 2014].

Processing of apples, as well as other fruits, causes changes in biochemical and physiological processes in the tissue, which may lead to changes in sensory attributes and the loss of freshness and attractiveness attributes. The most visible reaction occurring in the damaged apple tissue is enzymatic browning. Other processes causing a deterioration of quality in case of minimally processed apples are the action of pectinolytic enzymes, as well as microorganism growth. For this reason in order to ensure quality of such products it is necessary to apply a combination of several mild preservation agents, such as the use of enzymatic browning inhibitors, an appropriate packaging system and cold storage.

Minimally processed fruits are subjected to the procedures of cleaning and removal of inedible parts, and cutting. The application of other procedures, such as blanching, saturation with sugar and calcium compounds is to increase stability, delay tissue softening or ensure specific sensory attributes of the product [Beveridge and Weintraub, 1995; Watada et al., 1996; Betoret et al., 2012]. Numerous studies have been conducted on the application of compounds preserving natural texture of processed raw materials and inhibitors of enzymatic browning processes, and at the same time not lowering culinary value of the obtained product [Nicoli et al., 1993; Lurie and Nussinovitch, 1996; Muntada et al., 1998; Luna-Guzman et al., 1999; Gonzales-Aguilar et al., 2000; Gorny et al., 2002; Barrera et al., 2009].

Vacuum impregnation, according to Fito et al. [2001a], may be used as a method to obtain novel fruit and vegetable products, without changing their tissue structure, although it usually changes their original taste. Moreover, vacuum impregnation modifies physical properties of the product and may be advantageous in different technologies [Martinez-Monzo et al., 2000]. The structure of food having numerous pores (intercellular spaces), such as fruits and vegetables, facilitates their saturation with solutions containing specific additives: acids, preservatives, sugars, nutrients, compounds lowering water activity, etc. [Fito et al., 2001a; 2001b; Roa et al., 2001]. Mild blanching is one of the processing methods of minimally processed foodstuffs, which may result in the inactivation of selected enzymes responsible for deterioration in quality; however, it very frequently also leads to irreversible changes in the tissue of the raw material, especially texture changes [Del Valle et al., 1998].

The aim of the study was to compare the quality of fresh-cut apples after the application of dipping, blanching and vacuum impregnation of fruit slices with inhibitors of enzymatic browning and tissue softening.

## **Material and methods**

Apples of varieties *Cortland*, *Elstar*, *Gloster*, *Jonagold* and *Szampion*, originating from a pomiculture station of the Agricultural University in Przybroda near Poznań, were used in the study.

The first stage of the investigations included experiments aiming at a comparison of the effect of blanching, dipping and vacuum impregnation on the sensory quality and physicochemical properties of the obtained apple slices. The first experiment at this stage of the study was conducted for varieties with slowly darkening flesh, i.e. *Elstar*, *Cortland*,

*Szampion*, and for comparison variety *Jonagold*, with medium susceptibility to enzymatic browning was used. Solution (1) – citric acid 0.8%, sucrose 20%, was applied for apple slice processing. In the second experiment the experimental material consisted of apple varieties with varying flesh susceptibility to browning: *Elstar* (slowly browning), *Gloster* (fast browning) and variety *Jonagold*. Blanching, dipping and vacuum impregnation with solution (2) - ascorbic acid 1%, 4-hexylresorcinol 0.005%, calcium chloride 0.5%, sucrose 20% were used. Investigations were conducted immediately after the raw material was harvested (October/November) and after 4 months of storage (February/March). The product was analyzed after 1, 10 and 15 days of storage in terms of colour measurements, texture measurements – the measurement of the maximum compression force of the sample, sensory examination, the measurement of extract content and the measurement of pH values.

The second stage of the investigation included the evaluation of microbiological quality of the obtained apple slices in terms of the applied treatment methods. The experimental material consisted of apples of variety *Jonagold*. Microbiological analysis conducted after 1, 7 and 15 days of storage.

The third stage of the investigation was performed to evaluate the effect of treatment methods in the apple slices tissue structure. Experimental material consisted of apples of variety *Jonagold*. Samples for apple tissue observations were collected after 1 day of product storage.

### **Sample preparation and treatment application**

Fruits were washed, peeled, cored and sliced into 1-cm thick slices, and subsequently were subjected to various processing methods: blanching, dipping, and deaeration and vacuum impregnation with solutions of the following composition: solution (1) – citric acid 0.8%, sucrose 20%, solution (2) – ascorbic acid 1%, 4-hexylresorcinol 0.005%, calcium chloride 0.5%, sucrose 20%.

Blanching procedure – apple slices were immersed in a solution with the temperature of 60°C and left for 1 min, then slices were removed from the solution, dried on blotting paper and left to cool.

Dipping procedure – apple slices were placed in a container with the solution and left for 15 min, afterwards slices were removed from the solution and dried on blotting paper.

Vacuum impregnation procedure – apple slices were placed in a vacuum desiccator coupled with a pump and a container for the saturation solution. Slices were deaerated and saturated for 5 min at the pressure of 80 mbar. After pressure was equalized to atmospheric pressure slices were left in the solution for another 10 min. Next slices were removed from the solution and dried on blotting paper.

The parameters given above concerning procedures of dipping, deaeration and vacuum impregnation, and blanching were selected on the basis of preliminary optimization experiments. At the optimization of technological procedures the following parameters were adopted:

- dipping: duration of 5, 10, 15, 20 and 30 minutes;
- deaeration and vacuum impregnation: duration of 5, 10 and 15 minutes; pressure of 40, 60, 80 and 100 mbar;
- blanching: duration of 1, 2, 3, and 5 minutes; temperature of 50, 60, 65 and 70°C.

Moreover, control samples were also prepared, consisting of apple slices not subjected to processing and packed as those minimally processed.

### **Packing**

The obtained apple slices were packed in portions of 100 g each in containers made from oriented polyamide/polyethylene with layer thickness of 50/40  $\mu\text{m}$  and dimensions of 15 x 21 cm, which were vacuum sealed using an A 300 vacuum packaging machine (Multivac). Storage – the packed product was stored at the temperature of 4°C.

### **Measurement of colour parameters**

Colour parameters were measured using a Hitachi U-3000 spectrophotometer. The measurements were taken in the wave length range of 380-780 nm. The results are presented in the CIE L\*a\*b\* system. Before the measurement the amount of 100g shredded apple slices were homogenized using an IKA T-25 homogenizer. Homogenized pulp was placed in a 3 x 5 x 2 cm glass cell with the capacity of 30 cm<sup>3</sup>. Measurements were taken immediately after homogenization and after 30, 60 and 240 minutes for each sample.

### **Texture measurement**

The maximum compression force of the sample F<sub>max</sub> (N) was determined on the basis of the measurement curve. Measurements were taken for apple slice sections in the form of cylinders with the diameter = 20 mm and height h = 10 mm, subjected to compression to 75% of their height using of an apparatus for texture measurements TA-XT2 (Texture Technologies, NY) with a 25-kg load cell. The apple cylinders for measurement were prepared using a cork borer. Compression was performed with the velocity of  $1.67 \times 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , causing permanent sample deformation. The determinations were performed in 10 replications.

### **Sensory analysis**

The sensory quality was evaluated via a taste panel. The panel contained 5 trained members. The evaluation was performed according to a 5-point scale. Sensory examination was conducted immediately after the packages with apple slices were opened and after 1, 10 and 15 days of storage. The appraisal was conducted according to a 5-point scale using a specially developed chart of sensory examination. Colour (tone, uniformity, desirability), texture (type, tenderness), taste (typicality, intensity) and aroma were evaluated.

### **Microbiological analysis of apple slices**

Microbiological analysis conducted after 1, 7 and 15 days of storage included the following: total mesophilic bacteria count, total psychrophilic bacteria count, mesophilic mold count, psychrophilic mold count, yeast count, acetobacters count, lactic acid bacteria count, *Pseudomonas* bacteria count, coli count, and the presence of anaerobic bacteria.

Apple slices were transferred into a sterile stomacher bag and 90 ml of a physiological salt/peptone solution (8.5 g/l NaCl, 1 g/l pepton tryptone, Difco)

were added and mixed for 2 min in a DEVIMIX machine (De Ville Biotechnology, Raszyn, Poland). Ten-fold dilutions in the range from  $10^{-1}$  do  $10^{-8}$  were prepared from such prepared samples.

In the determination of the total counts of mesophilous and psychrophilous bacteria and counts of moulds and yeasts a quantitative culture using the Koch plate method was applied [Burbianka and Pliszka, 1983]. Media in case of the total counts of mesophilous and psychrophilous bacteria were prepared according to Burbianka and Pliszka [1983]. Peptone agar with glucose was the medium for aerobic mesophilic and psychrophilic bacteria (10 g/l bacteriological peptone, 10 g/l glucose, 15 g/l bacteriological agar, pH 7.2, BTL, Poland). Medium used for analysis of yeasts and moulds containing: 5 g/l yeast extract, 20 g/l glucose, 0.1 g/l chloramfenicol, 15 g/l bacteriological agar, pH 6.6 (BTL, Poland). The analyses were carried out on duplicate agar plates. The following incubation parameters were adopted: mesophilous bacteria – incubation time of 48-72 h, incubation temperature of 30°C; psychrophilous bacteria – incubation time from 72 to 120 h, incubation temperature of 15°C. Incubation time for the determination of mould and yeast was 72 – 96 h, while incubation temperature was 30°C. The filtration method [Libudzisz, 2000] was applied in order to determine the counts of coliform bacteria and *Pseudomonas* bacteria. The Endo – Total Coliform Broth (Millipore) was used as a medium for coliform bacteria. Incubation time was 24 - 48 h, while incubation temperature was 30°C. A selective medium, *Pseudomonas* Selective Broth (Millipore), was used as a medium for *Pseudomonas* bacteria. Incubation time was 48 - 72 h and incubation temperature was 37°C. In this determination process a quantitative culture using the Koch plate method was applied. Agar TSC (Merck) was used as a medium in this case. Incubation time was 48 h, while incubation temperature was 37°C. Black colonies on the medium constituted a positive culture result.

Microorganism morphology was analyzed on microscope slides: intravital for moulds; fixed and stained using the Gram method for bacteria [Burbianka and Pliszka, 1983]. Microorganism morphology was established on microscopic slides: intravital for yeasts and fixed and Gram stained for bacteria.

### Statistical analysis of results

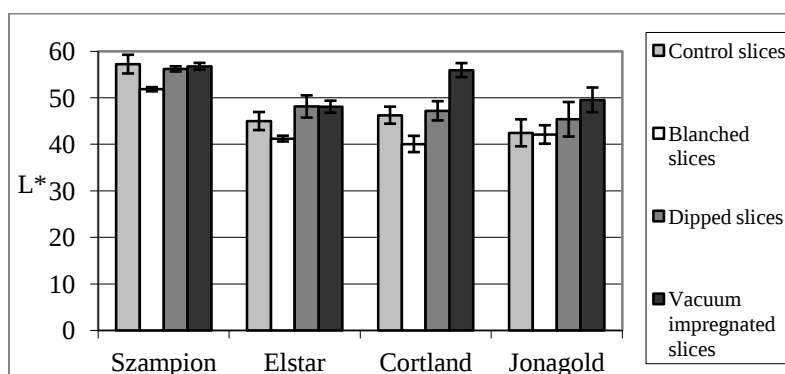
The experiments were carried out in two replications. Results were analyzed by the analysis of variance (ANOVA). Statistically significant differences were reported at  $p \leq 0.05$ . Statistical analysis was performed using computer software Statistica version 9.0 (StatSoft) and Design Expert version 5.0.1 (Stat – Ease INC., Minneapolis).

## Results and discussion

### The determination of the effect of the treatment method on sensory quality and physicochemical properties of apple slices

After the application of a minimal processing process a product of very high quality was obtained when slices were subjected to dipping and vacuum impregnation as processing methods in case of the used solutions, and of good quality in case of blanching.

When apple varieties with slowly darkening flesh were used and processed using a solution of citric acid and sucrose, a good quality product was obtained, irrespective of the adopted processing method. However, during the 15 days of storage the quality of dipped and vacuum impregnated slices slightly deteriorated, whereas the quality of blanched slices dropped considerably. Blanched slices exhibited the lowest values of colour parameter  $L^*$  (Figure 1), as well as the lowest notes in the sensory examination of their colour, which resulted from the occurrence of brown spots in their flesh. The effect of the adopted processing method and the duration of storage was shown to be statistically significant both for the notes of overall sensory examination and the values of colour parameter  $L^*$  of apple slices (Table 1).



**Figure 1.** The values of colour parameter  $L^*$  of apple slices in term on the applies processing method (after 15 days of storage, October)

**Rysunek 1.** Wartości parametru barwy  $L^*$  plasterków jabłek w zależności od metody obróbki (po 15 dniach przechowywania, przerób w listopadzie)

Slices dipped in the solution received the highest notes for colour in sensory examination. The values of colour lightness  $L^*$  of dipped and vacuum impregnated slices (Figure 1) were similar and higher than those of control slices. Blanching of apple slices had a negative effect on the values of colour parameter  $a^*$ , resulting in its increase. Samples from the same apple varieties, irrespective of the processing method, exhibited similar  $L^*$  and  $b^*$  values (Figure 2). During the 15 days of product storage the quality of dipped and vacuum impregnated slices decreased only slightly, whereas the quality of blanched slices lowered considerably.

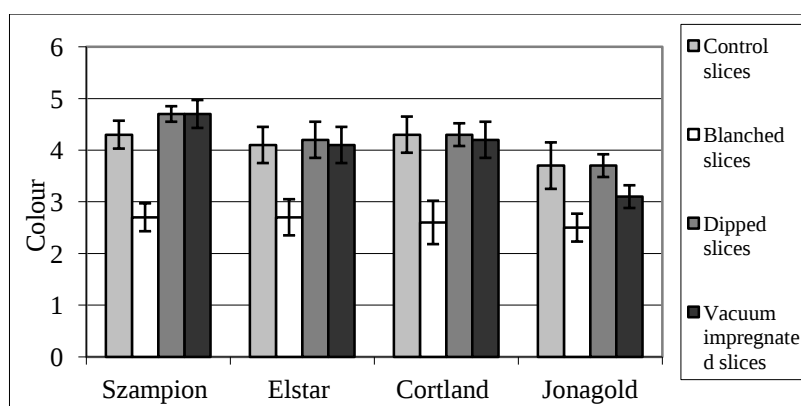
**Table 1.** A two-way analysis of variance determining the effect processing methods and apple slices storage duration on changes in colour parameter L\* ( $\alpha=0,05$ )

**Tabela 1.** Analiza wariancji dwuczynnikowej określającej wpływ metod obróbki oraz czasu przechowywania plasterów jabłek na zmiany wartości parametry barwy L\* ( $\alpha=0,05$ )

| Variable | Degrees of freedom | Mean of square | Value F  | Value p   |
|----------|--------------------|----------------|----------|-----------|
| Szampion |                    |                |          |           |
| A        | 3                  | 18.19046       | 46.29889 | <0.001    |
| B        | 2                  | 18.12093       | 46.12193 | <0.001    |
| AB       | 6                  | 20.89833       | 53.19231 | <0.001    |
| Elstar   |                    |                |          |           |
| A        | 3                  | 32.7698        | 200.592  | <0.001    |
| B        | 2                  | 417.5514       | 2555.930 | <0.001    |
| AB       | 6                  | 22.1335        | 135.485  | <0.001    |
| Cortland |                    |                |          |           |
| A        | 3                  | 399.4068       | 6031.75  | <0.001    |
| B        | 2                  | 128.9723       | 1947.686 | <0.001    |
| AB       | 6                  | 47.2860        | 714.093  | <0.01     |
| Jonagold |                    |                |          |           |
| A        | 3                  | 96.39679       | 19.36226 | <0.001    |
| B        | 2                  | 4.30108        | 0.86392  | 0.434207* |
| AB       | 6                  | 29.35135       | 5.89551  | <0.001    |

\* - the effect of the factor is statistically non-significant ( $p>0,05$ ), A – processing method, B – duration of storage of apple slices, AB – interactions between variables

\* - wpływ czynnika jest statystycznie nieistotny ( $p>0,05$ ), A – metoda obróbki, B – czas przechowywania, AB – interakcje pomiędzy zmiennymi



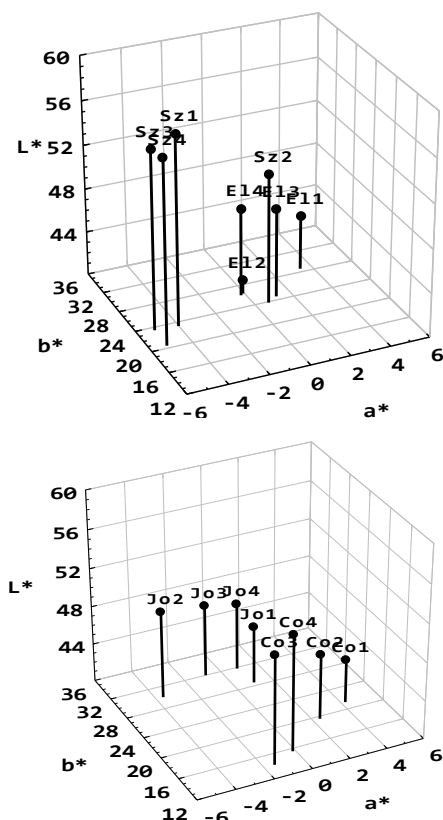
**Figure 2.** Sensory examination of apple slices colour in terms on the applies processing method (after 15 days of storage, processing in October)

**Rysunek 2.** Noty oceny sensorycznej barwy w zależności od metody obróbki plasterów jabłek (po 15 dniach przechowywania, przerób w listopadzie)

When varieties with varying flesh susceptibility to browning were used, i.e. *Elstar* (slowly darkening), *Gloster* (fast darkening) and *Jonagold* (medium susceptibility to darkening), and processing using solution (2): 1% ascorbic acid, 0.005% 4-hexylresorcinol, 0.5% sodium chloride and 20% sucrose apple slices subjected to dipping and vacuum impregnation exhibited very good quality, whereas the quality of blanched apple slices was evaluated as good. The lowest values of colour parameter  $L^*$  were found for control slices, on the surface of which brown spots were observed, found in biggest numbers on *Gloster* slices. Among slices subjected to processing, similarly to the previous experiment, the lowest  $L^*$  values were found for blanched slices, irrespective of apple variety. These samples also had the highest values of colour parameter  $a^*$ . Colour parameters of blanched, immersed and saturated samples did not change significantly during the 15-day storage.

Sensory examination of colour showed similar dependencies as its instrumental measurement. The lowest scores were observed for control slices (mean note of 3.0), followed by blanched slices (3.5), whereas dipped and vacuum impregnated slices received notes above 4.5, respectively. Colour of control slices deteriorated during 15 days of their storage, whereas the evaluating panel did not find colour deterioration during storage in case of blanched, dipped or vacuum impregnated slices, both those processed in November and in February (Figure 3). The original texture of apple slices was maintained when slices were dipped in the solutions. Blanching and vacuum impregnation processes considerably lowered  $F_{max}$  values in all the cases (Figure 4). Statistical analysis of significance for the effect of the applied treatment methods of apple slices on changes in  $F_{max}$  values showed that the effect of processing depended on the used apple variety.

The highest notes in the sensory examination of taste were given to dipped, control and vacuum impregnated slices, whereas the lowest notes were found for blanched slices. It was caused by a change in taste as a result of elevated temperature, which according to the assessment panel was very different from the taste of raw apple and gave the after-taste of a cooked product.



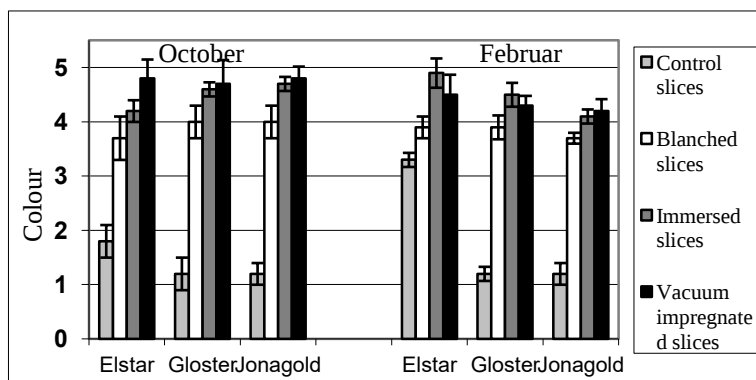
**Figure 3.** The colour parameters of apple slices after 15 days of storage (October); the measurement – 2 min after homogenization

**Rysunek 3.** Parametry barwy plastrów jabłek po 15 dniach przechowywania (przerób w listopadzie), pomiar w 2 min po homogenizacji

El – Elstar, Co – Cortland, Sz – Szampion, Jo – Jonagold,

1 – control slices, 2 – blanching slices, 3 – dipped slices, 4 – vacuum impregnated slices

1 – plastry kontrolne, 2 – blanszowane, 3 – zanurzone, 4 – nasączone próżniowo



**Figure 4.** Sensory examination of colour of blanched, dipped and vacuum impregnated apple slices (after 15 days of storage)

**Rysunek 4.** Ocena sensoryczna barwy plasterów jabłek poddanych różnym metodom obróbki (po 15 dniach przechowywania)

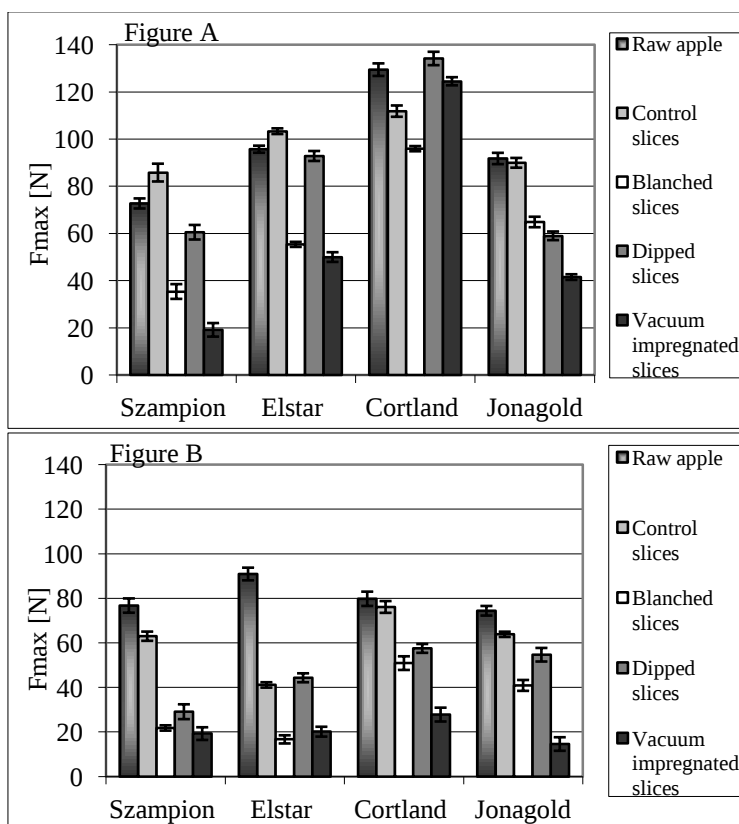
In the conducted experiments no effect of 4 months of storage was observed on colour parameters  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ , or notes of sensory examination of colour, taste and aroma of the product. However, during the storage of the raw material the softening of its tissue took place, which resulted in the lowering of the  $F_{max}$  value and notes for the sensory assessment of slice texture.

The application of deaeration and vacuum impregnation as a treatment method of apple slices in both conducted experiments resulted in a product with new sensory attributes, different from those of a fresh cut apple. Apple slices became glassy in appearance and their colour was getting more yellow. These changes were evaluated by the sensory assessment panel as advantageous and the product received a very good note in the overall sensory examination, in spite of the disadvantageous changes in texture. Vacuum impregnation was applied in the impregnation of fruits and vegetables with e.g. cryoprotectants, enzymatic browning inhibitors, enzymes, agents improving tissue firmness and inhibiting its softening [Sapers et al., 1990a; Sapers et al., 1990b; Javeri et al., 1991; Ponappa et al., 1993; Martinez-Monzo et al., 1998; Park et al., 2005; Radziejewska-Kubzdela et al., 2014]. Moreover, Fito et al. [2001b] suggested the application of vacuum impregnation as a method to obtain functional food through the introduction of mineral salts, vitamins and other physiologically active compounds. These authors conducted studies on the introduction of iron and calcium ions to cut eggplant and orange peel.

The dipping of apple slices in the applied solutions made it possible to obtain products with properties similar to those of fresh, raw apple, at the same time facilitating effective inhibition of browning of slice tissue at the simultaneous slight tissue softening. Apples processed in this way received very good notes in the overall sensory examination. Investigations on the effect of dipping in solutions of enzymatic browning inhibitors on the quality of fruits and subjected to this treatment were undertaken by numerous authors. Dong et al. [2000] subjected cut pears to such treatment, Gonzalez-Agilar et al. [2001] used mango fruits, while Nicoli et al. [1993], and Soliva-Fortuny et al. [2002] – cut apples. In all the

conducted studies the obtained effect was dependent on the type of the applied raw material, the duration of the process and the applied inhibitory agents.

Blanching of apple slices to the highest degree resulted in the deterioration of their quality. This process turned out to be the least effective in the inhibition of tissue browning, resulted in disadvantageous changes in the taste and aroma of apple slices, and caused softening, especially in the inner layers of the slice tissue. However, even this process made it possible to obtain a product with better quality than that of the control samples. Although Del Valle et al. [1998] applied the combination of blanching of apple slices in the HTST system with vacuum infiltration with calcium solutions, they still did not inhibit tissue softening.



**Figure 5.** The comparison of  $F_{max}$  values in terms on the applied processing method, A – raw material immediately after the harvest (October/November), B – raw material after 4 months of storage (February/March)

**Rysunek 5.** Porównanie wartości  $F_{max}$  w zależności od metody obróbki plastrów jabłek, pomiar po 1 dniu przechowywania produktu otrzymanego z surowca po zbiorze (październik/listopad – A) oraz przechowywaniu (luty/marzec – B)

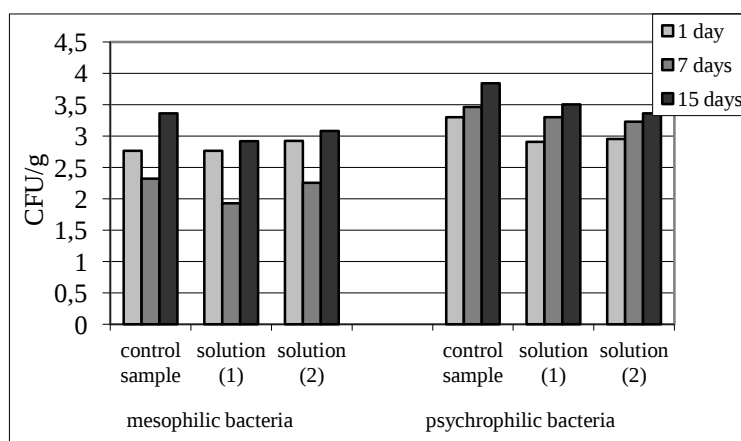
Pittia et al. [1999] used blanching of cut pears at the temperature of 95°C for 3 minutes, obtaining good microbiological quality of the product, but also a deterioration in texture. However, in the studies by Luna-Guzman and Barrett [2000] the application of dipping in a calcium chloride solution at the temperature of 20, 40 and 60°C either maintained or improved the texture of cut melons in comparison to samples not subjected to processing.

### **The determination of the effect of the treatment method of apple slices on their microbiological quality**

The application of dipping of apple slices as a method of processing with solutions with the composition (1) and (2) caused only slight differences in the counts of the investigated groups of microorganisms in comparison to control samples. Dipping of apple slices in solution (1) slightly lowered the count of mesophilic bacteria after 7 and 15 days of storage in comparison with control samples (Figure 6). However, no differences were observed in the counts of mesophilic bacteria in samples dipped in solution (2). Counts of psychrophilic bacteria, and psychrophilic and mesophilic molds in samples dipped in solutions (1) and (2) remained at the level found in control samples. Samples after 15 days of slice storage were an exception here, as faster development of psychrophilic molds was observed when they were treated with solution (1), and in case of treatment with solution (2) it was a faster development of mesophilic molds.

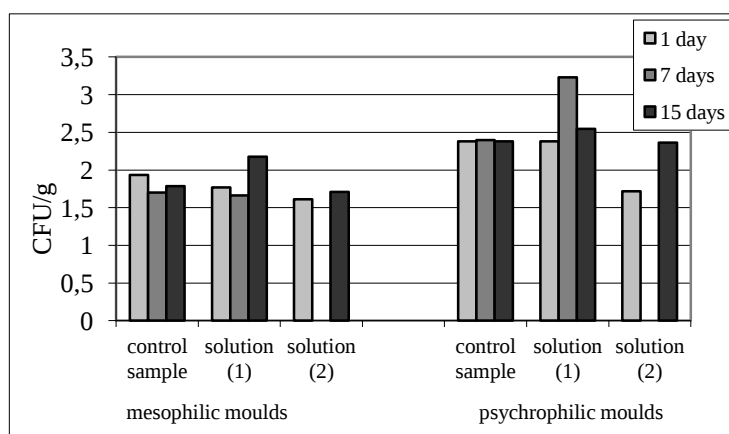
Vacuum impregnation with solutions (1) and (2) did not result in significant differences in the counts of mesophilic and psychrophilic bacteria in comparison to control samples. However, a distinct drop in the counts of mesophilic and psychrophilic molds was observed in slices vacuum impregnated with solution (2), especially after 1 and 7 days of storage (Figure 7). Counts of lactic acid bacteria were  $10^1$  CFU/g after 7 days and  $10^2$  CFU/g after 15 days of storage. An increase in the yeast counts was observed after 15 days of storage both in samples vacuum impregnated with solution (1) and solution (2) in comparison to control samples.

Blanching of apple slices at the temperature of 60°C both in solution (1) and (2) resulted in a decrease in the counts of most investigated groups of microorganisms in comparison to control samples. Counts of mesophilic bacteria in samples blanched in solutions (1) and (2) decreased already after 1-day storage from the level of  $10^2$  CFU/g for control samples to  $10^1$  CFU/g. Such a situation was observed during the 15 days of storage. Also counts of psychrophilic bacteria decreased, which after 15 days of storage amounted to  $10^1$  CFU/g (for both solutions), whereas in control samples it was  $10^2$  CFU/g (Figure 8). In blanched samples the counts of psychrophilic molds also dropped in comparison to those in control samples. Counts of mesophilic molds remained at the level found for control samples, while after 7 and 15 days of storage in samples blanched in solution (2) their presence was not detected. The presence of acetic, anaerobic and lactic acid bacteria was not detected in any of the blanched samples, whereas coli counts remained at the same level in all the samples.



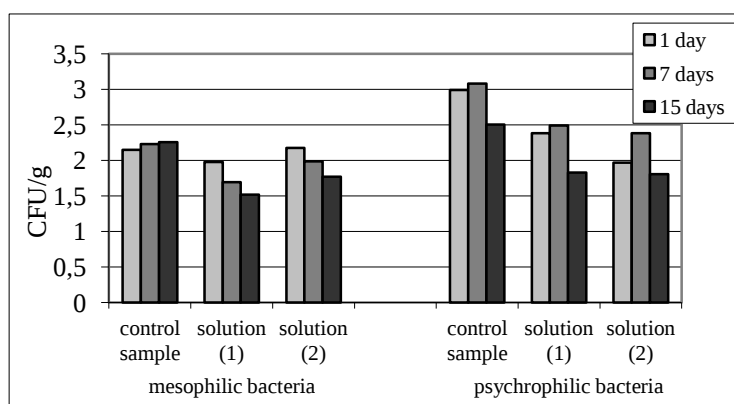
**Figure 6.** The effect of dipping in solutions on the counts of mesophilous bacteria and psychrophilous bacteria during the storage of apple slices (solution (1) – citric acid 0,8%, sucrose 20%, solution (2) – ascorbic acid 1%, calcium chloride 0,3%, 4-hexylresorcinol 0,005%, sucrose 20%)

**Rysunek 6.** Wpływ zanurzania w roztworach na liczbę bakterii mezofilnych i bakterii psychrofilnych podczas przechowywania plasterów jabłek (roztwór (1) – kwas cytrynowy 0,8%, sacharoza 20%, roztwór (2) – kwas askorbinowy 1%, chlorek wapnia 0,3%, 4-heksylrezorcynol 0,005%, sacharoza 20%)



**Figure 7.** The effect of vacuum impregnation on the counts of mesophilous moulds and psychrophilous moulds during the storage of apple slices (solution (1) – citric acid 0,8%, sucrose 20%, solution (2) – ascorbic acid 1%, calcium chloride 0,3%, 4-hexylresorcinol 0,005%, sucrose 20%)

**Rysunek 7.** Wpływ nasączenia próżniowego na liczbę pleśni mezofilnych i pleśni psychrofilnych podczas przechowywania plasterów jabłek (roztwór (1) – kwas cytrynowy 0,8%, sacharoza 20%, roztwór (2) – kwas askorbinowy 1%, chlorek wapnia 0,3%, 4-heksylrezorcynol 0,005%, sacharoza 20%)



**Figure 8.** The effect of blanching on the counts of mesophilous bacteria and psychrophilous bacteria during the storage of apple slices (solution (1) – citric acid 0,8%, sucrose 20%, solution (2) – ascorbic acid 1%, calcium chloride 0,3%, 4-hexylresorcinol 0,005%, sucrose 20%)

**Rysunek 8.** Wpływ blanszowania na liczbę bakterii mezofilnych i bakterii psychrofilnych podczas przechowywania plasterów jabłek (roztwór (1) – kwas cytrynowy 0,8%, sacharoza 20%, roztwór (2) – kwas askorbinowy 1%, chlorek wapnia 0,3%, 4-heksylrezorcynol 0,005%, sacharoza 20%)

Most of the investigated groups of microorganisms showed slower rates of growth in samples subjected to processing with an enzymatic browning inhibitor solution than that in control samples, not subjected to processing. However, faster growth of yeasts was observed in vacuum impregnated samples than that in control samples. It may be assumed that it is connected with an increase in sucrose concentration in apple slices.

Studies on the morphology of microorganisms grown on plates during the determination of the total counts of psychrophilic and mesophilic bacteria, as well as molds and yeasts showed that the dominant microflora consisted of Gram-negative bacteria, molds from genera *Rhizopus*, *Aspergillus* and *Penicillium*, as well as yeasts from genus *Sacchromyces*.

## Conclusions

The application of dipping and vacuum impregnation of apple slices with solutions containing sucrose and inhibitors of enzymatic browning and tissue softening facilitated the obtaining of the product with very high quality, higher than in case of blanching. As a result of vacuum impregnation of apple slices with a solution, a product was obtained with high sensory attractiveness, in spite of a certain deterioration in texture, resulting in a reduction in the compression force of the sample ( $F_{max}$ ). Moreover, vacuum impregnation of apple tissue facilitates the obtaining of a product with increased content of impregnation solution components, e.g. ascorbic acid.

Dipping and vacuum impregnation of apple slices had a slight effect on their microbiological quality, while blanching (60°C, 1 min) significantly reduced the level of contamination. The majority groups of microorganisms showed slower growth rate in the

samples treated with a solution inhibiting enzymatic browning compared to untreated control samples. However, an increase in the yeast counts was observed after 15 days of storage in vacuum impregnated samples with solution (1) and solution (2) in comparison to control samples.

## References

- Amiot M.J., Tacchini M., Aubert S., Nicholas J., Influence of cultivar, maturity, storage and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning on pear fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43, 1132-1137.
- Barrera C., Betoret N., Corell P., Fito P., Effect of osmotic dehydration on the stabilization of calcium-fortified apple slices (var. Granny Smith): Influence of operating variables on process kinetics and compositional changes. *Journal of Food Engineering*, 2009, 92, 416-424.
- Betoret E.E., Sentandreu E., Betoret N., Codoñer-Franch P., Valls-Bellés V., Fito P., Technological development and functional properties of an apple snack rich in flavonoid from mandarin juice *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2012, 16, 298-304.
- Beveridge, T., Weintraub, S.E., Effect of blanching on colour and texture of apple slices at various water activities. *Food Research International*, 1995 28 (1), 83-86.
- Burbianka M., Pliszka A., *Mikrobiologia żywności [Microbiology of food]*. PZWŁ, Warszawa, 1993.
- Del Valle J.M., Aranguiz V., Leon H., Effects of blanching and calcium infiltration on PPO activity, texture, microstructure, and kinetics of osmotic dehydration of apple tissue. *Food Research International*, 1998, 31 (8), 557-569.
- Diamante L.M., Hironaka K., Yamaguchi Y., Nademude E., Optimisation of vacuum impregnation of blackcurrant-infused apple cubes: application of response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 2014, 49, 689-695.
- Dong X., Wrolstad R.E., Sugar D., Extending shelf life of fresh-cut pears. *Journal of Food Science*, 2000, 65 (1), 181-186.
- Erle U., Schubert H., Combined osmotic and microwave-vacuum dehydration of apples and strawberries. *Journal of Food Engineering*, 2001, 49, 193-199.
- Fito P., Chiraldt A., Betoret N., Gras M., Chafer M., Martinez-Monzo J., Andres A., Vidal D., Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering application in functional fresh food development. *Journal of Food Engineering*, 2001a, 49, 175-183.
- Fito P., Chiralt A., Barat J.M., Andres A., Martinez-Monzo J., Martinez-Navarrete N., Vacuum impregnation for development of new dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, 2001b, 49, 297-302.

- Gonzales-Aguilar G.A., Wang C.Y., Buta J.G., Inhibition of browning and decay of fresh-cut radishes by natural compounds and their derivatives. *LWT-Food Science and Technology*, 2001, 34 (5), 324-328.
- Gonzales-Aguilar G.A., Wang C.Y., Buta J.G., Maintaining quality of fresh-cut mangoes using antibrowning agents and modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 4, 4204-4208.
- Gorny J.R., Hess-Pierce B., Cifuentes R.A., Kader A.A., Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by controlled atmospheres and chemical preservatives. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 24, 271-278.
- Javeri H., Toledo R., Wicker L., Vacuum infusion of citrus pectinmethylesterase and calcium effects on firmness of peaches. *Journal of Food Science*, 1991, 56(3), 739-742.
- Libudzis Z., *Mikrobiologia przemysłowa [Industrial microbiology]*. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, 2000, 421-424.
- Luna-Guzman I., Barrett D.M., Comparison of calcium chloride and calcium lactate effectiveness in maintaining shelf stability and quality of fresh-cut cantaloupes. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 19, 61-72.
- Luna-Guzman I., Cantwell M., Barrett D.M., Fresh-cut cantaloupe: effect of  $\text{CaCl}_2$  dips and heat treatments on firmness and metabolic activity. *Postharvest Biology and Technology*, 1999, 17, 201-213.
- Lurie S., Nussinovitch A., Compression characteristics, firmness, and texture perception of heat treated and unheated apples. *International Journal of Food Science and Technology*, 1996, 31, 1-5.
- Martinez-Monzo J., Barat J.M., Gonzalez-Martinez C., Chiralt A., Fito P., Changes in thermal properties of apple due to vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 2000, 43, 213-218.
- Martinez-Monzo J., Martinez-Navwrrete N., Chiralt A., Fito P., Mechanical and structural changes in apple (var. Granny Smith) due to vacuum impregnation with cryoprotectants. *Journal of Food Science*, 1998, 63 (3), 499-502.
- Muntada V., Gerschenson L.N., Alzamora S.M., Castro M.A., Solute infusion on texture of minimally processed kiwifruit. *Journal of Food Science*, 1998, 63 (4), 616-620.
- Nguyen-The C., Carline F., The microbiology of minimally-processed fresh fruits and vegetables. *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition*, 1994, 34(4), 371-401.
- Nicoli M.C., Anese M., Severini C., Combined effects in preventing enzymatic browning reactions in minimally processed fruit. *Journal of Food Quality*, 1993, 17, 221-229.
- Park S., Kodihalli I., Zhaonutritional Y., Sensory, and physicochemical properties of vitamin E- and mineral-fortified fresh-cut apples by use of vacuum impregnation. *Journal of Food Science*, 2005, 70(9, ), 593-599.

Pittia P., Nicoli M.C., Comi G., Massini R., Shelf-life extension of fresh-like ready-to-use pear cubes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 79, 955-960.

Ponappa T., Scheerens J.C., Miller A.R., Vacuum infiltration of polyamines increases firmness of strawberries slices under various storage conditions. *Journal of Food Science*, 1993, 58(2), 361-364.

Radziejewska-Kubzdela E., Biegańska-Marecik R., Kidoń M., Applicability of vacuum impregnation to modify physico-chemical, sensory and nutritive characteristics of plant origin products - A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(9), 16577-16610.

Reyes-Moreno C., Parra-Inzunza M.A., Milan-Carrilla J., Zazueta-Niebla J.A., A response surface methodology approach to optimise pretreatments to prevent enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum*) cubes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 82, 69-79.

Roa V., Tapia M.S., Millan F., Mass Balances in porous foods impregnation. *Journal of Food Science*, 2001, 66 (9), 1332-1336.

Sapers G.M., Douglas F.W. Jr., Ziolkowski M.A., Miller, R.L., Hicks, K.B., Determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic acid-2-phosphate in infiltrated apple and potato tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1990a, 503, 431-436.

Sapers G.M., Garzarella L., Pilizota V., Application of browning inhibitors to cut apple and potato by vacuum and pressure infiltration. *Journal of Food Science*, 1990b, 55 (4), 1049-1053.

Soliva-Fortuny R.C., Oms-Oliu G., Martin-Belloso O., Effect of ripeness stages on the storage atmosphere, colour, and textural properties of minimally processed apple slices. *Journal of Food Science*, 2002, 67 (5), 1958-1963.

Watada A.E., Nathanee P.K., Donna A.M., Factor affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest Biology and Technology*, 1996, 9, 115-125.

RÓŻA BIEGAŃSKA-MARECIK, ELŻBIETA RADZIEJEWSKA-KUBZDELA,  
JANUSZ CZAPSKI, MARCIN KIDOŃ, DOROTA WALKOWIAK-TOMCZAK,  
KAROLINA MŁYNARCZYK

*Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

*rozmarec@up.poznan.pl*

KATARZYNA CZACZYK

*Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności*

*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

## **PORÓWNANIE NASĄCZANIA PRÓŻNIOWEGO, ZANURZANIA ORAZ BLANSZOWANIA JAKO METOD OBRÓBKI MAŁO PRZETWORZONYCH PLASTRÓW JABŁEK**

### **Abstrakt**

W pracy porównano wpływ nasączania próżniowego, zanurzania oraz blanszowania roztworami zawierającymi związki hamujące brązowienie enzymatyczne i mięknięcie tkanki na jakość plasterków jabłek o małym stopniu przetworzenia. W badaniach wykorzystano 5 odmian jabłek: *Cortland*, *Elstar*, *Gloster*, *Jonagold* i *Szampion*. Plastry jabłek poddane obróbce zapakowano próżniowo w opakowania z laminatu OPA/PE i przechowywano w temperaturze 4°C przez 15 dni. Określono wpływ zastosowanych metod obróbki na parametry barwy L\*, a\*, b\*, teksturę, jakość sensoryczną (barwę, teksturę, smak i zapach) produktu oraz na jego jakość mikrobiologiczną. Zastosowanie zanurzania oraz nasączania próżniowego plasterków jabłek roztworami zawierającymi sacharozę oraz związki hamujące brązowienie enzymatyczne i mięknięcie tkanki pozwoliło na uzyskanie produktu o bardzo wysokiej jakości, wyższej niż przy zastosowaniu blanszowania. W wyniku nasączania próżniowego plasterków jabłek roztworem, uzyskano produkt o wysokiej atrakcyjności sensorycznej, pomimo pogorszenia tekstury, skutkującego obniżeniem wartości siły ściskania plasterków (Fmax). Zanurzenie i nasączanie próżniowe plasterków jabłek miało niewielki wpływ na ich jakość mikrobiologiczną, natomiast blanszowanie (60°C, 1 min) istotnie zmniejszyło poziom skażenia.

**Słowa kluczowe:** minimalne przetwarzanie, jabłka, tekstura, jakość mikrobiologiczna, nasączanie próżniowe, brązowienie enzymatyczne

---

ŁUKASZ K. KACZYŃSKI, PAULINA BIERZUŃSKA, DOROTA CAIS-SOKOLIŃSKA  
*Katedra Technologii Mleczarstwa*  
*Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu*  
*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*  
*lukasz.kaczynski@up.poznan.pl*

**TECHNOLOGICZNE UWARUNKOWANIA SYNTEZY KWASU  
2-HYDROKSYPROPANOWEGO W FERMENTOWANYM MLEKU  
O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI LAKTOZY**

**Streszczenie**

Rodzaj i wzajemne proporcje bakterii kwasu mlekowego (LAB) wchodzących w skład kultury starterowej inicjującej proces fermentacji mleka mają istotny wpływ na produkcję kwasu 2–hydroksypropanowego. Ilość wytworzonego kwasu decyduje o końcowym pH produktu, strukturze i jego profilu sensorycznym. Jednakże każda z zastosowanych bakterii fermentacji mlekowej tworzy charakterystyczną dla siebie formę izomeryczną kwasu: L(+) i/lub D(–) lub jako mieszaninę racemiczną. Ilość i forma wytworzonego kwasu zależy od konkretnego szczepu LAB i dostępności w podłożu składników niezbędnych do ich namnożenia. W doświadczeniu wytworzono modelowe mleko fermentowane (MMF) o początkowej zawartości laktozy w przedziale od 0,01 do 4,7%. Przeprowadzono fermentację mlekową (37°C) i mlekowo-alkoholową (23°C). W próbkach MMF oznaczono ogólną zawartość kwasu 2–hydroksypropanowego i jego form izomerycznych. Oznaczenie polegało na utlenieniu kwasu do pirogronianu przez dinukleotyd nikotynoamidoadeinowy (NAD<sup>+</sup>) katalizowane przez dehydrogenazę mleczanu (L-LDH; D-LDH). W dalszej kolejności dokonano konwersji pirogronianu do D-alaniny i 2–oksoglutanu przy pomocy enzymu transaminazy D–glutano–pirogronianowej (D–GPT) w obecności D–glutaminianu/D–mleczanu. Przy użyciu spektrofotometru UV-1601 zmierzono absorbancję przy  $\lambda=340$  nm.

Stwierdzono, że mleko zawierające  $\leq 0,01\%$  laktozy ukwaszone na drodze fermentacji mlekowej charakteryzowało się mniejszą kwasowością średnio o 0,03 jednostki pH niż mleko o początkowej zawartości 4,7% laktozy. W przypadku fermentacji mlekowo-alkoholowej tendencja była podobna, a różnica spowodowana różną zawartością laktozy, zwiększyła się do 0,17 jednostek pH. Im większa była zawartość laktozy w mleku przerobowym tym większa była ogólna zawartość kwasu 2–hydroksypropanowego w mleku fermentowanym.

W badanych próbkach mleka fermentowanego dominującą frakcją kwasu 2–hydroksypropanowego stanowiła frakcja L(+). Mleko przerobowe poddane fermentacji mlekowej o początkowej zawartości laktozy 4,7% charakteryzowało się większą zawartością frakcji L(+) kwasu 2–hydroksypropanowego w MMF o 23% niż z mleka bezlaktozowego. W modelowym mleku fermentowanym poddanym uprzedniemu procesowi fermentacji mlekowo-alkoholowej zawartość frakcji L(+) 2–hydroksypropanowego była wyższa aż o 45% w mleku o początkowej zawartości laktozy 4,7% niż z mleka bezlaktozowego.

**Słowa kluczowe:** bakterie kwasu mlekowego, kwas 2–hydroksypropanowy, mleko fermentowane

### Wprowadzenie

Mleko fermentowane to produkt mleczny otrzymany w wyniku fermentacji mleka przez działanie odpowiedniej charakterystycznej mikroflory. Powoduje one obniżenie pH, jednocześnie wywołując koagulację mleka.

Zastosowanie odpowiednich kultur starterowych podczas inokulacji mleka przerobowego istotnie wpływa na produkcję kwasu 2–hydroksypropanowego. Jednakże każda z zastosowanych bakterii fermentacji mlekowej tworzy charakterystyczną dla siebie formę izomeryczną kwasu 2–hydroksypropanowego - L(+) i/lub D(–) lub jako mieszaninę racemiczną.

Według doniesień naukowych kwas 2–hydroksypropanowy występujący w produktach klasyfikuje je dodatkowo, jako żywność funkcjonalną. Prozdrowotne właściwości kwasu 2–hydroksypropanowego wiążą się z faktem, iż hamuje on potencjał elektrochemiczny membran komórkowych, denaturuje wewnątrzkomórkowe białka i obniża pH treści komórek mikroflory patogennej. Ponadto, przyspiesza on trawienie białek w przewodzie pokarmowym, wzmacnia wydzielanie soków trawiennych, pobudza perystaltykę jelit oraz zwiększa wchłanianie jonów żelaza, wapnia i fosforu [Maeda i in., 2009].

Większy udział formy izomerycznej L(+) kwasu 2–hydroksypropanowego nad formą D(–) powoduje iż jest on całkowicie przyswajalny przez organizm jako źródło energii. Natomiast forma D(–) jest wydalana z organizmu, a jej nadmiar prowadzi do zaburzeń w wchłanianiu soli mineralnych oraz kwasicy. Występowanie form izomerycznych kwasu 2–hydroksypropanowego zależy także od stereo specyficzności dehydrogenazy mleczanowej. Forma L(+) powstaje we wcześniejszym stadium fermentacji mleka, a forma D(–) w późniejszym, a także podczas gdy temperatura fermentacji jest zbyt wysoka. Sam proces fermentacji mlekowej może faworyzować powstawanie formy D(–) kwasu w ilości od 2 do ponad 80%. W napojach najnowszej generacji zawierających wyłącznie udział bakterii jelitowych, występuje kwas 2–hydroksypropanowy głównie w formie L(+). Wiąże się to z tym, iż szczepy *Bifidobacterium bifidum* i *Streptococcus thermophilus* wytwarzają kwas 2–hydroksypropanowy w formie L(+) podczas gdy pałeczki *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* sprzyjają tworzeniu kwasu D(–) 2–hydroksypropanowego, a *Lactobacillus acidophilus* kwasu w formie racemicznej [Oh i in., 2005; Rojan i in., 2006].

Celem pracy była ocena zawartości kwasu 2–hydroksypropanowego występującego w tym formie D(–) i L(+) w modelowym mleku fermentowanym (MMF). Zakres syntezy kwasu w badanym mleku uwarunkowany został zmianą zawartością laktozy w mleku przerobowym i składem kultur starterowych użytych do przeprowadzenia fermentacji mleka.

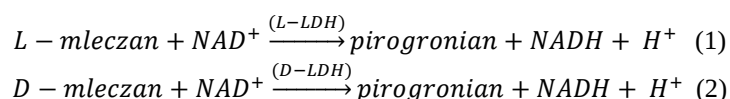
### Materiał i metody

Materiałem, było modelowe mleko fermentowane otrzymane na drodze fermentacji mlekowej i mlekowo-alkoholowej. Do badań użyto mleko przerobowe o różnej zawartości laktozy: 4,7%; 2,35% oraz mniej niż 0,01% laktozy. Mleko przerobowe o zawartości 4,7% laktozy oraz mleko o zawartości laktozy mniej niż 0,01% było mlekiem spożywczym

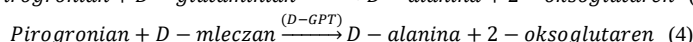
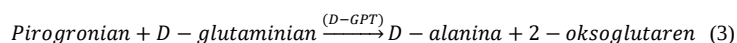
pasteryzowanym zakupionym w placówce handlu na terenie miasta Poznania. Mleko o zawartości laktozy 2,35% otrzymano w wyniku połączenia mleka o zawartości 4,7% laktozy oraz mleka o zawartości laktozy mniej niż 0,01% w jednakowych proporcjach, tj. 1:1. Mleko od momentu zakupu do czasu jego wykorzystania w badaniach przetrzymywano w stanie schłodzonym nie dłużej niż dwa dni. Deklarowany przez producentów czas przydatności do spożycia dla użytego w doświadczeniu mleka nie był krótszy niż 10 dni. Mleko przerobowe podgrzewano dopiero przed bezpośrednim wprowadzeniem bakterii fermentacji mlekowej lub mlekowo-alkoholowej. Temperatura, do jakiej podgrzewano mleko była taka sama jak temperatura inkubacji mleka po jego inokulacji. Mleko o różnej zawartości laktozy dzielono na dwie części. Jedną część poddawano inokulacji tradycyjnymi kulturami bakterii fermentacji mlekowej stosowanymi w technologii produkcji jogurtu. Drugą część mleka o tej samej zawartości laktozy poddawano inokulacji kulturami używanymi w technologii produkcji kefiru. Proces fermentacji zainicjowano wprowadzeniem kultur starterowych bezpośrednio do mleka przerobowego.

Wprowadzając kultury starterowe o nazwie handlowej Lyofast SAB 440 B firmy SACCO Polska, a następnie inkubacji mleka w temperaturze 37°C otrzymano jogurty. Zastosowane kultury składały się ze ściśle wyselekcjonowanych szczepów: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* oraz *Bifidobacterium animalis subspecies lactis*. Zgodnie ze specyfikacją ich producenta kultury Lyofast SAB 440 B zapewniają jednolitą i kontrolowaną produkcję mleka fermentowanego o wysokiej lepkości. Z kolei wprowadzając do mleka przerobowego kultury o nazwie handlowej Lyofast MT 432 ANV firmy SACCO, otrzymano kefir. Mleko po inokulacji tymi kulturami przetrzymywano w temperaturze 23°C. Zastosowane w badaniu kultury starterowe składały się z *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subspecies lactis*, *Lactococcus lactis subspecies lactis biovar diacetylactis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* oraz z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Czas inkubacji mleka przerobowego po inokulacji zarówno jednymi jak i drugimi kulturami wynosił 24 godziny. Oznaczenie form izomerycznych kwasu 2-hydroksypropanowego przeprowadzono z wykorzystaniem testu Megazyme L-lactic acid i D-lactic acid, firmy Megazyme International Ireland.

Oznaczenie ilościowe kwasu 2-hydroksypropanowego opierało się na przeprowadzeniu dwóch reakcji enzymatycznych z wykorzystaniem zestawu odpowiednio przygotowanych odczynników. Pierwszą reakcją było utlenienie kwasu 2-hydroksypropanowego do pirogronianu przez dinukleotyd nikotynoamidoadeinowy (NAD<sup>+</sup>) katalizowanym przez dehydrogenazę mleczanu (L-LDH lub D-LDH):



Jednakże równowaga reakcji jest bardziej przesunięta w stronę kwasu 2–hydroksypropanowego i NAD<sup>+</sup>, dlatego dalsza reakcja wymagała schwywania pirogronianu. Było to możliwe, dzięki konwersji pirogronianu do D–alaniny i 2–oksoglutanu przy pomocy enzymu transaminazy D–glutano-pirogronianowej (D–GPT) w obecności dużej ilości D–glutaminianu lub D–mleczanu:



Zawartość NADH, która wytworzyła się w obu reakcjach, była stechiometryczna do ilości kwasu 2–hydroksypropanowego. Ta ilość NADH, była zmierzona poprzez wzrost absorbancji przy długości fali  $\lambda=340$  nm przy użyciu spektrofotometru UV–1601 firmy Beijing Rayleigh Analytical Instrument Corporation z siedzibą w Chinach.

## Wyniki i dyskusja

Zawartość kwasu 2–hydroksypropanowego i jego form izomerycznych w modelowym mleku fermentowanym przedstawiono w Tabelach 1 i 2. Ogólną zawartość kwasu stanowiła suma jego form izomerycznych L(+) i D(–) z pominięciem formy racemicznej.

**Tabela 1.** Zawartość poszczególnych frakcji kwasu 2–hydroksypropanowego i jego ogólna ilość w jogurcie otrzymanym z mleka przerobowego o różnej zawartości laktozy

| Badany składnik                                    | Jogurt otrzymany z mleka o zawartości laktozy (%) |                   |                   |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                                    | 4,7                                               | 2,35              | ≤0,01             |
| Kwas L(+) 2–hydroksypropanowy (g·L <sup>-1</sup> ) | 5,74 <sup>c</sup>                                 | 2,92 <sup>a</sup> | 4,33 <sup>b</sup> |
| Kwas D(–) 2–hydroksypropanowy (g·L <sup>-1</sup> ) | 1,63 <sup>c</sup>                                 | 0,99 <sup>b</sup> | 0,7 <sup>a</sup>  |
| Ogólna zawartość kwasu (g·L <sup>-1</sup> )        | Σ = 7,37                                          | Σ = 3,91          | Σ = 5,03          |

a-c różne małe litery przy wartościach oznaczają statystycznie istotny wpływ zawartości laktozy w mleku przerobowym na zawartość kwasu 2–hydroksypropanowego na poziomie  $\alpha=0,05$

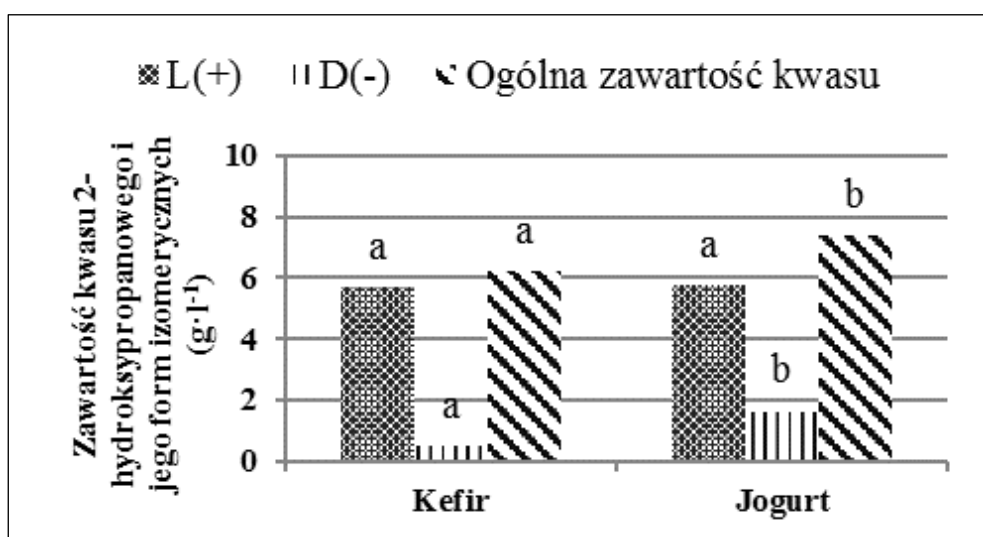
**Tabela 2.** Zawartość poszczególnych frakcji kwasu 2–hydroksypropanowego i jego ogólna ilość w kefirze otrzymanym z mleka przerobowego o różnej zawartości laktozy

| Badany składnik                                    | Kefir otrzymany z mleka o zawartości laktozy (%) |                   |                   |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                                    | 4,7                                              | 2,35              | ≤0,01             |
| Kwas L(+) 2–hydroksypropanowy (g·L <sup>-1</sup> ) | 5,70 <sup>c</sup>                                | 4,26 <sup>b</sup> | 3,14 <sup>a</sup> |
| Kwas D(–) 2–hydroksypropanowy (g·L <sup>-1</sup> ) | 0,51 <sup>c</sup>                                | 0,32 <sup>b</sup> | 0,07 <sup>a</sup> |
| Ogólna zawartość kwasu (g·L <sup>-1</sup> )        | Σ = 6,21                                         | Σ = 4,58          | Σ = 3,31          |

a-c różne małe litery przy wartościach oznaczają statystycznie istotny wpływ zawartości laktozy w mleku przerobowym na zawartość kwasu 2–hydroksypropanowego na poziomie  $\alpha=0,05$

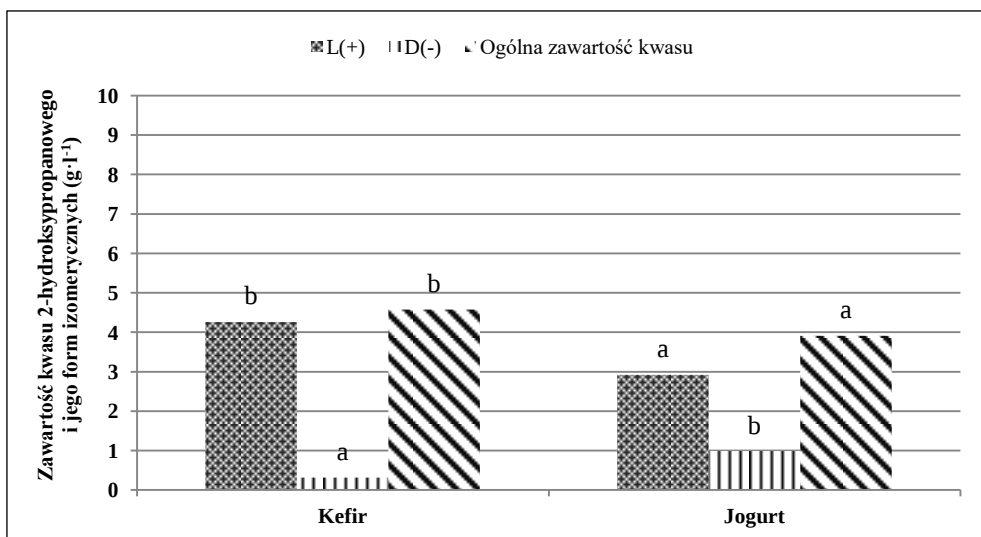
W procesie fermentacji mleka, wartość kwasowości czynnej mleka istotnie zwiększyła się. Średnio wartość pH mleka poddawanego fermentacji trwającej 24 h zmniejszyła się z pH 6,64 do pH 4,10. Mleko o zawartości 4,7% laktozy poddane ukwaszeniu kulturami jogurtowymi osiągnęło po 24 h fermentacji wartość pH wynoszącą 4,09, a ukwaszone bakteriami kwasu mlekowego i drożdżami osiągnęło wartość pH 4,13.

Mleko zawierające równo lub mniej niż 0,01% laktozy ukwaszone na drodze fermentacji mlekowej charakteryzowało się mniejszą kwasowością średnio o 0,03 jednostki pH niż mleko zawierające 4,7% laktozy. Nie była to różnica statystycznie istotna. W przypadku fermentacji mlekowo-alkoholowej tendencja była podobna, a różnica zwiększyła się do 0,17 jednostek pH. Wykazano statystycznie istotny wpływ zawartości laktozy w mleku przerobowym poddanym fermentacji mlekowo-alkoholowej na wartość kwasowości czynnej.



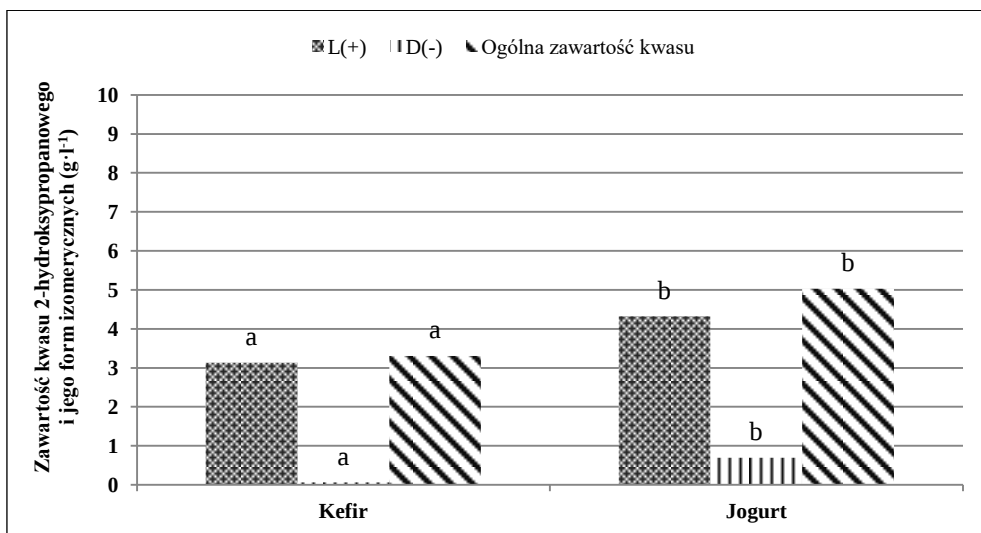
**Rysunek 1.** Wpływ rodzaju fermentacji na syntezę kwasu 2–hydroksypropanowego i jego frakcji w MMF na bazie mleka o zawartości laktozy 4,7%

a-b różne małe litery przy wartościach średnich tego składnika dotyczące wpływu rodzaju fermentacji oznaczają różnice statystycznie istotne dla  $\alpha=0,05$



**Rysunek 2.** Wpływ rodzaju fermentacji na syntezę kwasu 2–hydroksypropanowego i jego frakcji w MMF na bazie mleka o zawartości laktozy 2,35%

a-b różne małe litery przy wartościach średnich tego samego składnika dotyczące wpływu rodzaju fermentacji oznaczają różnice statystycznie istotne dla  $\alpha=0,05$



**Rysunek 3.** Wpływ rodzaju fermentacji na syntezę kwasu 2–hydroksypropanowego i jego frakcji w MMF na bazie mleka o zawartości laktozy  $\leq 0,01\%$

a-b różne małe litery przy wartościach średnich tego samego składnika dotyczące wpływu rodzaju fermentacji oznaczają różnice statystycznie istotne dla  $\alpha=0,05$

Na podstawie zaprezentowanego zestawienia analitycznego (Tab. 1-2 i Rys. 1-3) można wnioskować, że rodzaj zastosowanych w doświadczeniu kultur starterowych ma istotny wpływ na zawartość kwasu 2–hydroksypropanowego i jego formę izomeryczną.

Stwierdzono większą zawartość kwasu 2-hydroksypropanowego przy zastosowaniu fermentacji mlekowej niż mlekowo-alkoholowej. Jedynie ogólna zawartość kwasu mlekowego w modelowym kefirze wytworzonym z mleka o zawartości laktozy na poziomie 2,35% była większa niż przy produkcji modelowego jogurtu. Wartość ta wynikała z przeważającej ilości kwasu L(+) 2-hydroksypropanowego. W badanych próbkach mleka fermentowanego dominującą frakcją kwasu 2-hydroksypropanowego stanowiła frakcja L(+). Podwyższony poziom izomeru kwasu 2-hydroksypropanowego D(-) jest nietolerowany wśród ludzi, dlatego też izomer L(+) kwasu 2-hydroksypropanowego jest bardziej preferowany w żywności i w przemyśle farmaceutycznym. Jogurt powstały z mleka bezlaktozowego ( $\leq 0,01\%$ ) charakteryzował się mniejszą ilością kwasu 2-hydroksypropanowego (o 32%) niż jogurt powstały z mleka o normalnej (4,7%) zawartości laktozy. Natomiast w przypadku modelowego kefiru wielkość ta była znacznie większa, lecz nie stanowiła połowy ogólnej zawartości kwasu 2-hydroksypropanowego.

Jak wynika z badań innych autorów [Lourens-Hattingh i Viljoen, 2002] odpowiedni dodatek kultur starterowych oraz drożdży istotnie wpływa na końcową zawartość poszczególnych związków chemicznych w gotowym produkcie, w tym głównie kwasu 2-hydroksypropanowego. Autorzy zastosowali do ponownej inokulacji jogurty, które poddano odpowiednio procesowi sterylizacji, a następnie odwirowaniu zawartości glukozy, aby zastosować drożdże fermentujące laktozę.

Autorzy wykazali, że wzrost drożdży jest ściśle skorelowany ze zmniejszeniem się zawartości laktozy i wzrostem galaktozy w mleku fermentowanym. Jednocześnie zawartość kwasu 2-hydroksypropanowego jest różna w zależności od zastosowanych kultur drożdży w procesie inokulacji. W jogurcie naturalnym najmniejsze stężenie zaobserwowano przy użyciu *I. orientalis* (0,30%) a największe przy *K. marxianus* (2,04%). Ci sami autorzy zaobserwowali, że we wszystkich zastosowanych szczepionkach poziom zawartości laktozy był podobny i mieścił się w przedziale od 3,40 do 3,76% w jogurcie naturalnym.

Do podobnych wyników, co do ilości form izomerycznych kwasu 2-hydroksypropanowego występującego w jogurcie doszli [Nguyen-Boisse i in., 2013]. Autorzy do badań wykorzystali jogurty zakupione w lokalnym supermarkecie powstałe z mleka krowiego. Formy izomeryczne kwasu oznaczono zarówno konduktometrycznie za pomocą biosensorów LODP i kombinację LODP/HRP oraz metodą szybkich testów firmy R-Biopharm, GmbH, Germany. Wartość kwasu L(+) 2-hydroksypropanowego w produktach zbadanych przez [Nguyen-Boisse i in., 2013] wyniosła od  $6,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  do  $7,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , a zawartość kwasu D(-) 2-hydroksypropanowego, od 0,35 do  $0,54 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Całkowita zawartość kwasu 2-hydroksypropanowego oznaczona przez nich za pomocą biosensorów wyniosła od  $6,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  do  $7,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Serra i in. [2009] analizowali dodatkowo zawartość innych kwasów w zależności od zastosowanej obróbki cieplnej mleka przerobowego oraz czasu składowania. Mleko użyte w doświadczeniu autorzy poddali obróbce cieplnej w płytowym wymienniku ciepła w temperaturze  $90^{\circ}\text{C}$  przez 90 sekund, dodatkowo wzbogacili je w 3% odtłuszczone mleko w proszku składające się z 54% laktozy, 34,04% białka. próbki przechowywali przez okres 1, 14, oraz 28 dni. W pierwszym dniu autorzy oznaczyli  $8,774 \pm 0,208 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kwasu 2-hydroksypropanowego w wytworzonych próbach. Po 14 dniach była już to ilość  $10,516 \pm 1,25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Z kolei po 28 dniach wartość ta zwiększyła się do  $10,74 \pm 1,268 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

## Wnioski

1. W procesie fermentacji mleka zainicjowanej dodatkiem kultur starterowych wartość kwasowości czynnej mleka istotnie zwiększyła się, niezależnie od początkowej zawartości laktozy w mleku przerobowym. Średnio wartość pH mleka poddawanego fermentacji trwającej 24 h zmniejszyła się z pH 6,64 do pH 4,10. Przy czym po zakończeniu czasu inkubacji mleko poddane fermentacji mlekowej miało istotnie mniejszą kwasowość (pH = 4,09) niż mleko po fermentacji mlekowo-alkoholowej (pH = 4,13).
2. Ilość wytworzonego kwasu 2-hydroksypropanowego w modelowych jogurtach i kefirach uzależniona była od zawartości laktozy w mleku przerobowym. Im większa była zawartość laktozy w mleku przerobowym tym większa była ogólna zawartość kwasu 2-hydroksypropanowego w mleku fermentowanym niezależnie od zastosowanej fermentacji.
3. W badanych modelowych próbkach mleka fermentowanego dominującą frakcją kwasu 2-hydroksypropanowego stanowiła frakcja L(+). Stosunek ilości jednej frakcji do drugiej uwarunkowany był rodzajem zastosowanych kultur starterowych, a tym samym rodzajem przeprowadzanej fermentacji.
4. W wyniku użycia mleka o zmniejszonej do  $\leq 0,01\%$  zawartości laktozy w porównaniu do mleka o zawartości laktozy 4,7% oznaczono 7-krotnie mniej kwasu D(-) 2-hydroksypropanowego w kefirach i 2,5-krotnie mniej w jogurtach.

## Literatura

- Lourens-Hattingh A., C.Viljoen B., Survival of dairy-associated yeasts in yoghurt and yoghurt-related products. *Food Microbiology*, 2002, 19 (6), 597–604.
- Maeda T., Yoshimura T., Shimazu T., Shirai Y., Ogawa H. I., Enhanced production of lactic acid with reducing excess sludge by lactate fermentation. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 168 (2-3), 656–663.
- Nguyen-Boisse T.T., Saulnier J., Jaffrezic-Renault N., Lagarde F., Highly sensitive conductometric biosensors for total lactate, D- and L-lactate determination in dairy products. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 179 (3), 232–239.
- Oh H., Wee Y. J., Yun J. S., Han S. H., Jung S., Ryu H. W., Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*, 2005, 96 (13), 1492–1498.
- Rojan, J. P., Madhavan Nampoothiri K., Pandey A., Simultaneous saccharification and L(+)-lactic acid fermentation of protease treated wheat bran using mixed culture of lactobacilli. *Biotechnology Letters*, 2006, 28 (22), 1823–1826.
- Serra M., J. Trujillo A., Guamis B., Ferragut V., Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, 2009, 19 (2), 100–106.

## SPONSORZY – PAKIET ZŁOTY



Unilever



***Zeelandia***

## SPONSORZY – PAKIET SREBRNY



## SPONSORZY – PAKIET BRĄZOWY

Colian™



ISBN 978-83-7160-837-7



9 788371 608377

