

Dr inż. Elżbieta BILLER
Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji
Mgr Beata CIEŚLAK
Wydział Nauk o Żywności
SGGW w Warszawie

CHARAKTERYSTYKA ZWIĄZKÓW NIEENZYMATYCZNEGO BRĄZOWIENIA OTRZYMYWANYCH W REAKCJI LIZYNY Z RYBOZĄ, ZACHODZĄCYCH PODCZAS OBRÓBKII TERMICZNEJ ŻYWNOŚCI®

W artykule przedstawiono badania zawartości związków nieenzymatycznego brązowienia powstających podczas obróbki termicznej produktów spożywczych w reakcjach lizyny z rybozą oraz analizę ich rozpuszczalności w wodzie i w metanolu. Reakcje prowadzono w dwóch wartościach pH: 4 i 5,6 – charakterystycznych dla mięsa marynowanego oraz dla wartości standardowych. Przeprowadzone badania wykazały, że w środowisku o pH 4 związki rozpuszczalne w wodzie i w metanolu postawały w ilościach o podobnym rzędzie wartości. Gdy pH środowiska wynosiło 5,6 – związki rozpuszczalne w metanolu stanowiły jedynie niewielki udział w porównaniu z zawartością związków rozpuszczalnych w wodzie. Badania udowodniły ponadto, że przy pH 5,6 w obecności buforu fosforanowego w strukturę końcowych produktów reakcji wbudowywana była woda.

WSTĘP

Związki nieenzymatycznego brązowienia są grupą substancji powszechnie spożywanych przez konsumentów z codzienną dietą. Występują w żywności ekstrudowanej, pieczonej i opiekanej, prażonej oraz gotowanej [1, 2, 6, 7, 8, 10, 15, 18, 23]. Właściwości tych związków są uwarunkowane wieloma zmiennymi: temperaturą i czasem jej oddziaływania, pH, aktywnością wody, rodzajem substancji towarzyszących, składem środowiska i rodzajem prekursorów [3, 4, 14, 19, 21, 22]. Każdy z wymienionych powyżej czynników może powodować różnice w powstających produktach reakcji. Temat związków nieenzymatycznego brązowienia jest intensywnie badany na świecie, aby poznać ich właściwości, a pośrednio cechy teksturalne, sensoryczne, fizyczne, i biologicznie czynne związków dostarczanych do ustroju z różnymi grupami produktów spożywczych [5, 11, 12, 22]. W Polsce badania nad związkami nieenzymatycznego brązowienia prowadzono w Zakładzie Techniki w Żywieniu oraz w Zakładzie Oceny Jakości Żywności SGGW w Warszawie. Zakres pracy obejmował wiele kierunków badawczych. W bieżącym artykule przedstawiono charakterystykę związków powstających po reakcji lizyny z rybozą w różnym pH środowiska. Lizyna i ryboza są charakterystycznymi prekursorami reakcji zachodzących w mięsie [20, 22], stąd mogą wskazywać na kierunki przemian zachodzące w tym surowcu na skutek jego obróbki termicznej. Badanie cech związków nieenzymatycznego brązowienia polegało na poznaniu ich ilości powstających po reakcji prowadzonej w różnym czasie oraz na ocenie ich rozpuszczalności w wodzie i w metanolu. Taka wiedza jest niezbędna, aby ukierunkować dalsze prace badawcze nad identyfikacją poszczególnych grup związków tworzących się w mięsie poddanym oddziaływaniu wysokiej temperatury.

CEL I ZAKRES PRACY

Celem artykułu jest upowszechnienie wyników prezentowanych badań, dotyczących zawartości i rozpuszczalności

związków nieenzymatycznego brązowienia powstających w reakcji lizyny z rybozą, charakterystycznych dla obróbki termicznej żywności.

Zakres pracy polegał na przeprowadzeniu reakcji równomolowych i równoobjętościowych mieszanin obydwu reagentów w czasie 5, 10, 15, 30, 45 i 60 minut w temperaturze $185\pm 5^{\circ}\text{C}$. Doświadczenie przeprowadzono dla pH roztworów równych 4 i 5,6. Wartość pH 4 można uzyskać w mięsie na skutek jego marynowania, co zwiększa trwałość gotowego produktu, natomiast pH 5,6 jest wartością standardową mięsa.

MATERIAŁ I METODYKA

Odczynniki: L-lizyna (producent Sigma, czystość $\geq 98\%$, TLC, nr katalogowy L5501-25G), D-ryboza (producent SAFC Supply Solution, czystość $\geq 97\%$, nr katalogowy W37,930-1), 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, nr katalogowy 34254-II-R), metanol (HPLC, czystość 99,9%, producent POCH, nr katalogowy C17C11X), woda dejonizowana.

Do reakcji wykorzystano: wodne roztwory L-lizyny i D-rybozy o stężeniu 0,1M. Z roztworów przygotowano mieszaniny reakcyjne w stosunkach objętościowych 1:1. W roztworach doprowadzano pH do wartości 5,6 buforem fosforanowym, natomiast do wartości 4 – kwasem octowym. Reakcje prowadzono w opiekaczu gastronomicznym Philips typ HD4454/A, w temperaturze $185\pm 5^{\circ}\text{C}$ przez 5, 10, 15, 30, 45 i 60 minut odmierając czas od chwili rozpoczęcia wrzenia prób. Po reakcji próbki schładzano w lodzie. Szczegóły przebiegu reakcji zawarto w przygotowywanej rozprawie habilitacyjnej [9].

Z roztworów wodnych uzyskanych po reakcji pobrano pipetą 2 cm³ i przeniesiono do wytarowanych fiolek o pojemności 4 cm³. Fiolki wcześniej były wysuszone do stałej masy (rodzaj suszarki Binder 115, temperatura suszenia 105°C). Zmiany masy kontrolowano ważąc fiolki na mikrowadze (Sartorius MC 5, dokładność 0,001mg). Fiolki z próbka

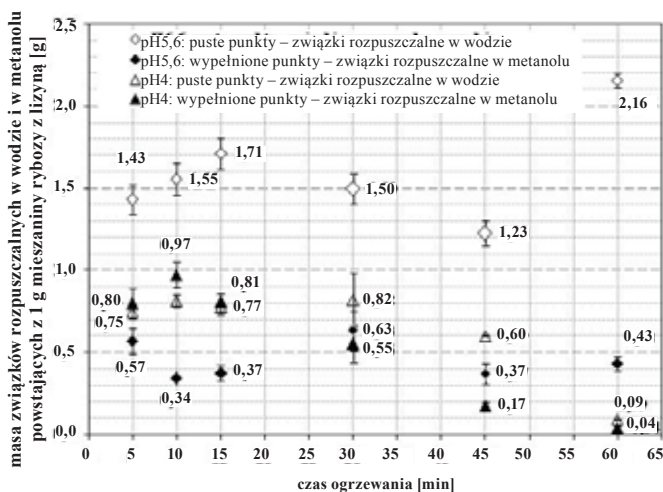
suszono w suszarce laboratoryjnej w 105°C [17] do uzyskania stałej masy. Po zakończonym suszeniu wynik przeliczono na sumaryczną masę związków rozpuszczalnych w wodzie uzyskanych z całej próbki, a następnie wyliczono masę związków powstających z 1g suchej masy lizyny z rybozą łącznie.

Związki rozpuszczalne w metanolu oznaczano podobnie, ale wcześniej ekstrahowano je metanolem z próbki, z której uprzednio odparowano wodę w temperaturze 30 °C. Po odparowaniu wody do fiolek dodano 4 cm³ metanolu. Próbki zamknięto teflonową uszczelką i nakrętką, a następnie wytrząsano przez 1 godzinę. Po ekstrakcji związków rozpuszczalnych w metanolu próbki przesączono (*bibula filtracyjna, producent Chempur*). Z przesączonych próbek pobrano pipetą 2 cm³ i przeniesiono do wytarowanych i wysuszonych fiolek o pojemności 4 cm³. Próbki suszono do uzyskania stałej masy (początkowa temperatura suszenia 30°C - do chwili odparowania metanolu, a następnie 105°C do uzyskania stałej masy). Fiolki z próbką ważono wykorzystując mikrowagę. Wynik podano jako masę związków nieenzymatycznego brązowienia rozpuszczalnych w metanolu powstających z 1g suchej masy lizyny z rybozą (łącznie).

Wyniki oznaczeń opracowano statystycznie (pakiet statystyczny *Statistica 8.0*) wykorzystując analizę wariancji ANOVA.

OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Na rys. 1. przedstawiono masę związków powstających na różnym etapie reakcji lizyny z rybozą.



Rys. 1. Masa [g] związków rozpuszczalnych w wodzie i w metanolu powstających na skutek reakcji równomolowych (0,1 M) wodnych roztworów lizyny i rybozy. Wyniki podano w przeliczeniu na masę związków powstających z 1g suchej masy lizyny i rybozy łącznie.

Zawartość produktów reakcji otrzymanych po ogrzewaniu lizyny z rybozą była zależna od czasu reakcji, pH oraz od rodzaju rozpuszczalnika użytego do ich ekstrakcji ($p=0$). Test post-hoc wykazał, że prawie wszystkie próby były od siebie istotnie różne. Najwięcej związków rozpuszczalnych w wodzie było w próbach o pH 5,6. Dotyczyło to każdego etapu ogrzewania. Związki rozpuszczalne w metanolu w tych próbach stanowiły niewielki procent zawartości wszystkich

produktów reakcji. Ogrzewanie lizyny z rybozą w pH 4 w obecności kwasu octowego powodowało, że charakterystyka mieszaniny poreakcyjnej była zupełnie inna niż w poprzednim przypadku. Po 5, 15 i 60 minutach reakcji zawartość związków rozpuszczalnych w wodzie i w metanolu była podobna. Po 10 minutach istotnie więcej było związków rozpuszczalnych w metanolu niż w wodzie, natomiast po 30 i 45 minutach ogrzewania istotnie więcej było związków rozpuszczalnych w wodzie niż w metanolu. Bardzo charakterystyczne dla mieszanin otrzymywanych w pH 5,6 w obecności buforu fosforowego było to, że w każdym przypadku zawartość produktów reakcji wyekstrahowanych wodą była większa niż łączna początkowa ilość lizyny i rybozy użyta do reakcji. Po 60 minutach reakcji uzyskano przeszło dwa razy większą ilość produktów reakcji niż wynosiła masa reagentów przed ogrzewaniem. Ponieważ uzyskano tak niespodziewany wynik, badania przeprowadzono wielokrotnie, jednak za każdym razem rezultat był podobny. Przy zakwaszeniu środowiska kwasem octowym do pH 4, nie zanotowano takiej tendencji. W pH 4 – z 1g suchej masy lizyny z rybozą (łącznie), po każdym etapie reakcji uzyskano mniej niż 1g produktów końcowych rozpuszczalnych w wodzie.

Zaobserwowano istotną różnicę w konsystencjach prób ogrzewanych w obydwu środowiskach. Próby ogrzewane w pH 5,6 były po każdym etapie badania płynne – wstępna ocena sensoryczna wykazała, że wszystkie końcowe związki reakcji były rozpuszczone w wodzie. W żadnej próbce nie było widocznego osadu. Z prób ogrzewanych w pH 4 od 30 minuty reakcji zaczęły wytrącać się substancje stałe, a po 45 i 60 minucie ogrzewania uzyskano wyłącznie stałą, włóknistą masę. Otrzymano wówczas mieszaninę związków w niewielkim stopniu rozpuszczalną i w wodzie, i w metanolu. Najprawdopodobniej nastąpiło zeszklenie próbek [3, 4].

Wynik doświadczenia oznaczał, że w pH 5,6 powstawała znaczna ilość związków nieenzymatycznego brązowienia, które w swojej strukturze zawierały wbudowaną wodę. Schemat reakcji Maillarda zaproponowany przez Hodge'a w 1953 r., stanowiący do dziś podstawowy wzorec kierunków przebiegu nieenzymatycznego brązowienia wskazuje, że woda jest jednym z ubocznych produktów reakcji Maillarda i wydziela się w początkowym etapie reakcji podczas tworzenia się N-podstawionej glikozyloaminy, po czym następuje przekształcenie Amadori. Następnym etapem, w którym wytwarza się woda to przekształcenie zasady Schiffa hydroksymetylofurfuralu (HMF) lub furfuralu, z których po odłączeniu związków aminowych powstaje HMF lub furfural. Reakcja zachodzi przy $pH \leq 7$. Furfural powstaje, gdy reagentem jest pentoza (co miało miejsce w przypadku omawianego doświadczenia), natomiast HMF tworzy się z heksozy [19]. W literaturze nie znaleziono odpowiedzi na pytanie, w którym momencie reakcji i w jakich warunkach środowiska woda wbudowywana jest w strukturę powstających związków. Można jedynie sformułować hipotezę, że brązowe barwniki powstające w czasie obróbki termicznej produktów spożywczych o podobnym składzie chemicznym i w podobnym pH do 5,6 – również gromadzą wodę w swojej strukturze. Gdy pH surowców jest kwaśne – powstające związki nieenzymatycznego brązowienia mają inne właściwości.

W literaturze brak jest informacji na temat tego ile związków nieenzymatycznego brązowienia może powstawać z określonej masy reagentów. Podaje się wyłącznie masy poszczególnych

grup związków w znaczeniu nie zawartości, ale wielkości cząsteczek (w Daltonach) [16].

Chobert i in. (2006) podali, że po ogrzewaniu arabinozy i rybozy z beta-laktoglobuliną uzyskano 35% związków rozpuszczalnych w wodzie w pH 4. Ilość ta była mniejsza niż w przypadku reakcji innych cukrów. Informacja powyższa potwierdziła wyniki otrzymane po ogrzewaniu lizyny z rybozą w pH 4, ponieważ udowodniono, że w mieszaninie poreakcyjnej były nie tylko substancje wodorozpuszczalne, ale istotny udział stanowiły również związki rozpuszczalne w metanolu.

Chobert i in. [13] ponadto zbadali, że reakcja beta-laktoglobulin z arabinozą i rybozą w pH 5 powodowała wzrost właściwości emulgujących mieszaniny w stosunku do samej beta-laktoglobuliny. Według autorów oznaczało to, że z tych reagentów otrzymuje się sieć trójwymiarową, czym należało tłumaczyć poprawę cech emulgujących produktów po reakcji. Takiego zjawiska nie zanotowano w przypadku galaktozy, glukozy, ani laktozy. Należałoby więc zbadać, czy wbudowywanie wody w cząsteczki ma związek z właściwościami fizycznymi związków nieenzymatycznego brązowienia, co przekłada się następnie na cechy powierzchni powszechnie spożywanych produktów żywnościowych poddanych obróbce termicznej, takich jak produkty piekarskie oraz inne produkty poddane pieczeniu, smażeniu oraz opiekaniu.

WNIOSKI

1. Charakterystyka związków nieenzymatycznego brązowienia powstających w wyniku reakcji lizyny z rybozą jest uwarunkowana różnym czasem reakcji, pH oraz rodzajem rozpuszczalnika użytego do ich ekstrakcji.

2. W pH 4 zawartość związków nieenzymatycznego brązowienia rozpuszczalnych w wodzie jest na podobnym poziomie jak rozpuszczalnych w metanolu, natomiast w pH 5,6 związki rozpuszczalne w metanolu stanowią wyłącznie niewielki procent zawartości w stosunku do związków rozpuszczalnych w wodzie.

3. W wyniku reakcji lizyny z rybozą prowadzonej w pH 5,6 w obecności buforu fosforanowego powstają związki, które w swojej strukturze mają wbudowaną wodę, co zwiększa ich masę w stosunku do użytych reagentów.

4. Celowe jest przeprowadzenie dalszych badań, które by wyjaśniły relacje związków nieenzymatycznego brązowienia powstających w różnych pH środowiska z ich właściwościami fizycznymi i składem chemicznym. Pozwoliłoby to na lepsze poznanie substancji powstających podczas obróbki termicznej wielu grup żywności.

LITERATURA

- [1] AMES J. M. 1998. *Applications of the Maillard reaction in the food industry*. Food Chemistry Vol. 62, No 4, 731-439.
- [2] AMES J.M., DEFAYE A.B., BAILEY R.G., BATES L. 1998. *Analysis of the non-volatile Maillard reaction products formed in an extrusion-cooked model food system*. Food Chemistry Vol 61, No 4, 521-524.
- [3] 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.
- [4] BELL L.N. 1997. *Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration*. Food Chemistry Vol 59, No 1, 143-147.
- [5] BENJAKUL S., LERTITIKUL W., BAUER F. 2005. *Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system*. Food Chemistry 93, 189-196.
- [6] BILLER E. 2010A. *Nieenzymatyczne brązowienie mięsa opiekanego w zależności od rodzaju obróbki wstępnej*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 546, 23-28.
- [7] BILLER E. 2010B. *Wpływ obróbki wstępnej karkówki wieprzowej na tworzenie się związków nieenzymatycznego brązowienia rozpuszczalnych w metanolu*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 546, 29-34.
- [8] BILLER E. 2010. *Właściwości przeciwutleniające związków nieenzymatycznego brązowienia*. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, Tom 20/37, nr 2, 30-32.
- [9] BILLER E. 2011. *Nieenzymatyczne brązowienie mięsa opiekanego w kontrolowanych i niekontrolowanych warunkach pH. Możliwości kształtowania cech smakowo-zapachowych mięsa na podstawie modelu ogrzewania lizyny z rybozą* (rozprawa habilitacyjna przygotowana do publikacji). SGGW, Warszawa.
- [10] BILLER E., EKIELSKI A. 2010. *Wpływ gryki i płatków owsianych na stopień brązowienia ekstrudatów kukurydzianych. Badanie roztworów metanolowych*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 546, 35-40.
- [11] CAPUANO E., FERRIGNO A., ACAMPA I., AIT-AMEUR L., FOGLIANO V. 2008. *Characterization of the Maillard reaction in bread crisps*. Eur. Food Res. Technol. 228, 311-319.
- [12] CHERIOT S., BILLAUD C., PÖCHTRAGER S., WAGNER K-H., NICOLAS J. 2009. *A comparison study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine glucose-derived Maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural*. Food Chemistry 114, 132-138.
- [13] CHOBERT J-M., GAUDIN J-CH., DALGALARRODO M., HAERTLÉ TH. 2006. *Impact of Maillard type glycation on properties of beta-lactoglobulin*. Biotechnology Advances 24, 629-632.
- [14] HODGE J. E. 1953. *Chemistry of browning reactions In model system*. J. Agric. Food Chem. 1, 928-943.
- [15] HWANG J-Y., SHUE Y-SH., CHANG H-M. 2001. *Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels*. Food Research International 34, 639-647.
- [16] KISLINGER TH. HUMENY A., SEEBER S., BECKER C-M., PISCHETSRIEDER M. 2002. *Qualitative determination of early Maillard-products by MALDI-TOF mass spectrometry peptide mapping*. Eur. Food Res. Technol. 215, 65-71.
- [17] KRELOWSKA-KULAS M. 1993. *Badanie jakości produktów spożywczych*. Państwowe Wydawnictwo Ekonomiczne, Warszawa.

- [18] LI Y., LU F., LUO CH., CHEN ZH., MAO J., SHOEMAKER CH., ZHONG F. 2009. *Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar*. Food Chemistry 117, 69-74.
- [19] MARTINS S. 2003. *Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modeling*. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- [20] MEYNIER A., MOTTRAM D.S. 1995. *The effect of pH on the formation of volatile compounds in meat-related model system*. Food Chemistry 52, 361-366.
- [21] MONTI S.M., BAILEY R.G., AMES J.M. 1998. *The influence of pH on the non-volatile reaction products of aqueous Maillard model systems by HPLC with diode array detection*. Food Chemistry Vol. 62, No 63, 369-375.
- [22] MOTTRAM D.S. 1998. *Flavour formation in meat and meat products: a review*. Food Chemistry Vol. 62, No 4, 415-424.
- [23] RAMIREZ M. R., MORCUENDE D., ESTEVEZ M., CAVA R., 2004. *Effect of the type of frying with culinary fat and refrigerated storage on lipid oxidation and colour of fried pork loin chops*. Food Chemistry 88, 85-94.

CHARACTERISTIC OF LYSINE-RIBOSE NON-ENZYMATIC BROWNING REACTION PRODUCTS, DURING THERMAL FOOD TREATMENT

SUMMARY

The aim of this study was to analyze products of food thermal treatment as typical for meat: lysine-ribose reaction and its products water or methanol solubility. Ribose-lysine reaction was performed in pH 4 for pretreated meat and 5.6 as standard meat's value. For pH 4 reaction products amounts were comparable and its water or methanol solubility was comparable too. Different situation took place for pH 5.6 thermal reaction products. Water soluble compounds were dominated group in comparison to methanol soluble. In presence of phosphatic buffer (pH 5.6) water was indicated as substance incorporated in structure of finish compounds.