

Mgr Beata CIEŚLAK
Wydział Nauk o Żywności
Dr inż. Elżbieta BILLER

Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, SGGW w Warszawie

WPŁYW ZAWARTOŚCI WODY NA INTENSYWNOŚĆ REAKCJI NIEENZYMATYCZNEGO BRĄZOWIENIA®

Celem pracy zaprezentowanej w artykule było zbadanie wpływu zawartości wody na intensywność przebiegu reakcji nieenzymatycznego brązowienia. Reakcję przeprowadzano ogrzewając wodne roztwory lizyny z rybozą w 100°C, o pH początkowym 4 oraz 5,6. Stopień brązowienia badano po różnym czasie reakcji, mierząc absorbancję przy 320 i 420 nm. Przeprowadzone badania wykazały, że podczas ogrzewania roztworów wodnych lizyny z rybozą ubytek wody nie miał wpływu na intensywność przebiegu reakcji.

WSTĘP

Jednym z czynników warunkujących przebieg reakcji nieenzymatycznego brązowienia podczas obróbki termicznej żywności jest aktywność wody (a_w) [7, 8]. Wpływ a_w na intensywność brązowienia badało w ostatnich latach wielu autorów uzyskując różne wyniki doświadczeń. Manzocco i Maltini [8] prowadzili reakcję glicyny z glukozą w celu zbadania procesu wiotryfikacji (punktu zeszklenia) związków Maillarda. Reakcję przeprowadzali w ciągu 24 godzin w 90°C w zakapslowanych wialkach. W jej wyniku aktywność wody zwiększyła się podczas procesu z 0,92 do 0,95 po 24 godzinach ogrzewania, co było wynikiem wydzielania się cząsteczek wody na skutek kondensacji produktów reakcji. Badacze stwierdzili, że przy niskim udziale wody w środowisku, woda powstająca w wyniku reakcji może działać jak czynnik plastyfikujący powodując tzw. „zeszklenie” reagentów. Ma to istotny wpływ na dalsze przemiany chemiczne zachodzące w takich warunkach. W stanie zeszklenia przebieg reakcji chemicznych jest uzależniony od możliwości dyfuzji cząsteczek reagentów. Ich mobilność jest spowolniona i reakcje chemiczne mogą nie zachodzić [11]. Autorzy podali, że takie zjawisko może mieć miejsce właśnie w przypadku reakcji Maillarda, ponieważ są one ściśle uzależnione od dyfuzji reagentów. Schebor i in. [11] przeprowadzili doświadczenie, które udowodniło, że w warunkach temperatury zeszklenia reakcje chemiczne są znacznie spowolnione (materiał jest stabilny pod względem chemicznym). Natomiast w mieszaninie, która znajduje się w formie gumy (stan poniżej temperatury zeszklenia), następuje skurcz i reakcje Maillarda zachodzą gwałtownie. Bell, Burin i in. [2, 5] stwierdzili, że stan gumy istnieje poniżej i powyżej temperatury zeszklenia. Autorzy wyjaśnili to zjawisko tym, że powyżej temperatury zeszklenia, materiał szklisty staje się miękki, spada jego lepkość i wzrasta jego mobilność. Mobilność cząsteczek wzrasta wraz ze wzrostem temperatury aż do uzyskania temperatury zeszklenia (kiedy to maleje), a powyżej temperatury zeszklenia mobilność cząsteczek ponownie rośnie nawet 100 krotnie [2].

Bell [3] podał za innymi autorami, że brązowienie najszybciej zachodzi przy a_w od 0,5 do 0,8, w przypadku substancji w formie stałej. W takich warunkach zachodzi dodatkowo plastyfikacja, co ma znaczący wpływ na szybkość brązowienia (zmniejsza się). Rückold i in. [10] podali, że nieenzymatyczne brązowienie wykazuje maksimum przy a_w 0,7 i zmniejsza się podczas suszenia.

Z podanego powyżej krótkiego przeglądu piśmiennictwa wynika, że reakcje nieenzymatycznego brązowienia są nie tylko skomplikowane pod względem chemicznym, ale także należy badać zjawiska fizyczne, które zachodzą w tym samym czasie i mają wpływ na reaktywność składników środowiska [4]. Podczas studiowania zjawiska nieenzymatycznego brązowienia, nasuwa się pytanie, jaki wpływ ma ubytek wody na intensywność przebiegu reakcji Maillarda, wykorzystując nie „suche” reagenty (jak robi to większość badaczy), ale roztwory wodne. Aby uzyskać odpowiedź na nie, przygotowano roztwory lizyny z rybozą, a następnie poddano je reakcji w 100 °C, prowadząc proces w szczelnie zamkniętych i otwartych wialkach reakcyjnych.

CEL I ZAKRES PRACY

Celem przeprowadzonych badań była analiza wpływu ubytku wody na zawartość pośrednich i końcowych produktów reakcji nieenzymatycznego brązowienia. Zakres pracy polegał na sporządzeniu mieszanin roztworów lizyny i rybozy o pH 4 i 5,6, oraz na przeprowadzeniu reakcji nieenzymatycznego brązowienia.

MATERIAŁ I METODYKA

Odczynniki: L-lizyna (producent Sigma, czystość $\geq 98\%$, TLC), D-ryboza (producent SAFC Supply Solution, czystość $\geq 97\%$), bufor fosforanowy (pH 4, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Producent Chempur), kwas octowy (producent Fluka), woda dejonizowana.

Sporządzono wodne roztwory L-lizyny i D-rybozy o stężeniu 0,1M. Następnie przygotowano z nich mieszaniny reakcyjne w stosunkach objętościowych 1:1. W roztworach doprowadzano pH do wartości 4 kwasem octowym, natomiast do wartości 5,6 - buforem fosforanowym. Roztwory poddano reakcji w temperaturze 100°C w piecu (*Binder 115*). W mieszaninach poreakcyjnych badano objętość i absorbancję przy długości fali 320 i 420 nm (spektrofotometr - *Shimadzu 1800*). Odpowiadało to pośrednim i końcowym produktom reakcji nieenzymatycznego brązowienia powstającym na poszczególnych etapach reakcji.

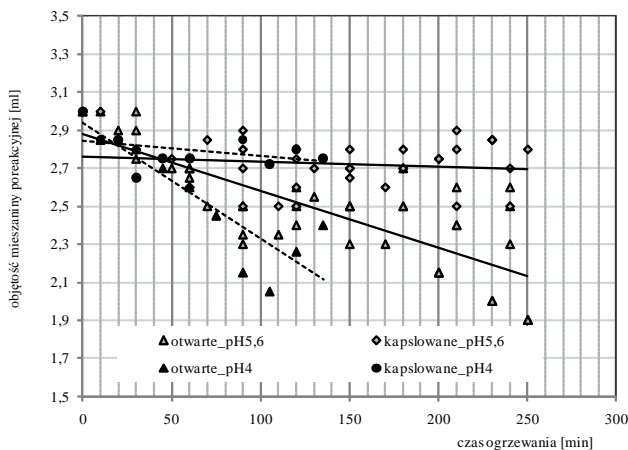
Z roztworów o pH 5,6 przygotowano dwie grupy próbek: jedną grupę próbek szczelnie zakapslowano (próbki były zamknięte uszczelką teflonową i aluminiowym kapslem), drugą grupę próbek ogrzewano bez zamknięcia (były zakryte

folią aluminiową). Próbki natychmiast po reakcji były schładzane w lodzie. Podczas ogrzewania próbek o pH 4 skrócono czas reakcji z 250 do 135 minut, ponieważ tendencja zmian ubytku wody i absorpcji były podobne jak przy pH 5,6. Jednocześnie był to moment, w którym w roztworach o pH 4 uzyskano maksymalną wartość absorpcji przy długości fali 320 nm.

Wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując program *Statistica 8,0*.

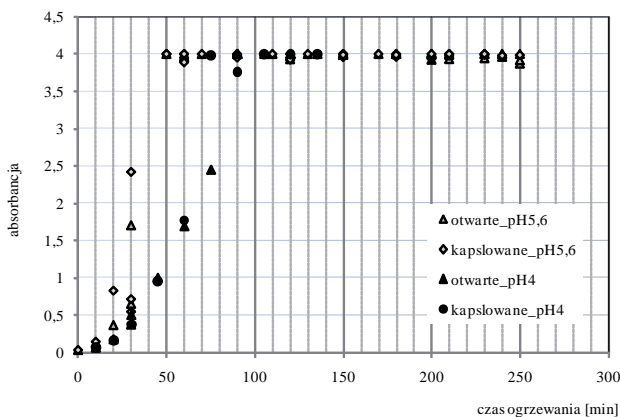
OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Wyniki doświadczenia zamieszczono na rys. 1, 2 i 3.

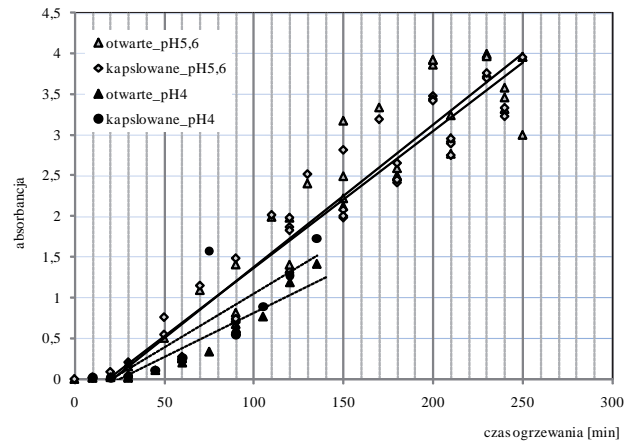


Rys. 1. Zmiany zawartości płynu podczas przebiegu reakcji lizyny z rybozą w 100°C i przy pH początkowym reagentów równym 4 oraz 5,6; rysunek obrazuje różnicę w objętości mieszanin poreakcyjnych ogrzewanych w wialkach szczelnie zamkniętych i otwartych.

Analiza wariancji ANOVA wykazała istotne różnice ($p < 0,05$) w objętości reagentów, gdy reakcję przeprowadzano w wialkach szczelnie zamkniętych, kapslowanych bezpośrednio po procesie i kapslowanych dopiero po schłodzeniu. Wynik eksperymentu był jednakowy dla obydwu wartości pH. Kolejne badania dotyczyły analizy różnic w wartościach absorpcji mierzonych przy długości fali 320 i 420 nm.



Rys. 2. Zmiany absorpcji zanotowane przy długości fali 320 nm w mieszaninach poreakcyjnych lizyny z rybozą w różnych warunkach przeprowadzania procesu: w szczelnie zamkniętych wialkach (kapslowane) oraz w wialkach niekapslowanych (zakrytych folią aluminiową) (otwarte).



Rys. 3. Zmiany absorpcji mierzone przy długości fali 420 nm w mieszaninach poreakcyjnych lizyny z rybozą w różnych warunkach przeprowadzania procesu: w szczelnie zamkniętych wialkach (kapslowane) oraz w wialkach niekapslowanych (zakrytych folią aluminiową) (otwarte).

Na podstawie analizy wariancji ANOVA stwierdzono, że pomimo istotnych zmian objętości reagentów (i ubytku wody) nie było istotnych statystycznie zmian ($p > 0,05$) w absorpcji mierzonej zarówno przy 320, jak i 420 nm. Dotyczyło to zarówno doświadczenia przeprowadzonego w pH 5,6, jak i w pH 4. Aktywność wody (a_w) wpływa na różne tempo brązowienia, ale w większości przeprowadzanych wcześniejszych eksperymentów stosowano różną startową zawartość wody Göğüş i in. [7] lub prowadzono reakcje stosując reagenty odwodnione. Wówczas a_w przy pozostałych parametrach reakcji stałych, była podstawowym czynnikiem wpływającym na jej przebieg. Różna początkowa zawartość wody powodowała, że reakcje zachodziły w różny sposób w poszczególnych warunkach i według różnej kinetyki. Jeżeli początkowa zawartość wody była podobna (bieżące doświadczenie), to w przebiegu reakcji nie zanotowano różnic, tym bardziej, że w wyniku reakcji Maillarda jednym z pośrednich produktów reakcji jest woda, która częściowo może równoważyć jej ubytki w środowisku. Manzocco i Maltini [8] podali, że z jednego mola glukozy mogą powstawać trzy mole wody gdy reakcja przebiega w środowisku kwaśnym. Podobnie Cämmerer i Kroh [6], którzy wcześniej badali elementarny skład melanoidyn stwierdzili, że podczas ich powstawania wydzielają się trzy mole wody na każdy mol wbudowywanych w melanoidyny związków karbonylowych.

Podsumowując powyższe informacje można podjąć próbę wyjaśnienia zjawisk chemicznych i fizycznych, mających miejsce podczas reakcji lizyny z rybozą prowadzonej w szczelnie zamkniętych i niezamkniętych naczyniach. Początkowa zawartość wody we wszystkich próbkach była podobna, a ich pH oraz temperatura reakcji były niezależne od tego, czy wialki były zamknięte, czy nie. Ponieważ stężenie reagentów było niewielkie, to aktywność wody mieszaniny była bliska 1. Podczas przebiegu reakcji część wody z wialek niezamkniętych odparowywała (rys. 1), ale nie wpływało to na kinetykę przebiegu reakcji ponieważ wartość a_w była wciąż wysoka, a jednocześnie tworzyły się nowe cząsteczki wody. Dlatego nie następowały istotne statystycznie zmiany w absorpcji charakteryzującej zarówno zawartość pośrednich, jak i końcowych związków reakcji. Taka sytuacja trwała przez cały

czas przebiegu reakcji w temperaturze 100°C, co potwierdziły wyniki doświadczenia. Uzyskane wyniki można przenieść na reakcje prowadzone w temperaturze wyższej, ale prawdopodobnie tylko do punktu bliskiego i równego temperaturze zeszklenia, ponieważ wówczas gwałtownie zmniejsza się a_w w środowisku. Przy niskiej zawartości wody i nieograniczonej mobilności cząsteczek (gdy nie nastąpi jeszcze punkt zeszklenia hamujący reakcje chemiczne), przemiany mogą zachodzić szybciej niż następowałyby w układzie, gdyby wody w środowisku było więcej. Z drugiej strony istnieje pogląd, że jeżeli w układzie znajdują się polimery i ich zawartość jest duża, ogranicza to mobilność reagentów i hamuje szybkość przebiegu reakcji (Mustapha i in., [9]. Dodatkowo Vaikousi i in. [12] podali, że brązowienie nie ma bezpośredniego związku z aktywnością wody, ale raczej z zawartością wody i jej formą – stopniem związania z reagentami. Badacze ci analizowali wpływ wysokości temperatury, wartość a_w i stężenie reagentów na stopień brązowienia soku jabłkowego. Wyniki ich badań wykazały, że bezpośredni wpływ na tempo brązowienia miała wysokość temperatury oraz początkowa zawartość reagentów – nie sama wartość a_w . Podobne wyjaśnienia podali Acevedo i in. [1]. Dlatego wpływu aktywności wody na zmiany intensywności reakcji nie można interpretować jednoznacznie.

WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że ubytek wody podczas reakcji wodnych roztworów lizyny z rybozą nie wpływał istotnie statystycznie na wartości absorbancji mierzonej przy długości fali 320 i 420 nm.
2. Zmiany zawartości wody można pominąć jako czynnik wpływający na reakcje nieenzymatycznego brązowienia jeżeli bada się to zjawisko w środowiskach o znacznej wilgotności.

LITERATURA

- [1] ACEVEDO N., SCHEBOR C., BUERA M.P. 2006. *Water-solids interactions, matrix structural properties and the rate of non-enzymatic browning*. Journal of Food Engineering 77, 1108-1115.
- [2] BELL L.N. 1996. *Kinetics of non-enzymatic browning in amorphous solid systems: distinguishing the effects of water activity and glass transition*. Food Research International Vol. 28, No 6, 591-597.
- [3] BELL L.N. 1997. *Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration*. Food Chemistry Vol 59, No 1, 143-147.
- [4] BILLER E. 2010. *Właściwości przeciwutleniające związków nieenzymatycznego brązowienia*. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, Tom 20/37, nr 2, 30-32.
- [5] BURIN L., JOUPILA K., ROOS Y.H., KANSIKAS J., BUERA M.P. 2004. *Retention of β -galactosidase activity as related to Maillard reaction, lactose crystallization, collapse and glass transition in low moisture whey systems*. International Dairy Journal 14, 517-525.
- [6] CÄMMERER B., KROH L. W. 1995. *Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins*. Food Chemistry 53, 55-59.

- [7] GÖĞÜŞ F., WEDZICHA B.L., LAMB J. 1998. *Modelling of Maillard reaction during the drying of a model matrix*. Journal of Food Engineering 35, 445-458.
- [8] MANZOCCO L., MALTINI E. 1999. *Physical changes induced by the Maillard reaction in a glucose-glycine solution*. Food Research International 32, 299-304.
- [9] MUSTAPHA W.A.W., HILL S.E., BLANSHARD J.M.V., DERBYSHIRE W. 1998. *Maillard reactions: do the properties of liquid matrices matter?* Food Chemistry, Vol. 62, No 4, 441-449.
- [10] RÜCKOLD S., GROBECKER K.H., ISENGARD. 2001. *The effects of drying on biological matrices and the consequences for reference materials*. Food Control 12, 401-407.
- [11] SCHEBOR C., DEL PILAR BUERA M., KAREL M., CHIRIFE J. 1999. *Color formation due to non-enzymatic browning in amorphous, glassy, anhydrous, model systems*. Food Chemistry 65, 427-432.
- [12] VAIKOUSI H., KOUTSOUMANIS K., BILIADERIS C.G. 2008. *Kinetic modeling of non-enzymatic browning of apple juice concentrates differing in water activity under isothermal and dynamic heating conditions*. Food Chemistry 107, 785-796.

WATER CONTENT INFLUENCE ON NONENZYMATIC BROWNING REACTION INTENSITY

SUMMARY

The purpose of the study was to analyse the effect of water content on intensity of non-enzymatic browning reaction. Reaction took place during heating at 100°C water solution of lysine and ribose, initial pH 4 and 5.6. Browning stage were measured after different reaction time in the wavelength 320 and 420 nm. Completed analyses demonstrated water decrease did not influence on intensity of browning.