

Dr inż. Joanna KRUK  
Mgr inż. Michał PANCERZ  
Mgr inż. Kacper KACZMARCZYK  
Dr hab. inż. Anna PTASZEK  
Dr inż. Maciej KABZIŃSKI  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Technologii Żywności  
Katedra Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego

# ŚLEDZENIE PROCESU ŻELOWANIA Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI DYNAMICZNEGO ROZPRASZANIA ŚWIATŁA LASEROWEGO (DLS)<sup>®</sup>

Following the gelling process using dynamic light scattering technique<sup>®</sup>

*Badania zostały sfinansowane z dotacji celowej na naukę przyznanej przez Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego\**

*W pracy przedstawionej w artykule zastosowano technikę dynamicznego rozpraszania światła do charakterystyki procesu żelowania w układzie guma konjac – guma ksantanowa. W przypadku wszystkich badanych układów wyznaczono punkt żelowania. Wykazano, że żelowanie w badanych układach dwuskładnikowych zachodziło dwuetapowo, co wynika z obecności łańcuchów o różnych masach cząsteczkowych. Wzrost stężenia stosowanych polisacharydów powoduje wzrost temperatury żelowania. Zjawiska tego nie odnotowano w przypadku układu wzorcowego w postaci żelatyny wieprzowej.*

*In this work was used the dynamic light scattering technique to characterisation gelling process in konjac gum – xanthan gum systems. In the case of all research systems the gelling point was determined. It was shown that in two-component research systems the gelling was two-step process, what was caused by presence of chains with different molar mass. Increase using polysaccharides concentration cause the increase of gelling temperature. This phenomenon has not been observed in the case of a standard system with porcine gelatine.*

## WPROWADZENIE

Proces żelowania odgrywa bardzo istotną rolę w przemyśle spożywczym, gdyż wiele produktów spożywczych to żele lub układy, w których stosowane są substancje żelujące w celu uzyskania odpowiedniej lepkości mającej bezpośrednie przełożenie na teksturę produktu i właściwości sensoryczne [1]. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych biopolimerów tworzących żele jest żelatyna. Oprócz niej stosowane są również białka serwatkowe, karagen, agar, a także różne rodzaje skrobi. Wykorzystywane są również polisacharydy takie jak guma konjac czy guma ksantanowa, które samodzielnie nie żelują lub proces żelowania z ich udziałem zachodzi w specyficznych warunkach, tj. w obecności zasad [8,13].

Guma konjac jest roślinnym glukomannanem pozyskiwanym z bulw gatunku *Amorphophallus konjac*. Jednostki D-glukozy i D-mannozy połączone wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym pozostają w stosunku 1:1.6 [19]. Natomiast guma ksantanowa jest zewnątrzkomórkowym polisacharydem produkowanym przez bakterie *Xanthomonas*

*campestris*. Celulozowy łańcuch główny utworzony z D-glukozy jest regularnie podstawiony przez trisacharydowe łańcuchy boczne: mannoza, kwas glukuronowy, mannoza. Końcowe jednostki mannozy mogą dodatkowo zawierać kwas pirogronowy, natomiast początkowe mogą posiadać przyłączone grupy acetylowe [4,14].

W celu otrzymania charakterystyki żelowania roztworów biopolimerów najczęściej wykorzystuje się różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) [3,11]. W tym przypadku analiza badanego układu odbywa się wobec układu kontrolnego o zdefiniowanej pojemności cieplnej w badanym zakresie temperaturowym. Wielkością mierzoną jest różnica ilości ciepła niezbędna do zapewnienia liniowych zmian (wzrost lub spadek) temperatury badanego układu w funkcji temperatury. Do tego celu można również zastosować reometrię rotacyjną. Na podstawie zmian lepkości pozornej badanego układu zachodzących na skutek podwyższania, a następnie obniżania temperatury możliwe jest określenie temperatury żelowania. Uzyskanie tego typu informacji możliwe jest również przy wykorzystaniu badań

oscylacyjnych, w których procedura pomiarowa składa się z dwóch etapów. Pierwszy polega na wyznaczeniu obszaru liniowej lepkości dla badanego układu i wyborze nieniszczącej wartości oscylacji ścinających. W drugim etapie badaną próbkę poddaje się działaniu wybranej częstotliwości w warunkach obniżania temperatury w odpowiednio dobranym zakresie. Na podstawie punktu przecięcia  $G'$  i  $G''$  wyznacza się temperaturę żelowania badanego układu [3,10,12,18]. Interesującą techniką, którą można zastosować do monitorowania przebiegu procesu żelowania jest dynamiczne rozpraszanie światła (DLS). Technika ta standardowo jest stosowana w celu określenia wielkości cząsteczek znajdujących się w roztworze na podstawie parametrów funkcji autokorelacji [15,16]. W przypadku niniejszych badań wyznaczenie punktu żelowania następuje na podstawie obserwacji zmian liczby fotonów rozpraszanych przez łańcuchy obecne w badanym roztworze przy zapewnieniu liniowego spadku temperatury układu [17].

**Celem artykułu jest przedstawienie możliwości wykorzystania techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS) do wyznaczania punktu żelowania hydrokoloidów spożywczych oraz analiza wyników badań dotyczących zdolności żelowania gumy konjac i gumy ksantanowej.**

## MATERIAŁY I METODY

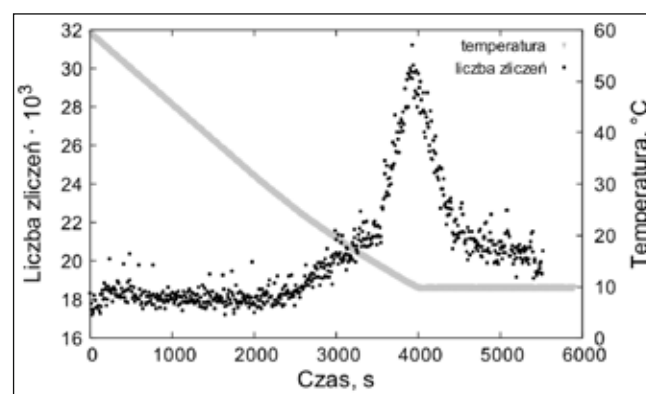
Materiał badawczy stanowiły handlowe preparaty gumy konjac (AGRO-SMAK, Dębe-Kolonia, Polska) – średnia wagowo masa cząsteczkowa  $M_w=9.9 \cdot 10^5$  g·mol<sup>-1</sup>, średnia liczbowo masa cząsteczkowa  $M_n=6.2 \cdot 10^5$  g·mol<sup>-1</sup>, polidispersja=1,6 i preparat gumy ksantanowej (Regis, Bochnia, Polska) –  $M_w=19,6 \cdot 10^5$  g·mol<sup>-1</sup>,  $M_n=0,022$  g·mol<sup>-1</sup>, polidispersja=871. Średnie masy molowe zostały wyznaczone z wykorzystaniem chromatografii żelowej, zgodnie z metodą zaproponowaną przez Łukasiewicza i Kowalskiego [7]. Żelatynę wieprzową (Gellwe, Zabierzów, Polska) wykorzystano jako materiał odniesienia.

Wodne roztwory badanych hydrokoloidów przygotowano przy wykorzystaniu obydwu hydrokoloidów w stosunku 1:1, przy całkowitym ich stężeniu wynoszącym 0,0025; 0,005; 0,01 g/100 mL. Próbkę wytrząsano w temperaturze 60°C przez 4 godziny. Stężenia roztworów żelatyny wieprzowej były analogiczne jak w przypadku prób właściwych.

Charakterystykę procesu żelowania i wyznaczenie punktu żelowania badanych roztworów (temperatury przemiany typu sol-żel) przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do dynamicznego rozpraszania światła. Zestaw złożony był z goniometru Brookhaven DLS/SLS BI-160 z cyfrowym autokorelatorem BI-9000AT (Brookhaven, New York, USA). Jako źródło światła zastosowano laser na ciele stałym (JDSU, CDPS532M-050) o mocy wyjściowej wynoszącej 50 mW i długości fali  $\lambda=532$  nm. Wszystkie pomiary były prowadzone przy kącie pomiędzy wiązką światła laserowego a ramieniem goniometru ze zintegrowanym detektorem, który wynosił 90°. Ilość zliczeń fotonów w czasie monitorowano w sposób ciągły przy spadku temperatury o 0,83K/minutę od początkowej temperatury próbki wynoszącej 60°C do 10°C. Po upływie tego czasu i osiągnięciu temperatury 10°C pomiar kontynuowano utrzymując temperaturę próbki na poziomie 10°C przez 30 minut.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Na rysunku 1 przedstawiono zależność liczby zliczeń fotonów trafiających do detektora w czasie, dla roztworu żelatyny wieprzowej o stężeniu 0,01 g/100mL (układ wzorcowy), przy obniżaniu temperatury rozpoczętym od 60°C. Początkowo pomimo zmniejszającej się temperatury liczba zliczeń utrzymywała się na poziomie wynoszącym około  $18 \cdot 10^3$  na sekundę. Poniżej temperatury 25°C zaobserwowano stopniowy przyrost liczby zliczeń w czasie. Po osiągnięciu temperatury 20°C nastąpił gwałtowny wzrost liczby zliczeń fotonów. Przy dalszym obniżaniu temperatury wartości tego parametru rosły, a maksymalną wartość ( $31,22 \cdot 10^3$ ) zarejestrowano w temperaturze 10,2°C (tab. 1). Po przekroczeniu tego punktu następuje gwałtowny spadek liczby zliczeń. Opisany wzrost i późniejszy spadek liczby zliczeń można zaobserwować w postaci wyraźnego piku (rys.1). Po pewnym czasie w temperaturze 10°C zaobserwowano plateau utrzymujące się na poziomie ilości zliczeń wynoszącym około  $20 \cdot 10^3$  na sekundę. Badania wykonano również dla stężeń 0,0025 i 0,005 g/100mL uzyskując w obydwu przypadkach maksimum zliczeń w temperaturze 10,1°C (tab. 1). Opisane obserwacje są zgodne z mechanizmem zaproponowanym przez Shibayama i Norisuye [15]. Idea pomiaru z wykorzystaniem metody dynamicznego rozpraszania światła i charakterystyka zmian zachodzących podczas żelowania została przedstawiona na rysunku 2. W pierwszym etapie (I) istnieją łańcuchy polimeru luźno rozproszone w roztworze. Oddziaływania pomiędzy nimi są niewielkie.



**Rys. 1. Zależność ilości zliczeń fotonów w funkcji czasu przy spadku temperatury – żelatyna wieprzowa stężenie 0,005g/100mL.**

**Fig. 1. Dependence of amount of photon count rate as a function of time with decreasing temperature – porcine gelatine concentration 0,005g/100mL.**

**Źródło:** Badania własne

**Source:** The own study

Intensywność fluktuacji i wartość liczby zliczeń związana jest ze stopniem polidispersji i rozmiarem cząsteczek obecnych w roztworze. W drugim etapie (II) wraz ze spadkiem temperatury cząsteczki zaczynają agregować, co objawia się zwiększeniem intensywności zliczeń. Wytworzenie uporządkowanej sieci powoduje znaczne ograniczenie ruchomości cząsteczek, a liczba zliczeń ulega zmniejszeniu.

W trzecim etapie (III) liczba zliczeń stabilizuje się – sieć jest w pełni uformowana. Liczba zliczeń jest większa niż w pierwszym etapie, a fluktuacje mniejsze. Spowodowane

jest to wytworzeniem uporządkowanej sieci połączeń, która mocniej rozprasza światło niż pojedyncze cząsteczki. Natomiast ograniczona możliwość przemieszczania się cząsteczek względem siebie ma odzwierciedlenie w stabilnej liczbie zliczeń.

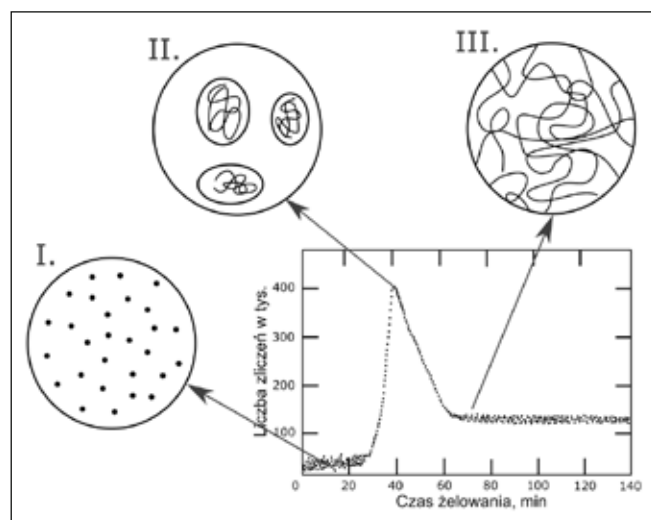
**Tabela 1. Temperatury żelowania badanych układów biopolimerowych w zależności od stężenia**

**Table 1. Gelling temperature of research biopolymer systems depending on**

Całkowite stężenie próbek g/100 mL	Punkt żelowania		
	Żelatyna wieprzowa	Guma konjac + guma ksantanowa	
	T1	T1	T2
0,0025	10,1	18,5	13,0
0,005	10,1	20,1	14,6
0,01	10,2	21,5	16,0

Źródło: Badania własne

Source: The own study



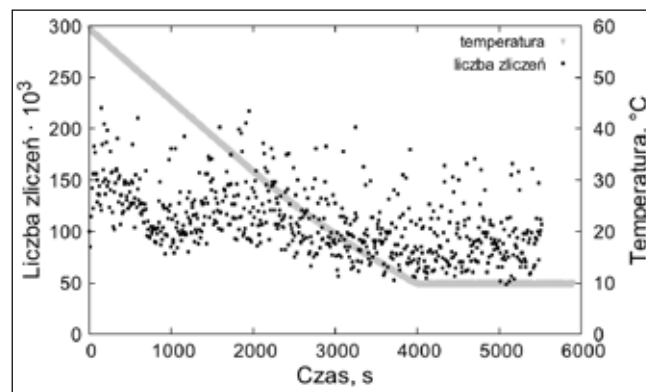
**Rys. 2. Schemat przemian zachodzących w procesie żelowania przy śledzeniu zmian z wykorzystaniem dynamicznego rozpraszania światła.**

**Fig. 2. Diagram of transformations occurring in the gelling process with tracking changes using dynamic light scattering.**

Źródło: Na podstawie badań Shibayama i Norisuye (2002) [15]

Source: Based on Shibayama and Norisuye (2002) reasearch [15]

W przypadku roztworu gumy ksantanowej przeprowadzone doświadczenie wykazało, że proces żelowania nie zachodzi. Uzyskana liczba zliczeń fotonów oscylowała w zakresie od  $50 \cdot 10^3$  do  $200 \cdot 10^3$  na sekundę (Rys. 3). Nie zaobserwowano piku świadczącego o przemianie typu zol-żel. W trakcie trwania eksperymentu wraz ze spadkiem temperatury próbki zaobserwowano stopniowe, powolne zmniejszenie liczby zliczeń. Zjawisko to spowodowane jest ograniczeniem ruchomości cząsteczek obecnych w roztworze wynikającym z obniżenia temperatury, a co za tym idzie spadkiem ich energii kinetycznej. Duże fluktuacje liczby zliczeń w czasie związane są z dużą polidispersją cząsteczek gumy ksantanowej. Zmiana stężenia badanego roztworu hydrokoloidu nie wpływa na zmianę obserwowanego zachowania.



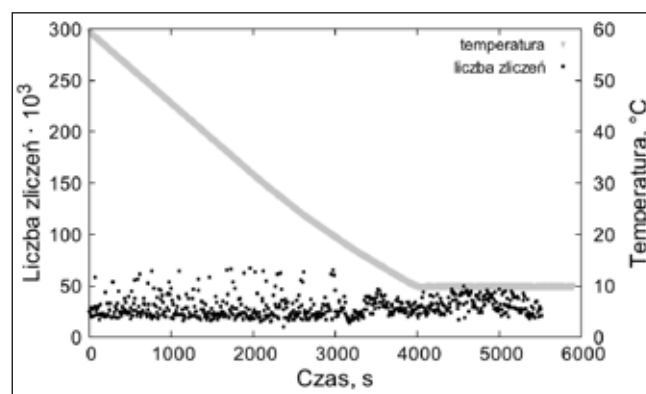
**Rys. 3. Zależność ilości zliczeń fotonów w funkcji czasu przy spadku temperatury –guma ksantanowa stężenie 0,005g/100mL.**

**Fig. 3. Dependence of amount of photon count rate as a function of time with decrease of temperature –xanthan gum concentration 0,005g/100mL.**

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Analiza przeprowadzona dla roztworu gumy konjac wykazała, że podobnie jak w przypadku gumy ksantanowej nie zaobserwowano procesu żelowania. Otrzymany wykres zależności zmian liczby zliczeń fotonów w czasie nie zawiera wyraźnych maksimumów. Ilość zliczeń kształtuje się na niższym poziomie niż w przypadku roztworu gumy ksantanowej i związane jest to z mniejszą masą cząsteczkową łańcuchów gumy konjac. Obserwowane fluktuacje w obrębie ilości zliczeń są mniejsze niż w przypadku gumy ksantanowej, co wynika ze znacznie mniejszej polidispersji cząsteczek tego hydrokoloidu. Podobnie jak w przypadku gumy ksantanowej zmniejszenie lub zwiększenie zawartości hydrokoloidu w roztworze nie indukuje procesu żelowania.



**Rys. 4. Zależność ilości zliczeń fotonów w funkcji czasu przy spadku temperatury – guma konjac stężenie 0,005g/100mL.**

**Fig. 4. Dependence of amount of photon count rate as a function of time with decrease of temperature – konjac gum concentration 0,005g/100mL.**

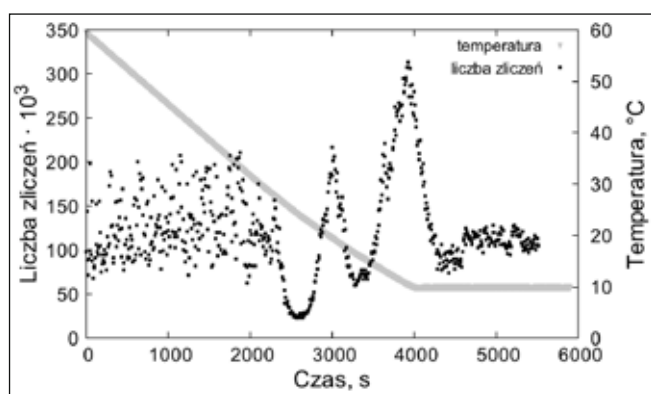
Źródło: Badania własne

Source: The own study

Badania prowadzone z wykorzystaniem dynamicznego rozpraszania światła ujawniły, że proces żelowania zachodzi w roztworach będących mieszaniną gumy konjac i gumy ksantanowej (rys. 5). Jest to zgodne z doniesieniami badaczy,



którzy wykazali istnienie interakcji, występujących pomiędzy łańcuchami tych hydrokoloidów, umożliwiających tworzenie termoodwracalnych żeli [2,5,9]. Kształtowanie uporządkowanej struktury żelu odbywa się przy udziale fragmentów łańcucha głównego gumy konjac zawierającego reszty glukozy, które wiążą się z łańcuchem celulozowym gumy ksantanowej [5,9]. W przypadku mieszaniny tych gum zaobserwowano, że początkowo liczba zliczeń fluktuuje, co związane jest z obecnością dwóch hydrokoloidów o różnych masach cząsteczkowych. W temperaturze około 27°C następuje wyraźne ograniczenie fluktuacji, jak również spadek liczby zliczeń. Podczas dalszego obniżania temperatury próbki zarejestrowano pierwsze minimum w temperaturze około 24°C. Związane jest to z ograniczeniem ruchomości cząsteczek w wyniku czego zostało zapoczątkowane tworzenie uporządkowanej struktury związane ze wzmocnieniem interakcji pomiędzy łańcuchami tych dwóch hydrokoloidów. Następnie na skutek niewielkiego obniżenia temperatury zaobserwowano intensywny wzrost ilości zliczeń fotonów do poziomu pierwszego maksimum wynoszącego około  $217 \cdot 10^3$  na sekundę (20,1°C – tab. 1). Wraz z dalszym obniżaniem temperatury następuje spadek ilości zliczeń do poziomu drugiego minimum, a zaraz potem ponowny gwałtowny wzrost do wartości drugiego maksimum – około  $307 \cdot 10^3$  na sekundę (14,6°C). Dalsze obniżanie temperatury powoduje podobnie jak w przypadku roztworu żelatyny spadek ilości zliczeń i ustalenie się plateau w zakresie od  $100 \cdot 10^3$  do  $130 \cdot 10^3$  zliczeń na sekundę. Występowanie dwóch maksimum wskazuje, że proces żelowania przebiega dwuetapowo. Zjawisko to jest związane z występowaniem dwóch frakcji gumy konjac o różnych masach cząsteczkowych. Zaobserwowane zachowanie potwierdzają wcześniejsze badania dotyczące koligatywnych właściwości wodnych roztworów gumy konjac [6], w których wykazano istnienie dwóch głównych czasów relaksacji łańcuchów gumy konjac (szybkie i wolne procesy relaksacyjne). Dalsze badania wykazały, że dwukrotne zmniejszenie stężenia roztworu (do 0,0025g/100mL) powoduje obniżenie I i II temperatury żelowania do wartości



Rys. 5. Zależność ilości zliczeń fotonów w funkcji czasu przy spadku temperatury – guma konjac + guma ksantanowa stężenie 0,005g/100mL.

Fig. 5. Dependence of amount of photon count rate as a function of time with decreasing temperature – konjac gum + xanthan gum concentration 0,005g/100mL.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

odpowiednio 18,5°C i 13,0°C. Zwiększenie stężenie roztworu (do 0,01g/100mL) powoduje podwyższenie I i II temperatury żelowania do wartości odpowiednio 21,5°C i 16,0°C.

## WNIOSKI

1. Technika dynamicznego rozpraszania światła może być z powodzeniem wykorzystywana do określania zdolności żelowania hydrokoloidów spożywczych.
2. Analiza zmian liczby zliczeń fotonów w czasie umożliwia otrzymanie charakterystyki procesu żelowania, a także wyznaczenie punktu żelowania (temperatury przemiany żol–żel).

\*Badania Młodych 2015 pn. „Właściwości koligatywne i hydrodynamiczne roztworów wybranych hydrokoloidów i białek”

## LITERATURA

- [1] BANERJEE S., S. BAHATTACHARYA. 2012. „Food gels: Gelling process and new applications.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 334–346.
- [2] DEA I.C.M., E.R. MORRIS, D.A. REES, E.J. WELSH, H.A. BARNES, J. PRICE. 1977. „Associations of like and unlike polysaccharides: Mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems.” *Carbohydrate Research* 57: 249–272.
- [3] DU L., T. BRENNER, J. XIE, S. MATSUKAWA. 2016. „A study on phase separation behavior in kappa/ iota carrageenan mixtures by micro DSC, rheological measurements and simulating water and cations migration between phases.” *Food Hydrocolloids* 55: 81–88.
- [4] GARCIA-OCHOA F., V.E. SANTOS, J.A. CASAS, E. GOMEZ. 2000. „Xanthan gum: production, recovery and properties.” *Biotechnology Advances* 18: 549–579.
- [5] GOYCOOLEA F.M., R.K. RICHARDSON, E.R. MORRIS, M.J. GIDLEY. 1995. „Stoichiometry and conformation of xanthan in synergistic gelation with locust bean gum or konjac glucomannan: evidence for heterotypic binding.” *Macromolecules* 28 (24): 8308–8320.
- [6] KRUK J., K. KACZMARCZYK, A. PTASZEK, U. GOIK, P. PTASZEK. 2017. „The effect of temperature on the colligative properties of food-grade konjac gum in water solutions.” *Carbohydrate Polymers* 174: 456–463.
- [7] LUKASIEWICZ M., S. KOWALSKI. 2012. „Low power microwave-assisted enzymatic esterification of starch.” *Starch–Stärke* 64(3): 188–197.
- [8] MAEKAJI K. 1974. „The mechanism of gelation of konjac mannan.” *Agr. Bio. Chon.* 38 (2): 315–321.
- [9] MAO C.F., W. KLINTHONG, Y.C. ZENG, C.H. CHEN. 2012. „On the interaction between konjac glucomannan and xanthan in mixed gels: an analysis based on the cascade model.” *Carbohydrate Polymers* 89(1): 98–103.

- [10] **MIYOSHI E., T. TAKAYA, K. NISHINARI. 1994a.** „Gel-sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts.” *Food Hydrocolloids* 8(6): 505–527.
- [11] **MIYOSHI E., T. TAKAYA, K. NISHINARI. 1994b.** „Gel-sol transition in gellan gum solutions. II. DSC studies on the effects of salts.” *Food Hydrocolloids* 8(6): 529–542.
- [12] **MLEKO S. 2004.** „Żelowanie preparatów serwatkowych.” *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 1(38): 25–33.
- [13] **MOFFAT J., V.J. MORRIS, S. AL-ASSAF, A.P. GUNNING. 2016.** „Visualisation of xanthan conformation by atomic force microscopy.” *Carbohydrate Polymers* 148: 380–389.
- [14] **PHILLIPS G.O., P.A. WILLIAMS. 2009.** *Handbook of hydrocolloids* (2nd ed.), Boston, CRC Press.
- [15] **RATCLIFFE I., P.A. WILLIAMS, C. VIEBKE, J. MEADOWS. 2005.** „Physicochemical characterization of konjac glucomannan.” *Biomacromolecules* 6: 1977–1986.
- [16] **RODD A.B., D.E. DUNSTAN, D.V. BOGERA. 2000.** „Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology.” *Carbohydrate Polymers* 42(2): 159–174.
- [17] **SHIBAYAMA M., T. NORISUYE. 2002.** „Gel formation analyses by dynamic light scattering.” *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 75: 641–659.
- [18] **VICINI S., M. CASTELLANO, M. MAURI, E. MARSANO. 2015.** „Gelling process for sodium alginate: New technical approach by using calcium rich micro-spheres.” *Carbohydrate Polymers* 134: 767–774.
- [19] **WANG C., M. XU, W. LV, P. QIU, Y. GONG, D. LI. 2012.** „Study on rheological behavior of konjac glucomannan.” *Physics Procedia* 33: 25–30.