

AGNIESZKA WOJTYŚ, TOMASZ JANKOWSKI

**WPŁYW TEMPERATURY NA SZYBKOŚĆ PRZENIKANIA
WYBRANYCH OLEJKÓW ETERYCZNYCH DO KOMÓREK
DROŻDŻY PIEKARSKICH**

Streszczenie

Zbadano wpływ temperatury na zjawisko przenikania olejków eterycznych, pomarańczowego i miętowego, do komórek drożdży piekarskich. Olejki mieszano z zawiesiną wodną świeżych drożdży i wytrząsano w temp. 25, 40, 50 i 70°C w różnym czasie. Po odwirowaniu i przemyciu osadu komórkowego wodą destylowaną preparat suszono metodą liofilizacji. Ilość zakapsułkowanego olejku oznaczano za pomocą chromatografii gazowej po uwodnieniu drożdży i ekstrakcji olejku etanolem. Hydrofobowe olejki eteryczne przenikały do komórek na zasadzie biernej dyfuzji w błonie komórkowej i pozostawały w komórkach po ich wysuszeniu. Szybkość dyfuzji olejków do komórek wzrastała ze wzrostem temperatury i była większa w przypadku olejku miętowego. Maksymalna zawartość olejku pomarańczowego w suchych komórkach drożdży wynosiła 24% s.s. natomiast olejku miętowego 43% s.s. i nie zależała od temperatury procesu kapsułkowania.

Słowa kluczowe: olejek pomarańczowy, olejek miętowy, kapsułkowanie aromatów, *Saccharomyces cerevisiae*.

Wstęp

Zainteresowanie przemysłu spożywczego aromatami w postaci mikrokapsułkowanej wynika z ich zwiększonej trwałości i ułatwionego stosowania w produktach sproszkowanych. Po procesie kapsułkowania ciekłe aromaty spożywcze są bardziej odporne na utlenianie i chronione przed dostępem światła. Sproszkowana forma aromatów umożliwia ich równomierne i łatwe rozproszenie w suchych mieszankach ciast cukierniczych, napojów instant, zbożowych przetworów śniadaniowych i różnych przekąskach [10].

Aromaty spożywcze w postaci olejków eterycznych są na skalę przemysłową najczęściej mikrokapsułkowane metodami suszenia rozpyłowego i ekstruzji [1, 8]. W pierwszej metodzie olejek zapachowy jest emulgowany w roztworze wodnym materiałów tworzących ściankę mikrokapsułek (maltodekstryny, guma akacjowa, syropy glukozowe i niektóre skrobie modyfikowane), a powstała emulsja suszona rozpyłowo. Zawartość olejku zapachowego w mikrokapsułkach suszonych rozpyłowo zwykle nie przekracza 20–25% ich suchej masy, a wadą jest naturalna obecność olejku na powierzchni [1, 19]. Mikrokapsułkowanie metodą ekstruzji polega na rozproszeniu olejku zapachowego w gorącej mieszaninie sacharozy, maltodekstryn i syropu glukozowego i wtłaczaniu powstałej emulsji do zimnego izopropanolu przez zespół dysz o niewielkiej średnicy. Zawartość olejku zapachowego w powstałych granulkach wynosi 8–20% zaś trwałość preparatu jest znacznie większa i wynosi ok. 2 lata [8, 21]. Inne techniki stosowane jak dotąd w małej skali, ale mające potencjalne zastosowanie przemysłowe w mikrokapsułkowaniu aromatów, to koacerwacja, inkluzja molekularna w β -cyklodekstrynach, otoczkowanie tłuszczem i współkryształizacja [12] oraz kapsułkowanie w preparowanych ziarenkach skrobi [13].

W ostatnich latach zainteresowanie nauki i przemysłu jest skierowane na możliwość wykorzystania materiałów biologicznych o strukturach komórkowych, jako naturalnych pojemników różnych substancji o charakterze związków zapachowych, barwników, środków farmakologicznych i insektycydów [17]. Wykazano na przykład, że w ludzkich erytrocytach można, po odpowiedniej obróbce, skutecznie zakapsułkować aktywne związki farmakologiczne w celu ich kontrolowanego uwalniania w organizmie człowieka [15]. Funkcję mikropojemników substancji niskocząsteczkowych mogą także spełniać pyłki roślinne dostępne w dużych ilościach, np. brzozy i sosny [9]. Wykazano także, że olejki aromatyczne mogą w znaczących ilościach wnikać do komórek drożdży [2]. Zjawisko to umożliwia, jak się wydaje, łatwe i wydajne mikrokapsułkowanie aromatów spożywczych w postaci olejków eterycznych w komórkach drożdży piekarskich lub browarniczych, tanich i dostępnych w dużej ilości. Po utrwaleniu, olejki zapachowe zakapsułkowane w komórkach drożdży mogą stanowić dodatek do ciast, nadzień cukierniczych, deserów i innych artykułów żywnościowych, a także znaleźć zastosowanie w innych branżach przemysłu, np. w produktach chemii gospodarczej.

Celem niniejszej pracy było zbadanie zjawiska dyfuzji wybranych olejków zapachowych do komórek drożdży piekarskich. Zakres badań obejmował analizę wpływu temperatury na szybkość przenikania olejków przez ściany komórek i określenie wydajności kapsułkowania.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły handlowe drożdże piekarskie (30% s.s., ZPD Wołczyn) oraz dwa terpenowe olejki eteryczne: pomarańczowy (gęstość $d_4^{15} = 0,849$ g/ml; skręcalność optyczna $\alpha_D^{15} = +99,35^\circ$; indeks refrakcji $n_{20} = 1,474$) i miętowy (gęstość $d_4^{15} = 0,900$ g/ml; skręcalność optyczna $\alpha_D^{15} = -17,18^\circ$; indeks refrakcji $n_{20} = 1,461$), produkcji firmy Misitano & Stracuzzi (Messyna, Włochy). Inne użyte odczynniki o czystości analitycznej pochodziły z firmy Sigma Chemicals Ltd.

Badania procesu transportu olejków eterycznych do komórek drożdży wykonano w temp. 25, 40, 50 i 70°C. W kolbach Erlenmeyera o pojemności 100 ml umieszczano 50 ml wody destylowanej i 10 g świeżych drożdży, mieszano do uzyskania jednolitej zawiesiny, a następnie dodawano 10 ml olejku. Zawiesinę wytrząsano w łaźni wodnej w odpowiedniej temperaturze przy liczbie skoków 120. min⁻¹.

W celu zbadania szybkości przenikania olejku do komórek drożdży, po ustalonych odstępach czasu pobierano próby (5 ml), wirowano (2000 × g, 10 min) i oddzielano osad komórek drożdży od supernatantu (mieszanina niewchłoniętego olejku i wody). Osad przemywano wodą destylowaną powtarzając procedurę płukania i wirowania trzykrotnie, a następnie suszono sublimacyjnie (zamrażanie -30°C, 4 h; suszenie 20°C, 65 Pa) w ciągu 24 h.

Zawartość olejku w komórkach drożdży określano metodą chromatografii gazowej. W tym celu naważkę suchych drożdży (0,15 g) ponownie mieszano z wodą destylowaną (1 ml), a następnie ekstrahowano 96% etanolem połączonym ze standardem wewnętrznym (2-nonanon, 4 mg/ml), mieszano (vortex, 30 s) i filtrowano (0,45 μm); 1 μl filtratu wprowadzano do kolumny chromatografu gazowego HP 5890 (Hewlett Packard, Avondale, USA), (kolumna HP1 ze związaną metylovaną gumą silikonową – 0,25 μm, 30 m × 0,53 mm; FID 260°C; gaz nośny hel – 5 ml/min; split 1:25; temp. inżektora 240°C; temp. kolumny 35–200°C, przyrost temp. 5°C/min w przypadku olejku miętowego i 8°C/min w przypadku olejku pomarańczowego). Procentową zawartość olejku obliczano na podstawie powierzchni pików jego podstawowych składników z poniższego równania [22], odnosząc otrzymane wartości liczbowe do suchej masy drożdży.

$$C[\%mas_i] = \frac{G_w \times A_i \times f_i}{G_p \times A_w} \times 100$$

G_w – masa wzorca dodanego do próbki,

G_p – masa próbki,

A_i – powierzchnia pików oznaczanego składnika,

A_w – powierzchnia pików wzorca,

f_i – współczynnik korekcyjny oznaczanego składnika.

Analizę wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki poddano jednoczynnikowej analizie wariancji, a wnioskowanie statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Olejki eteryczne ekstrahowane z różnych roślin wykazują zróżnicowane działanie przeciwdrobnoustrojowe względem wielu szczepów bakterii i drożdży przy stężeniu mniejszym niż 0,5% (v/v) [5, 11]. Uważa się, że terpenowe składniki olejków wnikają do błony komórkowej powodując jej modyfikację prowadzącą do zaniku zdolności transportowych białek, a w konsekwencji do zakłócenia bilansu osmotycznego komórki i utratę jej żywotności [6].

W niniejszej pracy komórki drożdży umieszczano w 20% (v/v) wodnej zawiesinie olejku eterycznego i po 2 h inkubacji nie stwierdzono obecności żywych komórek. Zanik żywotności komórek nie wstrzymywał jednak procesu wnikania olejków do ich wnętrza i w rezultacie wydajność kapsułkowania była większa od średniej wydajności uzyskiwanej innymi metodami. Na rys. 1. przedstawiono zmiany zawartości olejku pomarańczowego, a na rys. 2. olejku miętowego w komórkach drożdży piekarskich w czasie, w różnej temperaturze. Wnikanie olejków do drożdży charakteryzowały dwie fazy procesu. Pierwsza, w której zawartość olejku w czasie rosła prostoliniowo oraz druga, związana z ustalaniem się stanu równowagi. W doświadczeniach stwierdzono także, że równowagowa (maksymalna) zawartość tego samego olejku w drożdżach była podobna w każdej temperaturze procesu, a jednocześnie istotnie wyższa w przypadku olejku miętowego (tab. 1). Porównanie średnich zawartości olejku w poszczególnej temperaturze procesu wykazało brak różnic na poziomie istotności $p = 0,05$ w obrębie jednego rodzaju olejku oraz istotną różnicę pomiędzy zawartością olejku pomarańczowego i miętowego.

W celu zbadania wpływu temperatury na proces przenikania olejków do komórek drożdży, prostoliniowe odcinki wykresów opisano równaniami kinetyki reakcji rzędu zerowego typu [23]:

$$-dC/dt = k$$

gdzie: C – zawartość olejku w drożdżach, k – stała szybkości reakcji.

Stałe szybkości reakcji wykreślono względem odwrotności bezwzględnej temperatury zgodnie z równaniem Arrheniusa na rys. 3. i obliczono energię aktywacji procesu. Wartości liczbowe tej wielkości były zbliżone w przypadku obu badanych olejków (tab. 1), co wskazuje na ten sam mechanizm transportu w procesie przenikania olejków do komórek.