

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

Rozprawa doktorska

***OPRACOWANIE SPOSOBU I OKREŚLENIE OPTYMALNYCH
WARUNKÓW PRZETWARZANIA MĄCZKI POEKSTRAKCYJNEJ
SZARŁATU***

Mgr inż. Katarzyna Januszewska-Józwiak

Promotor: prof. dr hab. Józef Synowiecki

Gdańsk 2009

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania

Promotorowi prof. dr hab. Józefowi Synowieckiemu
za opiekę, pomoc i cenne wskazówki podczas wykonywania
i redagowania tej pracy

Koleżankom i Kolegom oraz **Wszystkim Pracownikom**
Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
za życzliwość i miłą atmosferę pracy

Rodzinie i Przyjaciołom za wyjątkową cierpliwość i wsparcie

STRESZCZENIE	5
WPROWADZENIE	6
1. Historia szarłat	7
2. Charakterystyka botaniczna i wymagania uprawowe	10
3. Skład chemiczny wartość żywieniowa ziaren szarłat	14
3.1. Białka	15
3.2. Skład i wartość żywieniowa lipidów	17
3.3. Węglowodany szarłat	19
3.4. Składniki mineralne i witaminy	21
4. Walory żywieniowe liści szarłat	22
5. Substancje antyodżywcze nasion i liści	23
6. Wpływ procesów technologicznych na składniki nasion i liści szarłat	24
7. Perspektywy wykorzystania szarłat	26
8. Otrzymywanie i przydatność preparatów białek roślinnych	29
9. Izolaty białkowe	30
10. Hydrolizaty białkowe	36
11. Syropy skrobiowe	49
CEL BADAŃ I ICH UZASADNIENIE	56
12. Postępowanie doświadczalne i metodyka badań	57
12.1. Rodzaje próbek	57
12.2. Izolacja białek z mączki szarłat	57
12.2.1. Ekstrakcja w środowisku alkalicznym	57
12.2.2. Ekstrakcja roztworami soli	57
12.2.3. Izolowanie produktów enzymatycznej hydrolizy białek	60
12.2.4. Oznaczanie stopnia hydrolizy białek	62
12.3. Określenie optymalnych warunków precypitacji białek w punkcie izoelektrycznym	64
12.4. Określenie wydajności termicznego strącania białek z ekstraktów	64
12.5. Oznaczenie właściwości funkcjonalnych preparatów i hydrolizatów białkowych	65
12.5.1. Rozpuszczalność przy różnym pH	65
12.5.2. Zdolność emulgowania (EA) i stabilność emulsji (ES)	65
12.5.3. Zdolność pienienia (FC) i stabilność piany (FS)	66
12.5.4. Oznaczanie gorzkości hydrolizatów	67
12.6. Wyznaczenie optymalnego czasu i temperatury upłynniania skrobi	67
12.7. Metody analityczne	68
12.8. Analiza statystyczna	70

13. Omówienie i dyskusja wyników	71
13.1. Wpływ sposobu odtłuszczenia na skład podstawowy mączki szarłatu	71
13.2. Uzasadnienie wyboru sposobów izolowania białek z odtłuszczonej mączki szarłatu	72
13.2.1. Dobór warunków enzymatycznej hydrolizy białek	73
13.2.2. Wpływ rodzaju enzymu na skuteczność odbiałczania mączki szarłatu w zależności od temperatury i czasu procesu	76
13.2.3. Określenie stopnia hydrolizy (DH) hydrolizatów białkowych	86
13.2.4. Wpływ rodzaju enzymu na niektóre właściwości funkcjonalne otrzymanych preparatów	88
13.2.5. Gorzkość hydrolizatów w zależności od rodzaju stosowanego enzymu	92
13.3. Otrzymywanie izolatów białkowych	94
13.3.1. Skuteczność ekstrakcji białek z mączki szarłatu	94
13.3.2. Wydajność odzyskiwania białek z ekstraktów przez strącenie w punkcie izoelektrycznym lub przez ich cieplną denaturację	96
13.3.3. Właściwości funkcjonalne preparatów białkowych	97
13.4. Otrzymywanie hydrolizatów białkowych po usunięciu skrobi z mączki szarłatu	103
13.4.1. Wybór enzymu i określenie optymalnych warunków upłynniania skrobi szarłatu	105
13.4.2. Hydroliza białek w pozbawionej skrobi pozostałości mączki szarłatu	108
13.4.3. Właściwości funkcjonalne hydrolizatów białkowych	109
WNIOSKI	112
DOROBEK NAUKOWY	114
PIŚMIENNICTWO	115

STRESZCZENIE

Warunkiem izolowania cennych żywniowo lipidów znajdujących się w nasionach szarlatu jest racjonalne wykorzystanie wszystkich ich składników, co znacznie obniży koszt i zwiększy opłacalność otrzymywania oleju charakteryzującego się korzystnym profilem nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz zawartością skwalenu, większą niż w innych źródłach roślinnego pochodzenia. Mączka poekstrakcyjna szarlatu zawiera w suchej masie około 70% skrobi, 15% białek o dobrej wartości biologicznej oraz 12,9% błonnika. Celem badań było opracowanie kompleksowego sposobu odzyskiwania i zagospodarowania wszystkich składników z uwzględnieniem możliwości uruchomienia produkcji w niewielkich zakładach przetwórczych dysponujących ograniczonymi środkami finansowymi. Technologia ta posłuży do wytwarzania produktów takich jak: izolaty lub hydrolizaty białkowe, syropy maltodekstrynowe oraz preparaty nierozpuszczalnego błonnika. Określono warunki enzymatycznego i ekstrakcyjnego pozyskiwania białek z mączki szarlatu. Zbadano wpływ zastosowanych metod na stopień ekstrakcji białek oraz na smak i niektóre właściwości funkcjonalne uzyskanych preparatów. Hydrolizę enzymatyczną białek prowadzono przy użyciu alkalazy, bromelainy, neutrazy, protamexu i trypsiny. Najskuteczniejszymi enzymami do odbiałczania mączki szarlatu okazały się alkalaza i protamex, które po 2 godz. hydrolizy w temperaturze 60°C lub 55°C usuwały odpowiednio 66% i 68% znajdujących się w mące związków azotowych. Stosowanie alkalazy lub protamexu powodowało jednak najwyższe zanieczyszczenie hydrolizatu sacharydami uwolnionymi z ziaren skrobi wskutek zbyt wysokiej optymalnej temperatury reakcji. Również wydłużenie czasu hydrolizy enzymatycznej mączki szarlatu przyczyniało się do zwiększenia zanieczyszczenia preparatu białkowego sacharydami. Jeśli czas trwania hydrolizy w temperaturze 45°C przy użyciu neutrazy wydłużono do 2 godz., wówczas ilość cukrów redukujących w hydrolizacie wzrosła z 11,8% do 15,3%. Hydrolizaty wytworzone z mączki szarlatu z udziałem alkalazy, bromelainy i neutrazy wykazywały dobrą rozpuszczalność wynoszącą 80-88% w całym badanym zakresie pH. Zdolność emulgowania przejawiana przez wszystkie hydrolizaty białkowe, mimo różnej specyficzności enzymów wykorzystanych do odbiałczania mączki szarlatu oraz różnych stopni hydrolizy była porównywalna i wynosiła około 50%. Wszystkie uzyskane preparaty białkowe posiadały zdolność do stabilizowania emulsji porównywalną z lecytyną. Badane hydrolizaty wykazywały jednak niewielkie właściwości pianotwórcze. Przeprowadzone oznaczenia nie wykazały żadnej korelacji między właściwościami pianotwórczymi a zdolnością emulgowania czy stopniem hydrolizy otrzymanych preparatów białkowych. Istotnym parametrem ograniczającym przydatność hydrolizatów w przemyśle spożywczym jest ich gorzkość. Najmniej gorzkie preparaty białkowe otrzymano przy użyciu protamexu, a przeprowadzone badania wskazują, iż w przypadku odbiałczania mączki szarlatu na kształtowanie gorzkości duży wpływ ma specyficzność działania enzymu. Aby uzyskać izolaty białkowe poekstrakcyjną mączkę szarlatu poddano ekstrakcji roztworami soli mineralnych lub zasad w temperaturze obniżonej do 4°C. Do badań skuteczności jedno- lub wieloetapowej ekstrakcji związków azotowych wykorzystano wodę, 1% i 3% roztwory NaCl oraz 0,25% roztwór NaOH. Największy stopień ekstrakcji związków azotowych uzyskano w przypadku stosowania 0,25% roztworu NaOH (83,6%). Znacznie mniejszą skuteczność odbiałczania zaobserwowano podczas ekstrakcji 1% lub 3% roztworem NaCl (41,6 i 38,3%), co eliminuje w praktyce możliwość ich stosowania. Prowadzenie ekstrakcji w temperaturze 4°C nie ograniczało przechodzenia do białkowego roztworu pewnej ilości związków bezazotowych pochodzących głównie z frakcji sacharydowej ziaren szarlatu. Ich zawartość była najmniejsza w przypadku jednoetapowej ekstrakcji 3% NaCl lub 0,25% NaOH w 3% NaCl oraz dwuetapowej ekstrakcji wodą, a następnie 3% NaCl i zmieniała się w granicach 6,4-8,0% suchej masy mączki. Niezależnie od rodzaju roztworu użytego do ekstrakcji maksymalny stopień precypitacji białek w pl uzyskano przy wartości pH wynoszącej 4,0. Tylko w przypadku strącania białek z ekstraktu mączki szarlatu 1% NaCl konieczne było obniżenie pH do 3,5. Odzyskiwanie białek z ekstraktów przez ich strącanie termiczne (85°C, 30 min) przebiegało z mniejszą wydajnością w porównaniu do ich odzyskiwania w wyniku precypitacji w pl. Wszystkie badane preparaty wykazywały niewielką rozpuszczalność w zakresie pH 4-5, która zwiększała się przy wyższych wartościach pH. Najgorzej rozpuszczalne okazały się globuliny szarlatu wyizolowane 3% roztworem NaCl. Preparaty białek szarlatu pozyskane w wyniku precypitacji termicznej rozpuszczały się bardzo słabo, w granicach 0,5-1,5%, w całym badanym zakresie pH. Wszystkie preparaty białkowe z mączki szarlatu uzyskane w wyniku strącania w punkcie izoelektrycznym przejawiały zdolność emulgowania i stabilizacji emulsji (52,6-57,4%) wyższą w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla lecytyny (48,8%). Wśród preparatów otrzymanych w wyniku koagulacji w podwyższonej temperaturze najlepszą zdolnością emulgowania na poziomie równym preparatom otrzymanym w wyniku precypitacji charakteryzowały się globuliny, natomiast preparat strącony termicznie albumin nie wykazywał właściwości emulgujących i stabilizujących emulsje. Zastosowanie różnych rozpuszczalników do ekstrakcji białek, a także sposobów ich wydzielania z ekstraktów, nie wpływało znacząco na właściwości pianotwórcze otrzymanych preparatów. Największą zdolność tworzenia piany wynoszącą około 71,3% miały albuminy szarlatu strącone w punkcie izoelektrycznym oraz mieszanina albumin i globulin uzyskana przez strącenie termiczne (77,1%). Wartości te są jednak mniejsze od zdolności tworzenia piany wykazywanych przez handlowe preparaty kazeiny (153,5%) i albuminy jaja kurzego (106,8%). Niedogodnością otrzymywania hydrolizatów białkowych z szarlatu w temperaturze bliskiej kleikowaniu skrobi jest zanieczyszczenie produktu sacharydami. Ograniczenie tych niekorzystnych zjawisk można osiągnąć zmieniając kolejność etapów stosowanych podczas przerobu mączki szarlatu. Przeprowadzono więc najpierw całkowite odtłuszczenie materiału, następnie hydrolizę skrobi, a dopiero w dalszej kolejności hydrolizę białek. Zmiana ta umożliwiła prowadzenie reakcji w temperaturze optymalnej dla działania stosowanych enzymów proteolitycznych, co zwiększyło wydajność oddzielania związków azotowych. Prowadząc hydrolizę białek z odtłuszczonej oraz pozbawionej skrobi mączki szarlatu można odzyskać od 85 do 91,3% związków azotowych, a otrzymane hydrolizaty charakteryzowały się większą rozpuszczalnością w badanym zakresie pH w granicach 78,4-87,2% w przypadku stosowania alkalazy oraz 81,7-96,7% gdy używano protamexu. Zdolność do emulgowania hydrolizatu otrzymanego przy udziale alkalazy była o 10,2% niższa w porównaniu do hydrolizatu uzyskanego z mąki zawierającej skrobię, zaś w przypadku stosowania protamexu właściwości emulgujące i stabilizujące emulsje nie uległy istotnym zmianom mimo, że stopień hydrolizy preparatu był ok. 10% niższy w porównaniu do hydrolizatu otrzymanego z tylko odtłuszczonej mąki. Zdolność do tworzenia piany przez hydrolizaty białkowe wynosiła około 32% i była znacznie niższa od handlowych preparatów kazeiny i albuminy jaja kurzego. Najlepszą wydajność usuwania skrobi uzyskano w temperaturze 90°C, zalecanej przez producenta preparatu Termamyl SC podczas pierwszych 2 godz. hydrolizy. Pozostałość po enzymatycznym usunięciu skrobi i białek zawierająca nierozpuszczalną frakcję składników błonnika stanowiła 12,5-13,6% masy wyjściowej próbki.

WPROWADZENIE

Poszukiwanie nowych źródeł białek roślinnych wzbogacających dietę jest szczególnie ważne ze względu na pogłębiający się deficyt białka zwierzęcego oraz wzrastającą liczbę konsumentów preferujących żywność wegetariańską (Gołąbczak, 2005). Do zmiany upodobań konsumenckich w znacznym stopniu przyczyniło się ryzyko zachorowań na chorobę Creutzfelda-Jacoba, spowodowane spożywaniem produktów żywnościowych pochodzących od bydła zarażonego BSE (Słota i in., 2002). Białka pochodzenia roślinnego są przydatne ze względu na różnorodność oraz dostępność surowców do ich otrzymania (Moure i in., 2006). Ponadto izolaty białek roślinnych stanowią doskonały dodatek do produktów żywnościowych stosowany w celu poprawy ich właściwości funkcjonalnych (Yoshie-Stark i Wäsche, 2004). Zainteresowanie szarłatem jako surowcem żywnościowym było skutkiem poszukiwania roślin alternatywnych charakteryzujących się między innymi lepszym składem aminokwasowym, zawartością korzystnie działających składników odżywczych oraz większą wydajnością plonów w porównaniu z tradycyjnie uprawianymi zbożami. Przykładem innych roślin dotychczas mało docenianych lub zapomnianych jest np. gryka, komosa ryżowa, łubin słodki, topinambur i kamelia olejodajna (Aletor i in., 2002; Bejosano i Corke, 1998; Fasuyi, 2007; Liu i Stützel, 2002; Mundigler, 1998). Szarłat jest rośliną o dużej wartości użytkowej wynikającej z korzystnego składu aminokwasowego nasion i liści. Istotną zaletą nasion szarłatu jest dość duża zawartość białek bogatych w aminokwasy egzogenne oraz oleju o dużym udziale nienasyconych kwasów tłuszczowych i zawartości skwalenu większej niż w innych źródłach roślinnych. Za rozpowszechnieniem upraw szarłatu przemawia również satysfakcjonująca wydajność plonów przy mniejszym, w porównaniu z innymi roślinami uprawnymi, zapotrzebowaniu na wodę, odporność na suszę oraz lepsze od innych roślin łagodzenie skutków efektu cieplarnianego wynikające z intensywnego wiązania atmosferycznego CO₂ (Nalborczyk, 1995; Piesiewicz i Ambroziak, 1995; Prokopowicz i in., 2000; Zheleznov i in., 1997).

W Polsce nasiona szarłatu są między innymi wykorzystywane do pozyskiwania oleju zawierającego nienasycone kwasy tłuszczowe, tokoferole, tokotrienole oraz skwalen. Produkt ten jest użyteczny w przemyśle spożywczym do wzbogacania żywności przeznaczonej dla osób starszych oraz w przemyśle kosmetycznym. Warunkiem opłacalnego otrzymania cennych żywnościowo lipidów z nasion szarłatu jest racjonalne zagospodarowanie mączki poekstrakcyjnej. Jednym z możliwych sposobów wykorzystania tego produktu ubocznego jest otrzywanie izolatów lub hydrolizatów białkowych, syropów skrobiowych oraz preparatów błonnika. Wymienione produkty są przydatne jako składnik żywności oraz stosuje się je w wielu gałęziach przemysłu. Dość istotne znaczenie ma możliwość wykorzystania mączki poekstrakcyjnej szarłatu do produkcji etanolu

stosowanego do wytwarzania jednego z rodzajów biopaliw. Stany Zjednoczone, Chiny i Brazylia, światowi liderzy w produkcji bioetanolu, pozyskują go obecnie z roślin wykorzystywanych w przemyśle żywnościowym, takich jak; trzcina cukrowa oraz ziarna kukurydzy, rzepaku i soi. Zwiększenie w tych krajach upraw roślin przeznaczonych na biopaliwa było przyczyną niedoboru i wzrostu cen niektórych surowców żywnościowych. Przewiduje się, że w następnych latach będą utrzymane dotychczasowe spadkowe tendencje spożycia wyrobów zbożowych, zwłaszcza ze względu na wysokie ceny zbóż spowodowane ograniczeniem powierzchni zasiewów przeznaczonych dla potrzeb przemysłu spożywczego. Wzrośnie natomiast areał upraw zbóż przeznaczonych na produkcję bioetanolu, który stanowi alternatywę dla coraz droższej importowanej ropy naftowej. Wykorzystanie zbóż do pozyskiwania skrobi wzrosło z 64,9 mln ton w sezonie 2003/2004 do 79,0 mln ton w latach 2006/2007, podczas gdy na produkcję bioetanolu w sezonie 2003/2004 przeznaczono 34,9 mln ton zbóż, a w latach 2006/2007 już 65,3 mln ton (Zawadzki, 2007). W perspektywie do 2010 roku areał upraw zbóż przeznaczonych na cele spożywcze zmniejszy się o 300-350 tys. ha gruntów uprawnych (Rosiak, 2006). Do 2010 roku udział etanolu w paliwach zużywanych w Unii Europejskiej powinien osiągnąć poziom 5,75%, co wg prognoz grozi wzrostem cen kukurydzy o 20%, roślin oleistych o 26% i zbóż o 11%. Aktualnie przeprowadzone badania wykazały natomiast, że 1% wzrost cen podstawowych surowców spożywczych zwiększa liczbę osób niedożywionych na świecie aż o 16 mln (Wald, 2007). Rozwiązaniem problemu ograniczania zasobów żywnościowych jest opracowanie technologii otrzymywania biopaliw z surowców niespożywczych, roślin niejadalnych lub ich części, odpadów gospodarczych lub rolniczych oraz produktów ubocznych, takich jak np. mączka poekstrakcyjna z nasion szarłat, która zawiera około 65% skrobi. Uprawa szarłat w USA jest na razie mało rozwojowa, podczas gdy w Chinach szybko wzrasta i obszary przeznaczone na uprawę tej rośliny wzrastają rocznie o 100 000 ha (Bejosano i Corke, 1999).

1. Historia szarłat

Amarantus, nazywany w Polsce szarłatem, należy do najstarszych roślin wykorzystywanych przez ludzi. Odkrycia archeologiczne wykazały, że szarłat uprawiano już 4000 lat p.n.e. w różnych częściach świata, między innymi nad jeziorem Atacama w Południowej Ameryce, w pobliżu miejscowości Basketmaker w Colorado, okolicach nowego Meksyku oraz w rolniczych regionach Tamaulipas. Przed najazdem hiszpańskich konkwistadorów Aztekowie produkowali rocznie

od 15 do 20 tys. ton nasion szarłat, które były trzecim po kukurydzy i fasoli głównym składnikiem ich diety (Abalone i in., 2006). Wykorzystywane były wówczas nie tylko nasiona, ale również części zielone tej rośliny, które wchodziły w skład wielu potraw (Grajeta, 1997a; Nalborczyk, 1995). Z Kodeksu Mendoza, malowanego manuskryptu objaśniającego zwyczaje i życie Azteków wiadomo, iż gromadzili oni ziarna kukurydzy i szarłat w szerokich szufladkowych skrzyniach i składali je jako daniny ostatniemu królowi Azteków Montezumie (Rys. 1). Nasiona szarłat wykorzystywano też powszechnie w rozmaitych obrzędach religijnych, których celem było np. dodawanie siły i męstwa wojownikom. Z tego powodu konkwistadorzy zabronili w 1519 roku upraw i spożywania szarłat, a ludzi nieprzestrzegających zakazu surowo karano (Schnetzler i Breene, 1994).



Rys. 1. Ilustracja pochodząca z Kodeksu Mendoza przedstawiająca składanie danin, m.in. z nasion kukurydzy i szarłat

W traktacie o przesądach indiańskich (*Tratado de las supersticiones y costumbres gentílicas que hoy vive entre los indios naturales desta Nueva España*) misjonarz Hernando Ruiz de Alarcón opisuje jak Indianie biorą ziarna szarłat z pierwszego plonu, mielą je i z ciasta robią małe, ćwierćmetrowe figurki ludzkie, szykują wiele wina, umieszczają to w miejscu obrzędowym, często zapalają świece i palą kadzidło. Wino składają jako dar bożkowi, wygłaszają mowy dziękczynne, ale same figurki zachowują starannie do następnego dnia, kiedy to dzielą je między wszystkich uczestników uroczystości jako ofiarę wotywną, znów wygłaszają mowy i uroczystości zjadają. „Ten fakt jest najlepszym dowodem, jak bardzo stara się szatan, i ile czyni wysiłków by kontynuować swój pierwotny grzech, to znaczy arogancję i chęć upodobnienia się do Boga ... jako że w tym co akurat opisałem widać najwyraźniej dokładne naśladownictwo tajemnicy Najświętszego Sakramentu Ołtarza, w której Nasz Pan, biorąc pod uwagę korzyści naszego odkupienia nakazał, byśmy go prawdziwie spożywali, podczas gdy szatan, który jest wrogiem wszystkiego co dobre,

raduje się, gdy ci nieszczęśnicy spożywają go lub pozwalają się wziąć w jego władanie przez jedzenie tych małych idoli” (www.antoranz.net/CURIOSA/ZBIOR4).

Skutkiem zakazu było trwające przez setki lat zupełne zaprzestanie upraw i wykorzystywania szarłat, który rozprzestrzenił się jednak w krajach Europy, Azji i Afryki jako roślina ozdobna i chwast. Dopiero w 1972 roku australijski fizjolog roślin John Downton zwrócił uwagę na walory żywieniowe białek z nasion szarłat, a w kolejnych latach naukowcy hinduscy wprowadzili w ramach programu dożywiania w szkołach jadalne części tej rośliny do posiłków podawanych dzieciom (Nalborczyk, 1995). Obecnie uprawy szarłat rozpowszechniły się w Meksyku, Gwatemali, Peru, Boliwii oraz w południowo-wschodniej Azji (Indie, Nepal, Chiny, Cejlon, Malesja) i Afryce (Uganda, Mozambik, Nigeria) (Abalone i in., 2006; Amin i in., 2006; Fasuyi, 2007; Liu i Stützel, 2002; Schnetzler i Breene, 1994). W przyszłości należy spodziewać się dalszego wzrostu znaczenia gospodarczego tej rośliny z uwagi na możliwość jej uprawy na nieużytkach i obszarach stepowych, które powiększają się w wielu rejonach świata na skutek postępującego efektu cieplarnianego (Gimplinger i in., 2007; Laisk i Edwards, 1998; Piesiewicz i Ambroziak, 1995).

Polskie uprawy szarłat pojawiły się najwcześniej na Lubelszczyźnie, ale stopniowo rozpowszechniają się także w innych rejonach kraju, a osiągnięta wydajność plonów sięga 30-35 q/ha. Rośnie też wykorzystanie nasion szarłat służących obecnie np. jako źródło oleju oraz do wytwarzania mąki, płatków, ekspandowanych ziaren, oraz niektórych rodzajów pieczywa. Z informacji firmy „Szarłat”, która jest dystrybutorem nasion szarłat w Polsce wynika, że szczególne zainteresowanie wykazały przemysł piekarniczy i cukierniczy. Z dodatkiem nasion tej rośliny wypieka się chleb pod nazwą „Junak” oraz „Chleb dla serca” (Piesiewicz, 2007). W sprzedaży dostępne są także paczkowane surowe nasiona, nasiona ekspandowane – popping, mussli oraz mąka, które mogą być wykorzystane do przyrządzania różnych potraw oraz jako dodatek do mleka, jogurtów, kefirów, lodów lub rosółów. Uprawy zbóż w Polsce (głównie pszenicy, żyta, pszenżyta, jęczmienia i owsa) zajmują 64% ogólnej powierzchni zasiewów. Na cele spożywcze przeznaczają się jednak tylko 20-25% uzyskanego ziarna. Reszta jest natomiast wykorzystywana do produkcji pasz i do innych celów. Duże spożycie przetworów zbożowych wynoszące w roku około 120 kg/osobę jest przyczyną ich deficytu uzupełnianego importem (Anonimowo, 2007). Można go zmniejszyć rozpowszechniając uprawy szarłat, które można przeprowadzać na glebach niezbyt przydatnych dla innych zbóż. Przewidywane poszerzenie upraw szarłat skłania do wnikliwych badań zmierzających do pełnego poznania i wykorzystania tej rośliny.

2. Charakterystyka botaniczna i wymagania uprawowe

Użyteczne gatunki szarłat różnią się pod względem botanicznym od innych zbóż i z tego względu są nazywane zbożem rzekomym. Należą one do rodziny *Amaranthaceae* (szarłatowate), w której znajdują się też rośliny rodzaju *Achyra*, *Alternanthera* i *Celosia*. Rodzaj *Amaranthus* (szarłat) obejmuje około 60 gatunków, z których tylko kilka ma znaczenie użytkowe, a pozostałe są roślinami ozdobnymi lub uciążliwymi chwastami (Klimczak i in., 2002; Nalborczyk, 1995). Dla celów spożywczych wykorzystywane są nasiona i liście roślin gatunku *Amaranthus cruentus* (Rys. 2), *Amaranthus caudatus* (Rys. 3) i *Amaranthus hypochondriacus* (Rys. 4) (Gamel i in., 2004; Prokopowicz i in., 2000; Teutonico i Knorr, 1985). W Polsce najbardziej popularny jest *Amaranthus cruentus*. Do grupy chwastów należy natomiast *Amaranthus viridis*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus tuberculatus* oraz szarłat szorstki (*Amaranthus retroflexus*), jeden z najbardziej rozpowszechnionych i szkodliwych chwastów upraw polowych (Tabela 1).

Tabela 1. Zastosowanie głównych gatunków szarłat

Gatunek	Kategoria rośliny	Zastosowanie
<i>A. cruentus</i> , <i>A. hypochondriacus</i> , <i>A. leucosperma</i> , <i>A. flavus</i> ,	uprawna	zboże, jarzyna
<i>A. caudatus</i> , <i>A. mategazzianus</i> ,	uprawna	zboże, jarzyna, zdobnictwo
<i>A. blitum</i> , <i>A. tricolor</i> , <i>A. mangostanus</i> ,	uprawna	jarzyna, zdobnictwo
<i>A. dubis</i>	chwast, uprawna	jarzyna
<i>A. hybridus</i> , <i>A. retroflexus</i> , <i>A. spinosus</i> , <i>A. viridis</i> , <i>A. gracilis</i> ,	chwast	jarzyna

Wg Teutonico i Knorr, 1985

Poszczególne gatunki szarłat charakteryzują się dużą różnorodnością morfologii, zabarwienia, warunków rozwoju oraz składu chemicznego (Szot, 1999). Są to zazwyczaj rośliny jednoroczne, jednak niektóre z nich, jak np. *Amaranthus muricatus* oraz *Amaranthus deflexus* są odmianami wieloletnimi. Osiągają one wysokość od 0,3 do 3 metrów i występują w strefach od umiarkowanej do tropikalnej, położonych nawet na wysokości 3000 m n.p.m (Prokopowicz i in., 2000). Charakterystyczną cechą szarłat jest duża zmienność barwy i formy kwiatostanów, które mogą być wyprostowane lub zwisające, osiągając niekiedy długość ponad 50 cm. Różny jest też kształt roślin poszczególnych gatunków rodzaju *Amaranthus*, które są rozgałęzione lub pozbawione bocznych pędów i przyjmują pozycję wyprostowaną lub płozącą. Nagie lub pokryte krótkimi szczecinkami łodygi szarłat są rozgałęzione albo pozbawione bocznych pędów i zawierają ułożone

naprzemianlegle podłużne liście o kształcie lancetowatym, romboidalnym lub eliptycznym. Łodygi i liście są zielone, czerwone, purpurowe lub wielobarwne (Nalborczyk, 1995; Szot, 1999). Szarłat posiada palowy system korzeniowy z licznymi odgałęzieniami sięgającymi nawet na głębokość do 2,5 m.



Rys. 2. *Amarantus cruentus*

Każdy ze złotych, purpurowych lub brązowych kwiatostanów wytwarza około 50 tys. soczewkowatych lub okrągłych nasion o średnicy od 0,9 do 1,7 mm (Calzetta Resio i in., 2004). Jedna roślina może więc wytworzyć około 3 kg ziarna. Barwa nasion również jest bardzo różnorodna, od białej przez kremową i brązową do czarnej i zróżnicowanie to można zaobserwować nawet w obrębie jednej grupy morfologicznej.



Rys. 3. *Amarantus caudatus*



Rys. 4. *Amarantus hypochondriacus*

Gatunki uprawiane jako zboże mają nasiona jasne, w przeciwieństwie do gatunków wykorzystywanych jako warzywa lub rośliny ozdobne (Rys. 5). Do uprawy odmian jadalnych należy stosować nadzorowany materiał siewny ze względu na podatność szarłatu na krzyżowanie z odmianami dzikimi (Prokopowicz i in., 2000; Szot, 1999). Szarłat jest zasadniczo rośliną wiatropylną, ale interesują się nim też pszczoły.

Szarłat występuje głównie w klimacie umiarkowanym, ale rośnie również w strefie tropikalnej przy bardzo zróżnicowanej wilgotności i wysokości geograficznej. Szybki wzrost i duża plenność szarłatu jest skutkiem przynależności do roślin o asymilacji CO₂ typu C₄, zwanego także cyklem Hatcha-Slacka. Pierwszymi produktami fotosyntezy w roślinach tej grupy są związki czterowęglowe (kwas szczawiooctowy, jabłczan i asparaginian) służące do pośredniego zasilania cyklu Calvina (Solomon i in., 1996). Rosnące w klimacie umiarkowanym rośliny z metabolizmem typu C₃, jak np. pszenica, żyto, len, ziemniaki, soja i szpinak, dysponują natomiast wyłącznie cyklem Calvina, którego pierwszym etapem jest wytwarzanie związków trójwęglowych: aldehydu i kwasu 3-fosfoglicerynowego. Rośliny typu C₄ dominujące w suchych rejonach o dużym nasłonecznieniu tracą mniej wody wskutek transpiracji, wykazują intensywniejszą fotosyntezę i szybszy wzrost od roślin wykorzystujących wyłącznie cykl Calvina (Zheleznov i in., 1997). Plony roślin typu C₄ są 2-3-krotnie większe niż w przypadku roślin typu C₃ (Solomon i in., 1996). Szarłat przy ograniczonym dostępie wody oraz silnym nasłonecznieniu nie wydziela CO₂ wytwarzanego podczas przebiegającego równocześnie z fotosyntezą oddychania tlenowego magazynując go w komórkach pochwy wiązkowej w celu ponownego wykorzystania. Zwiększa to zasilanie fotosyntezy dwutlenkiem węgla przyspieszając jej przebieg (Laisk i Edwards, 1998; Liu i Stützel, 2002). Najpowszechniej spotykanymi roślinami uprawnymi o mechanizmie fotosyntezy C₄ są: trzcina cukrowa, kukurydza, sorgo oraz proso (Svirskis, 2003).



Rys. 5. Nasiona spożywanej odmiany szarłatu

W Polsce pierwsze kompleksowe badania nad fizjologią plonowania, aklimatyzacją i użytkowaniem szarłatu zapoczątkowano w 1989 roku. Przeprowadzone w latach 1991-1994 doświadczenia polowe w wybranych gospodarstwach rolnych na terenie całego kraju wykazały, że szarłat może być uprawiany w różnych regionach klimatyczno-glebowych Polski. Oplacalne ceny zbytu oraz plony w granicach 1,8-3,5 t/ha, w zależności od odmiany rośliny, warunków glebowych i klimatycznych, czynią uprawę szarłatu bardzo obiecującą (Rutkowska, 2006).

Szarłat powinien być uprawiany na lekkich lub średniozwięzłych glebach charakteryzujących się wartością pH 6,5-7,5. Niewskazane jest natomiast lokalizowanie upraw na glebach zwięzłych, podatnych na zeskorupianie (Calzetta Resio i in., 1999; Nalborczyk, 1995; Szot, 1999). Dawki i rodzaje nawozów powinny być podobne jak w przypadku innych zbóż. Należy jednak unikać zbyt dużych dawek nawozów azotowych, które powodują nadmierny wegetatywny wzrost rośliny, bez zwiększenia plonu nasion i wydłużają okres ich dojrzewania (Myers, 1998; Pospíšil i in., 2006; Schulte-Erley i in., 2005). Młode rośliny są wrażliwe na obniżenie temperatury i już przy 8°C następuje znaczne zahamowanie ich rozwoju. Dość długi, wynoszący 90-140 dni, okres wegetacji różnych odmian szarłatu i konieczność opóźnienia wysiewu umożliwia zbiory dopiero w okresie od września do połowy października.

Najczęściej uprawianym w Polsce gatunkiem szarłatu jest *Amaranthus cruentus* pochodzący z Meksyku i Gwatemali (Rutkowska, 2006). Roślina ta o nasionach brązowych, złotych, lub kremowo-białych osiąga wysokość do 2 metrów, łatwo adaptuje się do warunków klimatyczno-glebowych i zakwita w szerszym zakresie długości dnia w porównaniu z innymi gatunkami (Szot, 1999). Przedplonem szarłatu mogą być wszystkie rośliny uprawne. Wymieniona roślina dobrze rozwija się w temperaturze 16-35°C. Stanowisko przed siewem powinno być ciepłe i wilgotne, wolne od chwastów, a temperatura gleby 10-13°C lub wyższa. Nasiona zaczynają kiełkować po 4-5 dniach, ale początkowy wzrost roślin jest powolny i dopiero po 3-4 tygodniach następuje jego przyspieszenie. Szarłat jest nieodporny na niskie temperatury i dlatego w szerokości geograficznej i warunkach klimatycznych Polski powinien być wysiewany po 15 maja. Zbiór nasion w zależności od pogody realizuje się od połowy września do połowy października, ale zielone pędy tej rośliny mogą być zbierane po rozpoczęciu intensywnego rozwoju w odstępach kilkutygodniowych (Fasuyi, 2007). Szarłat jest dobrym przedplonem pod wszystkie rośliny uprawne, ponieważ pozostawia odchwaszczone stanowisko z dużą ilością resztek poźniwnych. Obecnie rozpowszechniają się uprawy wyselekcjonowanej w Polsce odmiany „Rawa”, charakteryzującej się kwiatostanami zabarwionymi na żółto lub amarantowo. Jest ona niewybredna glebowo, odporna na suszę i dostosowana do naszych warunków klimatycznych (Prokopowicz, 2001; Rywotycki, 2005). Główny Inspektor Sanitarny kraju w 1994 roku zezwolił na wprowadzenie nasion oraz półproduktów

z szarłat do obrotu, a w 1999 roku wydał zgodę na wykorzystanie nasion tej rośliny w przemyśle spożywczym (Prokopowicz i in., 2000; Rutkowska, 2006).

3. Skład chemiczny i wartość żywieniowa ziaren szarłat

W porównaniu z innymi najbardziej popularnymi zbożami wymienionymi w tabeli 2 nasiona szarłat charakteryzują się większą zawartością białek, lipidów i substancji mineralnych. Zawartość tych składników jest jednak mniejsza niż w soi i nasionach roślin oleistych.

Tabela 2. Skład chemiczny nasion szarłat oraz niektórych zbóż i roślin oleistych (%)

Rodzaj rośliny	Udział składnika [%]					
	Woda	Białko ogólne	Tłuszcz surowy	Błonnik	Cukry niewłókniste	Substancje mineralne
Szarłat	6,2-11,5	13,2-18,9	6,3-8,5	2,2-4,4	56,6-65,0	2,2-4,0
Pszenica	12,5-15,0	8,9-14,0	1,7-12,2	1,9-2,6	66,9-71,1	1,5-1,9
Kukurydza	13,8-15,0	8,2-10,6	3,2-4,3	2,3-2,6	59,0-67,7	1,3-1,4
Ryż	11,5-15,0	8,5-10,8	1,7-2,5	0,9-9,5	64,0-75,4	1,4-3,9
Owies	13,0-15,0	10,3-13,5	4,8-7,5	1,4-10,3	56,4-61,6	1,9-3,6
Żyto	12,0-13,0	8,2-13,0	1,6-1,7	1,9-2,5	69,0-70,7	1,7-1,9
Jęczmień	9,4-14,0	9,3-12,6	1,8-2,3	4,5-17,3	67,0-73,5	2,3-2,5
Soja	7,0	33,7	18,1	21,9	6,3	13,0
Sezam	5,0	17,7	50,0	11,2	10,2	5,9
Słonecznik	6,6	22,5	49,0	6,3	12,3	3,3

Wg Segura-Nieto i in., 1994; Sikorski, 1996a; Svirskis, 2003; Tosi i in., 2001; Virk i Saxena, 2003

Głównym składnikiem nasion szarłat, podobnie jak w przypadku innych zbóż, jest skrobia. Jednak jej udział w masie ziarna jest nieco niższy i zależy w pewnym stopniu od warunków klimatyczno-glebowych i sposobu nawożenia uprawy. Inne jest także rozmieszczenie skrobi, która w ziarnach zbóż znajduje się w bielmie, a w nasionach szarłat jest umiejscowiona w peryspermie otoczonej liścieniami zarodka rośliny. Ważną cechą nasion szarłat jest dobra wartość żywieniowa wynikająca głównie z korzystnego składu białek i lipidów, których charakterystykę podano w dalszych częściach rozprawy. Poszczególne gatunki szarłat nieznacznie różnią się między sobą zawartością poszczególnych składników (Tabela 3).

Tabela 3. Skład chemiczny (%) nasion niektórych gatunków szarłat

Składnik	<i>Amaranthus caudatus</i>	<i>Amaranthus cruentus</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
Woda	7,5-11,6	6,2-11,5	11,1-11,4
Białko ogólne	13,8-18,4	13,2-18,9	14,2-17,9
Tłuszcz surowy	6,4-8,1	6,3-8,5	5,9-7,7
Błonnik	3,2-5,8	2,2-4,4	2,2-7,35
Cukry niewłókniste	56,0-62,0	56,6-65,0	58,0
Substancje mineralne	2,3-4,4	2,2-4,0	2,0-6,1

Wg Colmenares de Ruiz i Bressani, 1990; Czerwiński i in., 2004; Gamel i in., 2006a; Tosi i in., 2001

3.1. Białka

Zawartość białek w nasionach szarłat jest większa niż w tradycyjnych zbożach i zmienia się w zakresie 13-18% suchej masy, zależnie od odmiany rośliny, warunków klimatyczno-glebowych i sposobu nawożenia (Tabela 2). Wchodzą one głównie w skład frakcji albumin, globulin, prolamin i glutelin, stanowiących odpowiednio 48,9-65%, 13,7-18,1%, 1,0-3,2%, oraz 22,4-42,3% ogólnej zawartości białek (Fidantsi i Doxastakis, 2001; Silva-Sánchez i in., 2004). Podawane przez różnych autorów wartości różnią się jednak z powodu stosowania niejednakowych warunków ekstrakcji. Istotne znaczenie ma niewielka zawartość prolamin należących do frakcji glutenu, które nie zawierają występujących w pszenicy, jęczmieniu i życie gliadyny, sekaliny lub hordeiny, wywołujących niekorzystną odpowiedź immunologiczną (Gorinstein i in., 2002; Roučková i in., 2004). Umożliwia to wykorzystanie nasion szarłat jako składnika żywności bezglutenowej przeznaczonej dla chorych na celiakię, ale utrudnia wytworzenie ciasta o odpowiednich właściwościach lepko-sprężystych.

Należące do poszczególnych frakcji białka różnią się budową i spełniają rozmaite funkcje fizjologiczne. Albuminy szarłat są homodimerami bogatymi w aminokwasy siarkowe oraz tryptofan, treoninę i lizynę (Fidantsi i Doxastakis, 2001). Niektóre albuminy wykazują działanie ochronne zabezpieczając roślinę przed rozwojem patogenów. Frakcja albumin zawiera lektyny, glikoproteiny charakteryzujące się jednak niewielką zdolnością aglutynacji (250-krotnie mniejszą od lektyn soi) oraz dużą termolabilnością powodującą utratę 90% pierwotnej aktywności już po 5 min ogrzewania w temperaturze 70°C (Koeppel i Rupnov, 1988; Saunders i Becker, 1984). Wśród albumin znajdują się też inhibitory proteaz serynowych, które są jednym z nielicznych składników antyżywnościowych szarłat. Występują one jednak w bardzo małej ilości i nie wywierają istotnego wpływu na strawność produktów wytworzonych z nasion szarłat (Correa i in., 1986; Grajeta, 1997b).

Korzystnym oddziaływaniem inhibitorów trypsyny jest zwiększenie przepływu żółci do dwunastnicy. Nasila to przemianę cholesterolu w wątrobie przyczyniając się do spadku jego stężenia we krwi (Paśko i Bednarczyk, 2007).

Globuliny szarłat cechuje dobre wiązanie wody i lipidów oraz prawie 2-krotnie większa od izolatów sojowych zdolność tworzenia i stabilizacji emulsji. Największą stabilność wykazują emulsje o pH 6,5. Świadczy to o możliwości wykorzystania szarłat jako składnika sosów i majonezów oraz do poprawy tekstury i innych właściwości funkcjonalnych niektórych produktów (Marcone i Yada, 1998). Frakcja globulin zawiera głównie trimery i heksamery o współczynnikach sedymentacji 7S i 11S oraz masach cząsteczkowych 170-200 kDa i 300-400 kDa (Marcone, 1999; Segura-Nieto i in., 1994).

Białka nasion szarłat zawierają wszystkie aminokwasy egzogenne w ilościach wyższych niż w tradycyjnych zbożach (Tabela 4). Charakteryzują się one także lepszą od białek mleka wartością biologiczną wynoszącą około 75% (Escudero i in., 2004; Zheleznov i in., 1997), dobrą strawnością rzeczywistą zmieniającą się zależnie od gatunku rośliny w granicach 79-89% (Ferreira i Arêas, 2004; Grajeta, 1997a) oraz podobną lub nawet większą od wzorca FAO/WHO zawartością aminokwasów egzogennych (Tabela 5). Preparaty tych białek można więc użyć do wytwarzania produktów mlekozastępczych, przydatnych dla ludzi uczulonych na białka mleka lub cierpiących na nietolerancję laktozy.

Tabela 4. Zawartość aminokwasów niezbędnych (%) w białkach różnych nasion

Rodzaj rośliny	Aminokwasy niezbędne							
	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Phe+Tyr	Thr	Try	Val
Szarłat	3,0	5,8	8,2	3,6	6,3	2,7	1,8	3,2
Pszenica	4,3	6,7	2,8	3,5	8,6	2,9	1,2	4,6
Kukurydza	3,6	12,4	2,9	4,2	8,2	3,5	0,8	4,9
Owies	5,2	7,5	3,7	3,7	9,0	3,3	1,3	5,9
Proso	2,7	11,1	2,3	4,3	9,5	3,1	-	3,5
Soja	5,1	7,7	6,9	3,5	8,5	4,3	1,3	5,4
Mleko krowie	6,2	11,3	7,5	4,4	11,0	4,6	1,6	6,0
Jajo, białko+żółtko	8,0	9,2	7,2	6,5	10,8	4,9	1,5	7,3
Wiesiołek	2,7	5,7	2,0	11,0	6,9	2,3	10,5	3,4
Rzepak	4,4	7,6	5,9	3,6	7,6	3,8	-	6,1

Wg Escudero i in., 2004; Gaşiorowski, 2007; Gołabczak 2005; Jurga, 2007; Sikorski, 2000

Korzystną cechą białek szarłat jest przewyższająca wzorzec zawartość lizyny, aminokwasów siarkowych oraz innych aminokwasów ograniczających zbóż tradycyjnych (Correa i in., 1986; Grajeta, 1997a; Zheleznov i in., 1997). W przypadku białek szarłat aminokwasem ograniczającym jest leucyna, ale występuje ona w dość dużych ilościach np. w pszenicy lub kukurydzy i jej niedobór można skompensować mieszając mąkę szarłat i innych zbóż (Tosi i in., 2001). Użytecznym źródłem łatwo ekstrahowanych białek są też liście szarłat (Tabela 5), które można wykorzystać do otrzymywania izolatów białkowych o dobrych właściwościach funkcjonalnych i wartości żywieniowej lepszej od białek szpinaku, kapusty i zbóż (Fasuyi, 2006; Segura-Nieto i in., 1994). Białka liści szarłat są bogate w lizynę, leucynę i izoleucynę, a aminokwasami ograniczającymi są tryptofan, metionina i cysteina (Fasuyi, 2007; Gamel i in., 2004).

Tabela 5. Zawartość aminokwasów egzogennych (%) w białkach nasion i liści szarłat

Rodzaj aminokwasu	Nasiona szarłat:			Liście szarłat	Wzorzec FAO/WHO
	<i>Amaranthus caudatus</i>	<i>Amaranthus cruentus</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
Ile	2,7-4,1	2,9-3,7	2,8-3,8	4,3-6,4	2,8
Leu	5,8-6,3	4,8-5,9	5,0-5,9	4,9-9,6	6,6
Lys	5,5-6,4	4,8-5,8	3,2-6,0	4,1-7,4	5,8
Met +Cys	4,7-6,2	3,8-6,4	2,6-6,4	0,9-3,3	2,5
Phe+Tyr	6,2-9,1	5,6-8,5	6,9-8,5	6,4-10,1	6,3
Thr	3,8-4,2	3,2-4,6	2,6-4,3	3,0-7,0	3,4
Try	1,1-1,8	2,0-	1,1-4,0	0,8-1,0	1,1
Val	3,9-4,7	3,9-4,3	3,2-4,2	4,6-6,3	3,5

Wg Fasuyi, 2007; Gamel i in., 2004; Segura-Nieto i in., 1994; Sikorski, 2007; Tosi i in., 2002

3.2. Skład i wartość żywieniowa lipidów

Zawartość tłuszczu surowego w nasionach szarłat różnych gatunków zmienia się w zakresie 4,8-10% i jest zbyt mała, by zapewnić jego opłacalną produkcję bez racjonalnego wykorzystania innych składników śruty poekstrakcyjnej. Korzystny skład frakcji lipidowej szarłat jest jedną z głównych przyczyn dobrej wartości żywieniowej i zdrowotności tej rośliny, spowodowanej między innymi dość dużym udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych, który dla odmian uprawianych w celach spożywczych wynosi około 70% (Paśko i in., 2007). Frakcja nasyconych kwasów tłuszczowych zawiera między innymi kwas palmitynowy (20,3-22,1%), stearynowy (2,6-3,8%) i mirystynowy, występujący w ilości 0,1-0,2% (Becker, 1994; Grajeta, 2000;

Paško i in., 2007; Prokopowicz, 2001). Wśród nienasyconych kwasów tłuszczowych dominują kwas oleinowy (20,3-33,3%) i linolowy (38,2-51,7%) (Berganza i in., 2003; León-Camacho i in., 2001; Ratusz i Wirkowska, 2006). Niewielka, bo nie przekraczająca 1,2% jest natomiast zawartość kwasu linolenowego (Grajeta, 2000). Duża ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych przyczynia się do korzystnego oddziaływania zdrowotnego szarłat, ale wskutek przyspieszenia autooksydacji lipidów obniża trwałość niektórych produktów wytwarzanych z tej rośliny (Bartnik i Filipek, 1999). Wolne lipidy (głównie triacyloglicerole) stanowią w *Amaranthus cruentus* 90-93% ogólnej ilości frakcji lipidowej, a pozostałość zawiera około 5% fosfolipidów oraz 2,6% glikolipidów. Dość bogatym źródłem lipidów występujących (zależnie od gatunku rośliny i warunków uprawy) w ilości 6,8-9,1% są też liście szarłat (Tabela 7). Zawierają one głównie kwas linolenowy i palmitynowy oraz w mniejszych ilościach kwasy linolowy, stearynowy i oleinowy (Teutonico i Knorr, 1985).

Ważnymi składnikami frakcji lipidowej szarłat są tokoferole, tokotrienole i sterole. Zawartość tokotrienoli w oleju z nasion tej rośliny jest podobna lub nawet nieco wyższa od ich stężenia w oleju z oliwek. Dzięki dużej aktywności przeciwrodnikowej tokoferole i tokotrienole chronią fosfolipidy wchodzące w skład błon komórkowych, wzmacniają ścianki naczyń krwionośnych, ograniczają możliwość powstawania stanów zapalnych oraz są jedną z przyczyn hipocholesterolemicznego oddziaływania produktów żywnościowych zawierających nasiona szarłat. Dobrym źródłem tokoferoli jest gatunek *Amaranthus cruentus*, zawierający we frakcji lipidowej nasion podobną ilość α -tokoferolu o biologicznej aktywności witaminy E, jak olej palmowy oraz rzepakowy i prawie 2-krotnie więcej od oleju sojowego i kukurydzianego (León-Camacho i in., 2001). Znacznie większa niż w przypadku innych roślin jest zawartość fitosteroli występujących w nasionach szarłat w ilości 0,22-0,36 mg/g suchej masy. We frakcji tych związków znajduje się między innymi 46-54% spinasterolu, 15-18% delta-7-stigmasterolu, 12-15% delta-7-ergosterolu oraz 10-13% stigmasterolu (Marcone i in., 2004; Schnetzler i Breene, 1994). Nie stwierdzono natomiast występowania nawet śladowych ilości cholesterolu (Stuchlik i Žák, 2002). Spożywanie produktów z szarłatem skutecznie obniża poziom cholesterolu i triacylogliceroli we krwi, łagodzi skutki hipercholesterolemii oraz zwiększa udział HDL (Czerwiński i in., 2004; Escudero i in., 2006; Qureshi i in., 1996; Shin i in., 2004).

Wartościowym składnikiem szarłat jest skwalen ekstrahowany z nasion razem z lipidami. Substancja ta jest trójterpenowym węglowodorem o właściwościach przeciwutleniającej, występującym w ilości 6-8% tłuszczu surowego szarłat (León-Camacho i in., 2001). Skwalen znajduje się często w olejach roślinnych, ale w ilościach znacznie mniejszych niż w szarłacie (Małecka, 1995). Skwalen otrzymuje się w skali przemysłowej z oleju wątrób rekinów i wielorybów, w których stanowi 70-80% masy frakcji lipidowej (Sun i in., 1997). Oliwa z oliwek zawierająca 0,6%

skwalenu była natomiast uważana za główne źródło roślinne tego węglowodoru (Segura-Nieto i in., 1994). Znaczenie fizjologiczne skwalenu polega na wspomaganiu transportu tlenu do komórek i usuwaniu ksenobiotyków, udziale w metabolizmie steroli i alkoholi trójterpenowych oraz w syntezie kwasów żółciowych, prowitaminy D i hormonów płciowych (Stuchlík i Žák, 2002). Skwalen podobnie jak tokotrienole jest inhibitorem reduktazy HMG-CoA mającej kluczowe znaczenie w syntezie cholesterolu oraz zwiększa skuteczność leków przeciwdziałających rozwojowi chorób serca i stymuluje układ immunologiczny organizmu (Paško i Bednarczyk, 2007). Ze względu na korzystne oddziaływanie fizjologiczne skwalen jest składnikiem wielu kosmetyków i maści o działaniu przeciwzapalnym i przeciwbólowym, leków łagodzących skutki uczuleń i wzmacniających naczynia krwionośne oraz łagodzących skutki przemęczenia fizycznego lub umysłowego. Skwalen jest obecny w błonie komórkowej każdej komórki ciała, a najbardziej skoncentrowany jest w skórze ludzkiej, w której dodatkowo tworzy pozakomórkową warstwę ochronną, poprawia oddychanie skóry, chroni przed utratą wody oraz przyspiesza przenikanie substancji pielęgnacyjnych przez rogową warstwę naskórka. Jako komponent płaszcza lipidowego skóry węglowodór ten pełni funkcję antybakteryjną i przeciwrzybiczą oraz ogranicza niekorzystne oddziaływanie promieniowania ultrafioletowego (Kelly, 1999).

3.3. Węglowodany szarłat

Podobnie jak w przypadku innych zbóż głównym składnikiem frakcji węglowodanów występujących w nasionach szarłat jest skrobia, której udział (45-69%) jest jednak mniejszy niż w tradycyjnych zbożach i zależy od gatunku rośliny oraz warunków uprawy (Grajeta, 1997a; Konishi i in., 1985). Jest ona umiejscowiona w peryspermie znajdującej się wewnątrz ziarna, natomiast duży obszar zewnętrznej części zajmuje zarodek, w którego liścieniach jest zgromadzona główna część białek i lipidów. Stosując odpowiedni sposób przemiatu i separacji można więc uzyskać frakcje mąki wzbogaconej w poszczególne składniki. Nasiona szarłat zawierają ponadto polisacharydy tworzące frakcję rozpuszczalnego i nierozpuszczalnego błonnika, około 1% inozytolu, niewielką ilość glukozy, fruktozy i innych monosacharydów (których łączna zawartość zmienia się w zakresie 0,05-0,67%) oraz disacharydów takich jak rafinoza (0,13-0,93%), sacharoza (0,4-2,0%), maltoza (0,02-0,36%) i stachioza (0,02-0,29%). Zawartość rafinozy jest większa niż w pszenicy, ale mniejsza od ilości znajdującej się w kukurydzy (Colmenares de Ruiz i Bressani, 1990; Grajeta, 1997a; López i in., 1994). Najwięcej węglowodanów znajduje się w nasionach szarłat spożywczego *Amaranthus cruentus*.

Skrobia szarłatowa wyróżnia się niewielkim rozmiarem ziaren (1-3 μm), podobnym do skrobi ryżowej (6-8 μm) i znacznie mniejszym od ziaren skrobi ziemniaczanej, których średnica wynosi około 100 μm (Mundigler, 1998). Niewielki rozmiar ziaren jest przyczyną szybkiego podwyższenia poziomu glukozy we krwi spowodowanego ułatwionym trawieniem. Podwyższenie indeksu glikemicznego wskazuje na konieczność ostrożnego stosowania produktów z szarłatów w diecie osób chorych na cukrzycę (Paśko i Bednarczyk, 2007). Skrobia ma też lepszą od polisacharydu z innych źródeł zdolność pęcznienia i wiązania wody. Kleikowanie skrobi szarłatowej przebiega w zakresie temperatur 51-76°C, nieco niższym niż w przypadku skrobi pszennej, której ziarna ulegają degradacji przy 60-88°C (Gąsiorowski, 2004; Guerra-Matias i Arêas, 2005; Lindeboom i in., 2004; Tosi i in., 2001). Skrobię szarłatową stosuje się między innymi do produkcji folii ulegających biodegradacji, aerozoli hipoalergicznym, stabilizatorów emulsji i zagęstników żywności oraz rozmaitych pudrów, zasypek i innych kosmetyków. W zależności od genotypu szarłatowy udział amylozy w ziarnach skrobi wynosi od 4,8 do 22%, ale niektóre gatunki tej rośliny zawierają tylko amylopektynę (Calzetta Resio i in., 1999 i 2004). Skrobia o niewielkiej zawartości amylozy jest zaliczana do tzw. skrobi woskowych (Konishi i in., 1985), które tworzą żele o małej zdolności do retrogradacji i dużej stabilności podczas następujących kolejno cykli zamrażania i rozmrażania (Jobling, 2004). Konsekwencją małej zawartości amylozy, która ułatwia wiązanie lipidów blokujących dostęp enzymów amylolytycznych, jest polepszona strawność skrobi szarłatowej (López i in., 1994). Charakterystyczną cechą tej skrobi jest też stwierdzone przez niektórych autorów stymulowanie sekrecji insuliny oraz dość niska temperatura kleikowania, wysoka lepkość żeli w podwyższonej temperaturze, dobre właściwości sorpcyjne i większa zdolność pęcznienia od skrobi kukurydzy lub pszenicy (Guerra-Matias i Arêas, 2005; Jobling, 2004; Lindeboom i in., 2004). Podobnie jak w przypadku innych roślin skrobia szarłatowa jest związana w ziarnach z niewielką ilością białek (0,1-1%), lipidów (0,1-1,1%) i substancji mineralnych (0,1-1,4%) (López i in., 1994).

Ważną ze względu na oddziaływanie fizjologiczne frakcją szarłatową jest błonnik, którego zawartość zależy od gatunku rośliny i jest podobna do ilości znajdującej się w ryżu lub kukurydzy (Tabela 2). Zawartość błonnika w nasionach uprawianej w Polsce odmiany szarłatowej wynosi 2,2-4,4% (Rutkowska, 2006). Błonnik składa się z substancji rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie. Występują one w różnych proporcjach zależnie od gatunku szarłatowego. Frakcja rozpuszczalna stanowi 14% całkowitego błonnika z *Amaranthus cruentus* i 25% w przypadku *Amaranthus hypochondriacus* (Schnetzler i Breene, 1994). Rozpuszczalną frakcją błonnika tworzą pektyny, kwas uronowy oraz nietrawione biopolimery zbudowane z glukozy, arabinozy, ksylozy, mannozy i galaktozy. Substancje te fermentują w przewodzie pokarmowym tworząc kwas octowy,

mlekowy, masłowy i inne krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe zmieniające pH jelit i korzystnie wpływające na ich błonę śluzową (Rutkowska, 2006; Rywotycki, 2005). Frakcję nierozpuszczalną stanowią natomiast lignina, celuloza i hemicelulozy, które intensyfikują perystaltykę jelit oraz adsorbują - i wskutek tego - ograniczają wchłanianie substancji szkodliwych, kwasów żółciowych, metali ciężkich i niektórych związków nowotworogennych (Escudero i in., 2004; Gorinstein i in., 2002). Substancje tworzące frakcję błonnika pobudzają też sekrecję śliny i wiążą nadmiar kwasu solnego w żołądku, zwiększają wydalanie kwasów żółciowych, obniżają poziom cholesterolu we krwi, ograniczają strawność składników spożywczych, zapobiegają zbyt szybkim zmianom poziomu glukozy we krwi oraz wykazują oddziaływanie prebiotyczne (Grajeta, 1997b; Roučková i in., 2004). Dość bogatym źródłem błonnika są liście szarłatu (Tabela 7) przydatne do wytwarzania różnych sałatek warzywnych (Grajeta, 1997a; Paško i in., 2007). Oprócz zalecanego spożycia żywności zawierającej znaczne ilości błonnika wzrasta też zapotrzebowanie na preparaty i parafarmaceutyki będące jego skoncentrowanym źródłem. Podstawowym surowcem do produkcji wysokobłonnikowych preparatów zbożowych są m.in. otręby pszenne, owsiane i ryżowe. Surowiec przydatny do otrzymywania takich preparatów można też uzyskać jako produkt odpadowy przy wytwarzaniu syropów skrobiowych z mąki poekstrakcyjnej szarłatu.

3.4. Składniki mineralne i witaminy

Nasiona szarłatu są lepszym od zbóż tradycyjnych źródłem składników mineralnych (głównie wapnia, fosforu, potasu, magnezu, żelaza i sodu), które stanowią średnio 3,3% ich masy (Gajewska i in., 2002). Na uwagę zasługuje znacznie większa niż w pszenicy zawartość żelaza oraz wynoszący 1,9-2,6, korzystny stosunek fosforu do wapnia (Tabela 6). Dzięki znacznej zawartości żelaza, przekraczającej jego ilość w roślinach strączkowych, szpinaku i mięsie produkty z szarłatu są cennym uzupełnieniem diety dla dzieci i osób z objawami anemii. W nasionach szarłatu znajdują się też rozmaite mikroelementy, głównie mangan, nikiel, chrom, cynk, miedź, selen, jod i kobalt (Czerwiński i in., 2004; Gajewska i in., 2002). Bogatym źródłem żelaza, wapnia, fosforu i innych pierwiastków są też liście szarłatu (Tabela 6). Pod względem zawartości witamin nasiona szarłatu nie różnią się szczególnie od innych zbóż i charakteryzują się występowaniem kwasu foliowego, pantotenowego, niacyny oraz witamin grupy B (Gajewska i in., 2002; Roučková i in., 2004). Nasiona oraz liście szarłatu są też źródłem naturalnych przeciwutleniaczy, głównie polifenoli, flawonoidów, antocyjanów oraz β -karotenu (Czerwiński i in., 2004).

Tabela 6. Witaminy i sole mineralne w szarłacie i nasionach niektórych zbóż

Składnik [mg/100g]	Szarłat:		Jęczmień	Owies	Kukurydza	Ryż	Żyto	Pszenica
	nasiona	liście						
Ca	130-340	1100-6200	40	80	15	25	65	45
P	480-650	300-900	340	340	255	325	335	345
Zn	3,3-4,0	2,0-9,0	3,1	4,5	1,4	1,4	1,3	4,0
Cu	0,57-1,2	19-44	-	-	-	-	-	-
Fe	7,3-21,7	10-50	2,8	5,8	1,45	2,6	4,6	3,0
Na	6,3-25,0	10-40	18	8,0	6,0	10	40	8,0
K	290-735	200-5600	445	355	330	150	510	500
Mg	218-363	1100-2500	115	130	120	155	120	145
Tiamina	0,1-0,3	0,02-2,4	0,43	0,52	0,36	0,41	0,35	0,48
Ryboflawina	0,1-0,4	2,1-2,5	0,18	0,17	0,20	0,09	0,17	0,14
Niacyna	1,0-2,13	4,7-9,6	1,8	2,37	1,5	5,2	1,81	5,1
Witamina C	2,3-7,0	147-693	-	-	-	-	-	-
Biotyna	42-51	-	-	0,01	0,006	0,01	0,005	0,006
Pirydoksyna	0,4-0,6	-	0,56	0,96	0,40	0,67	0,29	0,44
Kwas foliowy	42-49	-	0,06	0,03	0,02	0,02	0,04	0,05

Wg Fasuyi, 2006; Jurga, 2007; Svirskis, 2003; Tyburcy, 2007

4. Walory żywieniowe liści szarłatu

Duże walory odżywcze posiadają również zielone części szarłatu. Cechują się one wyższą zawartością białek oraz składników mineralnych w porównaniu z liśćmi szpinaku, buraków oraz kapusty (Tabela 7). Suche liście szarłatu mogą zawierać od 17,4 do 38% białka bogatego w lizynę, leucynę i izoleucynę (Gamel i in., 2004). Najbogatsze w białko są liście szarłatu prostego (*Amaranthus hybridus*), zaś aminokwasami ograniczającymi są metionina, cysteina oraz tryptofan (Grajeta, 1997a; Teutonico i Knorr, 1985). Białka znajdujące się w liściach szarłatu mają dużą wartość odżywczą i ich preparaty są lepszym komponentem pasz od mączki rybnej (Fasuyi, 2007). Zależnie od gatunku i warunków uprawy zawartość tłuszczu w liściach zmienia się w granicach od 1 do 10%. Głównymi kwasami tłuszczowymi są kwas linolenowy (42%), palmitynowy (14%) oraz linolowy, stearynowy i oleinowy występujące w ilościach 5-6%. Gatunkiem o największej zawartości lipidów w liściach jest *Amaranthus tricolor* (Teutonico i Knorr, 1985). Całkowita zawartość węglowodanów w liściach różnych odmian szarłatu wynosi od 38 do 47% s.m. we frakcji tej znajduje się od 5,4 do 24,6% błonnika pokarmowego, którego najbogatszym źródłem są liście:

Amaranthus hybridus i *Amaranthus graecizans* (Grajeta, 1997a; Teutonico i Knorr, 1985). Pod względem zawartości wody (83 do 85%) liście szarłat nie różnią się od innych warzyw liściastych.

Tabela 7. Skład chemiczny (% suchej masy) liści szarłat i niektórych warzyw

Składnik	Szarłat	Szpinak	Burak ćwikłowy	Kapusta
Białko ogólne	32,3-46,5	34,4	26,9	32,6
Tłuszcz surowy	6,8-9,1	3,2	3,4	5,4
Błonnik	7,4-11,1	46,2	51,7	51,0
Substancje mineralne	19,5-35,4	16,1	18,0	10,9

Wg Aleator i in., 2002; Fasuyi, 2006; Nalborczyk, 1995; Segura-Nieto i in., 1994

Zaletą liści i kielków szarłat jest dość duża ilość witaminy C, mogąca pokryć dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na tę witaminę (70-100 mg/dobę). Jej zawartość w 100 g świeżych liści wynosi od 60 do 300 mg. Natomiast zarówno świeże jak i suszone kielki szarłat zawierają w 100 g odpowiednio 130 i 80 mg tej witaminy (Bartnik i Filipek, 1999). W mrożonych liściach szarłat zawartość witaminy C maleje jednak do około 40 mg/100 g. Najbogatszym źródłem tej witaminy (693 mg/100 g s.m.) są liście *Amaranthus tricolor*, natomiast w α -karoten obfitują liście *Amaranthus spinosus* (Teutonico i Knorr, 1985). Liście szarłat są też cennym źródłem składników mineralnych, zwłaszcza żelaza, wapnia i fosforu (Tabela 6), ale przyswajalność tych pierwiastków, zwłaszcza z surowych liści, może być ograniczona ze względu na występujące w nich szczawiany i fityniany (Aleator i Adeogun, 1995; Teutonico i Knorr, 1985). Liście warzywnych gatunków szarłat (*Amaranthus tricolor* i *Amaranthus gangeticus*) oraz niektórych gatunków nasiennych (*Amaranthus cruentus*, *Amaranthus hypochondriacus*) mogą być wykorzystane w postaci sałatek i surówek, których walory smakowe po ugotowaniu są porównywalne do szpinaku, lub nawet lepsze (Bartnik i Filipek, 1999; Teutonico i Knorr, 1985).

5. Substancje antyodżywcze nasion i liści

Nasiona i liście szarłat zawierają niewielką w porównaniu z innymi roślinami ilość inhibitorów proteaz, polifenoli, saponin, hemaglutynin, fityny oraz azotanów (V) i szczawianów. Nie wywierają one jednak istotnego oddziaływania fizjologicznego ze względu na występowanie w relatywnie małych ilościach (Gamel i in., 2006b). Saponiny zlokalizowane są głównie w korzeniach i nasionach oraz w mniejszej ilości w liściach tej rośliny. Występowanie saponin jest przyczyną

tworzenia się piany podczas kiełkowania nasion (Bartnik i Filipek, 1999). Liście szarłatu zawierają 0,3-0,8% azotanów (V) oraz 0,5-0,7% szczawianów i są pod tym względem podobne do szpinaku i innych warzyw (Aletor i Adeogun, 1995). Aktywność inhibitorów proteaz serynowych zależy od gatunku szarłatu i jest ponad 20-krotnie mniejsza niż w surowej soi (Gamel i in., 2006b). Inhibitory te są jednak nietrwałymi związkami i łatwo ulegają degradacji podczas obróbki cieplnej. Niewiele jest też polifenoli (0,04-0,56%), w skład których wchodzi między innymi taniny znajdujące się w ilości podobnej jak w innych zbożach (Laisk i Edwards, 1998). Występują one głównie w okrywie nasiennej ziaren o barwie brązowej, w ilości 0,04-0,12% (Piesiewicz i Ambroziak, 1995; Szot, 1999). Taniny ograniczają przyswajanie składników pokarmowych tworząc trudno rozpuszczalne kompleksy z białkami, aminokwasami i metalami. Stężenie tanin w wielu roślinach strączkowych jest znacznie większe i w fasoli wynosi około 0,2%, a w soczewicy nawet 0,79% (Śmiechowska, 2000).

Szarłat charakteryzuje się nieco mniejszą od innych zbóż zawartością fityny, która adsorbuje i zmniejsza wchłanianie substancji mineralnych oraz tworzy kompleksy z białkami ograniczając ich podatność na hydrolizę enzymatyczną. Nasiona i liście szarłatu zawierają odpowiednio 0,3-0,6% oraz 0,1-0,2% fityny, podczas gdy w ziarnie pszenicy znajduje się ona w ilości 0,9-1,1% (Gamel i in., 2006b; Piesiewicz i Ambroziak, 1995). Mało jest też hemaglutynin i nasiona szarłatu wykazują znacznie mniejszą aktywność koagulującą od soi lub fasoli (Piesiewicz i Ambroziak, 1995). Niekorzystną cechą szarłatu jest tendencja do akumulacji glinu, przewyższająca dość znacznie inne zboża i warzywa.

6. Wpływ procesów technologicznych na składniki nasion i liści szarłatu

Ziarna szarłatu służą między innymi do wytwarzania mąki, płatków i popcornu oraz są dodawane w ilości 10-15% do rozmaitych wyrobów piekarniczych. Surowe, blanszowane lub gotowane liście rośliny wykorzystuje się natomiast do sporządzania rozmaitych sałatek i innych potraw. Podczas wytwarzania tych produktów stosowane są różne procesy technologiczne, takie jak: mielenie, gotowanie, blanszowanie, prażenie, pieczenie, ekspandowanie, ekstruzja, modyfikacja enzymatyczna lub słodowanie. Przeprowadza się je między innymi w celu poprawienia właściwości sensorycznych i tekstury produktów, zwiększenia strawności białek i polisacharydów oraz obniżenia zawartości substancji antyżywniowych (Schnetzler i Breene, 1994). Niektóre z tych procesów mogą jednak obniżać wartość biologiczną i pogarszać właściwości funkcjonalne w stopniu zależnym od technologii przerobu i rodzaju przetwarzanego składnika. Przyczyną tych zmian są rozmaite przemiany fizyczne i enzymatyczne, wyciek zawartości uszkodzonych komórek oraz termiczna

degradacja składników lub ich ekstrakcja do ciekłego ośrodka, np. podczas rozparzania lub gotowania.

Stosując odpowiedni sposób mielenia i separacji poszczególnych frakcji nasion szarłat można uzyskać mąkę wzbogaconą w białka, lipidy i substancje mineralne, znajdujące się głównie w zewnętrznej części nasienia (Berganza i in., 2003; Tosi i in., 2001). Mąkę służącą do wytwarzania niektórych produktów z szarłat otrzymuje się często ze słodowanych nasion. Podczas kiełkowania następuje zwiększenie zawartości lizyny i udziału frakcji rozpuszczalnych w wodzie białek oraz wzrost ich ogólnej zawartości wynoszący wg niektórych autorów aż 25-30%. Opublikowane w różnych opracowaniach informacje różnią się jednak dość znacznie (Colmenares de Ruiz i Bressani, 1990; Gamel i in., 2005; Schnetzler i Breene, 1994). Wymienione przemiany białek odbywają się kosztem spadku ilości lipidów, skrobi i innych cukrów wykorzystywanych przez rozwijający się zarodek, a uzyskany produkt posiada charakterystyczne różowe zabarwienie. Wskutek słodowania zmniejsza się też zawartość fityny i błonnika, a wzrasta udział witamin, głównie kwasu askorbinowego i ryboflawiny oraz w mniejszym stopniu pirydoksyny, tiaminy, biotyny i niacyny (Colmenares de Ruiz i Bressani, 1990). Zbyt intensywne suszenie słodu w temperaturze 70-90°C powoduje jednak spadek zawartości wszystkich witamin oraz zmniejszenie dostępności aminokwasów i strawności białek (Gamel i in., 2006a).

Innym sposobem modyfikacji mąki szarłat jest katalizowana α -amylazą częściowa hydroliza skrobi przebiegająca w temperaturze 80-90°C. Po odwirowaniu uzyskuje się dwie frakcje: rozpuszczalną, zawierającą po liofilizacji głównie oligosacharydy i tylko 1% białek oraz precypitat, w którym znajduje się 30-40% białek, 13-20% lipidów, 20% cukrów oraz 1% nierozłożonej skrobi (Schnetzler i Breene, 1994). Frakcję tę ze względu na dobrą wartość biologiczną można wykorzystać jako substytut mleka.

Dość popularnym produktem są ekspandowane nasiona szarłat. Podczas ich wytwarzania następuje wynoszące 7-15% zmniejszenie dostępności lizyny oraz wzrost strawności białek, będący wynikiem rozfałdowania ich cząsteczek w podwyższonej temperaturze (Gamel i in., 2004). Ekspandowanie jest także przyczyną zwiększenia zawartości rozpuszczalnego błonnika kosztem frakcji nierozpuszczalnej, spowodowanego prawdopodobnie częściową hydrolizą niektórych polisacharydów pod wpływem ogrzewania w wilgotnym środowisku (Grajeta, 2000). Skutkiem podwyższenia temperatury jest także nasilenie reakcji Maillarda, degradacja i utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych (głównie linolowego i linolenowego) oraz około 3-krotny wzrost ilości wolnych kwasów tłuszczowych wywołany hydrolizą lipidów. Niekorzystnym efektem ekspandowania są dość duże straty witamin, a szczególnie witaminy C, której ilość maleje o około 40% początkowej zawartości (Gamel i in., 2006a).

Główną przyczyną niewielkich ubytków białek, węglowodanów, lipidów i substancji mineralnych podczas termicznej obróbki nasion i liści szarłatu w wodzie jest ekstrakcja tych składników w podwyższonej temperaturze. Wielkość strat zależy w dużym stopniu od temperatury i czasu trwania procesu oraz od rodzaju składnika. Podczas gotowania następuje zmniejszenie zawartości lipidów o około 6-8% ich początkowej ilości oraz wzrost udziału glutelin spowodowany intensywniejszą ekstrakcją albumin charakteryzujących się lepszą od innych białek rozpuszczalnością (Gamel i in., 2005 i 2006a). Następuje też usunięcie niewielkiej ilości skrobi. Skutkiem ekstrakcji są znaczne straty sodu, magnezu i żelaza i niewielkie zmiany zawartości innych składników mineralnych (Gamel i in., 2006a). Niekorzystnym efektem gotowania jest duży ubytek witamin, a szczególnie witaminy C i niacyny, wywołany ich ekstrakcją i termiczną degradacją. Gotowanie lub blanszowanie skutecznie obniża zawartość szczawianów i azotanów (V) występujących w liściach szarłatu w ilości utrudniającej przyswajanie wapnia i niektórych innych pierwiastków. Ponieważ liście szarłatu są stosowane do sporządzania rozmaitych surówek, szczawiany są uważane za dość istotny czynnik antyżywniowy i dąży się do selekcjonowania gatunków szarłatu o ograniczonej zawartości tego składnika. Obróbka termiczna jest skutecznym sposobem inaktywacji lub usuwania także innych składników antyżywniowych szarłatu, eliminującym w zupełności ich niekorzystne oddziaływanie (Ferreira i Arêas, 2004). Podczas gotowania zmniejsza się zawartość związków fenolowych (o 24-32% początkowej ilości), którego skutkiem jest jednak niepożądane obniżenie przeciwutleniającego działania szarłatu (Gamel i in., 2006b; Salunkhe i in., 1982). Suszenie nasion w podwyższonej temperaturze jest mniej skuteczne od gotowania i ilość rozłożonych związków fenolowych jest ponad 2-krotnie mniejsza. Gotowanie powoduje też prawie zupełną inaktywację inhibitora chymotrypsyny i 60-70% zmniejszenie aktywności inhibitora trypsyny. Ponadto wszystkie procesy termiczne są przyczyną spadku zawartości fityny o około 20% podczas gotowania i o 15% w przypadku ekstruzji (Gamel i in., 2006b).

7. Perspektywy wykorzystania szarłatu

Przytoczone informacje świadczą o przydatności nasion i liści szarłatu do wytwarzania zdrowotnej żywności, której korzystne działanie jest między innymi skutkiem znacznej zawartości białek o pełnej wartości biologicznej, lipidów charakteryzujących się korzystną proporcją nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, przeciwutleniaczy oraz stosunkowo dużej ilości substancji mineralnych i niektórych witamin. Istotną zaletą szarłatu jest hipocholesterolemiczne oddziaływanie spowodowane występowaniem błonnika, skwalenu i tokotrienoli (Paśko i Bednarczyk, 2007).

Oprócz wzbogacania produktów zawierających zboża tradycyjne szarłat jest użyteczny jako składnik dietetycznej żywności przeznaczonej dla ludzi ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego, a także w leczeniu celiakii (Rutkowska, 2006). Nasiona szarłat ze względu na znaczną zawartość składników mineralnych są zalecane osobom z chorobami układu kostnego oraz kobietom w ciąży i okresie połogu (Paško i in., 2007). Zbliżona do kazeiny wartość biologiczna białek szarłat świadczy o możliwości ich wykorzystania do wytwarzania produktów mlekozastępczych przydatnych dla ludzi uczulonych na białka mleka lub cierpiących na nietolerancję laktozy. Dla ułatwienia i rozpowszechnienia upraw szarłat, a także zwiększenia jego użyteczności pożądane są genetyczne modyfikacje tej rośliny zwiększające odporność na obniżenie temperatury, skracające okres jej wegetacji oraz wpływające na obniżenie zawartości szczawianów w liściach.

Obecnie szarłat wchodzi w skład różnych produktów spożywczych głównie w krajach, w których uprawia się tę roślinę w dużych ilościach. W Meksyku spożywa się tradycyjne *atole*, napój lub kleik sporządzony z pieczonych nasion, syropu i wody, a także *pinole*, mąkę z ekspandowanych nasion szarłat. Innym meksykańskim produktem cukierniczym jest *alegría*, składająca się z ekspandowanych nasion oraz melasy lub syropu. Innymi wyrobami cukierniczymi otrzymywanymi z szarłat są popularny w Peru *bollos* (ekspandowane nasiona z syropem), *alboroto* w Gwatemali oraz *laddos* w Indiach. Ponadto w Himalajach z mąki szarłat wytwarza się naleśnikopodobne *chapattis*, a w Nepalu *sattoo* - kleiki otrzymywane z prażonych nasion i wody. W Peru z fermentowanych nasion szarłat otrzymuje się piwo - *chicha* (Schnetzler i Breene, 1994). Z nasion szarłat produkuje się też: kasze, makarony, kleiki, precelki, chrupki, krakersy, wafle, tosty, tortille, mussli, popping oraz dodaje się je do chleba, bułek i ciast w celu poprawienia wartości odżywczej tych wyrobów (Grajeta, 2000). Wytwarzane są także imitacje chleba ziarnistego, przyprawy sałatkowe, imitacje masła orzechowego i majonezu, mleko amarantusowe, pilawy, pudingi, soki oraz wiele innych produktów (Nalborczyk, 1995). Produkty z szarłat mogą stanowić cenne uzupełnienie i urozmaicenie diety. Niewielki dodatek zmielonych lub ekspandowanych nasion zwiększa objętość, pulchność i elastyczność pieczywa oraz skraca czas fermentacji ciasta działając jako naturalny polepszacz (Haber i in., 1995; Rutkowska, 2006). Pieczywo z dodatkiem mąki szarłat wykazuje podwyższoną trwałość i przedłużoną świeżość w porównaniu do pieczywa pszennego i żytniego, a także ma lepszy kolor i mniejszą kruchość (Ambroziak i in., 1995; Sindhuja i in., 2005). W przemyśle mięsnym dodatek mąki lub mieszaniny skrobi i koncentratów białka szarłat do wędlin i pasztetów (również bezglutenowych), ułatwia emulgowanie farszu mięsnego. Dzięki temu następuje obniżenie kosztów produkcji oraz polepszenie zdrowotności wędlin (Kowal, 2000). Dodatek szarłat do zacierów gorzelnicznych podczas produkcji etanolu przyspiesza fermentację i zwiększa wydajność alkoholu (Dobrzyniecka i in., 1996).

W krajach rozwijających się odpowiednia kombinacja nasion szarłat, owsa, pszenicy, prosa, jęczmienia, kukurydzy i soi może znacząco podwyższać zawartość białka i tłuszczu w diecie dzieci (Grajeta, 1997a). Żywność z dodatkiem szarłat jest szczególnie polecana wegetarianom, alergikom, rekonwalescentom, sportowcom, kobietom w ciąży oraz osobom w starszym wieku. Nasiona szarłat mogą być podstawą diety dla osób chorych na celiakię (Rutkowska, 2006). Wykorzystanie mąki oraz ekspandowanych nasion szarłat jest korzystne dzięki zawartości błonnika i nienasyconych kwasów tłuszczowych (Grajeta, 2000). Ziarna szarłat były np. składnikiem racji żywieniowych dla astronautów z NASA (Svirskis, 2003). Do sporządzania rozmaitych potraw wykorzystuje się także liście oraz młode pędy i łodygi szarłat, które są spożywane w postaci sałatek i surówek lub gotuje się je w wodzie lub na parze (Svirskis, 2003). Ponadto przeprowadza się marynowanie liści, a z gotowanych przyrządza się zupy i sosy (Grajeta, 1997a; Schnetzler i Breene, 1994).

Badania amerykańskie wykazały, że nasiona szarłat ograniczają rozwój wirusów „Herpes” wywołujących np. ospę wietrzną, półpasiec i opryszczkę. Wywar z liści szarłat wykazuje działanie gojące i antyseptyczne oraz jest przydatny w leczeniu zapalenia gardła oraz błony śluzowej żołądka. U ludzi starszych szarłat wzmacnia system nerwowy oraz hamuje rozwój gruźlicy i wrzodów żołądka (Kowal, 2000). Kwiatostany, liście oraz nasiona szarłat można wykorzystać jako źródło naturalnych barwników żywności (Cai i in., 2005; Szot, 1999). Są one źródłem betalain, występujących jeszcze tylko w burakach ćwikłowych, owocach opuncji figowej oraz nie spożywanych przez człowieka grzybach. Buraki ćwikłowe są jedynym dotychczas wykorzystywanym źródłem betalain, zawierającym w suchej masie około 1% tych barwników. Betanina, nazywana również czerwienią buraczną oznaczaną symbolem E 162, jest stosowana jako naturalny czerwony barwnik spożywczy do barwienia produktów obojętnych lub mało kwaśnych i nie poddawanych ogrzewaniu, takich jak przetwory mleczne i desery (Wilska-Jeszka, 2007). Betanina wykazuje również właściwości prozdrowotne, jest ona efektywnym przeciwutleniaczem hamującym peroksydację lipidów (Kanner i in., 2001), a także posiada pewną aktywność przeciwnowotworową i przeciwwirusową (Wilska-Jeszka, 2007). Barwniki izolowane z kwiatostanów lub liści szarłat, których zawartość w świeżym materiale roślinnym mieści się w zakresie 46-199 mg/100 g, mogą znaleźć zastosowanie w barwieniu produktów żywnościowych, podobnie jak betalainy z buraków ćwikłowych (Cai i in., 1998).

Skrobia z nasion szarłat, ze względu na niewielkie rozmiary ziaren oraz dużą odporność żelu na zamrażanie i rozmrażanie, jest przydatna jako środek zagęszczająco-stabilizujący w produkcji majonezów niskotłuszczowych, mrożonych deserów, ciastek, sosów i wyrobów mięsnych (Calzetta Resio i in., 1999; Szot, 1999). Może być ona również stosowana do produkcji klejów,

puddingów kosmetycznych, aerozoli hipoalergicznym i krochmalu oraz jako składnik biodegradowalnych opakowań i nośników różnych substancji (Calzetta Resio i in., 2004; Lindeboom i in., 2004). Folie wytworzone z udziałem skrobi szałatu mają dobre właściwości barierowe dla tlenu i pary wodnej, ale wykazują mniejszą wytrzymałość mechaniczną od innych filmów białkopolisacharydowych (Avanza i in., 2005; Tapia-Blácido i in., 2005).

Nasiona szałatu mogą być też stosowane w hodowli ryb i drobiu (Pisarikova i in., 2006; Virk i Saxena, 2003), a zielone części rośliny do przygotowywania kiszzonek służących do skarmiania trzody chlewnej (Ojo, 1997). Dodatek szałatu do pasz zwiększa szybkość przyrostu masy mięśniowej, zmniejszając otłuszczenie zwierząt oraz intensyfikuje wytwarzanie mleka u bydła (Nalborczyk, 1995; Rywotycki, 2005). Natomiast łodygi szałatu mogą służyć jako słoma, materiał opałowy lub surowiec do produkcji bioetanolu (Svirskis, 2003; Szot, 1999).

8. Otrzymywanie i przydatność preparatów białek roślinnych

Jednym ze sposobów zagospodarowania śrutym poekstrakcyjnej szałatu jest jej wykorzystanie do produkcji preparatów białkowych. Można do tego celu zaadoptować opracowane już technologie izolowania białek z surowców roślinnych. Wprowadzone modyfikacje powinny stwarzać możliwość wykorzystania wszystkich użytecznych składników śrutym oraz zapewnić wytwarzanie preparatów o dobrych właściwościach funkcjonalnych.

Preparaty białkowe pochodzenia roślinnego są zazwyczaj wytwarzane ze śrutym poekstrakcyjnej nasion oleistych, nasion roślin strączkowych (grochu, fasoli, soi, łubinu, bobu), zielonych części wegetatywnych roślin, takich jak lucerna lub koniczyna oraz wielokomórkowych glonów morskich, głównie krasnorostów i brunatnic. Istnieją dwie podstawowe metody odzyskiwania białek z surowców roślinnych, polegające na ich ekstrakcji lub na hydrolizie enzymatycznej albo kwasowej. Przez wytrącenie białek z ekstraktu, np. w punkcie izoelektrycznym (pI) otrzymuje się izolaty białkowe. Produkty otrzymane z zastosowaniem reakcji hydrolizy są natomiast nazywane hydrolizatami białkowymi. Uzyskane preparaty białkowe są przydatne nie tylko jako dodatek do żywności, ale mają też wiele innych zastosowań, np. jako komponent biodegradowalnych materiałów oraz powłok o pożądanym właściwościach mechanicznych i barierowych. Białka uzyskane z roślin są ponadto stosowane do produkcji papieru, klejów i spoiw oraz jako stabilizator różnego rodzaju pian i emulsji, np. farb, medykamentów lub kosmetyków (Antonini i in., 1999; Askew, 2004; Larré i in., 2006). Kluczowym problemem utrudniającym wykorzystanie białek ze śrutym poekstrakcyjnej jest ich denaturacja pod wpływem warunków procesu ekstrakcji oleju (Vioque i in., 2000) powodująca pogorszenie właściwości funkcjonalnych uzyskanych preparatów

(Moure i in., 2006; Yoshie-Stark i in., 2006). Można temu częściowo zapobiec modyfikując proces pozyskiwania tłuszczów z nasion roślin olejodajnych (Guderjan i in., 2007). Modyfikowanie procesów polega między innymi na zastąpieniu ekstrakcji lub tłoczenia w podwyższonej temperaturze tłoczeniem na zimno, odolejaniu za pomocą ekstruzji albo usuwaniu rozpuszczalnika pod obniżonym ciśnieniem zamiast na gorąco. Innym sposobem jest zastosowanie ekstrakcji enzymatycznej, pozwalającej na uzyskanie preparatów o dobrej rozpuszczalności (Askew, 2004). Korzystne jest też stosowanie pulsacyjnego pola elektrycznego przed procesem ekstrakcji oleju (Guderjan i in., 2007) lub poprzedzenie ekstrakcji obróbką wstępną śruty za pomocą rozmaitych hydrolaz glikozydów takich jak pektynazy, celulazy czy β -glukanazy (Zhang i in., 2007a).

Funkcjonalne właściwości pozyskiwanych preparatów białkowych mogą być kształtowane w wyniku odpowiednio dobieranych warunków procesów, którym poddawany jest materiał wyjściowy (Moure i in., 2006). Zastosowanie odpowiednich technik oraz warunków izolacji białek z odtłuszczonej mączki sprawia, że otrzymane preparaty są pozbawione substancji antyodżywczych i mogą być stosowane do wzbogacania żywności (Piecyk i Klepacka, 2004).

9. Izolaty białkowe

W zależności od zastosowanej metody izolacji uzyskuje się wysokobiałkowe preparaty różniące się rodzajami i strukturą białek, jakością, a także właściwościami funkcjonalnymi (Moure i in., 2006). Stopień ekstrakcji białek oraz właściwości funkcjonalne tych preparatów kształtują się w zależności od rodzaju i surowca (Piecyk i Klepacka, 2004). Usunięcie rozpuszczalnych w wodzie składników mineralnych, cukrów i substancji antyodżywczych przez ich ekstrakcję w obojętnym lub kwaśnym środowisku prowadzi do otrzymania koncentratów zawierających 48-70% białka. Natomiast ekstrakcja w środowisku alkalicznym pozwala na odzyskanie z surowca 85-90% białek w postaci izolatu (Moure i in., 2006). Rodzaj i siła jonowa roztworu ekstrahującego oraz temperatura i odczyn środowiska mają duży wpływ na strukturę cząsteczek białka, kształtują jego rozpuszczalność i inne właściwości funkcjonalne. Białka o dużym ładunku elektrycznym i małej hydrofobowości łatwo rozpuszczają się w fazie wodnej, natomiast proteiny bogate w hydrofobowe reszty aminokwasów są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Najczęściej izolaty białek roślinnych (soi, rzepaku, arachidu, bawełny) uzyskuje się ekstrahując białka w środowisku alkalicznym. Maksymalna wydajność ekstrakcji jest osiągana przy pH ok. 11, ale najczęściej stosuje się bardziej rozcieńczone roztwory (0,03-0,1 M) NaOH o pH w granicach 8,0-9,0 w celu uniknięcia niekorzystnych zmian białek (Molina Ortiz i Wagner, 2002; Rutkowska i Kozłowska, 1981). Zależność stopnia ekstrakcji białek od temperatury jest zróżnicowana. W zakresie do 40°C

rozpuszczalność wielu białek wzrasta wraz z temperaturą. Podwyższenie temperatury i utrzymywanie jej przez dłuższy czas powoduje natomiast denaturację i strącanie białek z roztworu (Pelegrine i Gasparetto, 2005). Takie białka są po wysuszeniu mało rozpuszczalne w wodzie, jak np. preparat białek uzyskany przez ekstrakcję rozdrobnionej ryby wrzącym azeotropowym roztworem izopropanolu. Wyjątkiem jest kolagen, który w podwyższonej temperaturze rozpuszcza się wskutek przekształcenia w żelatynę (Sikorski, 2000). Wydajność ekstrakcji białek z nasion soi wzrasta o 0,25% przy wzroście temperatury procesu o 1°C, osiągając maksimum przy 80°C (Rutkowska i Kozłowska, 1981). Zazwyczaj ekstrakcję prowadzi się przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, czasem powtarzając ją kilkakrotnie z zastosowaniem w każdym etapie świeżego rozpuszczalnika (Sánchez-Vioque i in., 1998). Po oddzieleniu nierozpuszczalnego osadu ekstrakt należy zakwasić do pH 4,5-5,0, co jest przyczyną strącenia białek wskutek osiągnięcia przez większość z nich punktu izoelektrycznego (pI). Wytrącone białka zawierają niewiele zanieczyszczeń nierozpuszczalnych, co sprawia że preparat po przemyciu wodą lub roztworem alkoholu i wysuszeniu zawiera ponad 90% białka (Piecyk i Klepacka, 2004). W podobny sposób, z ponad 90% wydajnością, otrzymuje się izolaty białek nasion arachidu (Rutkowska i Kozłowska, 1981). Ze względu na tworzenie kompleksów z kwasem fitynowym, wydajność izolatów białek rzepaku, otrzymywanych przez ekstrakcję w zasadowym środowisku i strącanie w pI jest znacznie mniejsza i nie przekracza 40%. Izolaty tych białek posiadają pożądane właściwości pianotwórcze i stabilizujące emulsje oraz dość dużą termostabilność (Xu i Diosady, 1994). Alkaliczna ekstrakcja białek, a następnie strącanie i suszenie sprawia, że ich izolaty są pozbawione glikozynolanów ale zawierają polifenole, głównie taniny (ok. 20 mg/g), które obniżają wydajność ekstrakcji i wartość odżywczą preparatów w wyniku tworzenia kompleksów z białkami (Jędrusek-Golińska i in., 2003). Wadą alkalicznej ekstrakcji jest pogorszenie jakości preparatu, gdyż traktowanie alkalią niszczy częściowo aminokwasy egzogenne (Zalewski i Jędrzejczyk, 1999). Preparaty białkowe uzyskane w wyniku alkalicznej ekstrakcji oraz izolaty otrzymane przez ekstrakcję roztworami soli mineralnych są zawsze zanieczyszczone pewną ilością węglowodanów (Jędrusek-Golińska i in., 2003; Sánchez-Vioque i in., 1998). Obecność cukrów w izolatach nie jest jednak niekorzystna, bo może wzmacniać ich właściwości pianotwórcze (Moure i in., 2006).

Dość skutecznym czynnikiem ekstrahującym białka są roztwory soli mineralnych. Do izolacji białek z roślin strączkowych wykorzystuje się 0,1-0,5 M roztwory NaCl (Jyothirmayi in., 2006), a z rzepaku 0,25% i 2% roztwory Na₂SO₃ (Sánchez-Vioque i in., 1998; Vioque i in., 2000). Otrzymane izolaty zawierają ponad 97% białek (Jyothirmayi in., 2006; Vioque i in., 2000). Stosowanie do ekstrakcji roztworów Na₂SO₃ zapobiega utlenianiu polifenoli prowadzącego do powstawania ciemnego zabarwienia produktu finalnego (Moure i in., 2006). Roztwory soli

sodowych, zwłaszcza wodorowęglany i chlorki oraz wodne roztwory alkoholi (etanol, butanol, izopropanol) wpływają na obniżanie zawartości związków fenolowych i oligosacharydów w preparatach (Moure i in., 2006). Stosowanie roztworów soli zmniejsza też zanieczyszczenie ekstraktu lipidami pochodzącymi z przetwarzanego surowca (Sánchez-Vioque i in., 1998). Proces obejmujący ekstrakcję roztworem cykloheksafosforanu (V) sodu, ultrafiltrację, strącanie w pl, dializę oraz suszenie umożliwia otrzymywanie izolatów białek rzepaku z wydajnością ok. 70%, a produkt zawiera mniej niż 2% fitynianów i jest całkowicie pozbawiony kwasu erukowego (Sikorski, 2000). Możliwe jest także otrzymanie izolatów białek rzepaku z ponad 90% wydajnością. Metoda ta polega na homogenizacji nasion w 3% wodnym roztworze NaCl, następnie na strąceniu białek przez zakwaszenie ekstraktu do pH 3,1. W celu zwiększenia odzysku białek można stosować związki kompleksujące wiążące niskocząsteczkowe nieskoagulowane białka, umożliwiając wskutek tego ich strącenie. Osad zawierający kompleksy białkowe rozpuszczany jest przez doprowadzenie roztworu do pH 9,5 za pomocą 0,1 M NaOH. Uzyskany alkaliczny roztwór jest następnie ogrzewany do 100°C, co wywołuje koagulację białek (Rutkowska i Kozłowska, 1981). Około 80% białek z nasion soi można wyekstrahować przy pH 6,8, a następnie strącić w punkcie izoelektrycznym (pH 4,5) (Rutkowska i Kozłowska, 1981).

Właściwości funkcjonalne preparatów białkowych zależą od stosowanej metody strącania białek. Jednym ze sposobów ich precypitacji jest wysalanie polegające na destrukcji warstwy hydratacyjnej cząsteczek przez jony pochodzące z rozpuszczalnych soli. Stężenie soli potrzebne do wysolenia białka zależy od jego właściwości i od pH środowiska. Białko najłatwiej jest wysoliczyć w punkcie izoelektrycznym, gdyż brak ładunków elektrycznych sprzyja łączeniu się cząsteczek w większe agregaty. Wysalanie białek jest procesem odwracalnym i po zmniejszeniu stężenia soli, np. w wyniku dializy, można ponownie rozpuścić strącone białko. Zachowuje ono swoje rodzime właściwości, ponieważ wysalanie nie powoduje denaturacji (Szostek, 2000). Ze względu na duże stężenie soli wysalanie nie jest dobrą metodą otrzymywania precypitatów białkowych wykorzystywanych w przemyśle żywnościowym. Efekt podobny do wysalania wywołuje dodanie do roztworu białka acetonu lub etanolu. Działanie rozpuszczalników jako czynników powodujących strącanie białek polega na zmniejszeniu stałej dielektrycznej roztworu. Jeżeli rozpuszczalniki działają w niskiej temperaturze i niezbyt długo, białko nie ulega denaturacji i można je łatwo rozpuścić (Milewski, 2000).

Innym sposobem usunięcia białek z mieszaniny jest zmiana pH roztworu ekstrahującego do wartości, przy której białko posiada najmniejszą rozpuszczalność (pl) i wypada z roztworu. Czasem etap precypitacji wspomagany jest dodaniem do roztworu związków kompleksujących (siarczanu skrobi, siarczanu dekstranu, polifosforanów, tanin, karboksymetylocelulozy lub kwasu

trichlorooctowego), które wiążą nieskoagulowane niskocząsteczkowe białka (Moure i in., 2006; Rutkowska i Kozłowska, 1981). Ciepła precypitacja zwiększa wydajność strącania białek, ale pogorsza ich właściwości funkcjonalne. Możliwe jest także wydzielanie białek z ekstraktu przez ultrafiltrację. Jej stosowanie pozwala na odzyskiwanie z ekstraktu ponad 98% białek rzepaku podczas gdy wydajność ich precypitacji w pl wynosi ok. 70% (Yoshie-Stark i in., 2008). Białka oddzielone przez ultrafiltrację mają dobre właściwości funkcjonalne, co wynika z łagodniejszych warunków procesu (Makri i Doxastakis, 2006). Po ultrafiltracji izolaty białek wykazują pożądane właściwości pianotwórcze i są dobrze rozpuszczalne w zakresie pH 5,0-9,0, podczas gdy precypitaty białek strącanych w pl osiągają największą rozpuszczalność przy pH 7,0-9,0. W środowisku kwaśnym precypitaty białek są nierozpuszczalne zaś rozpuszczalność ultrafiltratów wynosi 50-60% (Yoshie-Stark i in., 2008). Izolacja białek w pl może powodować częściowe rozfaldowanie łańcuchów polipeptydowych, dzięki czemu zmienia się udział poszczególnych reszt aminokwasowych na powierzchni cząsteczek. Zmienia to właściwości funkcjonalne białek. Wzrost dostępności aminokwasów polarnych zwiększa wodochłonność, natomiast niepolarnych wpływa na poprawę zdolności emulgowania.

W podobny sposób, jak izolaty białek roślinnych, otrzymuje się izolaty białek mięśniowych. Pozyskuje się je głównie z pozostałości po mechanicznym odmięśnianiu bydłowych, wieprzowych i drobiowych elementów kostnych, a także pancerzy skorupiaków. Można również zastosować ekstrakcję wodą lub roztworami soli, ale najbardziej wydajne jest odbiałczanie roztworami NaOH lub KOH. Ekstrakcja wodą umożliwia wyizolowanie z pancerzy krabów i krewetek niewielkiej ilości znajdujących się w nich białek, a ponadto nie niszczy substancji o charakterystycznym zapachu skorupiaków (Shahidi i in., 1995). Alkaliczna ekstrakcja białek mięśniowych przy pH 9,0-10,5 i ich odzyskanie przez zakwaszenie roztworu do wartości pl 4,5-5,0 wydaje się być najlepszą metodą ich pozyskiwania pod względem wydajności i bezpieczeństwa procesu. Wyższe pH ekstrakcji może powodować powstawanie składników o niekorzystnym oddziaływaniu fizjologicznym (Betti i Fletcher, 2005). Prawdopodobieństwo powstania lizynoalaniny, lantioniny i ornitynoalaniny i związany z tym spadek zawartości lizyny i cystyny oraz racemizacja aminokwasów są większe, jeśli ekstrakcję białek prowadzi się przy pH powyżej 13 przez kilka godzin, w temperaturze ponad 30°C (Palka i in., 1985; Shahidi i Synowiecki, 1996). Ekstrakcja białek jest zatem najczęściej prowadzona 0,02-5 M roztworami NaOH w temperaturze pokojowej przez 30 do 60 min (Betti i Fletcher, 2005; McCurdy i in., 1986). Białka wyizolowane zasadą są bogatsze w kwas asparaginowy i glutaminowy, leucynę, lizynę i tyrozynę w porównaniu do izolatów białek wyekstrahowanych wodą i posiadają pożądane właściwości emulgujące i stabilizujące emulsje (Shahidi i Synowiecki, 1996).

Izolaty białkowe z mięsa kurcząt są dobrymi stabilizatorami emulsji, a ich wartość odżywcza jest wyższa od kazeiny (Ozimek i in., 1986).

Wydajność ekstrakcji białek można zwiększyć przez wspomaganie działaniem enzymów (Claver i Zhou 2005). Sposób ten jest szczególnie przydatny w przypadku surowców, które nie nadają się do wstępnej obróbki mechanicznej z powodu małych rozmiarów lub specyficznej budowy albo odpadów przemysłowych, jak np. otrąb pszennych lub łusek ryżu (Kołakowski, 2005). Wydajność alkalicznej izolacji białek z nasion wiesiołka dziwnego wzrasta do 80% jeśli przebiega z udziałem kompleksu enzymów celulolitycznych (Gołąbczak, 2005). Skuteczność ekstrakcji białek zbóż zwiększają też enzymy degradujące pektyny i hemicelulozę. W procesie otrzymywania izolatu białkowego z kryla antarktycznego wykorzystano autoproteolizę katalizowaną aktywnymi w niskiej temperaturze enzymami tego skorupiaka. Proces przebiegał w temperaturze 25-30°C przez 30-60 min, a wytrącenie białek następowało po podgrzaniu ich roztworu do 90°C. Do otrzymywania izolatów białkowych z surowców mięsnych i ryb pozbawionych wnętrzości stosuje się łagodną hydrolizę przy użyciu preparatów papainy, trypsyny lub neutrazy, działających przy pH zbliżonym do obojętnego (6,6-6,7). Wyekstrahowane białka są następnie strącane heksametafosforanem sodu w silnie kwaśnym środowisku (Kołakowski, 2005).

W celu poprawy właściwości funkcjonalnych preparatów białkowych poddaje się je różnym modyfikacjom polegającym na alkilowaniu i utlenianiu niektórych reszt aminokwasowych, np. cysteiny, cystyny, metioniny histydyny i tyrozyny, acylowaniu, w którym uczestniczą lizyna i tryptofan, lub na estryfikowaniu kwasów glutaminowego i asparaginowego. Acylowanie polepsza rozpuszczalność i zdolność tworzenia emulsji i piany, a także umożliwia tworzenie twardych żeli. Sukcynylowanie izolatów białkowych poprawia lepkość, podczas gdy acetylacja zwiększa twardość żelu utworzonego z modyfikowanych izolatów (Moure i in., 2006). Modyfikacje właściwości izolatów mogą być prowadzone także metodami fizycznymi. Traktowanie wysokim ciśnieniem lub ogrzewanie izolatów białkowych w temperaturze 100°C przez 30 min powoduje rozfałdowanie cząsteczek białek i zwiększa ekspozycję aminokwasów polarnych i niepolarnych na ich powierzchni. Dzięki temu wzrasta wodochłonność preparatów i ich zdolność do emulgowania (Piecyk i Klepacka, 2004).

Izolaty białek otrzymanych przez koagulację cieplną lub strąconych w punkcie izoelektrycznym są nierozpuszczalne w wodzie przy wartości pH równej pI oraz słabo rozpuszczalne w zakresie pH 4,0-5,0 (Molina Ortiz i Wagner, 2002). Izolaty białek sojowych znajdują zastosowanie jako dodatki poprawiające stopień związania i soczystość potraw i zapobiegające wyciekowi tłuszczu i soków. Białka soi są stabilne cieplnie, a po ogrzaniu tworzą sprężyste żele i są wykorzystywane jako substancje żelujące, zagęszczacze, emulgatory i stabilizatory emulsji oraz składniki kontrolujące proces krystalizacji (Zalewski i Jędrzejczyk, 1999). Izolaty te są także stosowane do produktów

specjalnego przeznaczenia, jako zamienniki mleka w różnego rodzaju przetworach mleczarskich i ich imitacjach (zabielacze do kawy, imitacje sera) oraz w produktach odżywczych dla niemowląt uczulonych na białka mleka i laktozę. Są też składnikiem wyrobów bezglutenowych, wlewów dożylnych, odżywek dla sportowców i osób odchudzających się. W USA ok. 12% białek soi stosuje się w postaci izolatów. Sole wapnia zmniejszają rozpuszczalność tych białek, co wykorzystuje się w krajach Wschodu do strącania skrzepu sojowego (Sikorski, 2000).

Jeśli preparaty białkowe pozyskiwane były z zasadowych ekstraktów można się spodziewać, że będą one rozpuszczalne w alkalicznym środowisku. Redukcja rozpuszczalności może jednak być spowodowana częściową denaturacją wywołaną suszeniem preparatu (Bejosano i Corke, 1999) lub polimeryzacją białek zachodzącą z udziałem produktów oksydacji tłuszczu (Sánchez-Vioque i in., 1998).

Modyfikowanie właściwości funkcjonalnych izolatów białkowych może być prowadzone na drodze limitowanej proteolizy enzymatycznej. Łagodna hydroliza ogranicza się do rozszczepienia pojedynczych wiązań peptydowych lub niewielkiej ich ilości, ulokowanych przeważnie na powierzchni cząsteczki. Modyfikowane białko posiada pożądane właściwości funkcjonalne, ale w bardzo dużym stopniu zachowuje pierwotną strukturę. Natomiast w wyniku hydrolizy następuje fragmentacja cząsteczek białek spowodowana rozszczepieniem niektórych wiązań peptydowych, co prowadzi do powstania mieszaniny poli- i oligopeptydów oraz wolnych aminokwasów. Efektem tego są zmiany właściwości białek na skutek zniszczenia ich pierwotnej konformacji oraz fragmentacji cząsteczek (Claver i Zhou 2005). Nawet nieznaczna hydroliza białek prowadzi do wzrostu ich rozpuszczalności, powoduje spadek lepkości oraz znacząco zmienia właściwości pianotwórcze i emulgujące. Inkubacja mieszaniny reakcyjnej podczas ograniczonej hydrolizy jest prowadzona w temperaturze znacznie niższej od optymalnej (15-30°C) dla danego enzymu, przez stosunkowo krótki czas (15-30 min) (Kołakowski, 2005). Łagodna proteoliza może być prowadzona także w optymalnej temperaturze działania enzymu, ale w bardzo krótkim czasie, 2,5-10 min (Aluko i McIntosh, 2005). Peptydy wytworzone w wyniku mało zaawansowanej hydrolizy szybciej od niehydrolizowanego białka osiągają powierzchnię międzyfazową i tworzą na niej filmy utrzymujące strukturę piany (Severin i Xia, 2006). Katalizowana alkalazą w czasie 5 min proteoliza izolatu sojowego spowodowała poprawę właściwości pianotwórczych i stabilizujących emulsje (Vioque i in., 2000). Proteoliza białek izolatów sojowych do wartości DH 5% zwiększa ich zdolność emulgującą, podczas gdy kontynuowanie hydrolizy do DH 9% wywołuje wyraźne pogorszenie tego parametru. Proteoliza niemal zawsze powoduje zmniejszenie stabilności emulsji. Poprawa właściwości emulgujących w wyniku ograniczonej proteolizy jest spowodowana lepszą dostępnością reszt aminokwasów hydrofobowych, co ułatwia adsorpcję na powierzchni międzyfazowej

(Surówka, 2005). Łagodna proteoliza białek izolatu sojowego zwiększa jego rozpuszczalność i powoduje, że jest ona wysoka niezależnie od wartości pH. Zeina kukurydzy, rozpuszczalna w kwaśnym środowisku w bardzo małym stopniu, poddana łagodnej proteolizie (DH 1,9%) wykazuje w tym samym zakresie pH stosunkowo dobrą rozpuszczalność (30-50%). Hydroliza glutenu pod wpływem termitazy do DH 9,8% zwiększa jego rozpuszczalność przy pH 7,0 z 7 do 50%. Łagodna hydroliza bromelainą glicyniny zwiększa 2,5-krotnie zdolność absorpcji wody przez to białko. Częściowa hydroliza sojowych izolatów białkowych pankreatyną pozwala przystosować je do rozpuszczania w kwaśnym środowisku. Ich rozpuszczalność w punkcie izoelektrycznym (pH 4,5) zwiększa się do 18,7%, podczas gdy w białku niemodyfikowanym wynosi tylko 1,6%. Izolaty takie mogą być stosowane jako specyficzne dodatki białkowe do żywności, gdzie wymagana jest duża rozpuszczalność białek przy niskim pH (Kołakowski, 2005). Częściowa hydroliza preparatów białek szarłatu papainą poprawia ich rozpuszczalność oraz właściwości pianotwórcze (Bejosano i Corke, 1999). Izolaty białek szarłatu uzyskane przez ich alkaliczną ekstrakcję i wytrącenie w pl rozpuszczają się w wodzie w ok. 40%, a modyfikowane papainą rozpuszczają się w ok. 80% (Scilingo i in., 2002). Wywołane modyfikacje silnie zależą od warunków procesu, uzyskanego stopnia hydrolizy oraz od specyficzności zastosowanego enzymu (Scilingo i in., 2002). Modyfikacja izolatów białek serwatki przy użyciu protamexu powodowała pogorszenie ich zdolności pianotwórczych, emulgujących oraz stabilizujących, podczas gdy izolaty hydrolizowane przy użyciu alkalkazy, po uzyskaniu tej samej wartości DH (5%), posiadały lepsze właściwości pianotwórcze i emulgujące w porównaniu do białek nietkniętych (Severin i Xia, 2006).

10. Hydrolizaty białkowe

Skutkiem hydrolizy jest fragmentacja cząsteczek białek spowodowana rozszczepieniem niektórych wiązań peptydowych, co prowadzi do powstania mieszaniny poli- i oligopeptydów oraz wolnych aminokwasów. Efektem tego są zmiany właściwości białek na skutek zniszczenia ich pierwotnej konformacji oraz fragmentacji cząsteczek. Hydrolizaty różnią się od macierzystych białek masą cząsteczkową, lepkością roztworów, rozpuszczalnością, zdolnością do emulgowania, pienia i stabilizacji emulsji oraz brakiem zdolności żelowania (Flaczyk, 1997; Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997). Hydroliza białek następuje pod wpływem kwasów lub zasad albo może być katalizowana enzymami. Wadą alkalicznej hydrolizy przebiegającej w podwyższonej temperaturze są reakcje uboczne powodujące racemizację aminokwasów, rozszczepienie mostków dwusiarczkowych i degradację cysteiny, seryny, tyrozyny, treoniny oraz argininy. Ponadto skutkiem alkalicznej obróbki jest zmniejszenie strawności wywołane usieciowaniem aminokwasów

oraz wytwarzaniem nieprzyswajalnych pochodnych metylo- i dehydroalaniny (Moure i in., 2006). Zachodzi też nieenzymatyczne brunatnienie oraz może powstawać lizynoalanina, ornitynoalanina, lantionina i β -aminoalanina. Obecność tych substancji w produkcie budzi zastrzeżenia zdrowotne. Lizynoalanina działa np. jako inhibitor w biosyntezie białek i katabolizmie lizyny oraz jest substratem w syntezie kancerogennych N-nitrozopochodnych. Hydroliza kwasowa polega na długotrwałym ogrzewaniu białka pod podwyższonym ciśnieniem w roztworze kwasów organicznych lub nieorganicznych (HCl, H₂SO₄) w temperaturze przekraczającej 100°C. Uzyskany w tych warunkach stopień hydrolizy jest często zbyt duży i produkt zawiera głównie wolne aminokwasy. Następuje też obniżenie wartości odżywczej wskutek: rozpadu asparaginy, cysteiny, glutaminy, treoniny, tryptofanu i niektórych innych aminokwasów, wytwarzania produktów reakcji Maillarda pomiędzy cukrami znajdującymi się w środowisku reakcji a wolnymi aminokwasami oraz powstawania aminokwasów nietypowych dla białek, takich jak lizynoalanina i kwas diaminopropionowy (Moure i in., 2006). Ze względu na niekorzystne przemiany hydrolizaty uzyskane metodami alkaliczną i kwasową są stosowane głównie w przemyśle kosmetycznym i chemicznym do produkcji szamponów, kremów, pudrów i past czyszczących oraz jako komponenty pożywek mikrobiologicznych. W przemyśle spożywczym wykorzystuje się je natomiast w niewielkim zakresie, głównie w celu przyspieszenia dojrzewania serów oraz zmniejszania ich goryczki, przy produkcji konserw rybnych w celu polepszania ich konsystencji oraz jako przyprawy bulionowe (Dzwolak i Ziajka, 1993; Flaczyk, 1997).

Hydroliza enzymatyczna umożliwia zachowanie wartości biologicznej natywnego białka i pozwala na uzyskanie hydrolizatów o zdefiniowanym profilu peptydowym (Komorowska i Stecka, 1998; Lahl i Braun, 1994). Funkcjonalne właściwości produktu mogą być kształtowane w wyniku odpowiednio dobranych warunków procesu, któremu poddawany jest materiał wyjściowy (Moure i in., 2006). Właściwości te zależą zatem od specyficzności działania użytego enzymu, sekwencji aminokwasów w białku oraz stopnia hydrolizy (Chabanon i in., 2007; FitzGerald i O'Cuinn, 2006). Niewielki stopień hydrolizy uzyskuje się zazwyczaj ograniczając temperaturę i czas trwania procesu lub stosując enzymy o dużej specyficzności działania rozszczepiające tylko niektóre wiązania peptydowe. Zwiększenie hydrofobowości powierzchniowej, wywołane rozfałdowaniem cząsteczek i odsłonięciem reszt hydrofobowych aminokwasów zlokalizowanych wewnątrz natywnego białka, poprawia właściwości emulgujące. Przy zbyt dużym stopniu hydrolizy następuje jednak ubytek zdolności emulgowania i stabilizowania emulsji wskutek zmniejszania liczby cząsteczek peptydów zawierających zarówno domeny hydrofilowe i hydrofobowe (Vioque i in., 2000). Właściwości emulgujące hydrolizatu zależą także od specyficzności użytego enzymu, która wpływa na wielkość i skład aminokwasowy cząsteczek peptydów (Synowiecki i Sikorska-

Wiśniewska, 1997). Do tworzenia i stabilizacji emulsji między innymi wykorzystywane białka mleka i soi, które są często modyfikowane enzymatycznie w celu poprawy ich skuteczności działania (Flaczyk, 1997). Użyteczne są także hydrolizaty kolagenowe, które rozpuszczają się w zimnej wodzie i mają właściwości dyspergujące, klejące oraz stabilizujące emulsje, zmieniając korzystnie konsystencję pasztetów, past i konserw rybnych. Ze względu na właściwości emulgujące hydrolizaty stosowane są w produkcji past czyszczących i pudrów kosmetycznych (Flaczyk, 1997). Hydrolizaty białek z roślin oleistych służą jako zamienniki żółtka jaja pełniąc funkcję stabilizatora emulsji w majonezach (Aluko i McIntosh, 2005). Enzymatyczne hydrolizaty białkowe wykazują też zdolność do tworzenia i stabilizowania piany i dlatego są stosowane przy produkcji deserów piankowych, ciastek oraz galaretek owocowych, a w przemyśle kosmetycznym do produkcji szamponów i kremów. Hydrolizat z nasion bawełny otrzymany za pomocą proteazy z *Aspergillus oryzae* wykazuje większą o 90% zdolność do tworzenia emulsji oraz polepszoną o 40% skuteczność tworzenia piany w porównaniu z nieprzetworzoną mączką (Rahma i Narasinga Rao, 1983). Selektywna hydroliza kazeiny prowadzi do wydzielenia peptydów o bardzo dobrych właściwościach funkcjonalnych. Peptyd α_{S1} -kazeiny uwalniany pod wpływem chymozyny lub pepsyny posiada właściwości emulgujące w środowisku kwaśnym, zaś peptydy uwalniane przez plazminę z β -kazeiny wykazują właściwości pianotwórcze. Produkty zaawansowanej hydrolizy nie mają właściwości żelujących, co utrudnia wytwarzanie dietetycznej żywności, np. dla dzieci uczulonych na białko. Małocząsteczkowe peptydy mimo braku zdolności żelowania zwiększają jednak stabilność i trwałość żelu skrobiowego. Przy wzroście stopnia hydrolizy zwiększa się rozpuszczalność białek i zanika zdolność strącania się w punkcie izoelektrycznym oraz wysalania nawet w obecności kationów dwuwartościowych. Polepszenie rozpuszczalności rozszerza obszar aplikacji hydrolizatów (Vioque i in., 1999), bo cecha ta jest głównym czynnikiem determinującym pozostałe właściwości funkcjonalne (Pelegrine i Gasparetto, 2005). Izolaty większości białek roślinnych, a zwłaszcza preparaty białek strąconych w pl, są słabo rozpuszczalne w zakresie pH 4,0-5,0, co utrudnia ich wykorzystanie jako składnika kwaśnych napojów i dressingów (Molina Ortiz i Wagner, 2002). Dobra rozpuszczalność hydrolizatów białkowych w szerokim zakresie pH stwarza możliwość ich stosowania do produkcji napojów wysokoenergetycznych (Xu i Diosady, 1994). Mogą one zastępować również inne białka roślinne w produktach i napojach o niskim pH oraz są przydatne jako surogat białka jaja kurzego w produktach dla ludzi z alergią (Yoshie-Stark i in., 2008). Zdolność obniżania aktywności wody wpływa korzystnie na trwałość zawierających hydrolizaty wyrobów mięsnych i wędlin wskutek ograniczenia rozwoju drobnoustrojów (Yoshie-Stark i in., 2006). Odporność na strącanie się w temperaturze pasteryzacji umożliwia zastosowanie modyfikowanych

enzymatycznie białek do polepszenia wartości żywieniowej napojów i skondensowanych produktów żywnościowych (Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997).

Hydrolizaty białkowe wykazują właściwości przeciwutleniające, wywołane przez wolne aminokwasy, peptydy oraz produkty reakcji Maillarda (Flaczyk, 1997). Efektywność przeciwutleniająca hydrolizatów zwiększa się wraz ze wzrostem długości łańcucha peptydowego i zawartości wolnych grup tiolowych, aminowych i karboksylowych pochodzących od tryptofanu, histydyny, cysteiny, metioniny, argininy, lizyny, proliny i tyrozyny. Obecność pierścienia fenylowego obniża natomiast oddziaływanie przeciwutleniające. Aminokwasy współdziałają z tokoferolami tworząc chelaty z prooksydacyjnymi jonami metali. Działanie przeciwutleniające hydrolizatów jest skutkiem regeneracji przeciwutleniaczy fenolowych, tworzenia kompleksów z jonami metali i kwasami tłuszczowymi oraz blokowania podatnych na utlenianie grup metylenowych i rodników lipidowych (Flaczyk, 1997). Znajdujące się w hydrolizatach peptydy mają zdolność wychwytywania wolnych rodników i hamowania przez to procesów oksydacji lipidów (Korhonen i Pihlanto, 2006). Aktywność „zmiatania” rodników zależy od rodzaju enzymu proteolitycznego oraz od stopnia hydrolizy białka (Cumby i in., 2008). Hydrolizaty stosowane jako przeciwutleniacze nie powinny jednak zawierać zbyt dużo wolnych aminokwasów działających przy nadmiernym stężeniu jako prooksydanty (Kołakowski, 2005). Występująca w mięsie bielugi karnozyna, która jest dipeptydem o sekwencji β -Ala-His skutecznie ogranicza reakcje utleniania lipidów katalizowane jonami żelaza, hemoglobina oraz lipooksydazą (Dziuba, 1997). Peptydy o działaniu przeciwutleniającym (Tyr-Phe-Pro) znaleziono także w rybach takich jak sola (*Limanda aspera*) i makrela (Arg-Pro-Asp-Phe-Asp-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr) (Iwaniak i Minkiewicz, 2007). Oddziaływanie przeciwutleniające polega też na inaktywacji niektórych enzymów. Przykładem są oligopeptydy zawarte w pieczarkach, ziemniakach, grzybach i miodzie, które hamują aktywność oksydazy polifenolowej, odpowiedzialnej np. za brunatnienie żywności (Power i Murphy, 1999).

Hydrolizaty kazeinowe są wykorzystywane do przyspieszania dojrzewania serów. Nadtrawione białko, zawierające wolne aminokwasy i krótkie peptydy jest pożywką dla mikroorganizmów uczestniczących w procesach dojrzewania sera, kształtujących cechy smakowe i reologiczne wyrobu. Hydrolizaty uzyskane z białek rzepaku są przydatne jako składnik pożywek do hodowli ludzkich kultur tkankowych zastępując stosowane dotychczas osocze zwierzęcej krwi pępowinowej (Farges-Haddani i in., 2006).

Niekorzystnym skutkiem hydrolizy enzymatycznej białek jest możliwość powstawania gorzkiego smaku, spowodowanego uwalnianiem aminokwasów takich jak: leucyna, izoleucyna, walina, fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan oraz powstawaniem krótkich peptydów, zawierających hydrofobowe reszty aminokwasowe (FitzGerald i O’Cuinn, 2006). Wpływ peptydów na gorzkość

hydrolizatu zależy od sekwencji aminokwasowej, ilości reszt hydrofobowych, stopnia hydrolizy białek, specyficzności użytego enzymu oraz od konformacji cząsteczki peptydu (Kołakowski, 2005). Intensywność gorzkiego smaku można zmniejszyć przez usunięcie hydrofobowych aminokwasów i gorzkich peptydów w wyniku adsorpcji na węglu aktywnym, włóknach szklanych, żywicach fenolowo-formaldehadowych lub stosując selektywną ekstrakcję (Zhang i in., 2007b). Następuje jednak wtedy zmniejszenie wartości żywieniowej hydrolizatu spowodowane usunięciem fenyloalaniny, leucyny, izoleucyny, waliny i tryptofanu (Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997). Do maskowania niepożądanego smaku przydatne są również wielofosforany, żelatyna, dekstryny, cyklodekstryny, skrobia oraz niektóre aminokwasy, jak np. kwas asparaginowy i kwas glutaminowy (FitzGerald i O’Cuinn, 2006; Vioque i in., 2000). Gorzkość hydrolizatu można także zmniejszyć stosując reakcję plasteinową umożliwiającą przyłączenie hydrofilowych reszt aminokwasowych do peptydów wchodzących w skład hydrolizatu. W przypadku wbudowania deficytowych reszt aminokwasów synteza plastein umożliwia też zwiększenie wartości żywieniowej hydrolizatów (Shahidi i in., 1995; Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997). Gorzkość hydrolizatów można również ograniczyć przez acylowanie reszt lizyny (Yeom i in., 1994) lub stosując egzopeptydazy tworzące peptydy zawierające hydrofobowe reszty na końcach cząsteczek (Ge i Zhang, 1996).

Skład hydrolizatu zależy od rodzaju surowca i użytego enzymu oraz od warunków hydrolizy, takich jak temperatura, pH i czas reakcji. Istotny jest sposób przerwania reakcji oraz usunięcia enzymu. Zatrzymanie reakcji może się np. odbywać poprzez zmianę pH, obróbkę cieplną inaktywującą enzym lub ultrafiltrację powodującą oddzielenie biokatalizatora. Ultrafiltracja pozwala na usuwanie z hydrolizatów niektórych frakcji peptydów lub poszczególnych aminokwasów i czyni te preparaty przydatnymi do komponowania diet przeznaczonych dla pacjentów z wrodzonymi chorobami dietozależnymi lub w leczeniu klinicznym (Bagger i in., 1999; Vioque i in., 1999). Stosowanie enzymów do modyfikowania właściwości funkcjonalnych białek ze śruty rzepakowej powoduje np. obniżenie zawartości glukozytanolów o ok 60-70% (Mahajan i Dua, 1998). Antyodżywcze składniki mają mniejszy ciężar cząsteczkowy niż białka rzepaku, mogą być zatem łatwo oddzielone np. w wyniku ultrafiltracji lub precypitacji (Yoshie-Stark i in., 2008).

Jednym z najdawniejszych zastosowań hydrolizatów białkowych jest stosowanie ich jako przypraw, ponieważ uwypuklają, polepszają lub wprowadzają nowy smak produktu. Największy wpływ ma kwas glutaminowy, który generuje cztery podstawowe smaki, a dominacja każdego z nich zależy od stężenia aminokwasu. Kwas ten wykazuje synergiczne działanie w stosunku do nukleotydów w uwypuklaniu smaku mięsnego, podczas gdy w obecności NaCl modeluje charakterystyczny smak produktu. Duże znaczenie mają też reakcje Maillarda, których skutkiem jest tworzenie wielu aldehydów, ketonów i kwasów organicznych nadających wyrobom określoną nutę

smakową, np. smak bulionu. W wyniku reakcji zachodzących pomiędzy aminokwasami a cukrami na drodze degradacji Streckera, kondensacji, odwodnienia i polimeryzacji powstają różne produkty pośrednie, które współuczestniczą w tworzeniu związków barwnych oraz smakowo-zapachowych żywności (Flaczyk, 1997). Hydrolizaty są przydatne do nadawania określonego bukietu smakowo-zapachowego (smak pieczonego lub gotowanego kurczaka, pieczonego rostbefu, krabów, pieczeni wieprzowej czy wędzonego boczku). Hydrolizaty białkowe, po zmieszaniu z monosacharydami, lipidami i przyprawami są składnikiem różnych dodatków do żywności oraz zup w proszku i sosów (Świtek i Janicka, 1994). Hydrolizaty rybne są od dawna spożywane w krajach Azji w postaci rozmaitych past i sosów. Korzystnym skutkiem stosowania hydrolizatów jest pobudzanie kubków smakowych, co intensyfikuje odczucie smaku słonego pozwalając na zmniejszenie ilości dodawanej do potraw soli. Dlatego też hydrolizaty są składnikiem solanek nastrzykowych do szynek, boczków i wędlin oraz przypraw do sosów, bulionów, hamburgerów, pasztetów czy konserw. Dodatek hydrolizatów powinien wynosić 0,5-2%, w wyjątkowych przypadkach 3% masy gotowego produktu (Świtek i Janicka, 1994).

Krótkie oligopeptydy uwalniane podczas hydrolizy białek odgrywają ważną rolę w nadawaniu lub uwypuklaniu właściwości sensorycznych żywności (Iwaniak i Minkiewicz, 2007). Za gorzki smak produktów odpowiedzialne są peptydy, w skład których wchodzi aminokwasy hydrofobowe i zasadowe (Yeom i in., 1994). Szczególnie gorzkie są peptydy uzyskiwane wskutek hydrolizy hydrofobowego fragmentu β -kazeiny. C-końcowy peptyd o sekwencji Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val jest 250-krotnie bardziej gorzki od kofeiny (Sikorski, 1996b). Duży wpływ na kształtowanie smaku serów dojrzewających mają wewnątrzkomórkowe endopeptydazy i aminopeptydazy bakterii mlekowych powodujące proteolizę białek sera (Stepaniak, 1996).

Jeżeli w skład peptydu wchodzi głównie aminokwasy kwaśne to wywołuje on smak kwaśny lub umami. Smak umami to wrażenie smakowe charakterystyczne dla smaku rosół wołowego, które wywołują różne di- i tripeptydy zawierające sole sodowe kwasu glutaminowego lub asparaginowego. Reprezentantem smaku umami jest oktapeptyd o sekwencji Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala izolowany z papainowego ekstraktu wołowego (Power i Murphy, 1999). Peptyd ten składa się z trzech podstawowych elementów strukturalnych: zasadowego N-końcowego dipeptydu Lys-Gly, kwaśnego tripeptydu Asp-Glu-Glu i końcowej sekwencji Ser-Leu-Ala. Smak umami wywołuje też peptyd o sekwencji Glu-Glu, otrzymany z hydrolizatów białek ryb (Dziuba, 1997). Innym przykładem sensorycznego oddziaływania peptydów jest aspartam (L-Asp-L-Phe-OMe) i alitam (L-Asp-D-Ala-NH₂), które są wykorzystywane jako bezkaloryczne słodziki. Znane są również białka i peptydy pochodzenia roślinnego, takie jak monellina, taumatyna, kurkulina, mirakulina i pentadina, charakteryzujące się intensywną słodkością już przy bardzo małych stężeniach

(Power i Murphy, 1999). Ponadto kurkulina i mirakulina mają zdolność maskowania kwaśnego smaku, a nawet do przekształcania go w smak słodki. Niektóre zasadowe peptydy są natomiast silnie słone i można je wykorzystać jako zamienniki soli, nie zawierające sodu. Rola peptydów o właściwościach sensorycznych nie ogranicza się tylko do nadawania określonego smaku. Dipeptydy takie jak Gly-Leu, Pro-Glu i Val-Glu działają jako intensyfikatory smaku produktów żywnościowych, między innymi dzięki właściwościom buforującym (Iwaniak i Minkiewicz, 2007). Dodatek oligomerów glutaminy do soków owocowych lub warzywnych maskuje ich gorzkość (Dziuba, 1997). Krótkie peptydy uwolnione podczas procesów fermentacyjnych są prekursorami wielu heterocyklicznych składników zapachowych powstających podczas pieczenia lub prażenia, np. chleba, kakao, kawy czy orzeszków ziemnych (Iwaniak i Minkiewicz, 2007; Ludwig i in., 2000). Rodzaj i intensywność smaku hydrolizatów zależy też od zawartości wolnych aminokwasów. Gorzki smak wykazują walina, tyrozyna, leucyna izoleucyna, fenyloalanina i tryptofan, podczas gdy alanina i glicyna mają smak słodki. Smak kwaśny jest charakterystyczny głównie dla kwasu asparaginowego i glutaminowego. DL-glutamina i DL-asparagina uczestniczą w tworzeniu smaku słonego. Cysteina, a w mniejszym stopniu cystyna nadają hydrolizatom smak mięsny i są ponadto prekursorami wielu lotnych związków zapachowych (Kołakowski, 2005).

Hydrolizaty białkowe ze względu na zawartość aminokwasów i peptydów o dużej wartości biologicznej są składnikiem preparatów do odżywiania dożylnego oraz odżywek i preparatów wysokobiałkowych przeznaczonych dla rekonwalescentów oraz dla osób narażonych na znaczny wysiłek fizyczny i sportowców uprawiających dyscypliny siłowe (Clemente, 2000). Są one doskonałym źródłem łatwo przyswajalnego azotu i służą do wzbogacania wartości odżywczej produktów spożywczych zalecanych dla osób odchudzających się, dzieci oraz osób starszych (Claver i Zhou 2005; Iwaniak i Minkiewicz, 2007). Hydrolizaty są również składnikami żywności przeznaczonej dla osób z zaburzeniami wchłaniania i trawienia, z owrzodzeniem przewodu pokarmowego lub przewlekłym zapaleniem trzustki. Stosuje się je również w schorzeniach wątroby i nerek oraz w stanach pourazowych i przy przetokach (Clemente, 2000; Pinto E Silva i in., 1999; Schmidt i in., 1994). Zastosowanie w tym przypadku hydrolizatów w formie dodatku do napojów i soków owocowych pozwala na ograniczenie deficytu przyswajalnych związków azotowych. Fizjologiczne oddziaływanie hydrolizatów zależy od ich wchłaniania w przewodzie pokarmowym, masy cząsteczkowej, składu aminokwasowego, stopnia hydrolizy oraz zawartości aktywnych fizjologicznie substancji. Przeważanie krótkich peptydów w przewodzie pokarmowym jest łatwiejsze niż dużych białek, dlatego peptydy stosowane są także w schorzeniach przebiegających z ograniczeniem przyswajania żywności, np. w wyniku zmniejszenia wydzielania enzymów proteolitycznych lub też przed i po zabiegach operacyjnych przewodu pokarmowego

(Clemente, 2000; Silvestre, 1997). Preparaty hydrolizatów są podstawą diety dla osób cierpiących z powodu alergii pokarmowych, np. na białka mleka, gluten, owoalbuminę, białka ryb i nasion strączkowych. Postępowanie lecznicze polega na stosowaniu hypoalergicznym preparatów odżywczych bezlaktozowych, bezglutenowych i bezsacharozowych. Są to najczęściej mieszanki hydrolizatów kazeiny i białek serwatki, soi, kolagenu oraz białek mięsa jagnięcia czy kurczaka. Krótkie peptydy są mniej immunogenne niż natywne białka. Aminokwasy oraz di- i tripeptydy hydrolizatów kazeiny są ok. milion razy mniej alergenne niż białka wielkocząsteczkowe (Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997). W odżywkach mlekozastępczych białka mleka krowiego są zastępowane hydrolizatami białek serwatkowych oraz sojowych. Takie zmiany w preparatach dla niemowląt pozwalają zminimalizować zróżnicowanie w ilościowym i jakościowym składzie niebiałkowej frakcji azotowej mleka krowiego i kobiecego. Hydrolizaty kazeiny o odpowiedniej osmolarności mogą być stosowane do uzupełniania mleka kobiecego przy karmieniu wcześniaków, a dodatek zhydrolizowanej kazeiny do odżywek dla niemowląt zwiększa zdolność do stymulowania wzrostu bakterii *Bifidobacterium bifidum* (Dzwolak i Ziajka, 1993). Hydrolizaty białkowe znalazły także zastosowanie w formowaniu diety dla osób chorych na fenyloketonurię. Choroba ta o podłożu genetycznym związana jest z brakiem lub małą aktywnością enzymu przekształcającego fenyloalaninę w tyrozynę, a gromadzenie tego aminokwasu w organizmie prowadzi do różnych zaburzeń metabolicznych. Hydrolizaty kazeinowe, z których usunięto uwolnioną fenyloalaninę poprzez adsorpcję na węglu aktywnym lub żywicach jonowymiennych, są składnikiem specjalnej diety przeznaczonej dla ludzi cierpiących na fenyloketonurię (Iwaniak i Minkiewicz, 2007).

Wartość biologiczna białek żywności jest rozpatrywana głównie pod kątem zawartości aminokwasów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zgodnie z aktualnymi poglądami białka mogą być również źródłem peptydów regulujących procesy życiowe organizmów. W natywnym biologicznie białku sekwencje aminokwasowe bioaktywnych peptydów są zamaskowane. Ich funkcja ujawnia się dopiero po enzymatycznym uwolnieniu np. w wyniku trawienia w przewodzie pokarmowym lub podczas procesów technologicznych (Meisel, 1997). Takie fragmenty zawierające zazwyczaj 3-20 reszt aminokwasowych, oddziałują po uwolnieniu z odpowiednimi receptorami organizmu, regulując jego funkcje (Pihlanto-Leppälä, 2001). Dotychczas wyizolowano i scharakteryzowano około czterdziestu rodzajów biologicznie aktywnych peptydów, które mogą wpływać na obniżenie ciśnienia krwi, stymulować działanie układu odpornościowego, wykazywać aktywność opioidową oraz antagonistyczną w stosunku do opioidowej. Biologiczna aktywność takich peptydów przejawia się także w możliwości wywoływania skurczów mięśni gładkich, w regulowaniu tworzenia czerwonych krwinek oraz płytek krwi, w hamowaniu procesu agregacji płytek krwi oraz procesów utleniania, a także w kontrolowaniu masy ciała (Dziuba, 2005).

Białka zawierają też sekwencje peptydów, które wiążą i transportują metale, wpływają na procesy trawienia, wykazują aktywność moczopędną, antibakteryjną oraz są inhibitorami niektórych proteaz ustrojowych i bakteryjnych (Dziuba, 1997; Stepaniak, 1996). Bioaktywny peptyd pełni czasem kilka fizjologicznych funkcji, np. fragment hamujący enzym ACE jednocześnie działa opioidowo, a immunomodulujące peptydy kazeinowe stymulują proliferację ludzkich limfocytów i fagocytową aktywność makrofagów (Meisel, 1998).

Białka zwierzęce, a przede wszystkim białka mleka, odznaczają się potencjalnie największymi możliwościami uwalniania bioaktywnych peptydów (Tabela 8). Peptydy takie pozyskiwane są również z mięsa ryb, z kolagenu i miozyny kurcząt, z jaj, a także białek zapasowych roślin (soi, pszenicy, rzepaku, ryżu) oraz z niektórych bakterii i grzybów (Hartmann i Meisel, 2007). Znaczną ilość aktywnych biologicznie peptydów stwierdzono w fermentowanych produktach mlecznych. Proteolityczny system bakterii kwasu mlekowego (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*) umożliwia powstawanie biopeptydów o rozmaitych funkcjach biologicznych (Korhonen i Pihlanto, 2006). Przypuszczalnie kazeina i generowane z niej peptydy wykazują właściwości przeciwnowotworowe (Iwaniak i Minkiewicz, 2007).

Peptydy opioidowe odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu systemu nerwowego gdyż posiadają właściwości biologiczne podobne do narkotyków opiatowych otrzymywanych z maku. Wpływają one na samopoczucie oraz regulują percepcję bólu. Cechą charakterystyczną peptydów opioidowych jest występowanie tyrozyny na początku cząsteczki (Tabela 8). Ustrojowa Met-kefalina jest pentapeptydem o sekwencji Tyr-Gly-Gly-Phe-Met. Głównym źródłem opiatów z białek mleka jest β -kazeina, z której pochodzą β -kazomorfiny (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu) występujące także w mleku ludzkim, owczym i bawolim (Meisel, 1997). Obecność peptydów o działaniu opioidowym stwierdzono również w α -laktoalbuminie i β -laktoglobulinie (Pihlanto-Leppälä, 2001) oraz w albuminie serwatki (Meisel, 1998). Opioidowe peptydy mogą być także otrzymane z krwi wołowej oraz z białek roślinnych między innymi z glutenu i gliadyny pszenicy, hordeiny jęczmienia, zeiny kukurydzianej oraz soi (Smacchi i Gobbetti, 2000). Z hydrolizatów κ -kazeiny wyizolowano peptydy antagonistyczne w stosunku do kazomorfin - kazoksyny, blokujące specyficzne do kazomorfin neuroreceptory (Stepaniak, 1996). Peptydy stymulują także aktywność makrofagów ludzkich oraz rozwój różnych form limfocytów i regulują ich migrację (Fehlbaum i in., 2000). Peptydy Tyr-Gly i Tyr-Gly-Gly odpowiadające fragmentom zawartym w α -laktoalbuminie i w κ -kazeinie znacząco wzmacniają proliferację limfocytów krwi ludzkiej (Meisel, 1997). Peptydy zawierające domeny o sekwencji Glu-Ala-Glu stymulują procesy oksydacji w leukocytach, wydzielanie α - i β -interferonów oraz metabolizm fosfoinozytolu (Dziuba i in., 1996).

Tabela 8. Przykłady biologicznie aktywnych peptydów o określonym działaniu

Działanie	Nazwa	Sekwencja	Źródło	Piśmiennictwo
Opioidowe	α -laktorfina	Tyr-Gly-Leu-Phe	α -laktoalbumina f(50-53)	(1)
Opioidowe	β -laktorfina	Tyr-Leu-Leu-Phe	β -laktoglobulina f(102-105)	(1)
Opioidowe	serorfina	Tyr-Gly-Phe-Asn-Ala	albuminy serwatki, f(399-404)	(2)
Antagonistyczne do opioidowego	kazoksyna	Tyr-Pro-Tyr-Tyr	κ -kazeina f(31-34)	(3)
Immunostymulujące	-	Leu-Ala-Leu	kolagen kurcząt	(4)
Immunostymulujące	-	Leu-Leu-Tyr	β -kazeina f(191-193)	(5)
Antyhipertensyjne	kazokinina	Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	β -kazeina f(177-183)	(6)
Antyhipertensyjne	-	Val-Leu-Pro	mięso kurcząt	(4)
Antytrombotyczne	kazoplatelina	Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys- Lys-Asn-Gln-Asp-Lys	κ -kazeina f(106-116)	(6)
Antytrombotyczne	-	Arg-Gly-Asp	kolagen kurcząt	(4)
Antymikrobiologiczne	laktoferycyna	Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp- Asn-Arg-Met-Lys-Lys-Leu- Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys- Val-Arg-Arg-Ala-Thr-Ala	laktoferyna (f17-42)	(7)
Wiążące metale i mikroelementy	α_{S1} -kazeino-fosfopeptyd	SerP-SerP-SerP-Glu-Glu- Ile-Val-Pro-Asn	α_{S1} -kazeina (f66-74)	(2)
Antynowotworowe	lunazyna	Arg-Gly-Asp	albuminy soi	(8)

Wg Pihlanto-Leppälä, 2001 (1); Meisel, 1998 (2); Stepaniak, 1996 (3); Dziuba i in., 1996 (4); Korhonen i Pihlanto, 2006 (5); Meisel, 1997 (6); Dionysius i Milne, 1997 (7); Czarnecka i Koziolkiewicz, 2007 (8)

Obecność immunomodulujących peptydów stwierdzono w hydrolizatach trypsynowych i chymotrypsynowych β - i α_{S1} -kazeiny krowiej (Korhonen i Pihlanto, 2006). Podobne działanie wykazują peptydy z kazeiny mleka kobycego, które chronią noworodki przed infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi (Fehlbaum i in., 2000). Immunostymulujące peptydy uodparniają myszy na infekcję *Klebsiella pneumoniae* (Korhonen i Pihlanto, 2006). Peptydy antyhipertensyjne powstające głównie w wyniku działania trypsyny lub chymotrypsyny na β -kazeinę mają sekwencję Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg, a w przypadku hydrolizy α_{S1} -kazeiny uwalniane są kazokininy o składzie Phe-Phe-Val-Ala-Pro (Meisel, 1997; Stepaniak, 1996). Otrzymywana z kazeiny

β -kazomorfin-7 wykazuje działanie opioidowe, ale posiada również zdolność do regulacji ciśnienia krwi, chociaż z mniejszą od kazokinin skutecznością. Obniżające ciśnienie krwi peptydy mogą pochodzić także z białek mięsa kurcząt, tuńczyka oraz z białek roślinnych, np. glutenu i hordeiny (Dziuba i in., 1996; Smacchi i Gobbetti, 2000).

Peptydy z κ -kazeiny o sekwencji Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys hamują wiązanie fibrynogenu z płytkami krwi i zapobiegają ich agregacji (Meisel, 1997). Peptydy o działaniu przeciwzkrzepowym można otrzymać wskutek hydrolizy kolagenu lub fibrynogenu oraz niektórych białek roślinnych, np. wyki (Lys-Arg-Asp-Ser) (Dziuba i in., 1996). Peptydy hamujące agregację płytek krwi są rekomendowane jako czynnik wspomagający profilaktykę zakrzepicy dla osób z chorobami serca i układu krążenia (Iwaniak i Minkiewicz, 2007). Peptydy uwalniane pod wpływem trypsyny lub pepsyny z serwatkowej laktoferyny hamują rozwój różnych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii (*Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*), a także drożdży, grzybów oraz pierwotniaków (Hartmann i Meisel, 2007; Iwaniak i Minkiewicz, 2007). W trypsynowym hydrolizacie laktoferyny stwierdzono także obecność heksapeptydu o aktywności antywirusowej (Dziuba, 2005). Laktoferrycyna będąca fragmentem laktoferyny jest 3-krotnie bardziej aktywna w stosunku do enterotoksycznych *E.coli* niż niestrawiona laktoferyna, która także wykazuje aktywność przeciwbakteryjną (Dionysius i Milne, 1997). Peptyd ten ma zdolność wiązania się z lipopolisacharydami ściany komórkowej bakterii przez co nadmiernie zwiększa przepuszczalność błony komórkowej (Power i Murphy, 1999). Podwyższony poziom laktoferrycyny stwierdzono w siałce i gruczołach mlecznych kobiet karmiących (Dionysius i Milne, 1997). Laktoferrycyna działa hamująco na bakterie powodujące psucie się żywności (*Pseudomonas fluorescens*) oraz patogeny żywności (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* i *Salmonella salford*) (Dionysius i Milne, 1997).

Białka kolagenu kurcząt zawierające fragment o sekwencji Pro-Pro-Gly-Pro powodują inhibicję bakteryjnych dipeptydylokarboksypeptydaz (Dziuba i in., 1996). Zawierające 28 aminokwasów peptydy PR-39 o sekwencji Pro-Phe-Arg-Pro-Pro-Phe-Arg-Pro-Pro-Phe-Gly-Pro-Pro-Ile-Arg-Pro-Pro-Leu-Arg-Pro-Pro-Phe-Phe-Pro-Pro-Arg-Pro są letalne dla *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* (Bonetto i in., 1999). Peptydy te hamują syntezę białek potrzebnych do replikacji DNA (Piddock, 1998). Cennym źródłem peptydów o aktywności przeciwbakteryjnej jest śledziona wieprzowa (Bonetto i in., 1999). Dodatkowo naładowane fragmenty α_{s2} -kazeiny mogą hamować wzrost *Escherichia coli* i *Staphylococcus carnosus* (Meisel, 1997).

Peptydy wpływają na transport metali i mikroelementów, a także na proces trawienia. Charakterystyczną cechą peptydów wiążących i transportujących metale jest powtarzająca się sekwencja zgrupowanych fosforylowanych reszt seryny, po których następują dwie reszty kwasu

glutaminowego (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu) (Meisel, 1998). Glikomakropeptyd uwalniany z κ -kazeiny w czasie koagulacji mleka podpuszczką hamuje wydzielanie kwasu solnego i gastryny oraz spowalnia przejście pokarmu przez przewód pokarmowy (Stepaniak, 1996). β -kazomorfiny uwalniane z β -kazeiny stymulują absorpcję wody i elektrolitów w jelicie cienkim zapobiegając bieguncie. Mogą one również wpływać na absorpcję składników pokarmowych oraz sekrecję insuliny (Smacchi i Gobbetti, 2000). Duże znaczenie mają fosfopeptydy uwalniane z α_{S1} -, α_{S2} -kazeiny oraz β -kazeiny. Kazeinopochodne fosfopeptydy mają zdolność wiązania dwuwartościowych jonów metali (Fe, Cu, Ca, Mn, Se, Zn), tworząc z nimi rozpuszczalne sole fosfoorganiczne (Smacchi i Gobbetti, 2000). Białka mleka są głównym źródłem peptydów wiążących mikroelementy, ale mogą one być również pozyskiwane z białek ryb, soi oraz zbóż (Power i Murphy, 1999). Niektóre bioaktywne peptydy są toksyczne dla embrionów. Udowodniono, że peptyd będący fragmentem fibrynogenu, kolagenu i innych białek mięsa jest toksyczny dla zarodków małp. Tetrapeptydy uzyskane z α -gliadyny, białka uznanego za najbardziej toksyczne w celiakii, zawsze zawierają jeden z czterech motywów sekwencji aminokwasowych: Pro-Ser-Gln-Gln, Gln-Gln-Gln-Pro, Gln-Gln-Pro-Tyr lub Gln-Pro-Tyr-Pro (Dziuba, 2005).

Białka pochodzenia roślinnego są generalnie uboższym źródłem bioaktywnych peptydów (Tabela 8). Bioaktywne peptydy znaleziono w białkach ryżu, sorgo, jęczmienia, dyni, czy gliadynach pszenicy. Aktywne peptydy pozyskiwane z białek roślinnych wykazują działanie głównie jako regulatory ciśnienia krwi, ale występują także peptydy (np. z gliadyn pszenicy) o aktywności opioidowej i antyoksydacyjnej oraz inhibitora dipeptydylopeptydazy. Mało jest natomiast fragmentów o aktywności antybakteryjnej (Dziuba i in., 1995). Białka rzepaku, bobiku i soi mają najuboższe profile peptydowe. Hydrolizaty białek rzepaku zawierają peptyd hamujący aktywność proteazy HIV (Yust i in., 2004) oraz fragment Val-Tyr wykazujący działanie inhibitora konwertazy angiotensyny (ACE) (Yoshie-Stark i in., 2008). Właściwości takie stwierdzono również w hydrolizatach soi i sosu sojowego. Preparaty białek łubinu i rzepaku mają zdolność do obniżania poziomu cholesterolu stymulując syntezę kwasów żółciowych (Yoshie-Stark i Wäsche, 2004). Fragmenty peptydowe zawarte w albuminach rącznika pospolitego wykazują właściwości immunostymulujące, zaś wśród albumin 2S soi znajduje się peptyd - lunazyna o działaniu przeciwnowotworowym (Czarnecka i Koziółkiewicz, 2007).

Szerokie spektrum działania bioaktywnych peptydów spowodowało, że zalecane są one jako składniki żywności funkcjonalnej (Hartmann i Meisel, 2007). Brane są pod uwagę szczególnie peptydy hamujące rozwój drobnoustrojów, obniżające ciśnienie krwi oraz peptydy odpowiedzialne za transport jonów metali i o działaniu immunomodulacyjnym. Biologicznie aktywne peptydy mogą

znaleźć zastosowanie jako konserwanty żywności, ponieważ hamują rozwój patogenów oraz bakterii powodujących psucie się żywności (Dionysius i Milne, 1997). Peptydy antybakteryjne są potencjalnym terapeutycznym w leczeniu posocznicy, ze względu na ich zdolność do łączenia się z lipopolisacharydami ściany komórkowej drobnoustrojów (Iwaniak i Minkiewicz, 2007). Biologicznie aktywne peptydy mogą być składnikiem past do zębów, płynów do płukania ust oraz gum do żucia ponieważ hamują rozwój *Streptococcus mutans* i *Actinomyces viscosus* (Arihara i in., 1996; Hartmann i Meisel, 2007). Aktywność przeciwmikrobiologiczna peptydów skierowana na bakterie *Propionibacterium acnes* może być wykorzystana podczas komponowania kosmetyków do oczyszczania i pielęgnacji twarzy (Arihara i in., 1996). Kazeinopochodne fospopeptydy ze względu na możliwość tworzenia kompleksów z różnymi mikroelementami mogą być stosowane w przeciwdziałaniu osteoporozie, nadciśnieniu, anemii oraz próchnicy zębów (Meisel, 1998). Są one także łatwodostępnym czynnikiem w profilaktyce i leczeniu krzywicy oraz we wzbogacaniu diety wegetariańskiej (Smacchi i Gobbetti, 2000). Peptydy takie znalazły zastosowanie w napojach i produktach spożywczych przeznaczonych dla dzieci oraz w tabletkach zawierających wapń (Meisel, 1998; Świdorski i Waszkiewicz-Robak, 2000). Peptydy hamujące agregację płytek krwi są rekomendowane jako składnik diety dla osób z chorobami serca i układu krążenia oraz jako czynnik wspomagający profilaktykę zakrzepicy (Iwaniak i Minkiewicz, 2007). Preparaty obniżające ciśnienie krwi, o handlowych nazwach Vasotensin 120TTM lub PeptACETM obecne na rynku Stanów Zjednoczonych, zawierają bioaktywne peptydy pochodzące z mięsa ryb bonito (z rodziny tuńczyków) (Hartmann i Meisel, 2007). Zainteresowano się również wykorzystaniem bioaktywnych peptydów w leczeniu schorzeń neurologicznych, kardiologicznych, zaburzeń systemu immunologicznego, nowotworów, a także stresu (Korhonen i Pihlanto, 2006; Sato i in., 2006). W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie peptydami umożliwiającymi kontrolę masy ciała. Preparat D4TM oferowany przez firmę DMV International, zawiera peptydy o sekwencji Val-Val-Tyr-Pro otrzymywane w procesie hydrolizy enzymatycznej białek. Ich stosowanie zapobiega odkładaniu się tłuszczu w organizmie, ale mechanizm działania tego peptydu nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Peptyd ten zapobiega również chorobie wieńcowej i zwiększa przyrost masy mięśni (Świdorski i Waszkiewicz-Robak, 2000). Istnieją bioaktywne peptydy, których specyficzne oddziaływanie, zwłaszcza opioidowe i immunostymulujące, zostaje zniesione przez proteazy układu trawiennego (Stepaniak, 1996). Można temu częściowo zapobiec za pomocą glikolu polietylenowego (PEG) ograniczającego ich trawienie (Sato i in., 2006).

Niektóre produkty żywnościowe zawierają uwolnione już bioaktywne peptydy. Do produkcji wielu typów sera (Gouda, Cheedar, Gorgonzola) oraz innych produktów mlecznych stosowane są bakterie kazeinolityczne, zatem możliwe jest występowanie w nich licznych bioaktywnych

peptydów (Meisel, 1997; Smacchi i Gobbetti, 2000). Fermentowane produkty mleczne zawierają peptydy obniżające ciśnienie krwi, regulujące system immunologiczny, transportujące jony metali oraz wykazujące działanie antybakteryjne i antynowotworowe. Peptydy o działaniu obniżającym ciśnienie krwi, a także opioidowe kazomorfiny znaleziono w mleku fermentowanym przez bakterie *Lactobacillus helveticus* (Smacchi i Gobbetti, 2000). Aktywność peptydów o działaniu hamującym ACE jest wysoka w serach o wydłużonym okresie dojrzewania oraz przechowywania. Produkty mleczne o niewielkim stopniu hydrolizy białek, np. jogurty, twarogi, świeże serki, wykazują małą aktywność inhibitorów ACE (Korhonen i Pihlanto, 2006), ale mogą być źródłem peptydów zmniejszających ryzyko nowotworów jelita grubego (Smacchi i Gobbetti, 2000). Peptydy izolowane z fermentowanych produktów mlecznych hamują działanie enzymów bakteryjnych, np. *Pseudomonas fluorescens*, bakterii obniżającej czas przydatności do spożycia mleka UHT oraz odpowiedzialnej za jego gorzkość (Korhonen i Pihlanto, 2006).

Wysoka wartość odżywcza białek szarlatu powoduje, iż najlepszym wykorzystaniem hydrolizatów tych białek wydaje się wzbogacanie diety w łatwo przyswajalne aminokwasy i peptydy o wysokiej wartości biologicznej, łatwo i szybko wchłanianych przez organizm ludzki. Uzyskiwane z białek szarlatu preparaty białkowe mogą być stosowane jako składnik odżywek mlekozastępczych zawierających także hydrolizaty białek serwatkowych i sojowych oraz odżywek dla alergików. Poszukiwanie białek roślinnych wzbogacających dietę jest szczególnie ważne ze względu na pogłębiający się deficyt białka zwierzęcego oraz wzrastającą liczbę konsumentów preferujących żywność wegetariańską (Gołąbczak, 2005).

11. Syropy skrobiowe

Skrobia stanowiąca materiał zapasowy roślin jest ważnym składnikiem węglowodanowym żywności. Najważniejszym źródłem skrobi są rośliny zbożowe, w nasionach których może ona występować w ilości 23-70% ich masy. Skrobia znalazła też wiele innych zastosowań, szczególnie w przemyśle włókienniczym, krochmalniczym, papierniczym, chemicznym, farmaceutycznym i żywnościowym (Rocha i in., 2005), jednak najczęściej jest używana jako materiał wyjściowy do otrzymywania syropów skrobiowych, będących mieszaniną oligosacharydów, disacharydów i cukrów prostych. Hydrolizę skrobi można przeprowadzić w środowisku kwaśnym lub z wykorzystaniem odpowiednich enzymów.

Już w 1811 roku Kirchoff odkrył cukry proste w roztworze skrobi, uprzednio potraktowanej kwasem nieorganicznym w podwyższonej temperaturze. Pod koniec XIX wieku w USA otrzymywano na skalę przemysłową syropy skrobiowe i glukozowe z zastosowaniem metody kwasowej.

Po odkryciu enzymów amylolytycznych stosowano metodę łączoną, której pierwszym etapem była metoda kwasowa, a w kolejnych stadiach procesu kontrolowana hydroliza enzymatyczna. Od 1960 roku rozpowszechniło się używanie enzymów także w pierwszym etapie upłynniania surowca. W procesach enzymatycznych możliwa jest bardziej subtelna modyfikacja skrobi, polegająca na usuwaniu z jej makrostruktury konkretnych fragmentów cząsteczki, co pozwala na uzyskanie syropów o postulowanym równoważniku dekstrozowym i zawartości oligosacharydów. Jej zaletą jest także ograniczenie zanieczyszczenia środowiska. Obecnie katalizę enzymatyczną stosuje się w produkcji wielu środków słodzących o charakterze syropów takich jak maltodekstryny, syropy maltozowe, glukozowo-maltozowe i fruktozowe oraz cyklodekstryny lub cukrów krystalicznych: maltozy, glukozy i fruktozy (Słomińska, 1995). Z cukrów tych przez uwodornienie otrzymuje się rozmaite alkohole wielowodorotlenowe. Przewagami metody enzymatycznego upłynniania i scukrzania skrobi są: niska zawartość produktów degradacji cukrów, brak zabarwienia, brak gorzkiego posmaku i zapachu oraz większa zawartość glukozy (~ 93%) w porównaniu z hydrolizatami kwasowymi (80%). Syropy fruktozowe otrzymywano do 1965 roku metodą alkalicznej izomeryzacji, którą szybko zastąpiono procesem enzymatycznym zapewniającym większy stopień przereagowania substratu i czystość otrzymanego produktu (Bryjak, 1999).

Zależnie od rodzaju stosowanych enzymów można uzyskiwać hydrolizaty o różnych właściwościach funkcjonalnych. Proces upłynniania przy użyciu α -amylaz zakończony jest otrzymaniem maltodekstryn. Przy bardziej zaawansowanej hydrolizie katalizowanej w dalszym etapie innymi enzymami otrzymywane są natomiast syropy: maltodekstrynowe, maltozowe i glukozowe (Rocha i in., 2005). Syropy skrobiowe różnią się stopniem hydrolizy skrobi, który określa się za pomocą ekwiwalentu dekstrozowego (DE), wyrażonego ilością cukrów redukujących przypadających na jednostkę suchej masy produktów (Bryjak, 1999). W praktyce przemysłowej wytwarzane są produkty o DE od 2-3 do 98-99. Im wyższa wartość DE, tym większe jest zróżnicowanie składu chemicznego i właściwości funkcjonalnych produktów. Do procesów klasycznych należy obecnie zaliczyć produkcję syropów maltodekstrynowych, glukozowych i fruktozowych z udziałem kolejno α -amylaz, pululanaz, glukoamylaz i izomeraz glukozowych. Reakcje enzymatyczne są też wykorzystywane do wytwarzania cyklodekstryn (Słomińska, 1995). Syropy skrobiowe ze względu na duże zróżnicowanie słodkości są użyteczne jako składnik żywności i napojów oraz znalazły zastosowanie w medycynie jako związki ograniczające utlenianie, preparaty odżywcze i stabilizatory oraz nośniki wielu leków (Bryjak, 1999). Wykorzystanie enzymatycznej hydrolizy skrobi do przemysłowej produkcji wysokoscukrzonych syropów rozpoczęło się od zastosowania mieszaniny bakteryjnej β -amylazy i grzybowej glukoamylazy do otrzymywania

hydrolizatów odznaczających się dużą słodkością. Następnie na bazie mieszaniny α -amylazy i grzybowej amyloglukozydazy opracowano technologię pozwalającą na uzyskanie hydrolizatu skrobiowego zawierającego 95% glukozy. Po wprowadzeniu na rynek izomerazy ksylozowej (nazywanej także izomerazą glukozową), katalizującej konwersję D-ksylozy do D-ksylulozy oraz D-glukozy do D-fruktozy zaczęto produkować wysokofruktozowe syropy, zawierające ponad 50% fruktozy, które znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle cukierniczym.

Wpływ na stopień depolimeryzacji ma nie tylko rodzaj enzymu, ale jego dawka, temperatura, szybkość jej wzrostu, czas procesu, stężenie substratu, temperatura kleikowania skrobi i jej zakres, termostabilność oraz obecność w surowcu składników mogących wpływać na pęcznienie ziaren skrobi i aktywność enzymu (Li i in., 2004; Słomińska i Garbacik, 2002). W miarę jak rośnie równoważnik dekstrozowy, wzrasta słodycz syropów i maleje ich lepkość (Słomińska, 1995). Skuteczność działania enzymów zależy od zawartości kompleksów amylozowo-lipidowych i interakcji skrobi z białkami oraz od stopnia chemicznej modyfikacji spowodowanej podwyższeniem temperatury procesu (Gašiorowski, 2004).

Produkcja hydrolizatów skrobiowych jest procesem wielostopniowym. Pierwszym etapem jest kleikowanie, przeprowadzone w temperaturze około 110°C z udziałem termostabilnej α -amylazy (Słomińska i Garbacik, 2002). Następnie po schłodzeniu do 90-95°C następuje dalsze upłynnianie skleikowanej skrobi za pomocą α -amylazy, czemu towarzyszy spadek lepkości roztworu, po czym przeprowadza się proces daleko posuniętego scukrzania przy użyciu glukoamylazy lub β -amylazy. Celem usunięcia rozgałęzionych maltooligosacharydów konieczne jest zastosowanie enzymów działających na wiązania α -1,6-glikozydowe (Crabb i Mitchinson, 1997). W zależności od źródła skrobi i metody jej scukrzania, otrzymuje się syropy glukozowe o DE od 80 do 93 lub syropy maltozowe o DE od 40 do 80. Ten ostatni etap przebiega w temperaturze 55-60°C i trwa 2-3 doby (Słomińska, 1995). Uzyskanie dużego stężenia glukozy jest utrudnione wskutek reakcji rewersji prowadzącej do wytworzenia maltozy, zanieczyszczającej produkt finalny (Crabb i Mitchinson, 1997).

Warunki otrzymywania hydrolizatów skrobiowych zależą w pewnym stopniu od pochodzenia skrobi oraz od warunków wzrostu, sposobu nawożenia i stosowania pestycydów w czasie wegetacji rośliny (Jobling, 2004; Leszczyński, 2001). Występujące w komórkach roślin ziarna skrobi mają kształty i rozmiary charakterystyczne dla gatunku rośliny. Inna jest też zawartość amylozy i amylopektyny oraz stopień polimeryzacji tych frakcji, a także temperatura kleikowania, która zależnie od pochodzenia skrobi mieści się w przedziale od 46 do 100°C (Grajek i Krzyżaniak, 2005). Różnice między zawartością białka, tłuszczu i nieskrobiowych polisacharydów w surowcu

skrobiowym poddany hydrolizie zależą od jego pochodzenia i mają wpływ na jakość uzyskanych hydrolizatów. Duża zawartość białka i tłuszczu w ziarnach skrobiowych jest niekorzystna z uwagi na ujemny wpływ tych substancji na barwę i zapach hydrolizatu, a występujące w ziarnach kompleksy amylozowo-tłuszczowe zmniejszają zdolność pęcznienia i rozpuszczania skrobi, redukują zdolność wiązania wody oraz powodują zmętnienie hydrolizatu i obniżają szybkość jego filtracji. Zwiększona ilość tłuszczu powoduje również powstanie nieprzyjemnego zapachu spowodowanego procesami utlenienia. Niekorzystne działanie tłuszczu podczas produkcji hydrolizatów, głównie kukurydzianych i pszennych, można obniżyć stosując fosfolipazę (Słomińska, 1997).

Do produkcji skrobi wykorzystywane są głównie kukurydza, pszenica, ziemniaki i maniok. Istotnym źródłem tego polisacharydu jest także sorgo, a w mniejszym stopniu pszenżyto i ryż. Skrobia kukurydziana występująca w ziarnach w ilości 68-74% zawiera bardzo zróżnicowane ilości amylozy sięgające od 1% w kukurydzy woskowej, aż do 60-70% w kukurydzy mączystej. W naszej strefie klimatycznej istotnym źródłem skrobi jest ziemniak, zawierający w suchej masie 65-85% tego polisacharydu. Z ogólnych plonów ziemniaków do produkcji skrobi wykorzystanych jest tylko 3% (Grajek i Krzyżaniak, 2005). Do najważniejszych zastosowań tej skrobi należy zaliczyć produkcję żywności, tekstyliów, papieru oraz klejów. Ziarna skrobi ziemniaczanej należą do największych, co ułatwia ich separację z surowca roślinnego. Temperatura kleikowania skrobi ziemniaczanej wynosi 59-68°C. Następnym ważnym surowcem skrobiowym jest pszenica. Spośród światowych zbiorów pszenicy tylko niewielka część, sięgająca 0,4-0,5%, jest przeznaczana na produkcję skrobi. Głównym odbiorcą skrobi pszennej jest przemysł piekarniczy. Ponadto do ważniejszych zastosowań należy zaliczyć produkcję klejów oraz konserw. Jej ziarna mają bardzo zróżnicowane rozmiary, a udział amylozy w skrobi pszennej wynosi 24-29% (Grajek i Krzyżaniak, 2005). Poszukiwanie nowych źródeł skrobi jest uzasadnione wzrastającym zapotrzebowaniem na etanol będący komponentem niektórych biopaliw.

W zależności od zaawansowania hydrolizy otrzymuje się maltodekstryny, syropy maltozowe oraz glukozowe, które mają wiele rozmaitych zastosowań (Tabela 9). Syropy maltodekstrynowe powstające na drodze ograniczonej hydrolizy skleikowanej skrobi są mieszaniną niewielkiej ilości glukozy oraz od 75 do 96% oligosacharydów o różnym stopniu polimeryzacji. Maltodekstryny, które posiadają ten sam ekwiwalent dekstrozowy mogą różnić się właściwościami, zależnie od rodzaju surowca i specyficzności stosowanego enzymu. Produkt ten jest sprzedawany w formie syropu lub białego proszku, który jest rozpuszczalny w zimnej wodzie i prawie nie wykazuje smaku słodkiego. Maltodekstryny znajdują zastosowanie jako regulatory wilgotności przetworów spożywczych, zagęszczacze, inhibitory krystalizacji, nośniki różnych związków (np. leków), wypełniacze oraz plastyfikatory żywności (Słomińska, 1995).

Tabela 9. Właściwości i zastosowanie syropów skrobiowych

Rodzaj syropu	Sposób wykorzystania	Przykłady zastosowań
Maltodekstrynowy	Regulator kwasowości i wilgotności przetworów spożywczych	Mleko w proszku, cukierki, czekolady, kremy, napoje, dżemy, galaretki
	Materiał wypełniający, kapsułkujący, nośnik różnych substancji	Produkty suszone rozpyłowo, nośnik leków, związków zapachowych oraz syntetycznych środków słodzących
	Zdolność formowania termoodwracalnych i odpornych na zamrażanie żeli	Desery mleczne, przemysł piekarski
	Zamiennik tłuszczów w emulsjach	Lekkie majonezy, margaryny, sosy, dressingi, analogi mięsne, odżywki dla sportowców
	Zdolność tworzenia filmów	Powlekanie produktów spożywczych jadalną błoną, powlekanie tabletek
	Czynnik opóźniający tworzenie kryształów lodu	Produkcja lodów i produktów mrożonych, cukierków
	Składnik żywności funkcjonalnej	Oligosacharydy jako prebiotyki w jogurtach
	Stabilizator piany	Desery mleczne
Maltozowy	Zwiększanie lepkości, poprawa tekstury i elastyczności produktów	Składnik cukierków, dżemów, ketchupu, deserów lodowych, czekolad, kremów
	Zapobieganie krystalizacji sacharozy w produktach	Składnik cukierków, dżemów, syropów, napojów, lodów
	Polepszanie konsystencji przetworów spożywczych	Składnik konserw wyrobów cukierniczych
	Produkcja środków słodzących	Składnik cukierków, słodzików, gum do żucia oraz past do zębów
Glukozowy	Produkcja krystalicznej maltozy	Składnik wlewów dożylnych dla diabetyków
	Zwiększanie zdolności utrzymywania wody	Produkcja biszkoptów, krakersów
	Uwydatnianie aromatu	Przetwory owocowe, napoje bezalkoholowe
	Kształtowanie brązowej barwy	Produkcja pieczywa i wyrobów ciastkarskich, Składnik likierów i brandy
	Ułatwianie fermentacji	Piwowarstwo i piekarnictwo
Fruktozowy	Wytwarzanie krystalicznej glukozy i sorbitolu	Składnik cukierków, dżemów, kosmetyków, gum do żucia oraz past do zębów
	Zamienniki sacharozy	Składnik konfitur, napojów bezalkoholowych, zalew do marynat, syropów owocowych
	Metabolizowanie fruktozy bez udziału insuliny	Składnik żywności dla diabetyków
Fruktozowy	Wytwarzanie krystalicznej fruktozy i manitolu	Składnik gum do żucia, past do zębów kosmetyków

Wg Bryjak, 1999; Grajek i Krzyżaniak, 2005; Słomińska, 1995

Jako składniki żywności, maltodekstryny wykorzystywane są w celu poprawy konsystencji, lepkości, tekstury i stabilizacji produktów spożywczych. Syropy o małym DE znalazły zastosowanie jako zamienniki tłuszczu zmniejszające ryzyko występowania chorób serca (Rocha i in., 2005). Maltodekstryny wykazują zdolność absorpcji wody i zależnie od masy cząsteczkowej wchodzących w ich skład oligosacharydów przechodzą w formę kleistego żelu lub syropu. Szczególnie wodochłonne są maltotrioza i maltotetraoza. W wyniku agregacji liniowych łańcuchów amylozowych, maltodekstryny tworzą żel i dlatego są wykorzystywane w przemyśle spożywczym jako substancja teksturotwórcza i utrzymująca wilgotność produktu. Ważną cechą maltodekstryn jest duża lepkość ich roztworów. Maltodekstryny łatwo łączą się z tłuszczami tworząc emulsje i mogą być stosowane zamiast lipidów do produkcji żywności o zredukowanej kaloryczności, np. lekkich majonezów. Emulsje te wykazują dużą stabilność w warunkach chłodniczych (Grajek i Krzyżaniak, 2005). Inną cenną właściwością maltodekstryn jest zdolność do tworzenia filmów. Produkty pokryte filmem lepiej zachowują zapach i utrudniają swobodną penetrację tlenu w głąb produktu. Np. powlekanie truskawek filmem maltodekstrynowym ogranicza straty spowodowane wyciekami oraz polepsza jędrność owoców po rozmrożeniu (Grajek i Krzyżaniak, 2005).

W zależności od stopnia hydrolizy wyróżnia się syropy wysokomaltozowe (o stężeniu maltozy 30-45%), syropy o podwyższonej koncentracji maltozy (zawierające 70-85% tego cukru) i syropy o wysokim stopniu konwersji (w których stężenie maltozy wynosi 30-47%, a glukozy 35-45%). Syropy maltozowe są otrzymywane w procesie dwuetapowym katalizowanym najpierw α -amylazą, a następnie β -amylazą (Bryjak, 1999). W przypadku produkcji syropów o dużym stężeniu maltozy oprócz α - i β -amylazy stosuje się także enzymy rozszczepiające rozgałęzienia boczne, tj. pululanazę i izoamylazę. Wysokoscukrzone syropy maltozowe po odbarwieniu i filtracji, posiadają niską lepkość i higroskopijność, średnią słodkość i są stabilne w podwyższonych temperaturach. Nieco inny system enzymów stosuje się przy produkcji syropów o wysokim stopniu konwersji. Obejmuje on α -amylazę oraz β -amylazę i glukoamylazę (Grajek i Krzyżaniak 2005). Syropy maltozowe stosowane są głównie w przemyśle cukierniczym do zapobiegania krystalizacji sacharozy, polepszania konsystencji przetworów spożywczych i przedłużania ich trwałości. Wykorzystuje się je też jako związki regulujące wilgotność żywności oraz jako stabilizatory i nośniki związków zapachowych. Syropy o DE 42-49 zawierające 30-50% maltozy i 6-10% glukozy, używane są do produkcji lodów, konfitur, syropów owocowych, napojów bezalkoholowych, ciast, ciastek, mrożonych przetworów cukierniczych, mrożonej żywności oraz żywności dla dzieci i diabetyków. Krystaliczna maltoza jest stosowana we wlewach dożylnych u diabetyków, zastępując glukozę, natomiast zatężone syropy wysokomaltozowe są substratem do produkcji maltitolu

(alkohol wielohydroksylowy) i maltulozy (4- α -D-glukopiranozylo-D-fruktoza), które są słodzikami o bardzo małej wartości kalorycznej. Syropy o DE 60-70 zawierające 30-50% maltozy i 30-40% glukozy ze względu na wysoki wskaźnik cukrów fermentujących są używane w procesach warzenia piwa i wypieku chleba.

Syropy glukozowe otrzymywane w procesie scukrzania katalizowanym glukoamylazą zawierają 93-98% glukozy, 1-3% maltozy, 0,3-0,5% maltotriozy oraz 1-2% wyższych sacharydów. Są one stosowane w procesach fermentacyjnych, w produkcji leków, witamin, kwasów organicznych, w przemyśle cukierniczym i do produkcji żywności dla niemowląt i małych dzieci. Glukoza uzyskana z tych syropów ma zastosowanie we wlewach dożylnych i w diecie płynnej w leczeniu oraz w produkcji polidekstrozy, która nie posiada słodkiego smaku i jest używana do produkcji żywności niskokalorycznej. Z glukozy otrzymuje się też sorbitol wywołujący uczucie ochłodzenia jamy ustnej oraz syropy fruktozowe (Bryjak, 1999).

Syropy fruktozowe zajmują poważną pozycję na rynku środków słodzących, bo słodkość fruktozy jest około 80% wyższa od glukozy. Do ich produkcji stosuje się syrop zawierający w suchej masie 96-98% glukozy. Syropy fruktozowe zawierające 42% fruktozy i 52% glukozy otrzymuje się przez reakcję izomeryzacji w obecności izomerazy ksylozowej katalizującej konwersję D-glukozy do D-fruktozy (Grajek i Krzyżaniak, 2005). Syropy te znalazły zastosowanie w piekarnictwie oraz w produkcji mrożonej żywności jako zamiennik sacharozy i czynnik hamujący wzrost kryształów lodu. Syropy wysokofruktozowe zawierające w suchej masie do 90% fruktozy są natomiast otrzymywane przez usunięcie glukozy na wymienniczu jonowym (Słomińska, 1995). Ze względu na ograniczenie krystalizacji sacharozy w obecności syropu wysokofruktozowego jest on stosowany w produkcji konfitur, koncentratów owocowych i napojów bezalkoholowych. Ponieważ fruktoza jest metabolizowana bez udziału insuliny, używa się jej do produkcji żywności dla diabetyków.

CEL BADAŃ I ICH UZASADNIENIE

Mączka poekstrakcyjna szarłatowa zawiera w suchej masie 70% skrobi oraz około 15% białek bogatych w aminokwasy egzogenne. Racjonalne wykorzystanie tych składników znacznie zwiększy opłacalność otrzymywania z szarłatowego oleju charakteryzującego się korzystnym profilem nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz zawartością skwalenu, większą niż w innych źródłach roślinnego pochodzenia. Ze względu na dobrą wartość biologiczną preparaty białek szarłatowych są przydatne do wzbogacania innych produktów żywnościowych. Ich wykorzystanie zależy między innymi od opracowania skutecznej procedury izolacji białek umożliwiającej uzyskanie preparatów o dobrych właściwościach sensorycznych i funkcjonalnych, pozbawionych niepożądanych produktów przemian reszt aminokwasowych. Jednym z celów realizacji niniejszej pracy było więc porównanie skuteczności wyodrębniania białek z mączki szarłatowej z zastosowaniem różnych sposobów ich ekstrakcji lub też za pomocą hydrolizy enzymatycznej. Jako kryteria wyboru sposobu izolacji przyjęto wydajność procesu, właściwości funkcjonalne uzyskanych preparatów oraz ograniczenie przebiegu reakcji ubocznych. Szczególną uwagę zwrócono na enzymatyczne metody odbiałczania mączki, które umożliwiają dość precyzyjne regulowanie właściwości funkcjonalnych poprzez dobór enzymu o odpowiedniej selektywności działania. Ponieważ w dostępnej literaturze brak jest informacji dotyczących enzymatycznej izolacji białek szarłatowych należało dokonać wyboru najlepszego enzymu, określić warunki projektowanego procesu oraz zbadać wpływ stopnia hydrolizy na właściwości preparatu. Przy opracowywaniu sposobu ekstrakcji lub enzymatycznej hydrolizy niezbędne było także zminimalizowanie zanieczyszczenia uzyskanego izolatu lub hydrolizatu białkowego skrobią oraz substancjami tworzącymi frakcję błonnika.

Realizacja powyższych celów pozwoli na opracowanie prostej technologii przerobu mączki poekstrakcyjnej szarłatowej, przydatnej dla niewielkich zakładów przetwórczych dysponujących ograniczonymi środkami finansowymi. Taką technologią jest zainteresowane kierownictwo Zakładu Produkcyjnego MIX S.A. w Kwidzynie, zajmującego się produkcją win. Syropy skrobiowe są tam wykorzystywane jako dodatkowe źródło węgla przyspieszające fermentację etanolową. Aby uniknąć wzrostu ceny finalnego produktu zamierza się zastąpić syropy skrobiowe uzyskiwane od innych producentów wytwarzanymi w zakładzie hydrolizatami z surowców odpadowych, takich jak np. odtłuszczona mączka szarłatowa.

12. Postępowanie doświadczalne i metodyka badań

12.1. Rodzaje próbek

Do badań wykorzystywano trzy rodzaje mączki z nasion szarłatu *Amaranthus cruentus* udostępnionych przez Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Handlowo-Usługowe „Szarłat” z Łomży. Próbki oznaczone symbolem (mączka 1) zawierały wszystkie składniki zmielonego ziarna. Badano też próbki (mączka 2) o zmniejszonej zawartości lipidów uzyskane wg procedury przedstawionej w zgłoszeniu patentowym nr P-384-563 (Wilczewski i Martysiak-Żurowska, 2008), polegającej na odseparowaniu z mączki bogatej w tłuszcze frakcji liścieni, którą usuwano strumieniem powietrza, wykorzystując różnice masy właściwej tej frakcji i pozostałej części zmielonych ziaren. Trzeci rodzaj badanych próbek (mączka nr 3) otrzymano przez odtłuszczenie heksanem zmielonych nasion szarłatu. Stosowane enzymy proteolityczne zostały scharakteryzowane w Tabeli 11. Hydrolizę skrobi katalizowano preparatem termostabilnej α -amylazy - Termamyl SC firmy Novozymes.

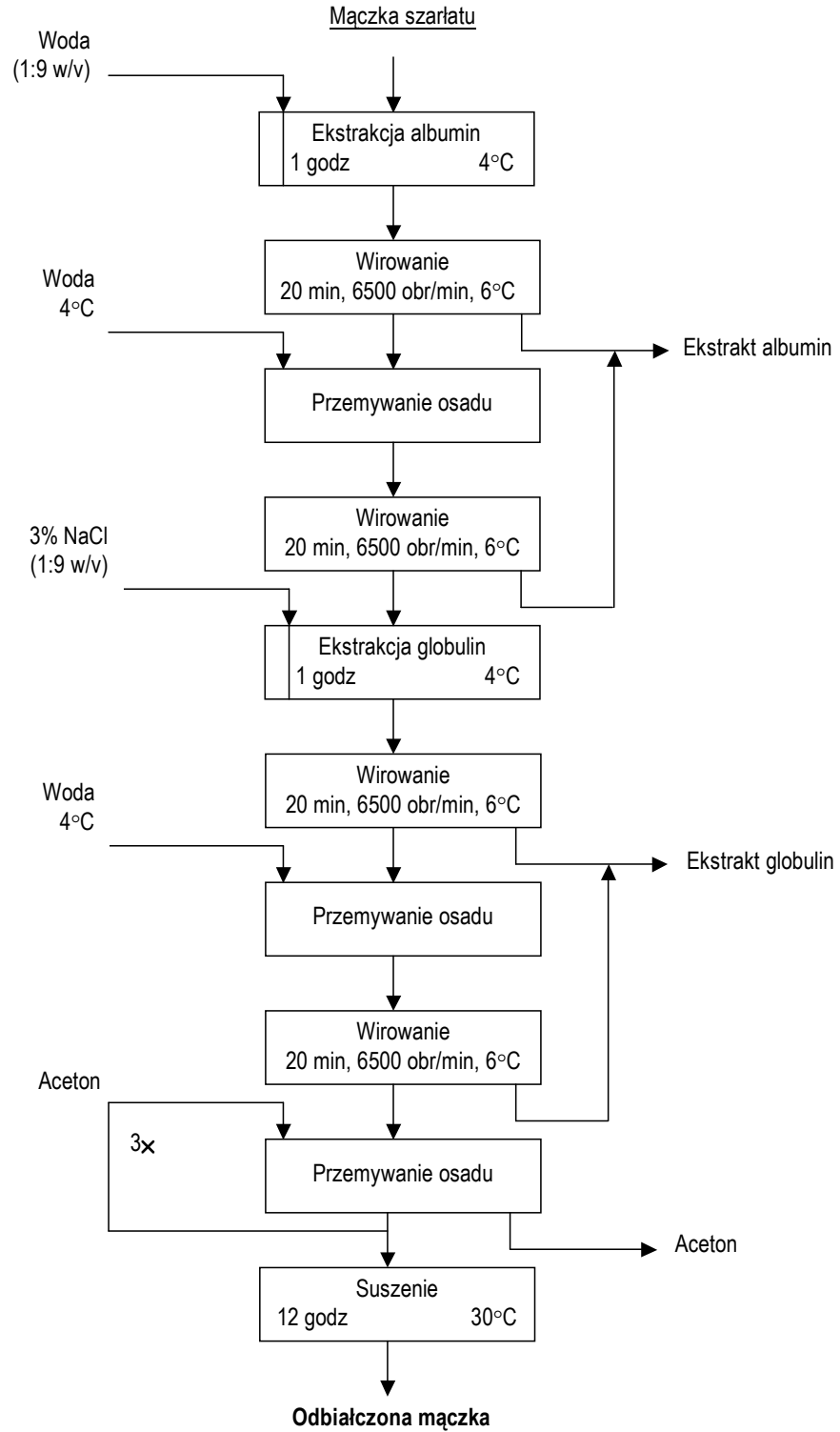
12.2. Izolacja białek z mączki szarłatu

12.2.1. Ekstrakcja w środowisku alkalicznym

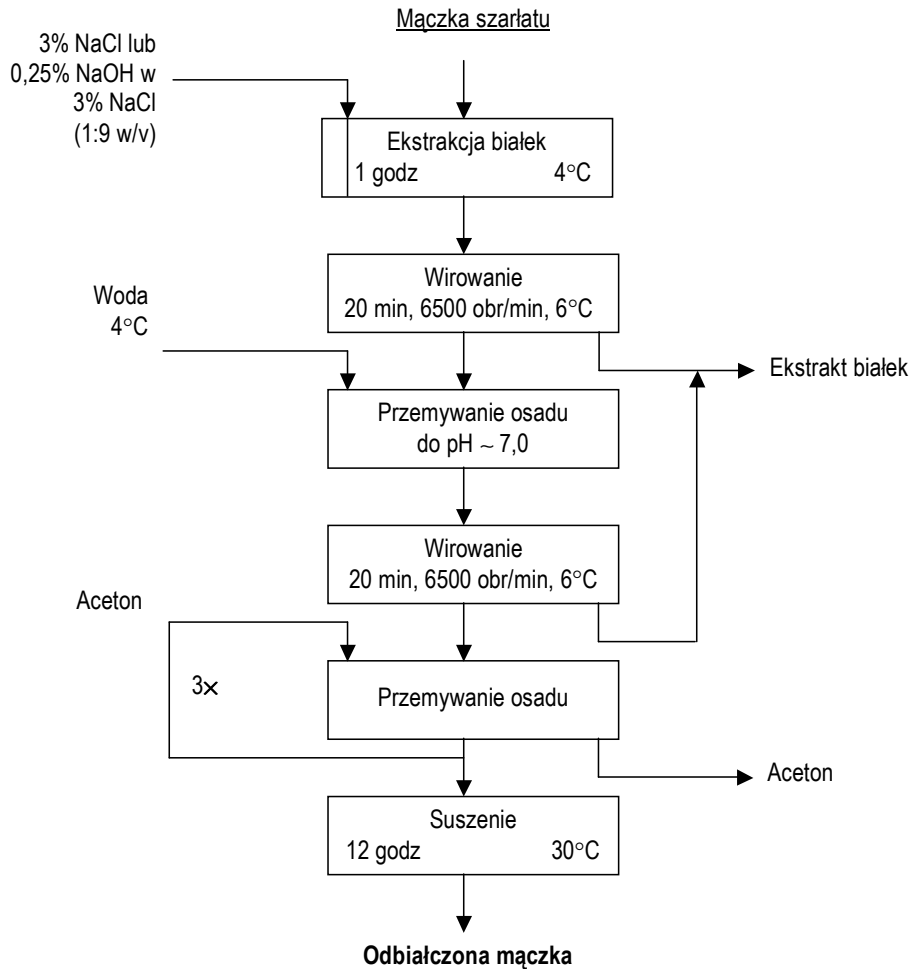
Białka z mączki szarłatu ekstrahowano roztworami NaOH o stężeniach zmienianych w zakresie od 0 do 0,9%. Ekstrakcja alkaliczna polegała na wytrząsaniu zawiesiny mączki w wodzie (1:20 w/v) przez 1 godz. w łaźni wodnej w temperaturze 20°C. Po odwirowaniu nierozpuszczalnej pozostałości (9000 obr/min, 15°C, 15 min) obliczano zawartość białek w supernatancie na podstawie ilości azotu oznaczonej metodą Kjeldahla. Wyniki wyrażono jako procent wyekstrahowanych białek w stosunku do całkowitej ich zawartości w mączce. Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech oddzielnych powtórzeniach.

12.2.2. Ekstrakcja roztworami soli

Stosowano siedem różnych wariantów ekstrakcji. Białka szarłatu ekstrahowano wodą a następnie 3% NaCl zgodnie ze schematem przedstawionym na Rys. 6, roztworami 3% NaCl lub 0,25% NaOH rozpuszczonym w 3% NaCl (Rys. 7) oraz roztworami 0,25% NaOH, 1% NaCl lub 1% NaCl rozpuszczonym w 0,25% NaOH (Rys. 8).

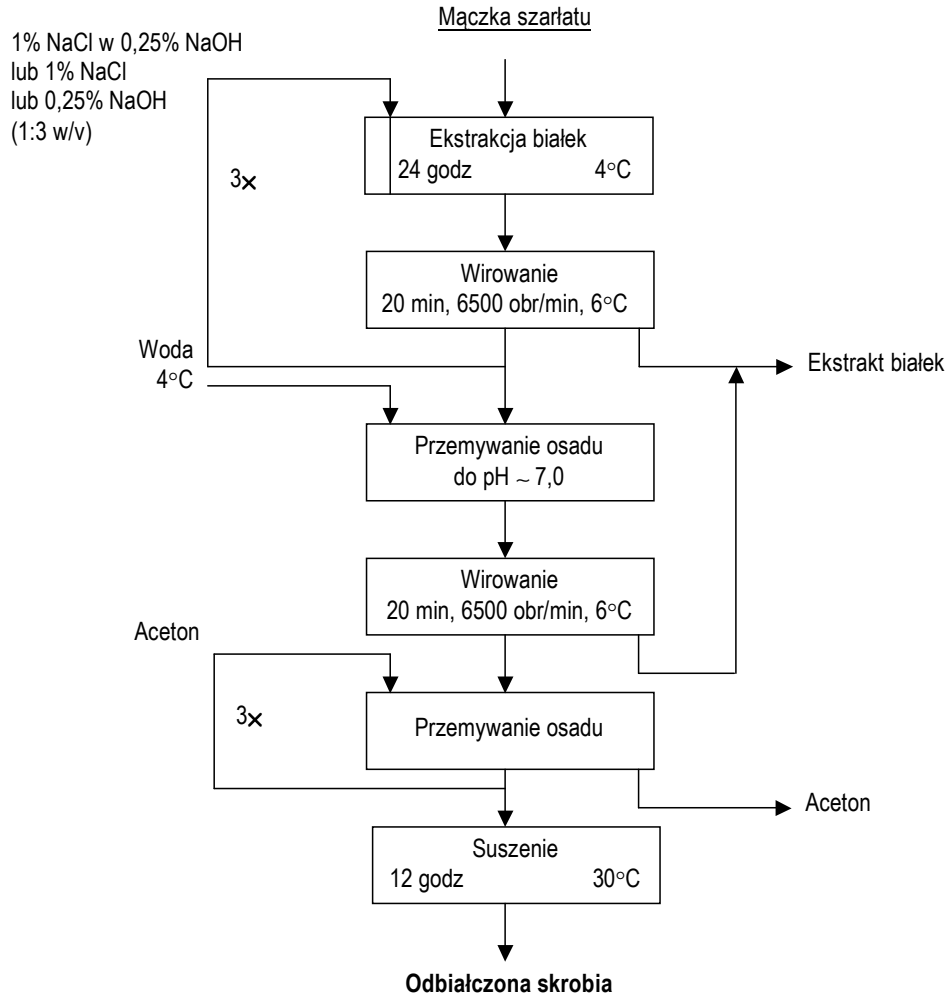


Rys. 6. Schemat frakcjonowania białek szarlatu



Rys. 7. Schemat ekstrakcji białek 3% NaCl lub 0,25% NaOH w 3% NaCl z mączki szarłatowej

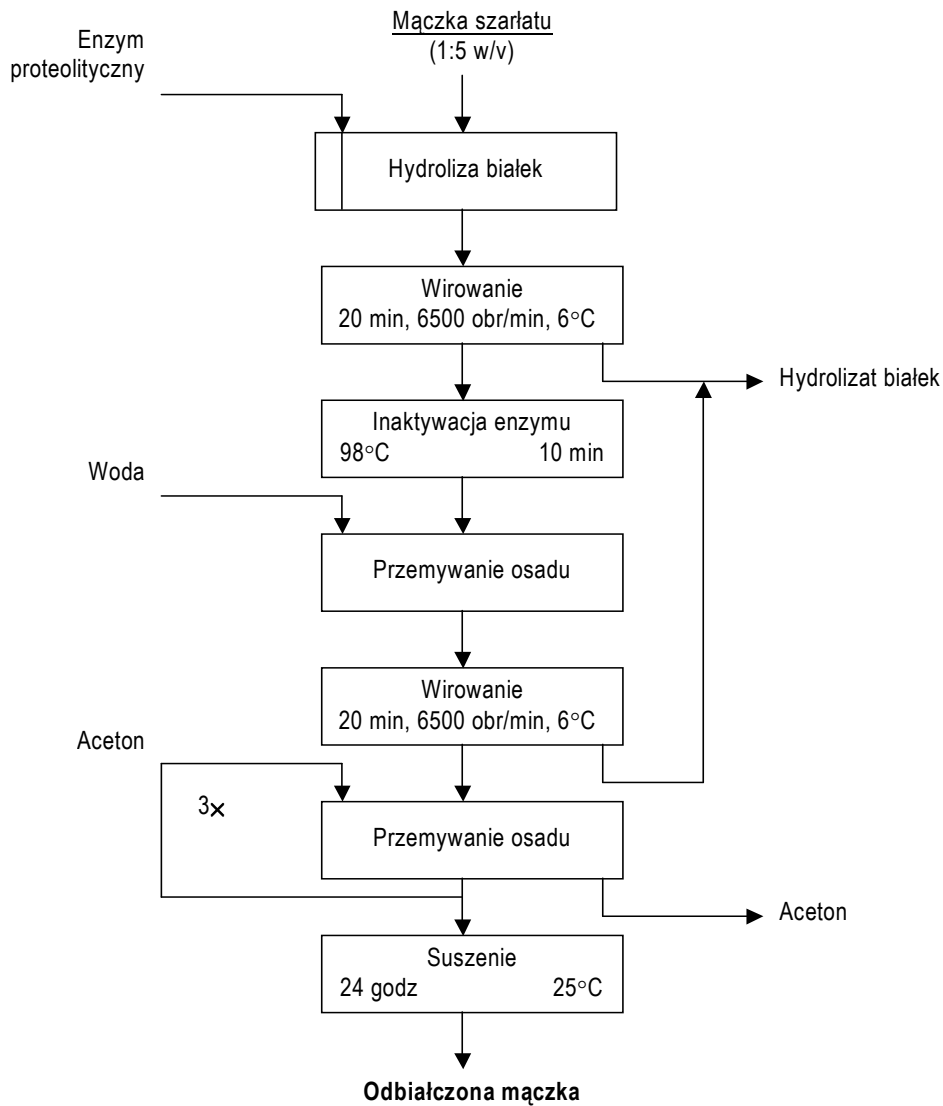
Po zakończeniu ekstrakcji i odwirowaniu supernatanty przechowywano w stanie zamrożonym, a część supernatantu liofilizowano w celu dalszych oznaczeń. W każdym supernatancie oznaczono ilość związków azotowych metodą Kjeldahla. Wyniki wyrażono jako procent wyekstrahowanych białek ($N \times 5,85$) w stosunku do całkowitej ich zawartości w mączce szarłatowej. Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech oddzielnych powtórzeniach.



Rys. 8. Schemat odbiałczania skrobi mączki szarłat roztworami 0,25% NaOH, 1% NaCl lub 1% NaCl w 0,25% NaOH

12.2.3. Izolowanie produktów enzymatycznej hydrolizy białek

Białka szarłat hydrolyzowano według schematu przedstawionego na Rys. 9 w warunkach optymalnych dla działania każdego enzymu (Tabela 10). Zawiesinę mączki szarłat (1:5 w/v) po uregulowaniu pH do wartości optymalnej dla działania stosowanego enzymu ogrzewano wstępnie w łaźni wodnej do osiągnięcia odpowiedniej temperatury (Tabela 11). Następnie dodawano enzym proteolityczny w ilości wymienionej w Tabeli 11 i prowadzono reakcję w czasie 0,5-2 godz. mieszając zawiesinę mieszadłem mechanicznym.



Rys. 9. Schemat enzymatycznego pozyskiwania białek z mąki szarłatowej

W celu określenia optymalnego czasu trwania hydrolizy białek co 0,5 godz. pobierano określoną ilość zawiesiny, którą natychmiast odwirowywano (6500 obr/min, 4°C, 20 min). Supernatant ogrzewano przez 10 min w 98°C celem inaktywacji enzymu. Po ochłodzeniu supernatantu doprowadzano pH do około 6,5, zamrażano, a następnie liofilizowano. Nierozpuszczalną pozostałość przemywano wodą destylowaną, a następnie 3-krotnie acetonem i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. W supernatantach oznaczono ilość uwolnionych związków azotowych metodą Kjeldahla. Wyniki wyrażono jako procent wyekstrahowanych białek ($N \times 5,85$) w stosunku do całkowitej ich zawartości w maczce. Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech oddzielnych powtórzeniach.

Tabela 10. Optymalne warunki działania oraz pochodzenie enzymów stosowanych do otrzymywania hydrolizatów białkowych z mączki szarłat

Enzym	Producent	Źródło	Optymalne warunki działania*	
			pH	Temperatura [°C]
Alkalaza	Merck	<i>Bacillus licheniformis</i>	8,5	55
Bromelaina	Merck	Ananas	6,8	28
Neutraza	Novo Industri A/S	<i>Bacillus subtilis</i>	6,5	45-55
Protamex	Novozymes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> lub <i>Bacillus licheniformis</i>	6,0-7,5	50-60
Trypsyna	Fluka	Trzustka wołowa	7,5	35

* optymalne warunki działania enzymów sugerowane przez producentów preparatów

Stopień hydrolizy białek określano na podstawie zawartości wolnych grup aminowych wyznaczonej metodą miareczkowania formolowego. W przypadku hydrolizatów otrzymanych z użyciem alkalazy stopień hydrolizy białek obliczono na podstawie ilości 4 M roztworu NaOH zużytego w celu utrzymania stałej wartości pH mieszaniny reakcyjnej wynoszącej 8,5. Metody określenia stopnia hydrolizy białek opisano dokładnie w sekcji 12.2.4.

Tabela 11. Warunki prowadzenia enzymatycznej hydrolizy mączki szarłat

Enzym	Dawka enzymu*	pH	Temperatura hydrolizy [°C]				Czas [godz]
Alkalaza	4,5 AU	8,5	45	50	55	60	0,5-2
Bromelaina	4,5 AU	6,0	25	30	35	40	0,5-2
Neutraza	4,5 AU	6,5	40	45	50	55	0,5-2
Protamex	4,5 AU	7,0	40	45	50	55	0,5-2
Trypsyna	0,25 g	7,5	30	35	40	45	0,5-2

* ilość enzymu (wyrażona w g lub jednostkach Ansona) użyta do hydrolizy 100 g mączki szarłat

12.2.4. Oznaczanie stopnia hydrolizy białek

Zawartość wolnych grup aminowych w hydrolizatach wyznaczono metodą miareczkową (Kędryna i in., 1996). 1% roztwory hydrolizatów alkalizowano wobec fenoloftaleiny za pomocą 0,02 M roztworu NaOH aż do wystąpienia różowego zabarwienia. Następnie dodawano 5 cm³ doprowadzonego do pH=8,5 aldehydu mrówkowego i po upływie 5 min miareczkowano tak przygotowany roztwór za pomocą 0,01 M roztworu NaOH do barwy lekko różowej utrzymującej się przez 20 sekund.

Zawartość wolnych grup aminowych ($\mu\text{mol/g}$) obliczono ze wzoru:

$$N (\mu\text{mol/g}) = \frac{V \cdot 10}{m_b}$$

gdzie:

V – objętość 0,01 M roztworu NaOH zużyta na miareczkowanie próbki [cm^3]

m_b – masa próbki [g]

W analogiczny sposób oznaczono zawartość wolnych grup aminowych w mączce szarłatu poddanej całkowitej hydrolizie w 6 M roztworze HCl przez 6 godz. w temperaturze 105°C .

Stopień hydrolizy białek szarłatu (%) obliczono ze wzoru:

$$\text{DH} (\%) = \frac{N_1}{N_2} \cdot 100\%$$

gdzie:

N_1 – zawartość wolnych grup aminowych w hydrolizacie [$\mu\text{mol/g}$ białka]

N_2 – zawartość wolnych grup aminowych w mączce szarłatu poddanej całkowitej hydrolizie [$\mu\text{mol/g}$ białka]

Stopień hydrolizy białek (%) katalizowanej alkalazą obliczono na podstawie ilości 4 M roztworu NaOH dodawanego podczas hydrolizy w celu utrzymania stałej wartości pH wynoszącej 8,5, korzystając ze wzoru:

$$\text{DH} (\%) = \frac{1}{\alpha \cdot h_{\text{tot}}} \cdot \frac{V \cdot c}{MB} \cdot 100\%$$

gdzie:

α – stopień dysocjacji

h_{tot} – ogólna ilość wiązań peptydowych w białkach wynosząca średnio 8 moli/kg

V – zużycie zasady [dm^3]

c – stężenie zasady [mol/dm^3]

MB – masa białka ($N \times 5,85$) [kg]

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH} - \text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}}}$$

W zależności od warunków hydrolizy wartość stopnia dysocjacji (α) przyjmuje różne wartości (Tabela 12). Optymalne pH dla działania alkalazy wynosi 8,5.

Tabela 12. Wartości stopnia dysocjacji (α) w zależności od warunków panujących podczas hydrolizy białek katalizowanej alkalazą

Temperatura [°C]	Wartość pK	Wartość α
45	7,2	1,05
50	7,1	1,04
55	7,0	1,035
60	6,9	1,03

wg Olsen i Adler-Nissen, 1979

12.3. Określenie optymalnych warunków precypitacji białek w punkcie izoelektrycznym

W ekstrakcie ustalano odpowiednie pH (3,0-7,0) roztworami 1 M HCl lub 1 M NaOH. Następnie mieszano przez 30 min mieszadłem magnetycznym w temperaturze 20°C. Strącony precypitat odwirowano (9000 obr/min, 6°C, 15 min), a następnie rozpuszczano w 0,125 M roztworze NaOH (Molina Ortiz i Wagner, 2002). Ilość uzyskanych w ten sposób białek oznaczono metodą Kjeldahla. Zauważono, że po przekroczeniu wartości pH 5,5 ilość strąconych białek malała, dlatego zawężono zakres badanego pH do wartości 3,0-5,5. Punkt izoelektryczny białek szarłatki wynosi ok. 4,0 (Segura-Nieto i in., 1994).

12.4. Określenie wydajności termicznego strącania białek z ekstraktów

Ekstrakty białek ogrzewano w łaźni olejowej w temperaturze 85°C przez 30 min okresowo mieszając. Strącone białka odwirowano (9000 obr/min, 6°C, 15 min), a następnie rozpuszczano w 0,125 M roztworze NaOH (Molina Ortiz i Wagner, 2002). Ilość strąconych termicznie białek obliczono ($N \times 5,85$) na podstawie zawartości azotu oznaczonej metodą Kjeldahla.

12.5. Oznaczenie właściwości funkcjonalnych preparatów i hydrolizatów białkowych

Właściwości funkcjonalne oznaczono w próbkach hydrolizatów otrzymanych w warunkach zapewniających najlepszy stopień ekstrakcji białek (Tabela 13) oraz w preparatach białkowych otrzymanych przez strącenie w punkcie izoelektrycznym lub przez termiczną precypitację. Wszystkie oznaczenia właściwości funkcjonalnych hydrolizatów i preparatów białkowych wykonano w trzech oddzielnych powtórzeniach.

Tabela 13. Warunki enzymatycznej hydrolizy mączki szarlatu zapewniające najlepszy stopień ekstrakcji białek

Enzym	Alkalaza	Bromelaina	Neutraza	Protamex	Trypsyna
Temperatura hydrolizy [°C]	60	40	55	55	40
Czas hydrolizy [godz]	2	2	2	2	1

12.5.1. Rozpuszczalność przy różnym pH

Hydrolizaty lub preparaty białkowe mieszano z wodą w proporcji 1:100 (w/v). Wartość pH mieszaniny zmieniano w zakresie 4,0-9,0 1 M roztworami NaOH lub HCl i mieszano mieszadłem magnetycznym przez 30 min w temperaturze pokojowej (Severin i Xia, 2006). Następnie próbki wirowano (9000 obr/min, 4°C, 15 min) i w supernatantach oznaczono zawartość azotu ogólnego metodą Kjeldahla.

Rozpuszczalność preparatu (%) obliczono ze wzoru:

$$X (\%) = \frac{m_1}{m} \cdot 100\%$$

gdzie:

m_1 – zawartość azotu ogólnego w supernatancie [g]

m – zawartość azotu ogólnego w masie naważki [g]

12.5.2. Zdolność emulgowania (EA) i stabilność emulsji (ES)

1% roztwory hydrolizatów lub preparatów białkowych mieszano mieszadłem magnetycznym przez 15 min w temperaturze pokojowej. Pobierano równe objętości roztworu próbek i oleju

rzepakowego „Kujawski”, a następnie homogenizowano (11600 rpm) przez 1 min. Po homogenizacji próbki wirowano (2000 obr/min, 20°C, 5 min) i mierzono objętość całkowitą próbki oraz objętość warstwy emulsji. W celu oznaczenia stabilności emulsji ogrzewano ją przez 30 min w temperaturze 80°C w łaźni olejowej, a następnie ponownie wirowano (2000 obr/min, 20°C, 5 min) i mierzono objętość całkowitą próbki i objętość warstwy emulsji (Shahidi i in., 1995).

Zdolność emulgowania (%) obliczono ze wzoru:

$$EA (\%) = \frac{V_1}{V} \cdot 100\%$$

gdzie:

V_1 – objętość warstwy emulsji [cm³] po homogenizacji

V – objętość całkowita próbki [cm³]

Stabilność emulsji (%) obliczono ze wzoru:

$$ES (\%) = \frac{V_2}{V_1} \cdot 100\%$$

gdzie:

V_2 – objętość warstwy emulsji po ogrzewaniu [cm³]

V_1 – objętość warstwy emulsji po homogenizacji [cm³]

12.5.3. Zdolność pienienia (FC) i stabilność piany (FS)

1% roztwory hydrolizatów lub preparatów białkowych mieszano mieszadłem magnetycznym przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie próbki homogenizowano (11600 rpm) przez 3 min i po 30 s mierzono objętość wytworzonej piany. W celu oznaczenia stabilności piany mierzono jej objętość po upływie 5, 10 i 20 min od momentu homogenizacji (Silva-Sánchez i in., 2004).

Zdolność pienienia (%) obliczono ze wzoru:

$$FC (\%) = \frac{V_1}{V} \cdot 100\%$$

gdzie:

V_1 – objętość piany po upływie 30 s po homogenizacji [cm³]

V – objętość roztworu przed homogenizacją [cm³]

Stabilność piany (%) obliczono ze wzoru:

$$FS (\%) = \frac{V_2}{V_1} \cdot 100\%$$

gdzie:

V₂ – objętość piany po upływie 5, 10 lub 20 min po homogenizacji [cm³]

V₁ – objętość piany po upływie 30 s po homogenizacji [cm³]

12.5.4. Oznaczenie gorzkości hydrolizatów

Gorzkość oznaczono sensorycznie w próbkach hydrolizatów otrzymanych w warunkach zapewniających najlepszy stopień ekstrakcji białek (Tabela 13), a także w próbkach hydrolizatów o podobnym stopniu hydrolizy białek. Analizę wykonano przy udziale 6 osób, u których po przeprowadzonych uprzednio testach nie wykryto daltonizmu smakowego i u których określono próg wrażliwości na smak gorzki. Ocenę sensoryczną przeprowadzono stosując 2,5% roztwory liofilizowanych hydrolizatów w wodzie destylowanej. Gorzkość tak przygotowanych roztworów oceniono w skali od 1 do 5, gdzie wyróżnik 1 oznaczał hydrolizat najmniej gorzki, a ocena 5 – najbardziej gorzki.

12.6. Wyznaczenie optymalnego czasu i temperatury upłynniania skrobi

Pozostałość po ekstrakcji białek zawieszano w wodzie (1:15 w/v) i prowadzono hydrolizę skrobi preparatem termostabilnej α -amylazy (Termamyl SC firmy Novozymes) w ilości zalecanej przez producenta. Reakcję hydrolizy prowadzono przez 6 godz. w warunkach optymalnych dla działania enzymu (90°C, pH 7,0). Po każdej godzinie procesu pobierano określoną objętość zawiesiny i inaktywowano enzym przez oziębienie próbek w lodzie, a następnie odwirowywano (9000 obr/min, 4°C, 20 min). Natomiast w celu określenia optymalnej temperatury upłynniania reakcje hydrolizy skrobi prowadzono przez 2 godz. w temperaturach 80, 85, 90 oraz 95°C. Po upływie tego czasu enzym inaktywowano przez oziębienie próbek w lodzie. Pozostałość po odwirowaniu (9000 obr/min, 4°C, 20 min) przemywano acetonem i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. W otrzymanych supernatantach oznaczono zawartość cukrów redukujących metodą Bernfeld'a (1955). Na podstawie wykresu zależności zawartości cukrów

redukujących od czasu procesu wyznaczono optymalny czas hydrolizy skrobi, zaś z wykresu zależności zawartości cukrów redukujących od temperatury procesu wyznaczono optymalną temperaturę hydrolizy skrobi.

12.7. Metody analityczne

Suchą masę oznaczono metodą suszarkową w temperaturze 105°C. Zawartość lipidów oznaczono metodą Soxhleta prowadząc ekstrakcję lipidów eterem naftowym przez 6 godz. Popiół oznaczono metodą wagową polegającą na spaleniu próbek w kwarcowych tyglach w płomieniu palnika gazowego, a następnie ich spopieleniu w piecu muflowym w temperaturze 650°C. Zawartość azotu ogółem (N_O) oznaczono metodą Kjeldahla wg PN-75/A-04018. Stosowano przelicznik azotu na białka szarłatu wynoszący 5,85 wg Segura-Nieto i in., (1994).

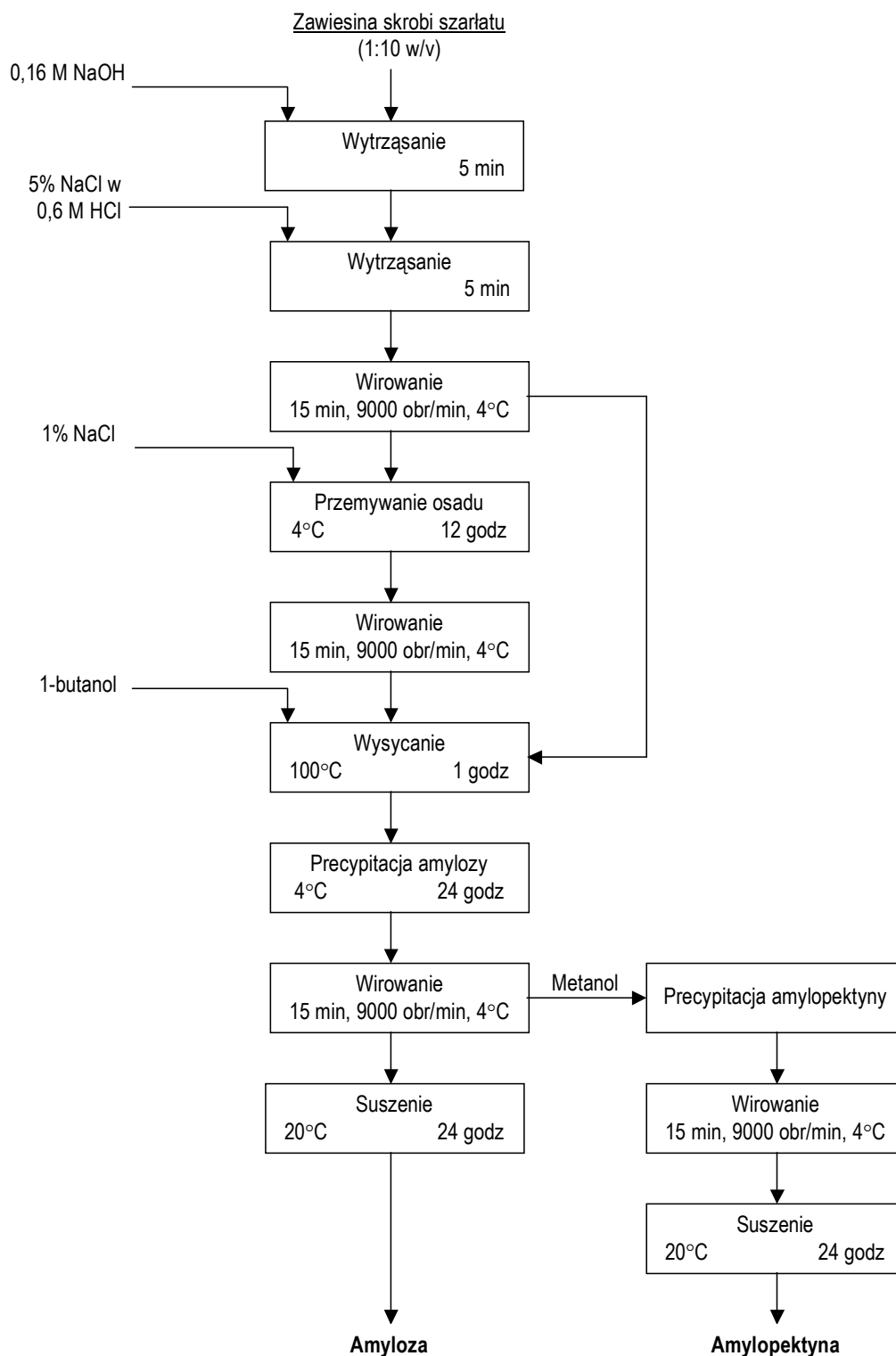
Ilość błonnika w materiale wyjściowym oznaczono jako pozostałość po całkowitym upłynnieniu skrobi przy użyciu termostabilnej α -amylazy (Termamyl SC firmy Novozymes) i odbiałczeniu enzymatycznym alkalazą firmy Merck.

W celu oznaczenia zawartości azotu niebiałkowego w mące szarłatu przeprowadzono dwukrotną ekstrakcję białek 0,25% roztworem NaOH w temperaturze 20°C, a następnie strącono wyekstrahowane białka 27% roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA) w takiej ilości, aby jego końcowe stężenie w mieszaninie wynosiło 10%. W supernatancie oznaczono zawartość azotu niebiałkowego (N_N) metodą Kjeldahla i z zależności: N_O - N_N obliczono zawartość azotu białkowego w mące szarłatu.

Zawartość cukrów redukujących w hydrolizatach białkowych i skrobiowych (mg/ml) oznaczono metodą Bernfeld'a (1955). Stężenie cukrów redukujących obliczono z równania regresji krzywej wzorcowej wyznaczonej dla maltozy w zakresie stężeń od 0 do 1,0 mg/ml:

$$c = 0,832 \cdot A_{500} + 0,109$$

Zawartość amylozy i amylopektyny w skrobi szarłatu oznaczono zmodyfikowaną metodą Lawal'a i in., (2004) oraz metodą zamieszczoną na stronie internetowej www.faculty.mansfield.edu/bganong/biochemistry/starch.htm zgodnie ze schematem przedstawionym na Rys. 10.



Rys. 10. Schemat otrzymywania amylozy i amylopektyny ze skrobi szarłatu

Do 5 ml 10% (w/v) roztworu skrobi dodano 55 ml 0,16 M roztworu NaOH i delikatnie wytrząsano przez 5 min. Następnie dodano 15 ml 5% NaCl w 0,6 M roztworze HCl i ponownie

wytrząsano. Następnie próbki wirowano (9000 obr/min, 4°C, 15 min), osad zawieszono w 20 ml 1% roztworu NaCl w celu przemycia osadu i pozostawiono na 12 godz. w temperaturze 4°C, a następnie wirowano (9000 obr/min, 4°C, 15 min). Supernatant zawierający amylozę nasycono 1-butanołem. Próbkę ogrzewano w łaźni wodnej przez 1 godz. w temperaturze 100°C, a następnie pozostawiono w temperaturze 4°C na 24 godz. w celu precypitacji amylozy. Po tym czasie próbkę wirowano (9000 obr/min, 4°C, 15 min) i osad zawierający amylozę suszono w temperaturze pokojowej i ważono. Do supernatantu dodano nadmiar metanolu w celu precypitacji amylopektyny, następnie próbkę wirowano (9000 obr/min, 4°C, 15 min). Osad zawierający amylopektynę pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej i ważono.

12.8. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawione w tabelach i na wykresach są średnią z trzech do sześciu oddzielnych doświadczeń \pm odchylenie standardowe. Istotność różnic ($P < 0,05$) pomiędzy próbkami określano testem t – Studenta.

13. Omówienie i dyskusja wyników

13.1. Wpływ sposobu odtłuszczania na skład podstawowy mączki szarłatu

Jednym z istotnych sposobów wykorzystania nasion szarłatu jest wytwarzanie preparatów oleju uzupełniającego dietę w niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe, naturalne substancje przeciwutleniające, tokoferole, tokotrienole i fitosterole. Szczególnie cennym składnikiem tego oleju jest skwalen wzmacniający odporność i poprawiający gospodarkę lipidową organizmu oraz obniżający ryzyko choroby niedokrwiennej serca. Olej z szarłatu jest też stosowany w kosmetyce do pielęgnacji skóry, którą chroni przed łuszczeniem i rogowaceniem oraz wywiera działanie przeciwzapalne i antybakteryjne.

Oprócz oleju nasiona szarłatu zawierają cenne żywieniowo białka, których charakterystykę i wartość biologiczną przedstawiono w rozdziale 3.1. niniejszej rozprawy. Zaletą białek szarłatu jest między innymi duża wartość biologiczna oceniana przez niektórych autorów jako porównywalna z białkami mleka, dobra strawność rzeczywista oraz bardzo mała zawartość białek wywołujących niekorzystną odpowiedź immunologiczną u osób cierpiących na celiakię, które występują we frakcji glutenu innych zbóż. Głównym celem przeprowadzonych badań było więc opracowanie sposobu wykorzystania mączki szarłatu z której oddzielono lipidy, do produkcji preparatów białkowych użytecznych jako dodatek do żywności. Skład i wartość biologiczna takich preparatów zależy między innymi od sposobu izolacji lipidów.

Porównanie składu podstawowego próbek wyszczególnionych w sekcji 12.1. wykazało, że najbardziej zachowawczą metodą jest proponowana w zgłoszeniu patentowym nr P-384-563 procedura oddzielania strumieniem powietrza bogatych w lipidy liścieni nasion szarłatu, opisana w sekcji 12.1. Jej skuteczność jest jednak niewielka i ilość oddzielonych tym sposobem lipidów nie przekracza 40% ich zawartości w zmielonym ziarnie (Tabela 14). Zubożona w lipidy mączka zawiera podobną do zmielonych nasion ilość białek oraz mniej błonnika i więcej skrobi (Tabela 14). Zróżnicowanie zawartości tych składników w nasionach szarłatu oraz w częściowo odtłuszczonej mączce wynika ze zmielenia nasion, a następnie separacji frakcji mączki przeznaczonej do izolacji lipidów, zawierającej liścienie, okrywy nasienne i warstwę aleuronową. Ziarna i częściowo odtłuszczone mąka szarłatu są lepszym źródłem substancji mineralnych od innych zbóż, o czym świadczy około 2-krotnie większa zawartość popiołu niż w nasionach pszenicy czy żyta (Tabela 2).

Pominięcie ekstrakcji lipidów rozpuszczalnikami organicznymi oraz niewielkie różnice składu podstawowego mączki zubożonej w lipidy wg zgłoszenia patentowego P-384-563 i zmielonych ziaren szarłatu wskazują, że oba surowce mogą być wykorzystane do produkcji rozmaitych

produktów żywnościowych wymienionych w rozdziale 7. W celu uzyskania satysfakcjonującej wydajności oddzielania oleju niezbędna jest jednak jego ekstrakcja stosowanym np. powszechnie w tym celu heksanem. Ekstrakcji odpowiednimi rozpuszczalnikami nie da się też uniknąć w celu wyizolowania lipidów z oddzielonej frakcji liścieni. Skutkiem ekstrakcji mączki szarłatu heksanem było spowodowane usunięciem lipidów zwiększenie zawartości białka ogólnego i skrobi przy prawie niezmiętej w porównaniu z mączką nr 1 zawartością błonnika (Tabela 14).

Tabela 14. Skład podstawowy ziaren szarłatu, zubożonej w lipidy mąki szarłatu oraz całkowicie odtłuszczonej mąki szarłatu

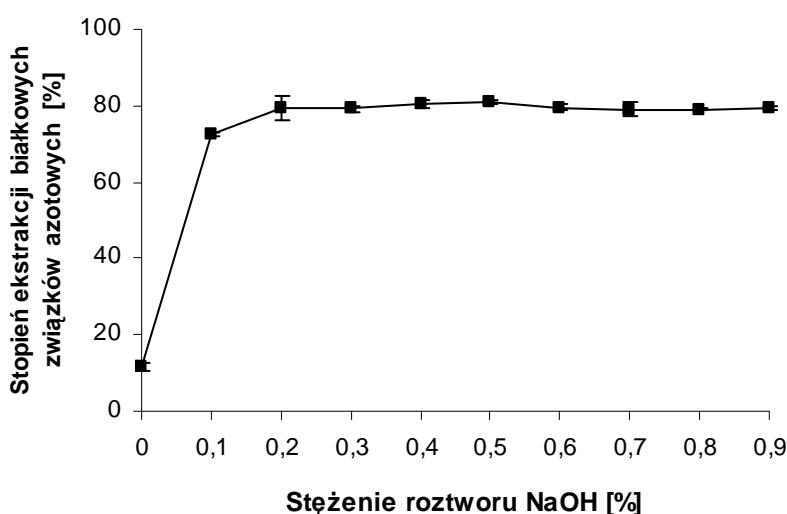
Składnik	Udział składnika [%]		
	Ziarno szarłatu (mączka 1)	Mączka zubożona w lipidy (mączka 2)	Mączka odtłuszczone heksanem (mączka 3)
Sucha masa	88,9 ± 0,11	90,21 ± 0,034	95,45 ± 0,086
Białko ogólne (N × 5,85)	12,9 ± 0,24	13,2 ± 0,80	15,02 ± 0,093
Błonnik	12,0 ± 0,13	7,3 ± 0,25	12,9 ± 0,20
Skrobia, w tym:	53,6	61,6	69,92
amyloza	19,3 ± 5,4	19,3 ± 5,4	19,3 ± 5,4
amylopektyna	75,4 ± 5,7	75,4 ± 5,7	75,4 ± 5,7
Tłuszcz	7,7 ± 0,62	4,6 ± 0,16	0,0
Popiół	2,65 ± 0,013	3,52 ± 0,035	3,21 ± 0,050

Przedstawione wyniki stanowią wartość średnią z 6-10 oznaczeń ± odchylenie standardowe

13.2. Uzasadnienie wyboru sposobów izolowania białek z odtłuszczonej mączki szarłatu

Odtłuszczone heksanem mączka szarłatu zawiera około 15% białka surowego i jest dobrym, ale do tej pory niewykorzystywanym surowcem do otrzymywania preparatów białkowych. Wynika to między innymi z niewielkiej dotychczas ilości opracowań dotyczących warunków wydajnej ekstrakcji białek z nasion szarłatu, a szczególnie możliwości uzyskiwania hydrolizatów białkowych. Opracowana metoda przetwarzania mączki powinna zapewnić wytwarzanie preparatów o jak najmniej zmienionej wartości biologicznej. Najbardziej skutecznym sposobem oddzielania białek od pozostałych składników surowca jest ekstrakcja w środowisku alkalicznym lub hydroliza enzymatyczna. Istniejące technologie odzyskiwania białek z rozmaitych produktów ubocznych rzadko przewidują ekstrakcję roztworami zasad. Wynika to z obawy przed możliwością niekorzystnych przemian w silnie alkalicznym środowisku. Wyniki rozmaitych badań sugerują jednak, że rozkład i racemizację aminokwasów w białkach oraz tworzenie lizynoalaniny, lantioniny i kwasu

diaminopropionowego można ograniczyć przeprowadzając ekstrakcję bardzo rozcieńczonymi roztworami NaOH. Niepożądane zmiany w białkach powstają gdy ekstrakcja prowadzona jest w mniej łagodnych warunkach, w temperaturze powyżej 30°C i wartości pH 13. Stosując odczyn środowiska reakcji poniżej 11 i temperaturę pokojową, można otrzymać izolat białkowy wolny od lizynoalaniny i innych toksycznych aminokwasów, który posiada wartość odżywczą porównywalną do wartości odżywczej mięsa (Lawrence i Jelen, 1982; Palka i in., 1985; Shahidi i in., 1995). Alkaliczną ekstrakcję zastosowano również do odzyskiwania białek z pancerzy krabów i krewetek (Shahidi i Synowiecki, 1996). Badania skuteczności ekstrakcji białek z mąki szarłatu wykazały, że największą wydajność alkalicznego odbiałczania wynoszącą około 80% znajdujących się w surowcu białek uzyskiwano przy 0,2% stężeniu roztworu NaOH i dalszy wzrost stężenia czynnika ekstrahującego w środowisku nie powodował już istotnego przyrostu stopnia ekstrakcji i zmniejszenia pozostałości związków azotowych w mączce (Rys. 11). Dużą niedogodnością alkalicznej ekstrakcji było żelowanie mieszaniny o stężeniu powyżej 0,5% utrudniające skuteczne oddzielenie stałej pozostałości. Można to tłumaczyć niewielką, wynoszącą tylko 20°C temperaturą procesu, której zwiększenie nasiliłoby jednak niekorzystne przemiany białek.



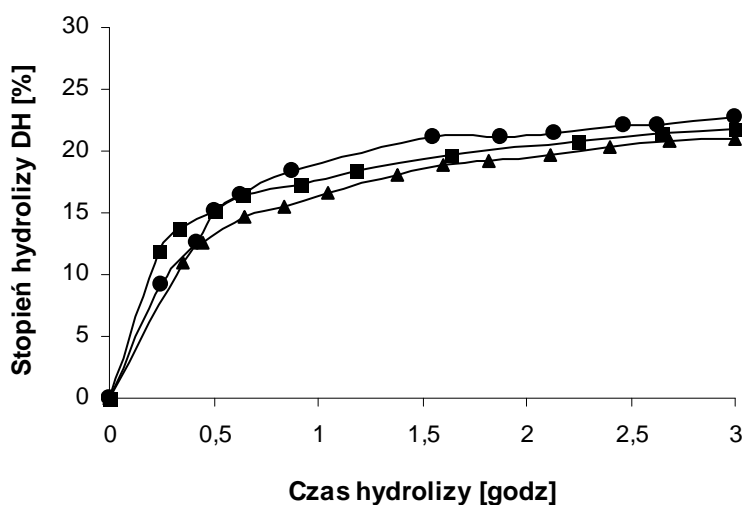
Rys. 11. Zmiany stopnia ekstrakcji białkowych związków azotowych z częściowo odtłuszczonej mączki szarłatu w zależności od stężenia roztworu NaOH

Przedstawione wyniki są średnią z 3 ekstrakcji oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

13.2.1. Dobór warunków enzymatycznej hydrolizy białek

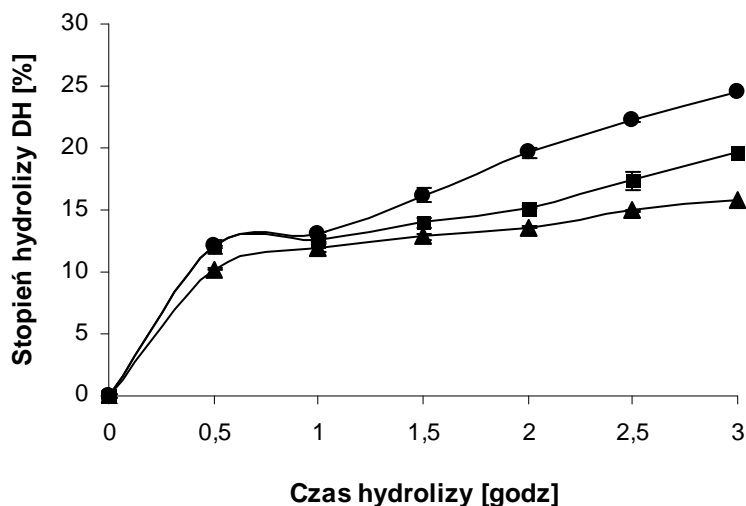
Szybkość hydrolizy pod wpływem enzymów proteolitycznych zależy między innymi od rodzaju reszt aminokwasów tworzących wiązania peptydowe, które są z tego powodu lepiej

lub gorzej dostępne dla enzymu. Sekwencje aminokwasów determinują więc specyficzność działania biokatalizatora względem określonego rodzaju białka. Dokonując wyboru enzymów proteolitycznych do otrzymywania hydrolizatów z mąki szarłatu należało sprawdzić skuteczność ich działania względem surowca. Przeprowadzone wstępne badania wykazały, że powszechnie stosowane w przemyśle preparaty enzymatyczne – alkalaza, neutraza i protamex, różniące się warunkami i specyficznością działania, mogą być stosowane do odzyskiwania białek z mąki szarłatu. W przypadku wszystkich tych enzymów prawie maksymalny stopień hydrolizy białek z mączki szarłatu uzyskiwano w okresie pierwszych 30 min hydrolizy i dalsze zwiększanie czasu reakcji powodowało tylko niewielkie zmiany wydajności procesu. Na wyczerpanie ilości wiązań peptydowych ulegających szybko rozszczepieniu wskutek katalitycznego oddziaływania enzymów wskazuje także zahamowanie przyrostu stopnia hydrolizy białek po przekroczeniu wartości 20-25% niezależnie od zwiększenia ilości jednostek enzymu dodanego do środowiska reakcji (Rys. 12-14). Dane literaturowe potwierdzają te wyniki, bowiem uzyskany przez innych autorów maksymalny stopień hydrolizy białek przy użyciu alkalazy wynosi 15-25%, zaś przy zastosowaniu protamexu 10-20% (Chabanon i in., 2007; Kołakowski, 2005; Yust i in., 2004).



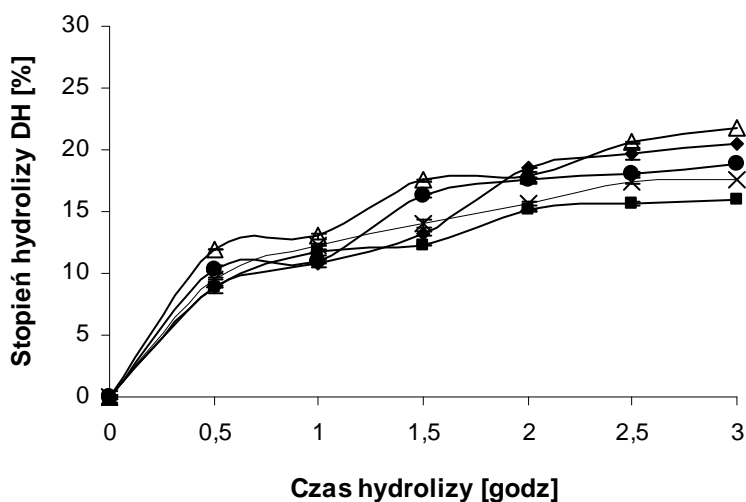
Rys. 12. Zależność stopnia hydrolizy białek od czasu reakcji przy stężeniach alkalazy wynoszących 0,205 (●); 0,307 (▲) i 0,410 (■) AU/g białka

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe



Rys. 13. Zależność stopnia hydrolizy białek od czasu reakcji przy stężeniach preparatu protamex wynoszących 0,205 (▲); 0,307 (●) i 0,410 (■) AU/g białka

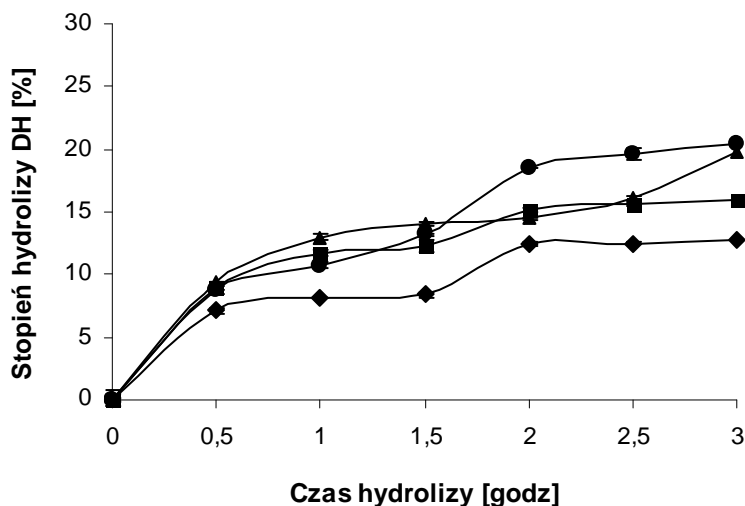
Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe



Rys. 14. Zależność stopnia hydrolizy białek od czasu reakcji przy stężeniach neutrazy wynoszących 0,307 (◆); 0,410 (■); 0,512 (●); 0,615 (×) i 0,717 (Δ) AU/g białka

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Preparat neutrazy wymaga do prawidłowego działania katalitycznego aktywatora w postaci Ca^{2+} . Mączka szarłatu zawiera związki wapnia, a zatem należało sprawdzić czy ich obecność w mieszaninie reakcyjnej jest wystarczająca dla optymalnego działania tego preparatu (Rys. 15). Wiadomo bowiem, że nadmiar aktywatorów może działać hamująco na przebieg katalizowanej reakcji.



Rys. 15. Zależność stopnia hydrolizy białek od obecności aktywatora enzymu przy stężeniach preparatu neutraza wynoszących 0,307 AU/g białka bez dodatku CaCl₂ (●); 0,307 AU/g białka z dodatkiem CaCl₂ (◆); 0,410 AU/g białka bez dodatku CaCl₂ (▲) oraz 0,410 AU/g białka z dodatkiem CaCl₂ (■)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Dodanie soli wapnia do mieszaniny reakcyjnej nie wpływało istotnie na polepszenie procesu hydrolizy białek przy udziale neutraży (Rys. 15). Ilość wapnia obecna w mieszaninie reakcyjnej pochodząca z surowca jest więc wystarczająca do prawidłowego działania neutraży.

13.2.2. Wpływ rodzaju enzymu na skuteczność odbiałczania mączki szarłat w zależności od temperatury i czasu procesu

Warunki hydrolizy zmieniają właściwości funkcjonalne, sensoryczne oraz wartość żywieniową hydrolizatów białkowych. W wyniku enzymatycznej hydrolizy następuje stopniowe zniszczenie pierwotnej konformacji oraz fragmentacja cząsteczek. Po rozszczepieniu tylko kilku wiązań peptydowych w cząsteczce, zmiany są niewielkie i otrzymany produkt jest zmodyfikowanym białkiem. Limitowana proteoliza ma na celu poprawę właściwości funkcjonalnych białek, jak zwiększenie rozpuszczalności, obniżenie lepkości, wzrost aktywności powierzchniowej wpływający na właściwości emulgujące i pianotwórcze, obniżenie alergenicności, zmianę właściwości żelujących oraz polepszenie smaku i zapachu (Kořakowski, 2005). Wielkość tych zmian zależy od specyficzności użytego enzymu, udziału i sekwencji aminokwasów w białku oraz stopnia hydrolizy (DH), wyrażonego procentowym udziałem azotu aminowego w ogólnej zawartości azotu w hydrolizacie. Czynniki środowiska, takie jak temperatura i czas jej oddziaływania, wywierają wpływ na przestrzenne ukształtowanie łańcuchów polipeptydowych i przez zmianę konformacji białka mogą

ułatwić dostępność enzymów do wiązań podatnych na hydrolizę. Tak więc określone białko, które w rodzimym stanie jest odporne na działanie danego enzymu proteolitycznego, może wskutek działania czynników denaturujących przyjąć taką konformację, w której wrażliwe wiązania są odsłonięte i podatne na hydrolizę. Zwiększenie szybkości hydrolizy wskutek denaturacji zależy od odporności danego białka na proteolizę w stanie rodzimym, im większa jest szybkość hydrolizy formy rodzimej, tym mniejszy jest wpływ denaturacji. W wielu przypadkach skuteczność działania enzymów proteolitycznych osiąga maksimum przy umiarkowanym stopniu denaturacji białka. Dalsze ogrzewanie obniża stopień hydrolizy, prawdopodobnie wskutek agregacji zdenaturowanych cząstek zmniejszającej dostępność enzymu do wiązań peptydowych.

Do badania wpływu rodzaju stosowanego enzymu na stopień ekstrakcji produktów hydrolizy białek z odtłuszczonej mączki szarłatki oraz na właściwości funkcjonalne uzyskanych produktów stosowano handlowe preparaty endoproteaz, różniące się warunkami i specyficznością działania, takie jak: alkalaza, bromelaina, neutraza, protamex i tripsyna. Jako kryteria umożliwiające dokonanie wyboru najbardziej odpowiedniego enzymu przyjęto skuteczność ekstrakcji produktów hydrolizy białek w różnych temperaturach przy optymalnym pH oddziaływania oraz zależność wybranych właściwości funkcjonalnych od uzyskanego stopnia hydrolizy białek.

Tabela 15. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatki od czasu hydrolizy alkalazą w 45°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	57,1 ± 0,48 ^a	23,0 ± 0,94	11,44 ± 0,47
1,0	57,9 ± 0,85 ^b	23,3 ± 0,11	11,71 ± 0,055
1,5	60,4 ± 1,36 ^c	24,5 ± 0,22	12,29 ± 0,11
2,0	61,9 ± 0,82 ^d	26,1 ± 0,22	13,35 ± 0,11

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Ponieważ podczas enzymatycznej hydrolizy białek następuje ekstrakcja znajdującej się w mączce glukozy, fruktozy, sacharozy i rafinozy oraz pewnej ilości skleikowanej skrobi badano także stopień zanieczyszczenia hydrolizatu tymi substancjami oznaczając zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym produkcie. Badania te są przydatne do dokonania wyboru enzymu o temperaturze działania zapewniającej jak największą ekstrakcję białek z surowca przy możliwie małym zanieczyszczeniu hydrolizatu pochodzącymi ze skrobi sacharydami. Oceniając wpływ rodzaju

enzymu i warunków reakcji na zawartość cukrów redukujących należy jednak uwzględnić, że około 11% ich oznaczonej w liofilizacie ilości pochodzi od dobrze rozpuszczalnych nieskrobiowych sacharydów, które prawie w całości przechodzą do hydrolizatu.

Tabela 16. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy alkalazą w 50°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	53,7 ± 0,21 ^a	28,2 ± 0,19	17,8 ± 0,20
1,0	53,3 ± 1,0 ^a	28,5 ± 0,32	18,1 ± 0,12
1,5	55,8 ± 1,4 ^b	30,3 ± 0,46	19,2 ± 1,3
2,0	57,4 ± 0,79 ^c	32,0 ± 1,0	19,4 ± 0,73

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 17. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy alkalazą w 55°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	53,6 ± 0,58 ^a	19,7 ± 0,51	12,6 ± 0,42
1,0	57,1 ± 0,50 ^b	21,4 ± 0,72	13,9 ± 0,41
1,5	57,1 ± 0,50 ^b	23,3 ± 0,68	15,5 ± 0,48
2,0	60,2 ± 2,5 ^c	24,8 ± 0,77	16,21 ± 0,088

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Największą wydajność reakcji enzymatycznej hydrolizy uzyskiwano prowadząc hydrolizę przez 2 godz. w obecności alkalazy w temperaturze 60°C lub protamexu w temperaturze 55°C, które usuwały odpowiednio 66% i 68% znajdujących się w mączce związków azotowych oznaczonych metodą Kjeldahla (Tabele 18 i 30). Maksymalny stopień ekstrakcji związków azotowych z mączki szarłatku, których głównym składnikiem są produkty enzymatycznej degradacji białek jest tylko o około 10% mniejszy niż w przypadku odbiałczania surowca w alkalicznym środowisku (Rys. 11).

Do uzyskanego hydrolizatu białkowego przechodzi jednak pewna ilość znajdującej się w mączce skrobi (Tabele 15-18), o czym świadczy między innymi większa zawartość

cukrów redukujących od wynikającej z zawartości glukozy, fruktozy i rafinozy wyekstrahowanej z mączki szarłat.

Tabela 18. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłat od czasu hydrolizy alkalazą w 60°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	59,6 ± 0,66 ^a	12,3 ± 0,12	8,27 ± 0,083
1,0	62,2 ± 1,7 ^b	20,5 ± 0,53	14,1 ± 0,45
1,5	63,8 ± 1,4 ^c	21,4 ± 0,29	15,2 ± 0,39
2,0	65,7 ± 1,2 ^d	26,5 ± 0,14	15,6 ± 0,21

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 19. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłat od czasu hydrolizy bromelainą w 25°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	40,8 ± 0,26 ^a	14,0 ± 0,17	3,38 ± 0,040
1,0	44,4 ± 0,43 ^b	14,3 ± 0,04	3,56 ± 0,010
1,5	47,5 ± 0,62 ^c	15,4 ± 0,13	4,13 ± 0,0,36
2,0	47,2 ± 0,70 ^c	16,8 ± 0,27	4,45 ± 0,071

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 20. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłat od czasu hydrolizy bromelainą w 30°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	43,8 ± 0,54 ^a	14,1 ± 0,080	3,58 ± 0,019
1,0	48,6 ± 0,93 ^b	14,1 ± 0,10	3,97 ± 0,027
1,5	49,0 ± 0,34 ^c	15,9 ± 0,21	4,54 ± 0,061
2,0	49,6 ± 0,40 ^c	17,4 ± 0,13	4,96 ± 0,039

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 21. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy bromelainą w 35°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	46,4 ± 1,1 ^a	15,3 ± 0,089	4,45 ± 0,027
1,0	48,0 ± 0,52 ^b	16,9 ± 0,10	5,06 ± 0,028
1,5	48,4 ± 0,50 ^b	18,2 ± 0,16	5,09 ± 0,012
2,0	49,7 ± 0,51 ^c	20,2 ± 0,07	5,63 ± 0,020

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy $p > 0,05$)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 22. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy bromelainą w 40°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	48,4 ± 0,40 ^a	15,5 ± 0,10	4,57 ± 0,030
1,0	50,5 ± 0,90 ^b	17,7 ± 0,15	5,60 ± 0,048
1,5	51,9 ± 0,74 ^c	19,3 ± 0,10	6,04 ± 0,030
2,0	52,6 ± 0,59 ^d	22,2 ± 0,13	7,08 ± 0,042

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy $p > 0,05$)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 23. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy neutrazą w 40°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	31,0 ± 2,4 ^a	11,8 ± 0,15	3,80 ± 0,047
1,0	34,9 ± 4,4 ^b	13,9 ± 0,34	5,72 ± 0,042
1,5	36,9 ± 1,4 ^c	14,1 ± 0,14	5,36 ± 0,054
2,0	40,5 ± 0,90 ^d	15,3 ± 0,54	6,0 ± 0,21

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy $p > 0,05$)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Ilość skrobi przenikającej do hydrolizatu wskutek powolnej degradacji jej ziaren zależy przede wszystkim od temperatury i czasu prowadzenia reakcji i tak np. w przypadku prowadzenia procesu przez 0,5 godziny z użyciem neutrazy jako biokatalizatora ilość cukrów redukujących

przechodzących do preparatu białkowego w temperaturze 55°C wzrasta o 28,8% wartości uzyskanej w temperaturze 40°C (Tabela 23).

Tabela 24. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy neutralną w 45°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	33,8 ± 2,8 ^a	15,1 ± 0,18	5,61 ± 0,067
1,0	44,8 ± 0,65 ^b	20,6 ± 0,41	8,4 ± 0,17
1,5	47,0 ± 0,91 ^c	23,1 ± 0,15	9,4 ± 0,27
2,0	48,2 ± 1,2 ^c	23,5 ± 0,39	9,5 ± 0,16

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 25. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy neutralną w 50°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	42,1 ± 0,79 ^a	16,2 ± 0,067	6,95 ± 0,030
1,0	48,2 ± 0,58 ^b	17,9 ± 0,56	8,2 ± 0,25
1,5	53,3 ± 1,2 ^c	21,1 ± 0,24	10,2 ± 0,14
2,0	53,6 ± 1,6 ^c	23,3 ± 0,11	11,23 ± 0,052

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 26. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy neutralną w 55°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	42,5 ± 0,0,5 ^a	15,2 ± 0,26	7,0 ± 0,12
1,0	50,2 ± 0,82 ^b	16,8 ± 0,45	8,6 ± 0,23
1,5	50,8 ± 2,0 ^b	18,3 ± 0,44	9,6 ± 0,23
2,0	58,0 ± 3,9 ^c	19,5 ± 0,62	10,5 ± 0,33

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Również zwiększanie czasu hydrolizy enzymatycznej mączki szarłatki powoduje zwiększenie zanieczyszczenia preparatu białkowego polisacharydami. Jeśli czas trwania hydrolizy w temperaturze 45°C przy użyciu neutrazy wydłużono do 2 godzin, wówczas ilość cukrów redukujących w hydrolizacie wzrosła z 11,8% do 15,3%.

Tabela 27. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatki od czasu hydrolizy protamexem w 40°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	51,8 ± 1,7 ^a	17,1 ± 0,13	6,42 ± 0,050
1,0	56,5 ± 0,93 ^b	18,7 ± 0,080	7,49 ± 0,031
1,5	58,5 ± 0,66 ^c	19,5 ± 0,22	8,63 ± 0,097
2,0	58,4 ± 1,1 ^c	21,4 ± 0,10	9,35 ± 0,045

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 28. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatki od czasu hydrolizy protamexem w 45°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	53,4 ± 0,96 ^a	16,4 ± 0,13	6,63 ± 0,053
1,0	55,5 ± 0,55 ^b	18,2 ± 0,14	7,86 ± 0,059
1,5	60,1 ± 0,92 ^c	21,2 ± 0,17	9,88 ± 0,078
2,0	60,8 ± 0,72 ^c	26,3 ± 0,14	12,93 ± 0,069

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Przechodzenie komponentów skrobi (amylozy i amylopektyny) jest spowodowane nie tylko jej kleikowaniem w podwyższonej temperaturze, ale też enzymatyczną degradacją białek występujących w gałeczkach skrobiowych w ilości około 0,5%. Znaczenie tego zjawiska potwierdza zależność zawartości cukrów redukujących od czasu hydrolizy oraz od temperatury reakcji obserwowana nawet w przypadku stosowania bromelainy (Tabele 19-22) i trypsyny (Tabele 31-34). Skuteczność działania tych enzymów badano bowiem w zakresie 25-40°C, nie przekraczającym temperatur kleikowania skrobi szarłatki następującego dopiero w zakresie 51-76°C (Guerra-Matias i Arêas, 2005; Lindeboom i in., 2004).

Na wzrost zawartości cukrów redukujących w hydrolizatach białek może mieć też wpływ zanieczyszczenie środowiska reakcji enzymami amylolitycznymi pochodzącymi z mączki szarlatu lub z handlowych, niezupełnie oczyszczonych preparatów proteaz.

Tabela 29. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarlatu od czasu hydrolizy protamexem w 50°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	54,4 ± 0,45 ^a	16,6 ± 0,041	7,48 ± 0,046
1,0	59,1 ± 0,63 ^b	18,6 ± 0,13	9,32 ± 0,065
1,5	61,0 ± 0,82 ^c	20,9 ± 0,072	10,63 ± 0,033
2,0	64,5 ± 0,55 ^d	25,5 ± 0,17	13,83 ± 0,094

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 30. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarlatu od czasu hydrolizy protamexem w 55°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	53,8 ± 1,2 ^a	16,6 ± 0,17	9,02 ± 0,091
1,0	63,1 ± 0,73 ^b	18,5 ± 0,31	10,9 ± 0,18
1,5	66,7 ± 0,91 ^c	21,6 ± 0,073	13,48 ± 0,042
2,0	68,0 ± 0,67 ^d	24,7 ± 0,10	15,87 ± 0,063

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 31. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarlatu od czasu hydrolizy trypsyną w 30°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	16,0 ± 0,49 ^a	8,6 ± 0,29	1,37 ± 0,046
1,0	16,8 ± 0,45 ^b	11,3 ± 0,12	1,94 ± 0,020
1,5	17,2 ± 0,35 ^b	13,6 ± 0,18	2,39 ± 0,031
2,0	17,5 ± 0,27 ^b	14,2 ± 0,42	2,60 ± 0,077

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 32. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatu od czasu hydrolizy trypsyną w 35°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	12,8 ± 0,23 ^a	15,3 ± 0,040	2,01 ± 0,055
1,0	13,2 ± 0,15 ^b	17,1 ± 0,43	2,47 ± 0,063
1,5	13,8 ± 0,17 ^c	19,1 ± 0,31	3,07 ± 0,082
2,0	15,7 ± 0,53 ^d	21,1 ± 0,35	3,01 ± 0,036

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Tabela 33. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatu od czasu hydrolizy trypsyną w 40°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	17,1 ± 0,23 ^a	14,5 ± 0,36	2,6 ± 0,15
1,0	17,4 ± 0,24 ^a	15,1 ± 0,15	2,91 ± 0,029
1,5	17,6 ± 0,23 ^b	16,5 ± 0,62	3,2 ± 0,12
2,0	17,8 ± 0,19 ^b	17,7 ± 0,35	3,56 ± 0,071

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy p>0,05)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Największą skuteczność enzymatycznej hydrolizy białek uzyskiwano stosując protamex lub alkalazę. Nieco gorsze rezultaty zapewniało wykorzystanie neutrazy lub bromelainy, usuwających z mączki około 58% i 53% azotu ogólnego. Najmniej przydatnym enzymem do otrzymywania hydrolizatów białek szarłatu okazała się trypsyna, gdyż przy jej użyciu nie uzyskiwano stopnia ekstrakcji związków azotowych większego od 18% (Tabele 31-34).

W przypadku wszystkich badanych enzymów prawie maksymalny stopień ekstrakcji związków azotowych z mączki szarłatu uzyskiwano w okresie pierwszych 30-60 min hydrolizy i dalsze zwiększanie czasu reakcji powodowało tylko niewielkie zmiany wydajności procesu (Tabele 15-34). Uzyskane wyniki są potwierdzeniem badań przeprowadzonych przez Jyothirmayi i in., (2006) którzy zauważyli, że długość czasu ekstrakcji białek ma mały wpływ na wydajność procesu i po czasie 35 min nie zauważa się już znaczącego postępu ekstrakcji.

Tabela 34. Zależność wydajności ekstrakcji związków azotowych i skrobi z mączki szarłatku od czasu hydrolizy trypsyną w 45°C

Czas hydrolizy [godz]	Stopień ekstrakcji związków azotowych [%]	Zawartość cukrów redukujących w liofilizowanym hydrolizacie [%]	Stopień ekstrakcji skrobi [%]
0,5	15,1 ± 0,15 ^a	17,8 ± 0,25	3,30 ± 0,057
1,0	17,1 ± 0,20 ^b	19,1 ± 0,20	3,54 ± 0,049
1,5	17,8 ± 0,28 ^c	19,2 ± 0,33	3,99 ± 0,092
2,0	17,9 ± 0,42 ^c	21,3 ± 0,49	4,7 ± 0,11

^a (indeks górny) – porównanie statystyczne wyników dla danej temperatury hydrolizy (przy $p > 0,05$)

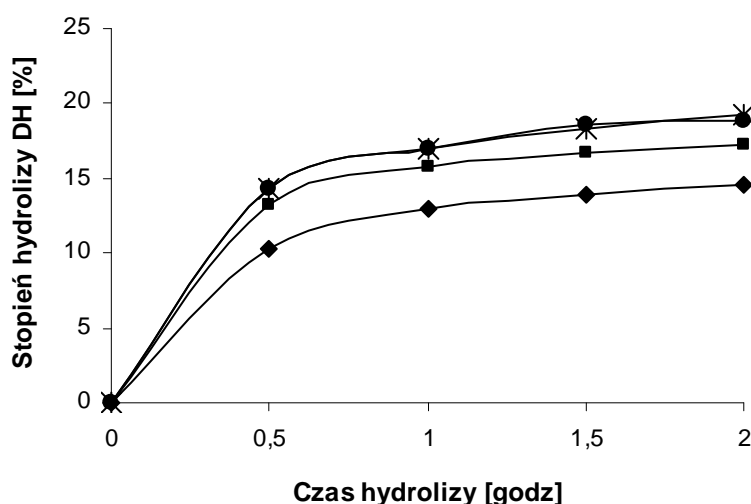
Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Zaobserwowane różnice maksymalnej ilości wyekstrahowanych produktów hydrolizy białek przy użyciu badanych enzymów proteolitycznych są spowodowane między innymi niejednakową aktywnością rozszczepiania wiązań peptydowych pomiędzy resztami rozmaitych aminokwasów. Potwierdza ten wniosek duża skuteczność działania alkalazy, która jest enzymem o małej specyficzności, rozszczepiającym aż siedem różnych wiązań tworzonych przez reszty aminokwasów hydrofobowych jak też aminokwasów kwaśnych lub obojętnych. Znaczna aktywność proteolityczna preparatu o nazwie protamex może być ponadto spowodowana faktem, że jest on kompleksem kilku enzymów proteolitycznych, z których każdy może katalizować rozszczepienie odrębnych wiązań peptydowych (Kolakowski, 2005). Porównując dane dotyczące efektywności odbiałczania mączki przez różne enzymy oraz stopnia zanieczyszczenia otrzymanych preparatów cukrami redukującymi można zauważyć, iż przy wzroście stopnia ekstrakcji produktów hydrolizy białek zwiększa się ilość cukrów redukujących przechodzących do hydrolizatu. Mając to na uwadze konieczny jest wybór odpowiedniego enzymu do otrzymywania hydrolizatów z mączki szarłatku zapewniającego zadowalający stopień ekstrakcji białek z mączki przy jednoczesnym możliwie niskim zanieczyszczeniu produktu. Protamex i alkalaza, które wykazują największą wydajność reakcji enzymatycznej hydrolizy posiadają wysoką optymalną temperaturę działania (50-60°C), bliską temperaturze kleikowania skrobi szarłatku, wskutek czego zwiększa się możliwość zanieczyszczenia hydrolizatów skrobią pochodzącą z mączki (Tabele 17-18 oraz 29-30). Można temu zapobiec obniżając temperaturę procesu do 45°C, co obniża wydajność ekstrakcji związków azotowych alkalazą lub protamexem zaledwie o 5,8% oraz 10,6% wartości uzyskiwanych w optymalnej temperaturze działania tych enzymów (Tabele 15 i 28).

13.2.3. Określenie stopnia hydrolizy (DH) hydrolizatów białkowych

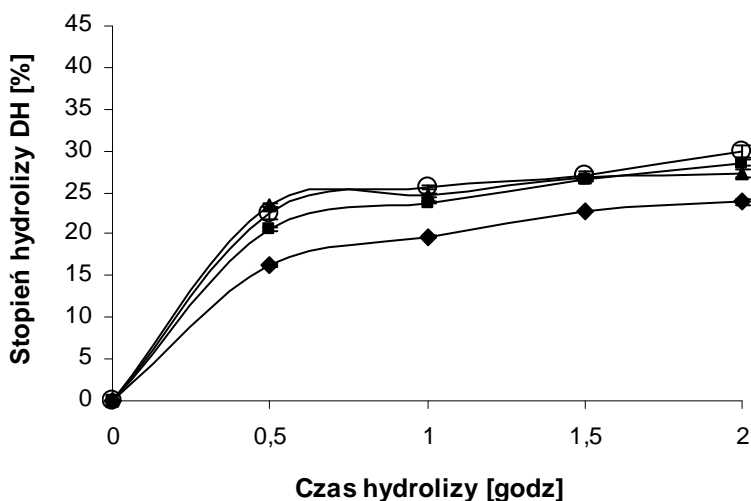
Prawie wszystkie podatne na oddziaływanie stosowanych enzymów wiązania peptydowe były rozszczepiane w okresie około pierwszych 30 min reakcji. Świadczy o tym znaczne zahamowanie po tym czasie przyrostu stopnia hydrolizy białek (DH) określanego jako stosunek zawartości wolnych grup aminowych w badanych hydrolizatach i w mieszaninie aminokwasów z białek szarlatu uzyskanych wskutek wyczerpującej hydrolizy w kwaśnym środowisku (Rys. 16-20).

Na wyczerpanie ilości wiązań peptydowych ulegających rozszczepieniu wskutek katalicznego oddziaływania stosowanych preparatów wskazuje także zahamowanie przyrostu stopnia hydrolizy białek po przekroczeniu wartości 20-25% niezależnie od zwiększenia ilości jednostek enzymów dodanych do środowiska reakcji (Rys. 12-15).



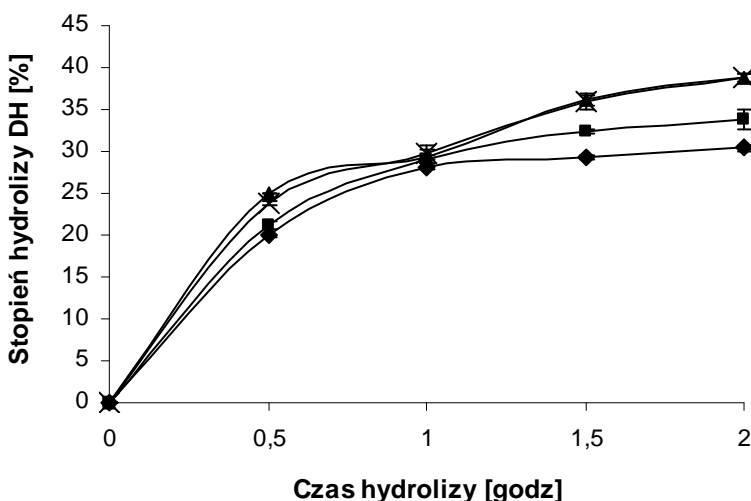
Rys. 16. Wpływ czasu katalizowanej alkalazą reakcji hydrolizy przeprowadzonej w temperaturze: 45°C (◇), 50°C (■), 55°C (●) i 60°C (×) na stopień hydrolizy białek z częściowo odtłuszczonej mączki szarlatu

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe



Rys. 17. Wpływ czasu katalizowanej bromelainą reakcji hydrolizy przeprowadzonej w temperaturze: 25°C (◆), 30°C (■), 35°C (▲) i 40°C (○) na stopień hydrolizy białek z częściowo odtłuszczonej mączki szarłatu

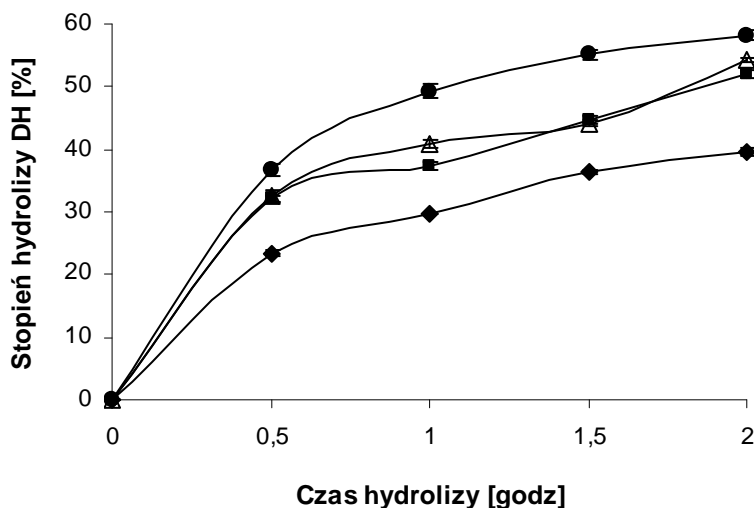
Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe



Rys. 18. Wpływ czasu katalizowanej neutralazą reakcji hydrolizy przeprowadzonej w temperaturze: 40°C (◆), 45°C (■), 50°C (▲) i 55°C (×) na stopień hydrolizy białek z częściowo odtłuszczonej mączki szarłatu

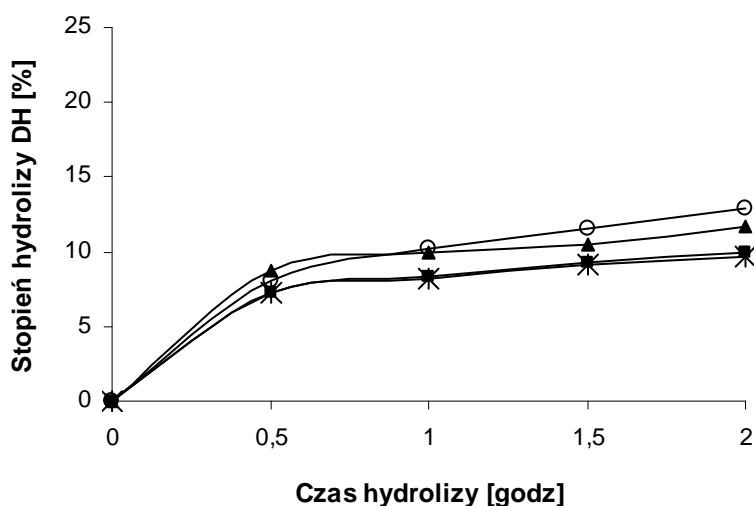
Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Podczas degradacji białek katalizowanej endoproteazami należy unikać zbyt wysokiego stopnia hydrolizy z powodu uwalniania hydrofobowych peptydów (Kołakowski, 2005). Zaobserwowane ograniczenie stopnia hydrolizy jest zatem korzystne, bo zbyt zaawansowana fragmentacja cząsteczek białek pogarsza np. właściwości emulgujące preparatu i prowadzi do pojawienia się gorzkiego smaku (Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997).



Rys. 19. Wpływ czasu katalizowanej protamexem reakcji hydrolizy przeprowadzonej w temperaturze: 40°C (◆), 45°C (■), 50°C (▲) i 55°C (●) na stopień hydrolizy białek z częściowo odtłuszczonej mączki szarłatu

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe



Rys. 20. Wpływ czasu katalizowanej trypsyną reakcji hydrolizy przeprowadzonej w temperaturze: 30°C (×), 35°C (■), 40°C (▲) i 45°C (○) na stopień hydrolizy białek z częściowo odtłuszczonej mączki szarłatu

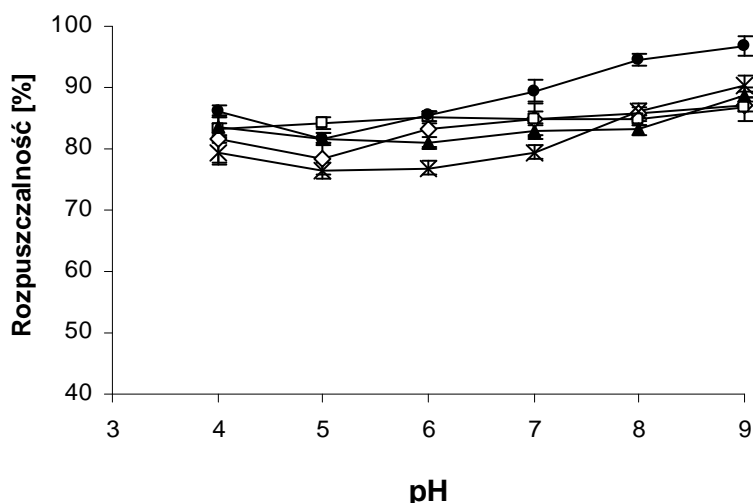
Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

13.2.4. Wpływ rodzaju enzymu na niektóre właściwości funkcjonalne otrzymanych preparatów

Preparaty otrzymane w wyniku enzymatycznej hydrolizy białek różnią się od białek macierzystych rozpuszczalnością, wodochłonnością oraz zdolnością emulgowania, stabilizowania emulsji, pienienia i stabilizowania piany (Vioque i in., 2000). Różnice te zależą od budowy białka,

specyficzności użytego enzymu oraz od uzyskanego stopnia hydrolizy. Zmiana właściwości funkcjonalnych hydrolizatów jest spowodowana zwiększeniem hydrofilności produktu wynikającym ze zwiększenia podczas hydrolizy liczby wolnych grup aminowych i karboksylowych, zmniejszeniem masy cząsteczkowej peptydów oraz zwiększeniem hydrofobowości powierzchniowej wywołanym rozfałdowaniem cząsteczek i odsłonięciem reszt hydrofobowych aminokwasów, które w macierzystym białku znajdują się wewnątrz cząsteczek (Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997). Określenie hydrofobowości powierzchniowej białek umożliwia między innymi przewidywanie ich rozpuszczalności oraz zachowania się podczas tworzenia emulsji i piany.

Rozpuszczalność białek ma duży wpływ na inne ich właściwości funkcjonalne (Pelegrine i Gasparetto, 2005). Nasiona szarłatu zawierają dużo nierozpuszczalnych lub mało rozpuszczalnych białek, co ogranicza ich zastosowanie do produkcji różnych artykułów spożywczych. Zwiększenie rozpuszczalności można uzyskać w wyniku enzymatycznych modyfikacji (Segura-Nieto i in., 1994). Proteoliza umożliwia rozpuszczanie białek nawet w punkcie izoelektrycznym wskutek fragmentacji ich cząsteczek na mniejsze, rozpuszczalne w wodzie fragmenty oraz rozszczepienia połączeń białka z innymi składnikami (Kołakowski, 2005; Surówka, 2005). Hydrolizaty białkowe na ogół są dobrze rozpuszczalne w szerokim zakresie pH, choć zależy to również od specyficzności użytego enzymu proteolitycznego, od rodzaju wytworzonych peptydów, a także od stopnia hydrolizy białka.



Rys. 21. Wpływ pH na rozpuszczalność hydrolizatów białkowych mączki szarłatu otrzymanych w warunkach najlepszej ekstrakcji związków azotowych z zastosowaniem alkalazy (◇), bromelainy (□), neutrazy (▲), protamexu (●) i trypsyny (x)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oddzielnych doświadczeń oraz 9 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Hydrolizaty wytworzone z mączki szarłat z udziałem alkalazy, bromelainy i neutrazy (Rys. 21) wykazują dobrą rozpuszczalność wynoszącą 80-88% w całym badanym zakresie pH. Preparaty uzyskane z udziałem protamexu i trypsyny charakteryzują się jednak niewielkim, około 10%, obniżeniem rozpuszczalności przy wartości pH zbliżonej do punktu izoelektrycznego macierzystych białek. Dobra rozpuszczalność badanych hydrolizatów świadczy o ich przydatności do wytwarzania energetyzowanych kwaśnych napojów owocowych, w których niemodyfikowane enzymatycznie białka nie ulegają rozpuszczeniu (Vioque i in., 1999). Pierwsze napoje tego typu produkowano przy wykorzystaniu białka sojowego, które hydrolizowano proteazą pochodzącą z *Trameces sanquinea*. Rozcieńczony wodą koncentrat (v/v 1:2) dawał klarowny jasnożółty napój o cechach smakowo-zapachowych zbliżonych do lemoniady (Dzwolak i Ziajka, 1993). Najgorszą rozpuszczalnością w zakresie pH 5,0-7,0 cechowały się hydrolizaty uzyskane z użyciem trypsyny, przypuszczalnie z powodu niewielkiego stopnia hydrolizy.

Zdolność emulgowania i stabilizowania emulsji przejawiana przez hydrolizaty białkowe jest zależna od dostępności aminokwasów hydrofobowych i hydrofilowych, które ułatwiają adsorpcję na powierzchni międzyfazowej oraz od długości łańcucha peptydowego. Peptydy zawierające zarówno domeny hydrofobowe i hydrofilowe tworzą wokół kropeł lipidowych warstwę międzyfazową, obniżającą napięcie powierzchniowe i zapobiegającą flokulacji i koalescencji tłuszczu. Właściwości emulgujące hydrolizatu zależą od macierzystego białka, ale głównie od struktury i wielkości cząsteczek uwalniających się peptydów, na co ma wpływ rodzaj zastosowanego enzymu i warunki hydrolizy (Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997). Przy zbyt dużym stopniu hydrolizy następuje ubytek zdolności emulgujących i stabilizowania emulsji wskutek zmniejszenia liczby cząsteczek peptydów zawierających zarówno domeny hydrofilowe i hydrofobowe (Surówka, 2005). Przykładem tego są hydrolizaty białek rzepaku wytworzone przy użyciu alkalazy, które wraz ze wzrostem stopnia hydrolizy białek wykazywały obniżenie zdolności emulgujących i stabilizujących emulsje (Vioque i in., 2000).

Mimo różnej specyficzności enzymów wykorzystanych do odbiałczania mączki szarłat, zdolność emulgowania otrzymanych hydrolizatów jest podobna i wynosi około 50% (Tabela 35). Jest to wartość niższa od podanej w literaturze zdolności emulgowania izolatów białkowych pochodzących z różnych genotypów *A. cruentus*, która wynosi od 56% do 73% (Bejosano i Corke, 1999), lecz porównywalna z oznaczoną w taki sam sposób jak otrzymane hydrolizaty zdolnością emulgowania lecytyny. Hydrolizaty białkowe otrzymane przy pomocy wszystkich zastosowanych enzymów charakteryzują się dobrymi zdolnościami stabilizacji emulsji wynoszącymi około 100%, czyli pod tym względem również mają podobne właściwości do lecytyny, która jest uważana za dobry emulgator i powszechnie stosowana w przemyśle żywnościowym. Hydrolizaty białek

serwatki wytworzone przy użyciu alkalazy oraz protamexu niezależnie od uzyskanych stopni hydrolizy (5-20% DH) wykazywały zdolność do tworzenia emulsji na poziomie 40-50% (Severin i Xia, 2006). Hydrolizaty białek szarłat, podobnie jak hydrolizaty białek rzepaku, mogą zastąpić żółtko jaja kurzego w produkcji majonezu (Aluco i McIntosh, 2005).

Tabela 35. Zależność niektórych właściwości funkcjonalnych hydrolizatów od rodzaju użytego enzymu

Hydrolizat białkowy	Zdolność emulgowania [%]	Stabilność emulsji [%]
Alkalaza	50,9 ± 3,2	99,6 ± 5,4
Bromelaina	48,8 ± 3,7	100,2 ± 7,0
Neutraza	51,5 ± 0,41	100,0 ± 0,0
Protamex	47,0 ± 3,3	99,3 ± 1,3
Trypsyna	52,1 ± 3,6	102,4 ± 4,1
Lecytyna	48,8 ± 3,6	100,0 ± 0,0

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Zdolność pienienia hydrolizatów jest zdeterminowana przez różne czynniki, których rola nie jest do końca sprecyzowana. Wiadomo, że właściwości pianotwórcze zależą od lepkości roztworu oraz od powierzchniowej hydrofobowości peptydów, nie stwierdzono jednak ścisłej korelacji pomiędzy właściwościami emulgującymi i pianotwórczymi białek (Kołakowski, 2005). Częściowa proteoliza białek może poprawiać zdolności do tworzenia piany wskutek zwiększenia ich rozpuszczalności oraz powstawania peptydów, które szybciej osiągają powierzchnię międzyfazową i tworzą na niej filmy utrzymujące strukturę piany (Bejosano i Corke, 1999; Surówka, 2005). Zbyt daleko posunięta hydroliza może jednak osłabiać właściwości pianotwórcze. Hydrolizaty białek rzepaku oraz hydrolizaty białek serwatki wytworzone przy użyciu alkalazy i protamexu wraz ze wzrostem stopnia hydrolizy białek wykazywały obniżenie zdolności pianotwórczych i stabilizujących pianę (Severin i Xia, 2006; Vioque i in., 2000).

Badane hydrolizaty wykazują niewielkie właściwości pianotwórcze i są pod tym względem podobne do badanych przez Claver'a i Zhou (2005) hydrolizatów białek z kielków pszenicy. Najlepsze właściwości pianotwórcze wykazują produkty hydrolizy przeprowadzonej z udziałem protamexu i trypsyny (odpowiednio 25 i 29%), które jednocześnie posiadają najlepsze zdolności do stabilizowania wytworzonej piany (Tabela 36). Najgorszą trwałość miała piana uzyskana z udziałem hydrolizatów otrzymanych za pomocą alkalazy. Oznaczone w tych samych warunkach zdolności do tworzenia i stabilizowania piany preparatów białkowych często stosowanych w przemyśle żywnościowym, kazeiny i albuminy jaja kurzego, wykazywały o wiele wyższe wartości

potwierdzające ich użyteczność jako czynników pianotwórczych (Tabela 36). Przeprowadzone oznaczenia nie wykazały żadnej korelacji między właściwościami pianotwórczymi a zdolnością emulgowania czy stopniem hydrolizy otrzymanych preparatów białkowych.

Tabela 36. Zależność właściwości pianotwórczych hydrolizatów białkowych od rodzaju użytego enzymu

Hydrolizat białkowy	Zdolność tworzenia piany [%]	Stabilność piany [%] po		
		5 min	10 min	20 min
Alkalaza	13,8 ± 2,0	68,8 ± 10,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Bromelaina	15,6 ± 0,0	66,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0
Neutraza	9,8 ± 1,7	69,4 ± 4,8	38,9 ± 9,6	0,0 ± 0,0
Protamex	25,0 ± 0,0	83,3 ± 7,2	75,0 ± 0,0	75,0 ± 0,0
Trypsyna	28,9 ± 1,3	82,6 ± 10,9	59,1 ± 6,6	53,7 ± 3,2
Kazeina	153,5 ± 10,2	70,5 ± 1,2	65,2 ± 3,9	55,8 ± 1,1
Albumina jaja kurzego	106,8 ± 10,2	94,1 ± 6,6	86,4 ± 4,2	86,4 ± 4,2

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Białkowe hydrolizaty o pożądanym właściwościach funkcjonalnych mogą być przydatne przy produkcji różnego rodzaju żywności, np. pieczywa i ciast, lodów, deserów, sosów sałatkowych, majonezów, jak również produktów mięsnych. Natomiast hydrolizaty o bardzo wysokim stopniu hydrolizy mogą znaleźć zastosowanie jako uzupełnienie białek w specjalnych dietach medycznych (Vioque i in., 2000). Hydrolizaty z białek szarłatki mogą być również źródłem bioaktywnych peptydów, np. o działaniu przeciwwgrzybiczym wykazujących aktywność wobec *Fusarium culmorum*, *Alternaria consortiale*, *Helminthosporium sativum* czy *Botrytis cinerea* (Lipkin i in., 2005). Hydrolizaty białkowe mogą służyć zatem jako preparaty do ochrony przeciwwgrzybiczej różnych zbóż. W ziarnach szarłatki *A. retroflexus* oraz *A. caudatus* znaleziono antymikrobiologiczne peptydy Ar-AMP oraz Ac-AMP składające się odpowiednio z 30 oraz 28 reszt aminokwasów wykazujące aktywność względem *Bacillus subtilis* (Lipkin i in., 2005; Martins i in., 1996).

13.2.5. Gorzkość hydrolizatów w zależności od rodzaju stosowanego enzymu

Istotnym parametrem ograniczającym przydatność hydrolizatów w przemyśle spożywczym jest ich gorzkość. Zbyt gorzkie preparaty białkowe mogą okazać się zupełnie nieprzydatne jako dodatek do żywności. Opracowując technologię ich otrzymywania należy ograniczyć możliwość powstawania gorzkiego smaku wywołanego uwalnianiem aminokwasów hydrofobowych

oraz gorzkich peptydów. Można to osiągnąć stosując enzymy o odpowiedniej selektywności oraz precyzyjnie kontrolując stopień hydrolizy określony jako procentowy udział rozszczepionych wiązań peptydowych w ogólnej ich ilości w białku. Intensywność gorzkości jest skorelowana z ogólną hydrofobowością hydrolizatu i zależy od składu i sekwencji aminokwasów w białku, specyficzności działania enzymu oraz od konformacji powstających w skutek hydrolizy peptydów. Mimo iż daleko posunięta fragmentacja zazwyczaj zwiększa prawdopodobieństwo powstania gorzkich produktów, to przy bardzo dużym DH goryczka hydrolizatu zmniejsza się wskutek wzrostu ilości wolnych aminokwasów oraz peptydów zawierających hydrofobowe reszty na końcach cząsteczek, mniej gorzkich od peptydów z aminokwasami hydrofobowymi w środku peptydu (Ney, 1972). Ponadto gorzki smak ulega zmniejszeniu w obecności wolnych aminokwasów takich jak kwas glutaminowy i asparaginowy (Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997). Zdarza się jednak że hydrolizaty o niskim stopniu hydrolizy (7,7%) zawierają gorzkie peptydy, jak np. hydrolizaty białek rzepaku otrzymane w wyniku działania alkalazy (Vioque i in., 2000).

Tabela 37. Wpływ rodzaju enzymu proteolitycznego na gorzkość hydrolizatów o podobnym stopniu hydrolizy oraz hydrolizatów o najlepszym stopniu ekstrakcji białek

Rodzaj enzymu	Warunki hydrolizy	DH [%]	Gorzkość (w skali 1-5)*	Warunki hydrolizy	DH [%]	Gorzkość (w skali 1-5)*
Alkalaza	60°C, 2 godz	19,3 ± 0,43	2,1 ± 0,55	60°C, 2 godz	19,3 ± 0,43	2,1 ± 0,65
Bromelaina	25°C, 1 godz	19,7 ± 0,18	5,0 ± 0,0	40°C, 2 godz	30,0 ± 0,68	4,9 ± 0,25
Neutraza	40°C, 0,5 godz	19,9 ± 0,11	3,5 ± 0,71	55°C, 2 godz	38,8 ± 0,53	2,7 ± 1,2
Protamex	40°C, 0,5 godz	23,3 ± 0,48	1,0 ± 0,0	55°C, 2 godz	58,2 ± 0,89	1,0 ± 0,0
Trypsyna	45°C, 2 godz	12,9 ± 0,16	3,2 ± 0,98	40°C, 1 godz	10,0 ± 0,21	4,2 ± 0,84

Przedstawione wyniki są średnią z 6 oznaczeń ± odchylenie standardowe

* ocena 1 oznacza najmniej, natomiast ocena 5 najbardziej gorzki hydrolizat

Wpływ rodzaju enzymu na gorzkość hydrolizatów oceniano porównując smak preparatów o podobnym stopniu hydrolizy oraz preparatów uzyskanych w warunkach zapewniających najlepszy stopień ekstrakcji produktów degradacji białek (Tabela 37). Najmniejszą, wynoszącą 1,0, gorzkość określoną sensorycznie w skali od 1 do 5 uzyskiwano w obu przypadkach przy zastosowaniu protamexu (Tabela 37). Enzym ten charakteryzuje się bardzo małą zdolnością wytwarzania gorzkich peptydów (Gildberg i in., 2002). Przeprowadzone badania wskazują, iż w przypadku odbiałczania mączki szarłatki alkalazą, bromelainą, neutrazą, protamexem oraz trypsyną na kształtowanie gorzkości największy wpływ ma specyficzność działania enzymu, a nie stopień hydrolizy białka (Tabela 37).

Największą gorzkością charakteryzuje się hydrolizat uzyskiwany przy użyciu bromelainy, która powoduje rozszczepienie wiązań peptydowych utworzonych przez aminokwasy polarne, co powoduje odsłonięcie reszt hydrofobowych znajdujących się wewnątrz cząsteczek, zwiększając przez to gorzkość produktu. Specyficzność działania alkalazy może powodować powstawanie bardziej lub mniej gorzkich produktów, w zależności od sekwencji białka. Atakując wiązania peptydowe utworzone przez aminokwasy obojętne lub kwaśne przyczynia się do powstawania gorzkich peptydów, natomiast przy odszczepianiu aminokwasów hydrofobowych powstające peptydy są mniej gorzkie. Podczas hydrolizowania substratu, jakim są białka z mączki szarłat rozerwaniu ulegają prawdopodobnie głównie wiązania peptydowe przy resztach hydrofobowych, ponieważ otrzymany preparat białkowy charakteryzuje się niewielką, bo wynoszącą zaledwie 2 w skali pięciopunktowej, gorzkością.

13.3. Otrzymywanie izolatów białkowych

13.3.1. Skuteczność ekstrakcji białek z mączki szarłat

Otrzymywanie hydrolizatów jest obecnie często stosowanym sposobem utylizacji odpadowych surowców białkowych. Alternatywną metodą ich wykorzystania jest produkcja izolatów białkowych z zastosowaniem ekstrakcji roztworami soli mineralnych lub zasad. Rodzaj i siła jonowa roztworu ekstrahującego oraz temperatura i odczyn środowiska mają duży wpływ na strukturę cząsteczek białka, a przez to jego rozpuszczalność i inne właściwości funkcjonalne.

Aby ograniczyć niepożądane przemiany pod wpływem rozpuszczalników przeprowadzono ekstrakcje białek w temperaturze obniżonej do 4°C. Do badań skuteczności jedno- lub wieloetapowej ekstrakcji związków azotowych wykorzystywano wodę, 1% i 3% roztwory NaCl oraz 0,25% roztwór NaOH. Każdy z tych roztworów charakteryzuje się odmienną efektywnością działania, co wynika z różnic rozpuszczalności poszczególnych frakcji białek występujących w nasionach szarłat. Kolejne ekstrakcje odtłuszczonej mączki szarłat wodą oraz 3% roztworem NaCl powodują wyizolowanie albumin, a następnie globulin. Aby uzyskać mieszaninę albumin i globulin zastosowano ekstrakcję jednoetapową 3% roztworem NaCl. Stopień ekstrakcji związków azotowych w dwu- lub jednoetapowych procesach wynosił odpowiednio 43,9% oraz 38,3% (Tabela 38). Zmniejszenie ilości odzyskanych związków azotowych podczas jednoetapowej ekstrakcji wynikało zapewne ze skrócenia czasu ekstrakcji, ponieważ każdy jej etap trwał 1 godz. Połączenie czynników ekstrahujących 3% NaCl oraz 0,25% NaOH spowodowało wzrost wydajności jednoetapowej ekstrakcji białek do ok. 60% (Tabela 38).

Tabela 38. Skuteczność jednoetapowej ekstrakcji związków azotowych z mączki szarłatu

Rozpuszczalnik	Ogólna ilość wyekstrahowanych substancji	Ilość wyekstrahowanego N	Stożenie ekstrakcji związków azotowych $N/N_{og} \times 100 \%$
	[% s.m. próbki]		
Woda i 3% NaCl	13,3 ± 2,0	1,2 ± 0,29	43,9
3% NaCl	12,7 ± 0,75	1,0 ± 0,15	38,3
0,25% NaOH w 3% NaCl	17,6 ± 2,0	1,6 ± 0,15	61,0

Przedstawione wyniki są średnią z 3 ekstrakcji oraz 6-9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

N – ilość azotu w wyekstrahowanych związkach azotowych

N_{og} – zawartość azotu w suchej masie mączki, wynosząca 2,69±0,017%

Największy stopień ekstrakcji związków azotowych z mąki szarłatu uzyskiwano w przypadku stosowania 0,25% roztworu NaOH (Tabela 39). Zastosowanie 1% NaCl rozpuszczonego w 0,25% roztworze NaOH nie miało istotnego wpływu na ilość wyekstrahowanych substancji azotowych.

Tabela 39. Skuteczność 3-etapowej ekstrakcji związków azotowych z mączki szarłatu

Rozpuszczalnik	Ogólna ilość wyekstrahowanych substancji	Ilość wyekstrahowanego N	Stożenie ekstrakcji związków azotowych $N/N_{og} \times 100 \%$
	[% s.m. próbki]		
1% NaCl	25,2 ± 0,86	1,04 ± 0,076	41,6
0,25% NaOH	28,3 ± 9,3	2,09 ± 0,071	83,6
1% NaCl w 0,25% NaOH	33,0 ± 3,5	2,03 ± 0,090	81,2

Przedstawione wyniki są średnią z 3 ekstrakcji oraz 6-9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

N – ilość azotu w wyekstrahowanych związkach azotowych

N_{og} – zawartość azotu w suchej masie mączki, wynosząca 2,50±0,15%

Znacznie mniejszą skuteczność odbiałczania zaobserwowano podczas ekstrakcji 1% lub 3% roztworem NaCl (41,6 i 38,3%), co eliminuje w praktyce możliwość ich stosowania (Tabele 39 i 38).

Prowadzenie ekstrakcji w temperaturze 4°C nie ograniczało przechodzenia do białkowego roztworu pewnej ilości związków bezazotowych pochodzących głównie z frakcji sacharydowej ziaren szarłatu. Ich zawartość była najmniejsza w przypadku jednoetapowej ekstrakcji 3% NaCl lub 0,25% NaOH w 3% NaCl oraz dwuetapowej ekstrakcji wodą a następnie 3% NaCl i zmieniała się w granicach 6,4-8,0% suchej masy mączki (Tabela 40). Wśród substancji niebiałkowych występowała pewna ilość skrobi trudnej do oddzielenia ze względu na małe rozmiary jej ziaren.

Najmniejszą zawartością skrobi charakteryzowały się ekstrakty uzyskane z zastosowaniem 0,25% roztworu NaOH w 3% roztworze NaCl (Tabela 40).

Ilość przechodzącej do ekstraktu skrobi wzrastała podczas 3-krotnej ekstrakcji prowadzonej przez 24 godziny każda i w przypadku stosowania 0,25% roztworu NaOH wynosiła $13,9\% \pm 2,4\%$ ogólnej jej zawartości w mączce.

Tabela 40. Ilość wyekstrahowanych związków bezazotowych z odtłuszczonej mączki szarłat

Rozpuszczalnik	Ogólna ilość wyekstrahowanych substancji (A) ----- [% s.m. próbki]	Białko surowe N \times 5,85 (B)	Substancje niebiałkowe (A - B)	Ilość skrobi w ekstrakcie [% ogólnej jej zawartości]
Woda i 3% NaCl	$13,3 \pm 2,0$	$6,9 \pm 1,7$	6,4	$5,2 \pm 0,32$
3% NaCl	$12,7 \pm 0,75$	$6,0 \pm 0,88$	6,7	$5,0 \pm 0,043$
0,25% NaOH w 3% NaCl	$17,6 \pm 2,0$	$9,6 \pm 0,89$	8,0	$1,3 \pm 0,43$

Przedstawione wyniki są średnią z 3 ekstrakcji oraz 6-9 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

13.3.2. Wydajność odzyskiwania białek z ekstraktów przez strącanie w punkcie izoelektrycznym lub przez ich cieplną denaturację

Wyzolowane w środowisku obojętnym oraz alkalicznym białka strącono w punkcie izoelektrycznym. W celu określenia optymalnych warunków tego procesu zbadano zależność ilości strąconych białek od wartości pH środowiska. Stopień strącenia znajdujących się w ekstrakcie białek zależał nie tylko od wartości pH, ale też od rodzaju roztworu użytego do ich wyizolowania. Każdy ze stosowanych roztworów ekstrahował tylko część znajdujących się w mączce białek, charakteryzujących się różną rozpuszczalnością w punkcie izoelektrycznym. Największą, około 98%, skuteczność strącania białek uzyskiwano w przypadku ekstraktów z mączki 0,25% roztworem NaOH lub 0,25% roztworem NaOH w 3% NaCl (Tabela 41). Wydajność precypitacji białek z ekstraktów uzyskanych za pomocą 3% roztworu NaCl izolującego mieszaninę albumin i globulin była o około 28% mniejsza, głównie z powodu dość dobrej rozpuszczalności globulin szarłat w punkcie izoelektrycznym. Świadczy o tym niewielki, bo wynoszący tylko 30,7% ogólnej zawartości azotu białkowego stopień strącenia globulin z pozbawionego albumin ekstraktu globulin uzyskanego pod wpływem 3% roztworu NaCl. W przypadku ekstraktów mączki zawierającej albuminy stopień strącenia przy optymalnej wartości pH wzrastał do około 60% (Tabela 41). Niezależnie od rodzaju roztworu użytego do ekstrakcji maksymalny stopień precypitacji białek uzyskiwano przy wartości pH wynoszącej 4,0. Tylko w przypadku strącania białek z ekstraktu mączki szarłat 1% NaCl konieczne

było obniżenie pH do 3,5. Przyczyną tej zmiany optymalnej wartości pH są różnice składu frakcji białkowej, wyizolowanej 1% roztworem NaCl, która jest wzbogacona w białka o mniejszym punkcie izoelektrycznym.

Tabela 41. Wpływ pH na ilość białek ($N \times 5,85$) strąconych z ekstraktów mąki szarłat

Rodzaj ekstrahenta	[% ogólnej zawartości białek w ekstrakcie strąconych przy pH]					
	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
1% NaCl	60,3 ± 2,6	72,6 ± 1,8	60,3 ± 1,5	48,5 ± 2,6	35,6 ± 1,5	31,2 ± 2,4
Woda i Albuminy	40,5 ± 2,9	56,2 ± 3,4	61,4 ± 4,6	39,1 ± 3,5	26,5 ± 2,2	10,2 ± 3,9
3% NaCl Globuliny	23,8 ± 2,5	29,1 ± 1,6	30,7 ± 2,6	28,2 ± 2,6	20,8 ± 1,9	11,9 ± 2,8
3% NaCl	58,7 ± 1,5	66,9 ± 1,3	70,0 ± 2,3	67,5 ± 1,7	44,6 ± 1,7	18,5 ± 0,76
0,25% NaOH	90,4 ± 6,5	93,3 ± 4,7	98,4 ± 0,25	92,5 ± 2,3	81,8 ± 2,8	76,2 ± 3,2
0,25% NaOH w 3% NaCl	82,7 ± 1,7	95,1 ± 3,2	98,2 ± 3,5	92,1 ± 5,2	84,4 ± 3,5	76,8 ± 2,0

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oddzielnych doświadczeń oraz 5 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Odzyskiwanie białek z ekstraktów przez ich strącanie termiczne (85°C, 30 min) przebiega z mniejszą wydajnością w porównaniu do ich odzyskiwania w wyniku precypitacji w pl. Najwięcej można uzyskać albumin (50% ich zawartości w ekstrakcie), podczas gdy białka wyekstrahowane 0,25% roztworem NaOH w 3% roztworze NaCl strącały się na poziomie poniżej 1% (Tabela 42).

Tabela 42. Ilość białek strąconych z ekstraktów mąki szarłat w temperaturze 85°C

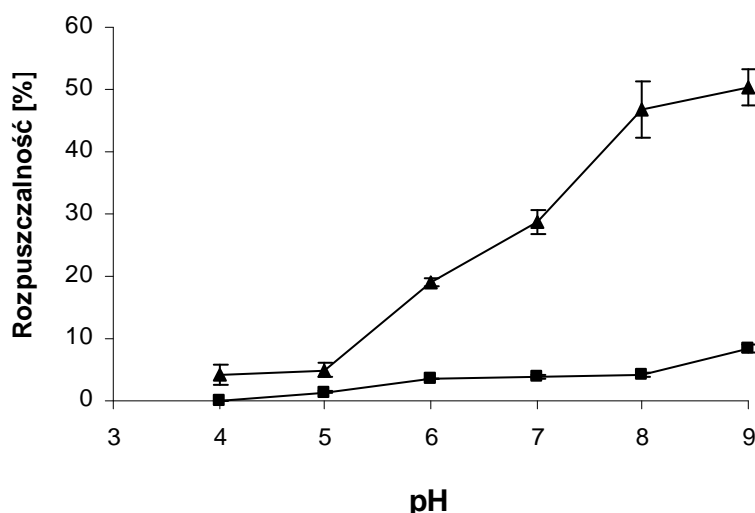
Rodzaj preparatu	Wydajność strącania termicznego [%]
Albuminy	50,0 ± 6,7
Globuliny	16,9 ± 2,4
Suma albumin i globulin wyekstrahowana 3% NaCl	39,3 ± 6,6
Białka wyekstrahowane 0,25% NaOH w 3% roztworze NaCl	0,80 ± 0,51

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oddzielnych doświadczeń oraz 5 oznaczeń ± odchylenie standardowe

13.3.3. Właściwości funkcjonalne preparatów białkowych

Izolaty uzyskane przez ekstrakcję mączki szarłat różnymi roztworami, a następnie przez strącanie białek w punkcie izoelektrycznym różnią się dość istotnie rozpuszczalnością. Wynika to ze zróżnicowania składu poszczególnych ekstraktów, w których zależnie od rodzaju stosowanego

roztworu dominują albuminy, globuliny i gluteliny. Uzyskane preparaty nie zawierały prolamin (występujących w mące w bardzo małej ilości) ze względu na pominięcie etapu ekstrakcji 70% etanolem. Zgodnie z wynikami uzyskanymi przez innych autorów wszystkie badane preparaty wykazywały niewielką rozpuszczalność w zakresie pH 4,0-5,0, która zwiększała się przy wyższych wartościach pH (Rys. 22). Preparaty z szarłatu są pod tym względem podobne do precipitatów białek rzepaku, które w środowisku kwaśnym są nierozpuszczalne, a największą rozpuszczalność, wynoszącą około 26%, osiągają w zakresie pH 7,0-9,0. Natomiast rozpuszczalność izolatu tych samych białek uzyskanego w wyniku ultrafiltracji wynosiła w środowisku kwaśnym 52,5-60% i w pH 7,0-9,0 wzrastała do wartości 90% (Yoshie-Stark i in., 2008). Poprawa rozpuszczalności oraz pożądane właściwości pianotwórcze białek po ultrafiltracji wynikają z łagodniejszych warunków procesu (Makri i Doxastakis, 2006).



Rys. 22. Wpływ pH na rozpuszczalność albumin (▲) i globulin (■) mączki szarłatu strąconych w punkcie izoelektrycznym

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oddzielnych doświadczeń oraz 9 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Izolacja białek w punkcie najmniejszej rozpuszczalności może powodować częściowe rozfałdowanie łańcuchów polipeptydowych, dzięki czemu zmienia się udział poszczególnych reszt aminokwasowych na powierzchni białek. Wzrost dostępności aminokwasów polarnych (cystyny i treoniny) wpływa na poprawę wodochłonności, natomiast niepolarnych na poprawę zdolności emulgowania (Yoshie-Stark i in., 2008). Zmianę właściwości funkcjonalnych białek daje też podwyższanie temperatury zwiększające ekspozycję aminokwasów polarnych i niepolarnych (wzrost hydrofobowości powierzchniowej) na powierzchni cząsteczek białka, w wyniku czego wzrasta

wodochłonność i zdolność emulgowania w porównaniu do preparatów uzyskanych podczas strącania w pl (Piecyk i Klepacka, 2004).

Niska rozpuszczalność preparatów białkowych w kwaśnym środowisku uniemożliwia ich stosowanie jako składnika kwaśnych napojów i dressingów (Molina Ortiz i Wagner, 2002). Najgorzej rozpuszczalne okazały się globuliny szarłatu wyizolowane 3% roztworem NaCl (Rys. 22). Poprawa ich rozpuszczalności nie następuje nawet w środowisku o pH około 9,0. Scilingo i in., (2002) sugerują, że to właśnie globuliny są białkami odpowiedzialnymi za pogorszenie rozpuszczalności izolatów białek z szarłatu. Rozpuszczalność izolatu albumin znacząco rośnie w środowisku obojętnym (20-30%), a przy wartości pH równej 9,0 wynosi ponad 50% (Rys. 22). Zauważyli to również Silva-Sánchez i in., (2004), który stwierdzili ponadto, że rozpuszczalność białek szarłatu, a w konsekwencji także inne właściwości funkcjonalne, są charakterystyczne dla odmiany rośliny i może to wynikać z różnicy składu aminokwasowego białek. Białka szarłatu ekstrahowane w pH 9,0 przez 30 min w temperaturze pokojowej i wytrącane w pH ok. 5,0 wykazywały rozpuszczalność w wodzie wynoszącą około 40% i mimo tego były bardziej rozpuszczalne od handlowych izolatów białkowych z soi (Bejosano i Corke, 1999; Scilingo i in., 2002). Redukcja rozpuszczalności w środowisku zasadowym jest spowodowana częściową denaturacją białek podczas procesu odtłuszczenia mąki heksanem w temperaturze 70°C (Bejosano i Corke, 1999).

Tabela 43. Wpływ pH na rozpuszczalność białek mączki szarłatu strąconych w temperaturze 85°C

Rodzaj preparatu białkowego	[% ogólnej zawartości rozpuszczonych białek w preparacie]					
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Albuminy	0,63 ± 0,094	0,52 ± 0,085	0,80 ± 0,089	0,99 ± 0,092	1,20 ± 0,10	1,29 ± 0,069
Globuliny	0,75 ± 0,055	0,55 ± 0,035	0,61 ± 0,069	0,78 ± 0,031	0,84 ± 0,037	0,86 ± 0,040
Suma albumin i globulin	1,48 ± 0,026	0,65 ± 0,070	0,50 ± 0,10	0,85 ± 0,045	0,91 ± 0,087	0,89 ± 0,071

Przedstawione wyniki są średnią z 2 oddzielnych doświadczeń i 6 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Generalnie rozpuszczalność białek rośnie wraz z temperaturą, ale przy nadmiernym jej wzroście białka ulegają denaturacji, która obniża rozpuszczalność w porównaniu z wartością charakteryzującą natywne białka (Pelegrine i Gasparetto, 2005). Preparaty białek szarłatu pozyskane w wyniku precypitacji termicznej rozpuszczały się bardzo słabo w całym badanym zakresie pH (Tabela 43). W podobny sposób zachowywały się preparaty białek soi uzyskane w pl, a następnie modyfikowane termicznie w temperaturze 90°C przez 30 min, których rozpuszczalność

mieściła się w zakresie 1,3-2% i nie posiadały one właściwości pianotwórczych (Molina Ortiz i Wagner, 2002). Było to spowodowane poddawaniem ziaren rzepaku działaniu wysokiej temperatury podczas procesów technologicznych w celu zmniejszenia ilości glukozyolanów (Yoshie-Stark i in., 2008).

Zdolność emulgowania oraz właściwości pianotwórcze zależą od występowania białek w przestrzeni międzyfazowej tłuszcz-woda lub powietrze-woda (Fidantsi i Doxastakis, 2001). Wszystkie preparaty białkowe z badanej mączki szarłatki uzyskane w wyniku strącenia w punkcie izoelektrycznym przejawiają zdolność emulgowania i stabilizacji emulsji wyższą w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla lecytyny (Tabela 44).

Tabela 44. Zdolność emulgowania i stabilność emulsji wytworzonych z udziałem izolatów i hydrolizatów białkowych z mączki szarłatki

Rodzaj preparatu	Białka strącone w punkcie izoelektrycznym		Białka strącone w temperaturze 85°C	
	Zdolność emulgowania [%]	Stabilność emulsji [%]	Zdolność emulgowania [%]	Stabilność emulsji [%]
Albuminy	57,4 ± 0,86	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Globuliny	56,1 ± 3,0	100,0 ± 0,0	56,1 ± 3,0	100,0 ± 0,0
Suma albumin i globulin wyekstrahowana 3% NaCl	52,6 ± 0,0	100,0 ± 0,0	-	-
Białka wyekstrahowane 0,25% NaOH w 3% roztworze NaCl	55,6 ± 2,7	100,0 ± 0,0	-	-
Hydrolizat białek uzyskany pod wpływem bromelainy	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-	-
Hydrolizat białek uzyskany pod wpływem papainy	16,4 ± 1,2	21,0 ± 3,6	-	-
Lecytyna	48,8 ± 3,6	100,0 ± 0,0	-	-

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Zastosowanie do ekstrakcji białek różnych rozpuszczalników nie wpływa znacząco na zdolność emulgowania i stabilizowania emulsji, a otrzymane wyniki są porównywalne do prezentowanych w dostępnej literaturze (55,6-73,3%) i dotyczących różnych genotypów szarłatki (Bejosano i Corke, 1999; Marcone i Yada, 1998). Wśród preparatów pozyskanych w wyniku koagulacji w podwyższonej temperaturze najlepszą zdolnością emulgowania (56,1%) na poziomie równym preparatom otrzymanym w wyniku precypitacji charakteryzują się globuliny.

Preparat strąconych termicznie albumin nie wykazywał natomiast właściwości emulgujących i stabilizujących emulsje (Tabela 44).

Preparat uzyskany przez enzymatyczną hydrolizę katalizowaną bromelainą nie wykazuje właściwości emulgujących i stabilizujących emulsje (Tabela 44). Jest to zapewne spowodowane zaawansowaną hydrolizą ($70,9 \pm 1,6$ % DH) i dużym pofragmentowaniem cząsteczek białek, ponieważ w zbyt krótkich peptydach nie występują jednocześnie obszary hydrofobowe i hydrofilowe i nawet w przypadku umiejscowienia peptydów na powierzchni zdyspergowanych lipidów nie tworzą się stabilizujące emulsję oddziaływania z fazą wodną. Skutkuje to zmniejszeniem zdolności emulgowania. W przypadku mało zaawansowanej hydrolizy można się natomiast spodziewać poprawy właściwości emulgujących wskutek zwiększenia liczby cząsteczek peptydów zawierających zarówno domeny hydrofobowe i hydrofilowe (Synowiecki i Sikorska-Wiśniewska, 1997). Dlatego też produkt hydrolizy papainą, którego stopień hydrolizy wynosi tylko $31,0 \pm 0,62$ %, posiada zdolność tworzenia i stabilizowania emulsji (Tabela 44). Wartości te są jednak znacznie niższe (odpowiednio 16 oraz 21%) w porównaniu do wszystkich uzyskanych izolatów białkowych.

Tabela 45. Właściwości pianotwórcze strąconych w punkcie izoelektrycznym izolatów z mączki szarłat

Rodzaj preparatu	Zdolność tworzenia piany [%]	Stabilność piany [%] po		
		5 min	10 min	20 min
Albuminy	$71,3 \pm 4,0$	$98,3 \pm 2,9$	$98,3 \pm 2,9$	$96,6 \pm 3,0$
Globuliny	$65,8 \pm 5,5$	$97,8 \pm 3,8$	$97,8 \pm 3,8$	$97,8 \pm 3,8$
Suma albumin i globulin wyekstrahowana 3% NaCl	$62,6 \pm 4,1$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$
Białka wyekstrahowane 0,25% NaOH w 3% roztworze NaCl	$59,1 \pm 3,5$	$97,9 \pm 3,6$	$97,9 \pm 3,6$	$97,9 \pm 3,6$
Hydrolizat białek uzyskany pod wpływem bromelainy	$50,5 \pm 5,2$	$74,6 \pm 7,6$	$64,1 \pm 3,6$	$56,9 \pm 4,4$
Hydrolizat białek uzyskany pod wpływem papainy	$14,3 \pm 1,5$	$100,0 \pm 0,0$	$80,0 \pm 0,0$	$60,0 \pm 0,0$
Kazeina	$153,5 \pm 10,2$	$70,5 \pm 1,2$	$65,2 \pm 3,9$	$55,8 \pm 1,1$
Albumina jaja kurzego	$106,8 \pm 10,2$	$94,1 \pm 6,6$	$86,4 \pm 4,2$	$86,4 \pm 4,2$

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Największą zdolność tworzenia piany wynoszącą około 71,3% miały albuminy szarłat strącone w punkcie izoelektrycznym (Tabela 45) oraz mieszanina albumin i globulin uzyskana przez

strącenie termiczne (77,1%) (Tabela 46). Wartości te są jednak mniejsze od zdolności tworzenia i stabilizowania piany wykazywanych przez handlowe preparaty kazeiny i albuminy jaja kurzego.

Tabela 46. Właściwości pianotwórcze strąconych termicznie z ekstraktu białek mączki szarłat

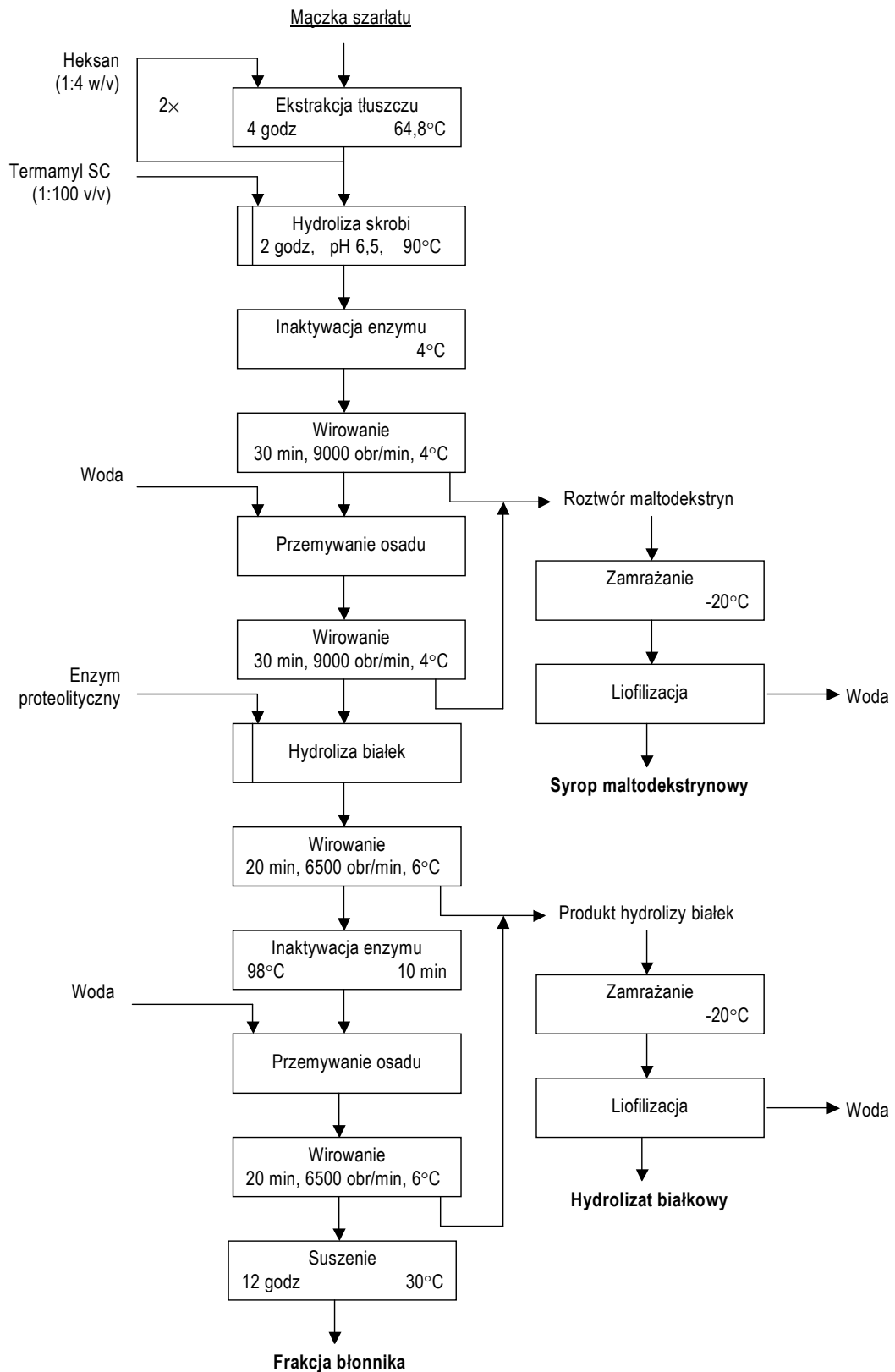
Rodzaj preparatu białkowego	Zdolność tworzenia piany [%]	Stabilność piany [%] po		
		5 min	10 min	20 min
Albuminy	48,0 ± 3,7	93,7 ± 0,39	91,7 ± 3,6	86,5 ± 4,6
Globuliny	63,9 ± 7,9	96,9 ± 4,4	93,3 ± 0,63	93,3 ± 0,63
Suma albumin i globulin wyekstrahowana 3% NaCl	77,1 ± 2,8	98,0 ± 3,4	97,1 ± 2,9	94,3 ± 5,2
Kazeina	153,5 ± 10,2	70,5 ± 1,2	65,2 ± 3,9	55,8 ± 1,1
Albumina jaja kurzego	106,8 ± 10,2	94,1 ± 6,6	86,4 ± 4,2	86,4 ± 4,2

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Dość dużą zdolnością tworzenia i stabilizowania piany charakteryzowały się też hydrolizaty białek nasion szarłat uzyskane z udziałem papainy i bromelainy. Hydrolizat wytworzony za pomocą papainy wykazywał jednak gorszą, bo wynoszącą tylko 14% zdolność tworzenia piany, która w przypadku stosowania bromelainy wzrastała do 50,5% (Tabela 45). Z wyjątkiem produktu hydrolizy bromelainą, wszystkie uzyskane preparaty białek posiadają dobre właściwości stabilizujące pianę (Tabele 45 i 46). Zastosowanie różnych rozpuszczalników do ekstrakcji białek, a także sposobów ich wydzielania z ekstraktów, nie wpływa znacząco na właściwości pianotwórcze otrzymanych preparatów. Preparaty białek szarłat charakteryzują się lepszą rozpuszczalnością (Vioque i in., 2000) oraz właściwościami emulgującymi i pianotwórczymi od preparatów uzyskanych z rzepaku (Xu i Diosady, 1994). Izolaty białkowe z gryki charakteryzują się natomiast dużą rozpuszczalnością i doskonałą zdolnością emulgowania, ale wykazują jednak małą zdolność do tworzenia piany (Bejosano i Corke, 1999). Dobre właściwości funkcjonalne stwarzają możliwość zastosowania białkowych preparatów z mąki szarłat jako funkcjonalnych składników żywności. Być może pożądane właściwości emulgujące i pianotwórcze białek szarłat wynikają z obecności w preparatach białkowych pozostałości sacharydów przechodzących do roztworu podczas ekstrakcji białek. Kompleksy białkowo-polisacharydowe zawarte w preparatach białek uzyskanych w wyniku precypitacji w pł polepszają bowiem ich właściwości pianotwórcze i emulgujące (Fidantsi i Doxastakis, 2001).

13.4. Otrzymywanie hydrolizatów białkowych po usunięciu skrobi z mączki szarłat

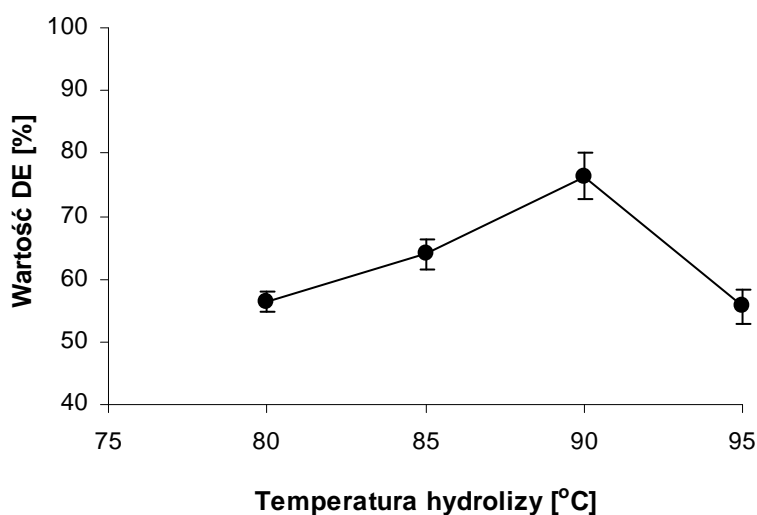
Niedogodnością opisanego poprzednio sposobu otrzymywania hydrolizatów białkowych z szarłat jest konieczność obniżenia temperatury reakcji, aby uniknąć kleikowania skrobi, która zanieczyszcza produkt. Zmniejsza to skuteczność działania wybranych enzymów proteolitycznych, a uzyskany produkt zawiera pochodzące z ziaren cukry redukujące, inicjujące reakcje Maillarda z udziałem aminokwasów znajdujących się w hydrolizacie. Niekorzystne jest też przechodzenie do hydrolizatu pewnej ilości ziaren skrobiowych, trudnych do usunięcia ze względu na ich niewielkie rozmiary. Ograniczenie tych niekorzystnych zjawisk można osiągnąć zmieniając kolejność etapów stosowanych podczas przerobu mączki szarłat. Przeprowadzono więc najpierw całkowite odtłuszczenie materiału, następnie hydrolizę skrobi, a dopiero w następnej kolejności hydrolizę białek (Rys. 23). Zmiana kolejności miała między innymi na celu ograniczenie strat skrobi podczas hydrolizy białek, gdy była ona pierwszym etapem przerobu mączki szarłat prowadzonym w temperaturze bliskiej temperaturze rozpuszczania skrobi. Wprowadzone zmiany wydają się korzystne również dlatego, że upłynnianie skrobi przebiega w temperaturze powodującej denaturację białek i ich większą podatność na hydrolizę enzymatyczną. Koszt i wydajność wytwarzania syropów skrobiowych zależą w dużym stopniu od wyboru odpowiedniego enzymu amylolitycznego stosowanego w etapie upłynniania skrobi. Stężenie stosowanej jako substrat zawiesiny ziaren skrobiowych zależy od temperatury ich kleikowania oraz od podatności na oddziaływanie enzymu. W przypadku zbyt powolnej hydrolizy następuje duży wzrost lepkości skleikowanej skrobi będący przyczyną konieczności zmniejszenia stężenia substratu, a w konsekwencji zwiększenia zużycia energii cieplnej podczas zagęszczania gotowego produktu. Nadmiernemu wzrostowi lepkości można przeciwdziałać zwiększając temperaturę upłynniania. Zastosowanie termostabilnej α -amylazy jest korzystne ze względu na dużą szybkość i wydajność reakcji związaną z wysoką temperaturą działania, minimalizację zanieczyszczenia mikrobiologicznego, zapewnienie strącania pozostałości białek zanieczyszczających substrat oraz ograniczenie niekorzystnego żelowania. Stopień upłynniania zależy od szybkości wzrostu temperatury, stężenia skrobi i enzymu, temperatury kleikowania skrobi i jej zakresu, termostabilności i punktu inaktywacji enzymu oraz od obecności innych składników, które mogą oddziaływać na pęcznienie ziaren skrobiowych lub aktywować enzym (Słomińska i Garbacik 2002).



Rys. 23. Schemat otrzymywania hydrolyzatów białkowych po usunięciu skrobi z mączki szarlatu

13.4.1. Wybór enzymu i określenie optymalnych warunków upłynniania skrobi szarłatu

Do upłynniania skrobi i jednocześnie oddzielania jej od pozostałych polisacharydów stanowiących frakcję błonnika wykorzystano stosowany powszechnie w przemyśle preparat termostabilnej α -amylazy (Termamyl SC). Enzym ten rozszczepia wewnątrzcząsteczkowe wiązania α -1,4-glikozydowe w amylozie i amylopektynie powodując szybki spadek lepkości skleikowanej zawiesiny substratu. Największy stopień hydrolizy skrobi z mączki szarłatu (czego przejawem jest maksymalna wartość równoważnika dekstrozowego - DE) uzyskano w temperaturze 90°C, zalecanej przez producenta preparatu Termamyl SC (Rys. 24).

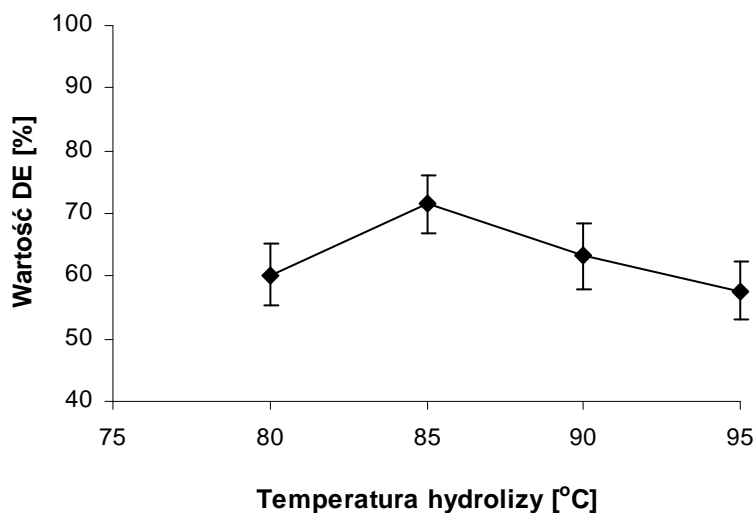


Rys. 24. Wpływ temperatury reakcji katalizowanej preparatem α -amylazy (Termamyl SC) na wartość równoważnika dekstrozowego (DE) hydrolizatów skrobiowych z mączki szarłatu uzyskanych po 2 godz. reakcji

Przedstawione wyniki są średnią z 4 reakcji hydrolizy oraz 5 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

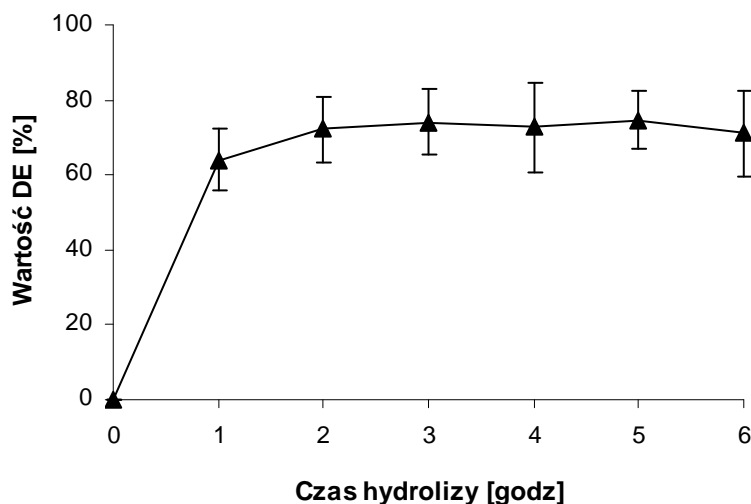
Dla porównania określono optymalną temperaturę upłynniania skrobi z mąki pszennej przy udziale tego samego preparatu enzymatycznego (Rys. 25). Skrobia pszenna jest powszechnie stosowanym w naszych warunkach klimatycznych surowcem do otrzymywania syropów glukozowych i fruktozowych o wysokim stopniu słodkości. Do wydajnego upłynniania skrobi pszennej wystarczająca wydaje się temperatura 85°C. Wyższa wartość DE uzyskiwana w przypadku hydrolizy skrobi szarłatu (76,4%) w temperaturze 90°C w porównaniu do skrobi pszennej (71,5%) w temperaturze 85°C świadczy o lepszej jej podatności na działanie enzymu i jest przypuszczalnie spowodowana różnicami struktury obu rodzajów ziaren skrobiowych. Obniżenie równoważnika

dekstrozowego, gdy reakcję prowadzono w temperaturze 95°C, wynika z częściowej inaktywacji preparatu α -amylazy (Termamyl SC) podczas długotrwałego procesu.



Rys. 25. Wpływ temperatury reakcji katalizowanej preparatem α -amylazy (Termamyl SC) na wartość równoważnika dekstrozowego (DE) hydrolizatów skrobiowych z mąki pszennej uzyskanych po 2 godz. reakcji

Przedstawione wyniki są średnią z 4 reakcji hydrolizy oraz 5 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

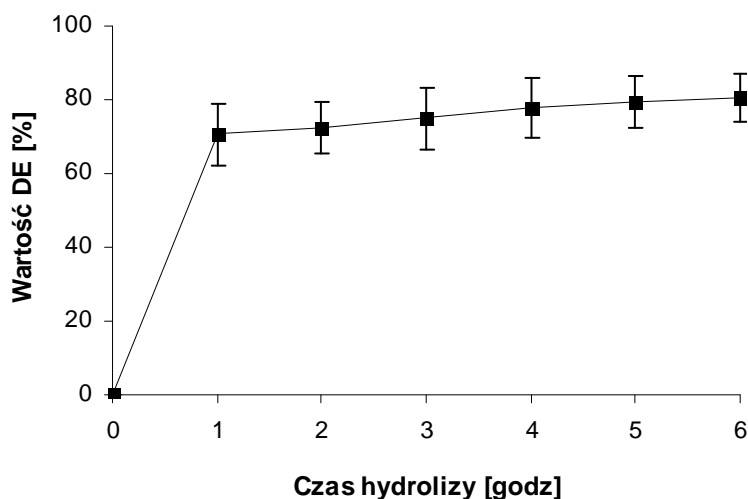


Rys. 26. Wpływ czasu reakcji katalizowanej w 90°C preparatem α -amylazy (Termamyl SC) na wartość równoważnika dekstrozowego (DE) hydrolizatów skrobiowych z mączki szarłat

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 5 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Określono również optymalny czas hydrolizy skrobi. Największe zmiany równoważnika dekstrozowego skrobi szarłat następowaly podczas pierwszych 2 godz. hydrolizy, a dalszy przyrost wartości DE był już minimalny (Rys. 26). Podobne wyniki uzyskano dla skrobi z mąki pszennej

(Rys. 27). Czas enzymatycznego upłynniania obu rodzajów skrobi nie powinien więc przekraczać dwóch godzin.



Rys. 27. Wpływ czasu reakcji katalizowanej w 90°C preparatem α -amylazy (Termamyl SC) na wartość równoważnika dekstrozowego (DE) hydrolizatów skrobiowych z mąki pszennej

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 5 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Bardzo istotna jest także ilość dodawanego do mieszaniny reakcyjnej katalizatora. W technologii wytwarzania syropów skrobiowych najczęściej stosuje się dawkę enzymu upłynniającego w ilości 2% w stosunku do surowca. Obniżenie dawki enzymu do 1% nie spowodowało jednak istotnego zmniejszenia równoważnika dekstrozowego hydrolizatu i ilości skrobi uwolnionej z mączki szarłat (Tabela 47). Uzyskany po 2 godz. reakcji przebiegającej w 90°C hydrolizat skrobiowy zawierał w suchej masie ok. 52% masy odtłuszczonej mączki szarłat niezależnie od ilości dodanego do mieszaniny reakcyjnej katalizatora (Tabela 47).

Tabela 47. Porównanie wpływu różnych ilości α -amylazy (Termamyl SC) na skuteczności usuwania skrobi z mąki szarłat

Ilość enzymu	Hydrolizat skrobiowy	Nie ulegająca hydrolizie pozostałość [% masy próbki]	Zawartość cukrów redukujących [mg/g hydrolizowanej próbki]	Ilość cukrów redukujących w syropie [g]	Równoważnik dekstrozowy DE [%]
1%	51,2 \pm 2,8	48,8 \pm 2,8	302,9 \pm 8,6	61,6 \pm 0,89	59,1 \pm 1,7
2%	52,5 \pm 4,6	47,5 \pm 4,6	319,0 \pm 6,4	63,8 \pm 1,3	60,7 \pm 1,2

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy skrobi oraz 3-5 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Pozostałość nie ulegająca hydrolizie pod wpływem Termamylu zawiera polisacharydy tworzące frakcje błonnika oraz zdenaturowane białka, które oddzielano za pomocą enzymów proteolitycznych.

Równoważnik dekstrozowy wytworzonej mieszaniny oligosacharydów wskazuje na dość duży stopień degradacji skrobi, ok. 60%, niezależnie od użytej ilości preparatu enzymatycznego (Tabela 47). Uzyskany syrop maltodekstrynowy można wykorzystać do poprawy konsystencji, lepkości i tekstury produktów spożywczych. Syropy maltodekstrynowe znalazły też zastosowanie jako zamienniki tłuszczu zmniejszające ryzyko występowania chorób serca (Moore i in., 2005). Jednak w celu uzyskania syropów zawierających głównie maltozę lub glukozę należy w dalszym etapie przeprowadzić scukrzanie β -amylazą lub glukoamylazą.

13.4.2. Hydroliza białek w pozbawionej skrobi pozostałości mączki szarłat

Pozostałość po upłynnieniu skrobi zawierającą białka oraz składniki błonnika wykorzystano w następnym etapie procesu do otrzymywania hydrolizatów białkowych. Do katalizowania hydrolizy wybrano dwa preparaty enzymatyczne, alkalazę i protamex, które we wcześniej przeprowadzonych doświadczeniach zapewniały największą wydajność izolacji białek z mączki szarłat (Tabele 18 i 30).

Tabela 48. Skuteczność ekstrakcji związków azotowych z odtłuszczonej mączki szarłat podczas hydrolizy enzymatycznej

Enzym stosowany do otrzymywania hydrolizatu białkowego	Ogólna ilość wyekstrahowanych substancji	Ilość wyekstrahowanego N	Stopień ekstrakcji związków azotowych $N/N_{og} \times 100 \%$
	[% s.m. próbek]		
Alkalaza	$35,4 \pm 0,15$	$3,77 \pm 0,018$	91,28
Protamex	$34,2 \pm 1,3$	$3,51 \pm 0,044$	85,00

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6-9 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

N – ilość azotu w wyekstrahowanych związkach azotowych

N_{og} – zawartość azotu w suchej masie pozostałości po upłynnieniu skrobi, wynosząca $4,13 \pm 0,097\%$

Zmiana kolejności odbiałczania umożliwiła prowadzenie reakcji w temperaturze optymalnej dla działania stosowanych enzymów proteolitycznych, co zwiększyło wydajność oddzielania związków azotowych. Prowadząc hydrolizę białek z odtłuszczonej oraz pozbawionej skrobi mączki szarłat można odzyskać od 85 do 91,3% związków azotowych (Tabela 48), natomiast podczas odbiałczania bez uprzedniego usunięcia skrobi uzyskano przy użyciu alkalazy i protamexu

odpowiednio 65,7 oraz 68,0% produktów hydrolizy białek. Hydrolizat uzyskany za pomocą obu badanych enzymów zawiera około 13% substancji bezazotowych (Tabela 49).

Tabela 49. Ilość wyekstrahowanych związków bezazotowych podczas hydrolizy enzymatycznej z odtłuszczonej mączki szarłat

Stosowany enzym	Ogólna ilość wyekstrahowanych substancji (A)	Białko surowe $N \times 5,85$ (B)	Substancje niebiałkowe (A - B)
	[% s.m. próbki]		
Alkalaza	35,4 ± 0,15	22,0 ± 0,10	13,4
Protamex	34,2 ± 1,3	20,5 ± 0,25	13,7

Przedstawione wyniki są średnią z 3 reakcji hydrolizy oraz 6-9 oznaczeń ± odchylenie standardowe

13.4.3. Właściwości funkcjonalne hydrolizatów białkowych

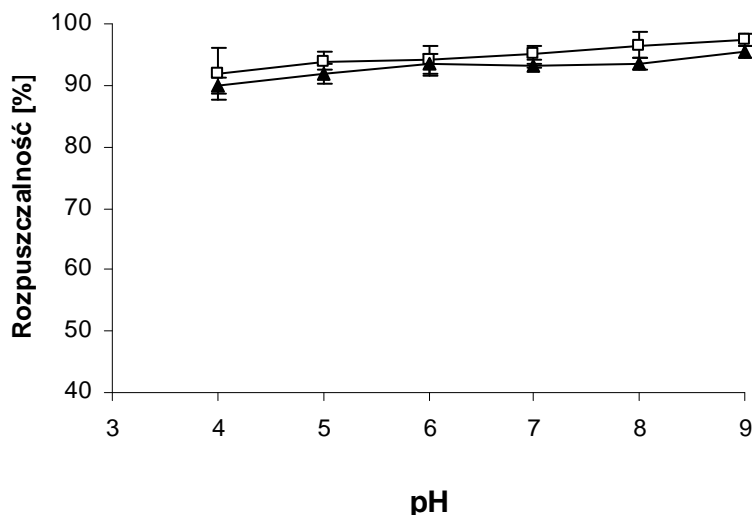
Wyższy stopień degradacji białek uzyskany podczas hydrolizy alkalazą pozostałości po usunięciu skrobi (Tabela 50) w porównaniu do hydrolizatu uzyskanego z częściowo odtłuszczonej mąki (Rys. 16) jest najprawdopodobniej spowodowany usunięciem skrobi z materiału zawierającego jej znaczną ilość. Gorzkość uzyskanych hydrolizatów białkowych jest jednak porównywalna do hydrolizatów otrzymanych bez uprzedniego usunięcia skrobi (Tabele 37 i 50).

Tabela 50. Wpływ warunków hydrolizy i rodzaju enzymu proteolitycznego na gorzkość otrzymanych hydrolizatów

Stosowany enzym	Warunki hydrolizy	DH [%]	Gorzkość (w skali 1-5)
Alkalaza	60°C, 2 godz	23,2 ± 0,63	2,0 ± 0,58
Protamex	55°C, 2 godz	48,6 ± 1,2	1,0 ± 0,0

Przedstawione wyniki są średnią z 6 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Rozpuszczalność hydrolizatów białkowych otrzymanych z pozbawionej tłuszczu i skrobi mąki szarłat przekracza 90% w całym badanym zakresie pH (Rys. 28). Hydrolizaty białkowe uzyskane z mąki zawierającej skrobię oraz tłuszcz charakteryzowały się mniejszą rozpuszczalnością, która w badanym zakresie pH zmieniała się w granicach 78,4-87,2% w przypadku stosowania alkalazy oraz 81,7-96,7% gdy używano protamexu (Rys. 21).



Rys. 28. Wpływ pH na rozpuszczalność hydrolizatów białkowych z odtłuszczonej i pozbawionej skrobi mączki szarlatu otrzymanych z zastosowaniem alkalazy (□) i protamexu (▲)

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oddzielnych doświadczeń oraz 9 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Wzrost stopnia hydrolizy białek z 19,3 do wartości 23,2% w hydrolizacie otrzymanym przy udziale alkalazy spowodował obniżenie zdolności do emulgowania o 10,2% (Tabele 35 i 51). Zaś w przypadku stosowania protamexu właściwości emulgujące i stabilizujące emulsje nie uległy istotnym zmianom mimo, że stopień hydrolizy preparatu był ok. 10% niższy w porównaniu do hydrolizatu otrzymanego z tylko odtłuszczonej mąki (Tabela 51).

Tabela 51. Zależność niektórych właściwości funkcjonalnych hydrolizatów białkowych z mąki szarlatu od rodzaju użytego enzymu

Rodzaj preparatu	Zdolność emulgowania [%]	Stabilność emulsji [%]
Białka hydrolizowane alkalazą	40,7 \pm 1,5	98,5 \pm 1,7
Białka hydrolizowane protamexem	40,8 \pm 0,7	97,9 \pm 1,6
Lecytyna	48,8 \pm 3,6	100,0 \pm 0,0

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń \pm odchylenie standardowe

Maltodekstryny również posiadają właściwości emulgujące i są czasem stosowane jako zamienniki tłuszczu podczas produkcji deserów i majonezów (Lindeboom i in., 2004; Ma i in., 2006). Zatem niewielka pozostałość maltooligosacharydów w hydrolizatach białkowych może poprawiać ich zdolności emulgujące i stabilizujące emulsje.

Tabela 52. Wpływ rodzaju enzymu na właściwości pianotwórcze oraz stabilizujące pianę hydrolizatów białkowych z mąki szarłat

Rodzaj preparatu	Zdolność tworzenia piany [%]	Stabilność piany [%] po		
		5 min	10 min	20 min
Białka hydrolizowane alkalazą	32,0 ± 1,6	80,9 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Białka hydrolizowane protamexem	32,7 ± 0,6	87,9 ± 5,2	78,8 ± 5,2	75,8 ± 5,2
Kazeina	153,5 ± 10,2	70,5 ± 1,2	65,2 ± 3,9	55,8 ± 1,1
Albumina jaja kurzego	106,8 ± 10,2	94,1 ± 6,6	86,4 ± 4,2	86,4 ± 4,2

Przedstawione wyniki są średnią z 3 oznaczeń ± odchylenie standardowe

Zdolność do tworzenia piany przez hydrolizaty wytworzone z udziałem badanych enzymów wynosi około 32% i jest znacznie niższa od handlowych preparatów kazeiny pianotwórcze (153,5%) i albuminy jaja kurzego (106,8%) (Tabela 52). Preparat uzyskany przy udziale protamexu stabilizuje wytworzoną pianę po 20 min tylko o 10% słabiej w porównaniu do albuminy jaja kurzego. Podczas gdy hydrolizat otrzymany po działaniu na białka szarłat alkalazą stabilizował pianę tylko przez 5 min, a po upływie tego czasu wytworzona piana zanikała.

Pozostałość po enzymatycznym usunięciu skrobi i białek zawierająca nierozpuszczalną frakcję składników błonnika stanowi 12,5-13,6% masy wyjściowej próbki, która zawiera jeszcze wynoszącą 2,53-4,04% pozostałość oznaczonych metodą Kjeldahla związków azotowych. Oddzieloną z mąki szarłat frakcję błonnika można wykorzystać do wytwarzania preparatów o korzystnym oddziaływaniu fizjologicznym. Dzięki fermentacji składników tej frakcji przebiegającej pod wpływem mikroflory przewodu pokarmowego tworzą się krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które korzystnie zmieniają pH i działają regenerująco na błonę śluzową jelit oraz pobudzają motorykę przewodu pokarmowego (Prokopowicz, 2001). Obecność w diecie błonnika ma także wpływ na obniżenie poziomu cholesterolu we krwi i zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia chorób serca (Kowal, 2000). Obok zalecanego spożycia żywności zawierającej znaczne ilości błonnika wzrasta też zapotrzebowanie na preparaty i parafarmaceutyki będące jego skoncentrowanym źródłem. Tanim surowcem do produkcji wysokobłonnikowych preparatów, obok otrębów pszennych, owsianych czy ryżowych, może okazać się produkt odpadowy przy produkcji syropów skrobiowych i hydrolizatów białkowych z mąki szarłat.

WNIOSKI

1. Największą wydajność izolacji znajdujących się w mączce szarłatu związków azotowych uzyskano stosując hydrolizę enzymatyczną katalizowaną alkalazą i protamexem.
2. Podczas enzymatycznej hydrolizy białek następuje ekstrakcja znajdującej się w mączce glukozy, fruktozy, sacharozy i rafinozy oraz pewnej ilości skleikowanej skrobi przyczyniając się do zanieczyszczenia produktu. Ilość cukrów oraz skrobi przenikających do hydrolizatu białkowego zależy przede wszystkim od temperatury i czasu prowadzenia reakcji.
3. Hydrolizaty białkowe wytworzone z mączki szarłatu zawierającej skrobię oraz tłuszcz wykazują dobrą rozpuszczalność wynoszącą 80-88% w całym badanym zakresie pH, podczas gdy rozpuszczalność hydrolizatów otrzymanych z pozbawionej tłuszczu i skrobi mąki przekracza 90% w całym badanym zakresie pH. Dobra rozpuszczalność badanych hydrolizatów świadczy o ich przydatności do wytwarzania energetyzowanych kwaśnych napojów owocowych, w których niemodyfikowane enzymatycznie białka nie ulegają rozpuszczeniu.
4. Mimo różnej specyficzności enzymów wykorzystanych do odbiałczania mączki szarłatu, zdolność emulgowania otrzymanych hydrolizatów jest podobna i wynosi około 50% i jest porównywalna z oznaczoną w taki sam sposób zdolnością emulgowania lecytyny. Hydrolizaty białkowe posiadają dobre zdolności stabilizacji emulsji wynoszące około 100% i są pod tym względem podobne do lecytyny uważanej za dobry emulgator. Przy zbyt dużym stopniu hydrolizy następuje ubytek zdolności emulgujących i stabilizowania emulsji wskutek zmniejszenia liczby cząsteczek peptydów zawierających zarówno domeny hydrofilowe i hydrofobowe. Hydrolizaty białek szarłatu mogą zastąpić żółtko jaja kurzego w produkcji produkcji deserów i majonezów. Przeprowadzone oznaczenia nie wykazały żadnej korelacji między właściwościami pianotwórczymi, a zdolnością emulgowania czy stopniem hydrolizy otrzymanych preparatów białkowych, badane hydrolizaty wykazują bowiem niewielkie właściwości pianotwórcze.
5. W przypadku odbiałczania mączki szarłatu alkalazą, bromelainą, neutrazą, protamexem oraz trypsyną na kształtowanie gorzkości największy wpływ ma specyficzność działania enzymu, a nie stopień hydrolizy białka. Najmniejszą, wynoszącą 1,0, gorzkość określoną

sensorycznie w skali od 1 do 5 uzyskiwano w obu przypadkach przy zastosowaniu protamexu, mimo iż stopień hydrolizy różnił się o około 35%.

6. Najwyższy stopień ekstrakcji białek z mąki szarłat, wynoszący około 84%, uzyskano stosując 0,25% roztwór NaOH. Strącenie ok. 98% ogólnej zawartości wyekstrahowanych związków azotowych następowało przy pH 4,0. Prowadzenie ekstrakcji w temperaturze 4°C nie ograniczało przechodzenia do białkowego roztworu związków bezazotowych pochodzących głównie z frakcji sacharydowej ziaren szarłat. Ich zawartość była najmniejsza w przypadku jednoetapowej ekstrakcji 3% NaCl lub 0,25% NaOH w 3% NaCl i zmieniała się w granicach 6,4-8,0% suchej masy mączki.
7. Zmiana kolejności odbiałczania umożliwiła prowadzenie reakcji w temperaturze optymalnej dla działania stosowanych enzymów proteolitycznych, co zwiększyło wydajność oddzielania związków azotowych. Prowadząc hydrolizę białek z odtłuszczonej oraz pozbawionej skrobi mączki szarłat można odzyskać od 85 do 91,3% związków azotowych, podczas gdy w wyniku odbiałczania bez uprzedniego usunięcia skrobi uzyskano przy użyciu alkalazy i protamexu odpowiednio około 66 oraz 68,0% produktów hydrolizy białek.
8. Najwyższy stopień hydrolizy skrobi prowadzący do otrzymania syropów maltodekstrynowych uzyskuje się prowadząc proces przez 2 godz. w temperaturze 90°C. Przedłużanie czasu trwania procesu nie wpływa istotnie na jego wydajność, przyczynia się natomiast do zwiększania kosztów produkcji syropów skrobiowych.
9. Zmniejszenie dawki preparatu upłynniającego skrobię (Termamyl SC) o 100%, w porównaniu do ilości stosowanej powszechnie w przemyśle, nie zmniejsza wydajności procesu otrzymywania hydrolizatów skrobiowych i pozwala na obniżenie kosztów produkcji syropów.
10. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają możliwość racjonalnego zagospodarowania poekstrakcyjnej mączki szarłat. Pozostałość po enzymatycznym usunięciu skrobi i białek zawierająca nierozpuszczalną frakcję składników błonnika może być wykorzystana do wytwarzania preparatów o korzystnym oddziaływaniu fizjologicznym.

DOROBEK NAUKOWY

PUBLIKACJE

Piotrowska B., Kołodziejska I., Januszewska-Jóźwiak K., Wojtasz-Pająk A. 2005. Effect of transglutaminase on the solubility of chitosan-gelatin films. *Advances in Chitin Science*. 8. 71-78.

Januszewska-Jóźwiak K., Synowiecki J. 2008. Charakterystyka i przydatność składników szarłatu w biotechnologii żywności. *Biotechnologia*. 3. (82). 89-102.

PREZENTACJE NA KONFERENCJACH NAUKOWYCH

Piotrowska B., Kołodziejska I., Januszewska-Jóźwiak K., Wojtasz-Pająk A. 31.08.-03.09.2004. Effect of transglutaminase on the solubility of chitosan-gelatin films. 6th International Conference of the European Chitin Society, Poznań.

PIŚMIENNICTWO

- Abalone R., Gastón A., Cassinera A., Lara M.A. 2006. Thin layer drying of amaranth seeds. *Biosys. Eng.* 93. (2). 179-188.
- Aletor V.A., Adeogun O.A. 1995. Nutrient and anti-nutrient components of some tropical leafy vegetables. *Food Chem.* 53. 375-379.
- Aletor O., Oshodi A.A., Ipinmoroti K. 2002. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. *Food Chem.* 78. 63-68.
- Aluko R.E., McIntosh T. 2005. Limited enzymatic proteolysis increases the level of incorporation of canola proteins into mayonnaise. *Innovative. Food Sci. Emerging Technol.* 6. 195-202.
- Ambroziak Z., Piesiewicz H., Węgiełek K., Krasnowska B., Węgiełek K., Barański M. 1995. Amaranthus – nowy surowiec piekarski. *Przegl. Piek. Cukiern.* 43. (6). 39-42.
- Amin I., Norazaidah Y., Emmy Hainida K.I. 2006. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food Chem.* 94. 47-52.
- Anonimowo. 2007. Polski rynek zbóż w sezonie 2006/2007. *Przegl. Zboż. Młyn.* 1. 28-31.
- Antonini G., Burghart P., Champolivier L., Evrard J., Gueguen J. 1999. Evaluation of non-food utilization of rapeseed meal. *Materiały konferencyjne 10th International Rapessed Congress*, Canberra, Australia. 316.
- Arihara K., Ogihara S., Mukai T., Itoh M., Kondo Y. 1996. Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* T140 active against pathogenic bacteria. *Letters Appl. Microbiol.* 22. 420-424.
- Askew M.F. 2004. Novel trends in investigations of *Brassica napus* protein and its designation for non-food use. *Rośliny Oleiste.* 25. 319-326.
- Avanza M.V., Puppo M.C., Añón M.C. 2005. Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydrocolloids.* 19. 889-898.
- Bagger C.L., Bjerregaard C., Sørensen H., Sørensen J.C., Sørensen S. 1999. High-quality oils, proteins and bioactive products for food and non-food purposes produced in pilot plant scale by biorefining of cruciferous crops. *Materiały konferencyjne 10th International Rapessed Congress*, Canberra, Australia. 568.
- Bartnik M., Filipek A. 1999. Badania nad wybranymi wskaźnikami wartości odżywczej nasion i liści amarantusa. *Żywnie Człowieka i Metabolizm.* 26. (3). 229-241.
- Becker R. 1994. Amaranth oil: composition, processing and nutritional qualities w: *Amaranth. Biology, Chemistry and Technology*. red. Paredes-López O., CRC Inc. Press, Boca Raton, Floryda. 133-141.
- Bejosano F.P., Corke H. 1998. *Amaranthus* and buckwheat protein concentrate effects on an emulsion-type meat product. *Meat Sci.* 50. (3). 343-353.
- Bejosano F.P., Corke H. 1999. Properties of protein concentrates and hydrolysates from *Amaranthus* and Buckwheat. *Industrial Crops and Products.* 10. 175-183.
- Berganza B.E., Moran A.W., Rodríguez G.M., Coto N.M., Santamaría M., Bressani R. 2003. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. *Plant Foods Human Nutr.* 58. 1-6.
- Bernfeld P. 1955. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. 1. 149-158.
- Betti M., Fletcher D.L. 2005. The influence of extraction and precipitation pH on the dry matter yield of broiler dark meat. *Poultry Sci.* 84. 1303-1307.

- Bonetto V., Andersson M., Bergman T., Sillard R., Norberg Å., Mutt V., Jörnvall H. 1999. Spleen antibacterial peptides: high levels of PR-39 and presence of two forms of NK-lysin. *Cell. Mol. Life Sci.* 56. 174-178.
- Bryjak J. 1999. Enzymatyczna hydroliza skrobi do syropów maltodekstrynowych i skrobiowych. Cz. I. Enzymy; Cz. II. Procesy. *Biotechnologia*. 1. (44). 180-225.
- Cai Y.Z., Sun M., Corke H. 2005. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends Food Sci. Technol.* 16. 370-376.
- Cai Y.Z., Sun M., Wu H.X., Huang R.H., Corke H. 1998. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *J. Agric. Food Chem.* 46. 2063-2070.
- Calzetta Resio A.N., Aguerre R.J., Suárez C. 1999. Analysis of the sorptional characteristics of amaranth starch. *J. Food Eng.* 42. 51-57.
- Calzetta Resio A.N., Aguerre R.J., Suárez C. 2004. Drying characteristics of amaranth grain. *J. Food Eng.* 65. 197-203.
- Chabanon G., Chevalot I., Framboisier X., Chenu S., Marc I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochem.* 42. 1419-1428.
- Claver I.P., Zhou H. 2005. Enzymatic hydrolysis of defatted wheat germ by proteases and the effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *J. Food Biochem.* 29. 13-26.
- Clemente A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 11. 254-262.
- Colmenares de Ruiz A.S., Bressani R. 1990. Effect of germination on the chemical composition and nutritive value of amaranth grain. *Cereal Chem.* 67. (6). 519-522.
- Correa A.D., Jokl L., Carlsson R. 1986. Chemical constituents, in vitro protein digestibility and presence of antinutritional substances in amaranth grains. *Arch. Latinoam. Nutr.* 6. (2). 319-326.
- Crabb W.D., Mitchinson C. 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnol.* 15. 349-352.
- Cumby N., Zhong Y., Naczek M., Shahidi F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem.* 109. 144-148.
- Czarnecka J., Koziolkiewicz M. 2007. Albuminy 2S – roślinne białka zapasowe o właściwościach alergicznych. *Biotechnologia*. 2. (77). 114-127.
- Czerwiński J., Bartnikowska E., Leontowicz H., Lange E., Leontowicz M., Katrich E., Trakhtenberg S., Gorinstein S. 2004. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *J. Nutr. Biochem.* 15. 622-629.
- Dionysius D.A., Milne J.M. 1997. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J. Dairy Sci.* 80. 667-674.
- Dobrzeńska A., Haberowa H., Sobczak E. 1996. Wpływ dodatku amarantusa na przebieg fermentacji zacierów gorzelnicznych. *Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw.* 40. (2). 23-24.
- Dziuba J. 1997. Biologicznie i funkcjonalnie aktywne peptydy. *Przegl. Mlecz.* 9. 266-269.
- Dziuba J. 2005. Strategia badania białek i bioaktywnych peptydów w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. red. Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S., Wyd. Akad. Roln., Szczecin. 219-237.
- Dziuba J., Minkiewicz P., Plitnik K. 1996. Chicken meat proteins as potential precursors of bioactive peptides. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 5/46. (4). 85-95.
- Dziuba J., Minkiewicz P., Puszka K., Dąbrowski S. 1995. Plant seed storage proteins as potential precursors of bioactive peptides. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 4/45. (3). 31-42.

- Dzwolak W., Ziajka S. 1993. Kierunki wykorzystania hydrolizatów białkowych. *Przem. Spoż.* 47. (11). 298-300.
- Escudero N.L., de Arellano M.L., Luco J.M., Giménez M.S., Mucciarelli S.I. 2004. Comparison of the chemical composition and nutritional value of *Amaranthus cruentus* flour and its protein concentrate. *Plant Foods Human Nutr.* 59. 15-21.
- Escudero N.L., Zirulnik F., Gomez N.N., Mucciarelli S.I., Giménez M.S. 2006. Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid metabolism. *Experimental Biol. Med.* 231. 50-59.
- Farges-Haddani B., Tessier B., Chenu S., Chevalot I., Harscoat C., Marc I., Goergen J.L., Marc A. 2006. Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochem.* 41. 2297-2304.
- Fasuyi A.O. 2006. Nutritional potentials of some tropical vegetable leaf meals: chemical characterization and functional properties. *Afr. J. Biotechnol.* 5. (1). 49-53.
- Fasuyi A.O. 2007. Bio-nutritional evaluations of three tropical leaf vegetables (*Telfairia occidentalis*, *Amaranthus cruentus* and *Talinum triangulare*) as sole dietary protein sources in rat assay. *Food Chem.* 103. 757-765.
- Fehlbaum P., Rao M., Zasloff M., Anderson G.M. 2000. An essential amino acid induces epithelial β -defensin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97. 12723-12728.
- Ferreira T.A.P.C., Arêas J.A.G. 2004. Protein biological value of extruded raw and toasted amaranth grain. *Pesquisa Agropecuária Tropical.* 34. (1). 53-59.
- Fidantsi A., Doxastakis G. 2001. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 21. 119-124.
- FitzGerald R.J., O'Cuinn G. 2006. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnol. Adv.* 24. 234-237.
- Flaczyk E. 1997. Zalety technologiczne i żywieniowe hydrolizatów białkowych. Część I. Otrzymywanie i charakterystyka chemiczna. Część II. Technologiczne możliwości wykorzystania hydrolizatów białkowych. *Przem. Spoż.* 51. (3). 6-8, 31; (4). 43-45.
- Gajewska R., Lebedzińska A., Malinowska E., Szefer P. 2002. Ocena jakości zdrowotnej szarlatu (amarantusa). *Roczn. PZH.* 53. (2). 141-147.
- Gamel T.H., Linssen J.P., Alink G.M., Mesallam A.S., Shekib L.A. 2004. Nutritional study of raw and popped seed proteins of *Amaranthus caudatus* and *Amaranthus cruentus* L. *J. Sci. Food Agric.* 84. 1153-1158.
- Gamel T.H., Linssen J.P., Mesallam A.S., Damir A.A., Shekib L.A. 2005. Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein. *J. Sci. Food Agric.* 85. 319-327.
- Gamel T.H., Linssen J.P., Mesallam A.S., Damir A.A., Shekib L.A. 2006a. Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibres, minerals and vitamins. *J. Sci. Food Agric.* 86. 82-89.
- Gamel T.H., Linssen J.P., Mesallam A.S., Damir A.A., Shekib L.A. 2006b. Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. *J. Sci. Food Agric.* 86. 1095-1102.
- Gąsiorowski H. 2004. Węglowodany w ziarnie pszenicy (cz. II). Cukry złożone – skrobia. *Przegl. Zboż. Młyn.* 2. 2-6.
- Gąsiorowski H. 2007. Skład chemiczny mąki kukurydzianej i niektóre aspekty wartości żywieniowej. *Przegl. Zboż. Młyn.* 10. 8-9.
- Ge S.J., Zhang L.X. 1996. The immobilized porcine pancreatic exopeptidases and its application in casein hydrolysates debittering. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59. (2). 159-165.
- Gildberg A., Arnesen J.A., Carlehög M. 2002. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochem.* 38. 475-480.

- Gimplinger D.M., Dobos G., Schönlechner R., Kaul H.P. 2007. Yield and quality of grain amaranth (*Amaranthus* sp.) in Eastern Austria. *Plant Soil Environ.* 53. (3). 105-112.
- Gołąbczak J. 2005. Wzbogacanie białek roślinnych w aminokwasy egzogenne w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. Red. Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S., Wyd. Akad. Roln., Szczecin. 167-181.
- Gorinstein S., Pawelzik E., Delgado-Licon E., Haruenkit R., Weisz M., Trakhtenberg S. 2002. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *J. Sci. Food Agric.* 82. 886-891.
- Grajek W., Krzyżaniak W. 2005. Enzymatyczne modyfikacje skrobi w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. Red. Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S., Wyd. Akad. Roln., Szczecin. 539-558.
- Grajeta H. 1997a. Wartość odżywcza i wykorzystanie szarłat (rodzaj *Amaranthus*). *Bromat. Chem. Toksykol.* 30. (1). 17-23.
- Grajeta H. 1997b. Wpływ nasion szarłat (*Amaranthus cruentus*) na gospodarkę lipidową u szczurów doświadczalnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 30. (1). 25-30.
- Grajeta H. 2000. Hipolipemiczne działanie ekspandowanych nasion szarłat (*Amaranthus cruentus*) u szczurów doświadczalnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 33. (1). 7-13.
- Guderjan M., Elez-Martínez P., Knorr D. 2007. Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 8. 55-62.
- Guerra-Matias A.C., Arêas J.A.G. 2005. Glycemic and insulinemic responses in women consuming extruded amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *Nutr. Res.* 25. 815-822.
- Haber T., Haberowa H., Karpińska J., Lewczuk J., Sobczyk M., Cacak-Pietrzak G. 1995. Wpływ dodatku mąki z nasion amarantusa na wybrane cechy ciasta i pieczywa pszennego i żytniego. *Przegl. Piek. Cukiern.* 43. (6). 36-37.
- Hartmann R., Meisel H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Op. Biotechnol.* 18. 163-169.
- Iwaniak A., Minkiewicz P. 2007. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 6. (3). 5-15.
- Jędrusek-Golińska A., Korczak J., Kmiecik D., Heś M., Gramza A. 2003. Wykorzystanie izolatów białkowych śruty rzepakowej do produkcji hydrolizatów. *Rośliny Oleiste.* 24. 701-708.
- Jobling S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Curr. Op. Plant Biol.* 7. 210-218.
- Jurga R. 2007. Możliwości wykorzystania mączki gryczanej. *Przegl. Zboż. Młyn.* 6. 8.
- Jyothirmayi T., Prabhakara Rao P.G., Walde S.G. 2006. Nitrogen extractability and functional properties of defatted *Erythrina variegata* flour. *Food Chem.* 96. 242-247.
- Kanner K., Harel S., Granit R. 2001. Betalains – a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 49. 5178-5185.
- Kelly G.S. 1999. Squalene and its potential clinical uses. *Altern. Med. Rev.* 4. (1). 29-36.
- Kędryna T., Gałka-Walczak M., Ostrowska B. 2001. Reakcje charakterystyczne dla aminokwasów oraz ich oznaczenie ilościowe w: *Wybrane zagadnienia z biochemii ogólnej z ćwiczeniami*. Wyd. Uniw. Jagiel. Kraków. 15-27.
- Klimczak I., Małecka M., Pacholek B. 2002. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. *Nahrung/Food.* 46. (3). 184-186.
- Koeppel S.J., Rupnov J.H. 1988. Purification and characterization of a lectin from the seeds of amaranth (*Amaranthus cruentus*). *J. Food Sci.* 53. (5). 1412-1417, 1422.

- Kołąkowski E. 2005. Enzymy i ich wykorzystanie w modyfikacji białek żywnościowych w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. Red. Kołąkowski E., Bednarski W., Bielecki S., Wyd. Akad. Roln., Szczecin. 31-99.
- Komorowska A.D., Stecka K.M. 1998. Białka i ich hydrolizaty do celów spożywczych – moda czy potrzeba chwili. *Przem. Spoż.* 52. (3). 26-28.
- Konishi Y., Nojima H., Okuno K., Asaoka M., Fuwa H. 1985. Characterization of starch granules from waxy, nonwaxy and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agric. Biol. Chem.* 49. (7). 1965-1971.
- Korhonen H., Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16. 945-960.
- Kowal Z. 2000. Złote ziarno – szarłat. *Mag. Prod. Żywn.* 2. 20-22.
- Lahl W.J., Braun S.D. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates of food use. *Food Technol.* 48. (10). 68-71.
- Laisk A., Edwards G.E. 1998. Oxygen and electron flow in C₄ photosynthesis: Mehler reaction, photorespiration and CO₂ concentration in the bundle sheath. *Planta.* 205. 632-645.
- Larré C., Mulder W., Sánchez-Vioque R., Lazko J., Bérot S., Guéguen J., Popineau Y. 2006. Characterisation and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 49. 40-48.
- Lawal O.S., Adebowale K.O., Oderinde R.A. 2004. Functional properties of amylopectin and amylose fractions isolated from bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*) starch. *Afr. J. Biotechnol.* 3. (8). 399-404.
- León-Camacho M., García-González D.L., Aparicio R. 2001. A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile. *Eur. Food Res. Technol.* 213. 349-355.
- Leszczyński W. 2001. Zróżnicowanie właściwości skrobi. *Przem. Spoż.* 55. (3). 38-39.
- Li J.H., Vasanthan T., Hoover R., Rossnagel B.G. 2004. Starch from hull-less barley: In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. *Food Chem.* 84. 621-632.
- Lindeboom N., Chang P.R., Tyler R.T. 2004. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. *Starch/Stärke.* 56. 89-99.
- Lipkin A., Anisimova V., Nikonorova A., Babakov A., Krause E., Bienert M., Grishin E., Egorov T. 2005. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry.* 66. 2126-2134.
- Liu F., Stützel H. 2002. Leaf water relations of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to soil drying. *Eur. J. Agron.* 16. 137-150.
- López M.G., Bello-Pérez L.A., Paredes-López O. 1994. Amaranth carbohydrates w: *Amaranth. Biology, Chemistry and Technology*. Red. Paredes-López O., CRC Inc. Press, Boca Raton, Floryda. 107-131.
- Ludwig E., Lipke U., Raczek U., Jäger A. 2000. Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. *Eur. Food Res. Technol.* 211. 111-116.
- Ma Y., Cai C., Wang J., Sun D-W. 2006. Enzymatic hydrolysis of corn starch for producing fat mimetics. *J. Food Eng.* 73. 297-303.
- Mahajan A., Dua S. 1998. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var toria) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. *Food Hydrocolloids.* 12. 349-355.
- Makri E.A., Doxastakis G.I. 2006. Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins. *Food Chem.* 98. 558-568.
- Małecka M. 1995. Składniki frakcji nieglicerydowej olejów roślinnych jako przeciwutleniacze. *Tłuszcze Jadalne.* 30. 123-130.

- Marccone M.F. 1999. Possible nutritional implications of varietal influence on the 7S/11S seed globulin ratios in amaranth. *Plant Foods Human Nutr.* 54. 375-380.
- Marccone M.F., Kakuda Y., Yada R.Y. 2004. Amaranth as a rich dietary source of β -sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods Human Nutr.* 58. 207-211.
- Marccone M.F., Yada R.Y. 1998. Structural analysis of globulins isolated from genetically different *Amaranthus* hybrid lines. *Food Chem.* 61. 319-326.
- Martins J.C., Maes D., Loris R., Pepermans H.A.M., Wyns L., Willem R., Verheyden P. 1996. ^1H NMR study of the solution of Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. *J. Mol. Biol.* 258. 322-333.
- McCurdy S., Jelen P., Fedec P., Wood D.F. 1986. Laboratory and pilot scale recovery of protein from mechanically separated chicken residue. *J. Food Sci.* 51. (3). 742-747, 753.
- Meisel H. 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Sci.* 50. 125-138.
- Meisel H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.* 8. 363-373.
- Milewski S. 2000. Oczyszczanie inwertazy z drożdży piekarskich w: *Biochemia. Ćwiczenia laboratoryjne*. red. Milewski S., Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk. 108-115.
- Molina Ortiz S.E., Wagner J.R. 2002. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Res. Intern.* 35. 511-518.
- Moure A., Sineiro J., Domínguez H., Parajó J.C. 2006. Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Res. Intern.* 39. 945-963.
- Mundigler N. 1998. Isolation and determination of starch from amaranth (*Amaranthus cruentus*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Starch/Stärke.* 50. 67-69.
- Myers R.L. 1998. Nitrogen fertilizer effect on grain amaranth. *Agron. J.* 90. 597-602.
- Nalborczyk E. 1995. Amaranthus roślina uprawna ponownie odkryta. *Przeegl. Piek. Cukiern.* 43. (6). 34-35.
- Ney K.H. 1972. Aminosäure-Zusammensetzung von Proteinen und die Bitterkeit ihrer Peptide. *Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch.* 149. 321-323.
- Ojo D.O. 1997. Effect of weeding frequencies on grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) growth and yield. *Crop Prot.* 16. (5). 463-466.
- Olsen H.S., Adler-Nissen J. 1979. Industrial production and application of a soluble enzymatic hydrolysate of soya proteins. *Process Biochem.* 14. 6-11.
- Ozimek G., Jelen P., Sauer W., McCurdy S.M. 1986. A composition of mechanically separated and alkali extracted chicken protein for functional and nutritional properties. *J. Food Sci.* 51. (3). 748-753.
- Palka K., Sikorski Z.E., Rakowska M. 1985. The recovery and nutritional evaluation of alkali extracted protein coagulates from crushed bone residues. *Food Chem.* 18. 291-299.
- Paśko P., Bednarczyk M. 2007. Szarłat (*Amaranthus* sp.) – możliwości wykorzystania w medycynie. *Bromat. Chem. Toksykol.* 40. (2). 217-222.
- Paśko P., Bednarczyk M., Zachwieja Z. 2007. Właściwości żywieniowe i zdrowotne szarłatu i komosy. Cz. I. Dotychczasowy stan wiedzy nt. właściwości odżywczych szarłatu (*Amaranthus* sp.); Cz. II. Wpływ dodatku nasion szarłatu i komosy do pasz szczerów na wybrane wskaźniki biochemiczne tych zwierząt karmionych dietą wysokofruktozową. *Żywnie Człowieka Metabolizm.* 34. (3/4). 1256-1268.

- Pelegrine D.H.G., Gasparetto C.A. 2005. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Lebensm.-Wissenschaft Technol.* 38. 77-80.
- Piddock L.J.V. 1998. Antibacterials – mechanisms of action. *Curr. Op. Microbiol.* 1. 502-508.
- Piecyk M., Klepacka M. 2004. Właściwości funkcjonalne preparatów białkowych otrzymanych z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*) metodą krystalizacji i izolacji klasycznej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 4. (41). 57-68.
- Pihlanto-Leppälä A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and aceinhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 11. 347-356.
- Piesiewicz H. 2007. Ewolucja znaczenia chleba w żywieniu człowieka. *Przegl. Piek. Cukiern.* 55. (9). 4-6.
- Piesiewicz H., Ambroziak Z. 1995. Amaranthus – aspekty żywieniowe. *Przegl. Piek. Cukiern.* 43. (6). 32-33.
- Pinto E Silva M.E.M., Mazzilli R.N., Cusin F. 1999. Composition of hydrolysates from meat. *J. Food Composition Anal.* 12. 219-225.
- PN-75/A-04018. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
- Pisarikova B., Zraly Z., Kracmar S., Trckova M., Herzig I. 2006. The use of amaranth (genus *Amaranthus* L.) in the diets for broiler chickens. *Veterinari Medicina.* 51. (7). 399-407.
- Power R., Murphy R. 1999. Biologically active peptides. *J. Equine Veterinary Sci.* 19. (5). 324-325.
- Pospišil A., Pospišil M., Varga B., Svečnjak Z. 2006. Grain yield and protein concentration of two amaranth species (*Amaranthus* spp.) as influenced by the nitrogen fertilization. *Eur. J. Agron.* 25. 250-253.
- Prokopowicz D. 2001. Właściwości zdrowotne szarłat (*Amaranthus cruentus*). *Med. Wet.* 57. (8). 559-561.
- Prokopowicz D., Puzanowska B., Czauż-Andrzejuk A. 2000. Cenne właściwości szarłat. *Wiad. Ziel.* 11. 1-2.
- Qureshi A.A., Lehmann J.W., Peterson D.M. 1996. Amaranth and its oil inhibit cholesterol biosynthesis in 6-week-old female chickens. *J. Nutr.* 126. 1972-1978.
- Rahma E.H., Narasinga Rao M.S. 1983. Effect of limited proteolysis on the functional properties of cottonseed flour. *J. Agric. Food Chem.* 31. (2). 356-358.
- Ratusz K., Wirkowska M. 2006. Charakterystyka nasion i lipidów amarantusa. *Rośliny Oleiste.* 27. 243-250.
- Rocha G., Plácido Moore R.G., Canto L.R., Amante E.R., Soldi V. 2005. Cassava and corn in maltodextrin production. *Quim. Nova.* 28. (4). 596-600.
- Rosiak E. 2006. Rynek rzepaku – stan i perspektywy. *Rośliny Oleiste.* 27. 151-167.
- Roučková J., Trčková M., Herzig I. 2004. The use of amaranth grain in diets for broiler chickens and its effect on performance and selected biochemical indicators. *Czech J. Anim. Sci.* 49. (12). 532-541.
- Rutkowska J. 2006. Amaranthus – roślina przyjazna człowiekowi. *Przegl. Piek. Cukiern.* 54. (1). 6-10.
- Rutkowska A., Kozłowska H., 1981. Metody wytwarzania preparatów białkowych w: *Preparaty białkowe z białka roślinnego*. WNT, Warszawa. 104-166.
- Rywotycki R. 2005. Właściwości żywieniowe i zdrowotne szarłat (amarantusa) dla ludzi i zwierząt. *Przegl. Zboż. Młyn.* 10. 24-26.
- Salunkhe D.K., Jadhav S.J., Kadam S.S., Chavan J.K. 1982. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 17. (3). 277-305.

- Sánchez-Vioque R., Clemente A., Vioque J., Bautista J., Millán F. 1998. Polar lipids of defatted chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour and protein isolates. *Food Chem.* 63. 357-361.
- Sato A.K., Viswanathan M., Kent R.B., Wood C.R. 2006. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr. Op. Biotechnol.* 17. 638-642.
- Saunders R.M., Becker R. 1984. Amaranthus: a potential food and feed resource w: *Advances in Cereal Science and Technology*. red. Pomeranz Y., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. 357-396.
- Schmidt M.K., Taylor S.L., Nordlee J.A. 1994. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technol.* 48 (10). 77-80, 85.
- Schnetzler K.A., Breene W.M. 1994. Food uses and amaranth product research: a comprehensive review w: *Amaranth. Biology, Chemistry and Technology*. red. Paredes-López O., CRC Inc. Press, Boca Raton, Floryda. 155-177.
- Schulte-Erley G., Kaul H-P., Kruse M., Aufhammer W. 2005. Yield and nitrogen utilization efficiency of the pseudocereals amaranth, quinoa and buckwheat under differing nitrogen fertilization. *Eur. J. Agron.* 22. 95-100.
- Scilingo A.A., Molina Ortiz S.E., Martínez E.N., Añón M.C. 2002. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatment. Relationship between structure and solubility. *Food Res. Intern.* 35. 855-862.
- Segura-Nieto M., Barba de la Rosa A.P., Paredes-López O. 1994. Biochemistry of amaranth proteins w: *Amaranth. Biology, Chemistry and Technology*. red. Paredes-López O., CRC Inc. Press, Boca Raton, Floryda. 75-106.
- Severin S., Xia W.S. 2006. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *J. Food Biochem.* 30. 77-97.
- Shahidi F., Han X.Q., Synowiecki J. 1995. Production and characteristic of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* 53. 285-293.
- Shahidi F., Synowiecki J. 1996. Alkali-assisted extraction of proteins from meat and bone residues of harp seal (*Phoca groenlandica*). *Food Chem.* 57. 317-321.
- Shin D.H., Heo H.J., Lee Y.J., Kim H.K. 2004. Amaranth squalene reduces serum and liver lipid levels in rats fed a cholesterol diet. *British J. Biomed. Sci.* 61. (1). 11-14.
- Sikorski Z.E. 1996a. Budowa i skład chemiczny żywności w: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. red. Sikorski Z.E., WNT, Warszawa. 26-57.
- Sikorski Z.E. 1996b. Niebiałkowe związki azotowe w: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. red. Sikorski Z.E., WNT, Warszawa. 353-371.
- Sikorski Z.E. 2000. Charakterystyka białek głównych surowców żywnościowych w: *Chemia żywności. Skład przemiany i właściwości żywności*. red. Sikorski Z.E., WNT, Warszawa. 304-361.
- Sikorski Z.E. 2007. Charakterystyka białek głównych surowców żywnościowych w: *Chemia żywności cz. II. Sacharydy, lipidy i białka*. red. Sikorski Z.E., WNT, Warszawa. 202-253.
- Silva-Sánchez C., González-Castañeda J., de León-Rodríguez A., Barba de la Rosa A.P. 2004. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two Mexican varieties. *Plant Foods Human Nutr.* 59. 169-174.
- Silvestre M.P.C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.* 60. 263-271.
- Sindhuja A., Sudha M.L., Rahim A. 2005. Effect of incorporation of amaranth flour on the quality of cookies. *Eur. Food Res. Technol.* 221. 597-601.
- Słomińska L. 1995. Enzymatyczne metody transformacji skrobi. *Przem. Spoż.* 49. (12). 472-475, 480.
- Słomińska L. 1997. Hydrolizaty skrobiowe otrzymywane z surowców zbożowych. *Przem. Spoż.* 51. (3). 9-12.

- Słomińska L., Garbacik M. 2002. Porównanie właściwości hydrolitycznych dwóch termostabilnych preparatów enzymatycznych. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 1. (2). 21-30.
- Słota E., Natonek M., Żyga A., Rejduch B. 2002. BSE – możliwości identyfikacji i profilaktyki. *Biotechnologia*. 1. (56). 136-141.
- Smacchi E., Gobbetti M. 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 17. 129-141.
- Solomon E.P., Berg L.R., Martin D.W., Vilee C.A. 2000. Fotosynteza – ujarzmianie energii w: *Biologia*. Wyd. Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa. 184-205.
- Stepaniak L. 1996. Biologicznie aktywne peptydy z białek mleka. *Przem. Spoż.* 50. (4). 17-20.
- Stuchlík M., Žák S. 2002. Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomed. Papers.* 146. (2). 3-10.
- Sun H., Wiesenborn D., Tostenson K., Gillespie J., Rayas-Duarte P. 1997. Fractionation of squalene from amaranth seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74. 413-418.
- Surówka K. 2005. Modyfikacja ekstrudowanej mąki sojowej i sojowego koncentratu białkowego metodą enzymatycznej hydrolizy w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. red. Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S., Wyd. Akad. Roln., Szczecin. 101-119.
- Svirskis A. 2003. Investigation of amaranth cultivation and utilisation in Lithuania. *Agron. Res.* 1. (2). 253-264.
- Synowiecki J., Sikorska-Wiśniewska G. 1997. Funkcjonalne właściwości i żywieniowe zastosowanie hydrolizatów białkowych. *Żywność. Technologia. Jakość.* 3. (12). 20-27.
- Szostek A. 2000. Właściwości fizykochemiczne białek w: *Biochemia. Ćwiczenia laboratoryjne*. red. Milewski S., Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk. 100-108.
- Szot B. 1999. Właściwości agrofizyczne amarantusa (*Amaranthus cruentus* L.). *Acta Agrophys.* 18. 7-15.
- Śmiechowska M. 2000. Naturalne substancje antyodżywcze w: *Żywnie kliniczne*. red. Łysiak-Szydłowska W., Via Medica, Gdańsk. 217-231.
- Świdorski F., Waszkiewicz-Robak B. 2005. Składniki bioaktywne w żywności funkcjonalnej. *Przem. Spoż.* 59. (4). 20-22.
- Świtek H., Janicka M. 1994. Substytuty ekstraktu mięsnego. *Przem. Spoż.* 48. (6). 174-175.
- Tapia-Blácido D., Sobral P.J., Menegalli F.C. 2005. Development and characterization of biofilms based on amaranth flour (*Amarantus caudatus*). *J. Food Eng.* 67. 215-223.
- Teutonico R.A., Knorr D. 1985. Amaranth: composition, properties and applications of rediscovered food crop. *Food Technol.* 39. (4). 49-60.
- Tosi E.A., Ré E., Lucero H., Masciarelli R. 2001. Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling. *Food Chem.* 73. 441-443.
- Tosi E.A., Ré E., Masciarelli R., Sánchez H., Osella C., de la Torre M.A. 2002. Whole and defatted hyperproteic amaranth flours tested as wheat flour supplementation in mold breads. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 35. 472-475.
- Tyburcy A. 2007. Znaczenie zbóż w żywieniu człowieka. *Przeegl. Zboż. Młyn.* 4. 9-10.
- Vioque J., Sánchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Bautista J., Millán F. 1999. Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 76. 819-823.
- Vioque J., Sánchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Millán F. 2000. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 77. 447-450.

- Virk P., Saxena P.K. 2003. Potential of *Amaranthus* seeds in supplementary feed and its impact on growth in some carps. *Biores. Technol.* 86. 25-27.
- Wald M.L. 2007. Czy etanol ma przyszłość? *Świat Nauki*. 195. (11). 60-66.
- Wilczewski T., Martysiak-Żurowska D. 2008. Sposób i urządzenie do otrzymywania wzbogaconej w olej mąki z nasion szarlatu. Zgłoszenie Patentowe nr P-384-563 z dnia 28. 02. 2008.
- Wilcka-Jeszka J. 2007. Barwniki w: *Chemia żywności. cz. I. Składniki żywności*. red. Sikorski Z.E., WNT, Warszawa. 142-171.
- www.antoranz.net/CURIOSA/ZBIOR4
- www.faculty.mansfield.edu/bganong/biochemistry/starch.htm
- Xu L., Diosady L.L. 1994. Functional properties of Chinese rapeseed protein isolates. *J. Food Sci.* 59. (5). 1127-1130.
- Yeom H.W., Kim K.S., Rhee J.S. 1994. Soy protein hydrolysate debittering by lysine-acetylation. *J. Food Sci.* 59. (5). 1123-1126.
- Yoshie-Stark Y., Wada Y., Schott M., Wäsche A. 2006. Functional and bioactive properties of rapeseed protein concentrates and sensory analysis of food application with rapeseed protein concentrates. *LWT - Food Sci. Technol.* 39. 503-512.
- Yoshie-Stark Y., Wada Y., Wäsche A. 2008. Chemical composition, functional properties and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chem.* 107. 32-39.
- Yoshie-Stark Y., Wäsche A. 2004. In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chem.* 88. 179-184.
- Yust M.M., Pedroche J., Megias C., Girón-Calle J., Alaiz M., Millán F., Vioque J. 2004. Rapeseed protein hydrolysates: a source of HIV protease peptide inhibitors. *Food Chem.* 87. 387-392.
- Zalewski S., Jędrzejczyk H. 1999. Preparaty białkowe w: *Żywność wygodna i żywność funkcjonalna*. red. Świdorski F., WNT, Warszawa. 246-258.
- Zawadzki K. 2007. Przemysłowe wykorzystanie zbóż na świecie wykazuje wysoką dynamikę wzrostu dzięki przetwórstwu na etanol. *Przegl. Zboż. Młyn.* 3. 38.
- Zhang S.B., Wang Z., Xu S.Y. 2007a. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 84. 97-105.
- Zhang S.B., Wang Z., Xu S.Y. 2007b. Downstream processes for aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 84. 693-700.
- Zheleznov A.V., Solonenko L.P., Zheleznova N.B. 1997. Seed proteins of the wild and cultivated *Amaranthus* species. *Euphytica*. 97. 177-182.