

ROBERT TYLINGO^{*)}, AGNIESZKA MAZUR-SANDOMIERSKA, MARIA SADOWSKA

Politechnika Gdańska

Wydział Chemiczny

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

^{*)} e-mail: robertt@chem.pg.gda.pl

Przydatność białka rybiego w postaci kolagenu lub żelatyny oraz polisacharydu — κ -karagenu do wytwarzania aktywnych opakowań biodegradowalnych

Streszczenie — Zbadano możliwość wykorzystania błon z kolagenu bądź z żelatyny (białko uzyskiwane z dorsza bałtyckiego) oraz z polisacharydowych błon karagenowych a także odpowiednich dwuskładnikowych układów białkowo/polisacharydowych jako nośników enzymów (lizozymu albo lizostafiny) do otrzymywania aktywnych mikrobiologicznie opakowań. Stwierdzono, że sieciowanie takich układów *N*-[3-(dimetyloamino)propyl]-*N'*-etylokarbodiimidem (EDC) nie wywiera wpływu na aktywność unieruchomionego w błonach lizozymu, w przypadku zaś lizostafiny jej aktywność w wyniku sieciowania błon maleje. Błony kolagenowe z unieruchomionym lizozymem lub lizostafiną wykazują większą aktywność niż odpowiednie błony kolagenowo-karagenowe i żelatynowo-karagenowe. Minimalne stężenie lizozymu potrzebne do zapewnienia aktywności usieciowanej błony kolagenowej wobec mikroorganizmu *Sarcina* S1 wynosi 0,2 mg/ml, natomiast użycie lizostafiny już w ilości 7 μ g/ml zapewnia aktywność usieciowanej błony kolagenowej wobec *Staphylococcus aureus*. Wprowadzenie do błony białkowej κ -karagenu (układy dwuskładnikowe) powoduje zmniejszenie aktywności w skutek oddziaływania enzymów z tym polisacharydem.

Słowa kluczowe: opakowania biodegradowalne, kolagen rybi, żelatyna rybia, κ -karagen, sieciowanie, enzymy, aktywność.

USEFULNESS OF FISH COLLAGEN, GELATIN AND CARRAGEENAN FOR PREPARATION OF ACTIVE BIODEGRADABLE PACKAGES

Summary — The possibility of use of protein films made of fish collagen or gelatin as well as polysaccharide carrageenan films as carriers of enzymes (lysozyme or lysostaphyne), for preparation of microbiologically active packages, was investigated. It was found that crosslinking of such systems with *N*-[3(dimethylamino)propyl]-*N'*-ethylcarboimide (EDC) does not influence the activity of lysozyme immobilized in the films (Table 1). In case of lysostaphyne, its activity decreases after the film crosslinking (Table 5). Collagen films with lysozyme or lysostaphyne immobilized show higher activities than collagen-carrageenan or gelatin-carrageenan ones. The minimal lysozyme concentration needed to secure the activity of crosslinked collagen film toward *Sarcina* S1 microorganisms equals 0.2 mg/mL (Table 2 and 3). However, the use of lysostaphyne in an amount of 7 μ g/mL secures the activity of crosslinked collagen film toward *Staphylococcus aureus* (Table 6). An introduction of κ -carrageenan into the film (two-component system) causes decrease in activity as a result of interaction of enzymes with this polysaccharide (Table 1 and 4).

Key words: biodegradable packages, fish collagen, fish gelatin, κ -carrageenan, crosslinking, enzymes, activity.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA OPAKOWAŃ BIODEGRADOWALNYCH I AKTYWNYCH

Do produkcji biodegradowalnych opakowań wykorzystuje się surowce naturalne takie jak polisacharydy (np. skrobię termoplastyczną i octan celulozy), białka zwierzęce i roślinne oraz lipidy. Do tego celu stosuje się także polimery wytwarzane przez mikroorganizmy, np. poli(kwas 3-hy-

droksymasłowy) lub kopolimer kwas 3-hydroksymasłowy/kwas 3-hydroksywalerianowy. Opakowania ulegające biodegradacji można również uzyskiwać z materiałów otrzymywanych na drodze klasycznej syntezy chemicznej z surowców pochodzenia naturalnego np. z polimerów takich jak poli(kwas polimlekowy) bądź polilaktyd [1].

Wśród opakowań biodegradowalnych ważną grupę stanowią opakowania jadalne. Tego typu folie opakowa-

niowe mogą być wytwarzane ze wspomnianych już grup surowców naturalnych, mianowicie z białek (glutenu, pszenicy, kolagenu, kazeiny, białek serwatki), polisacharydów (alginianów, karagenów, skrobi, pektyn i dekstryn) oraz lipidów (acylogliceroli i kwasów tłuszczowych) [2, 3].

Jadalne folie opakowaniowe często stają się integralną częścią produktu. Dzieje się tak wtedy, gdy formuje się je bezpośrednio na powierzchni pakowanego wyrobu w wyniku zanurzenia w roztworze błonotwórczym bądź rozpylenia błony na produkcie. Możliwe jest również użycie takich folii do rozdzielania poszczególnych warstw towaru, np. w wyrobach cukierniczych. Z tego względu folie jadalne powinny być bezwonne i pozbawione smaku, ponadto jest konieczne, aby spełniały wszystkie wymogi jakości i bezpieczeństwa dotyczące żywności. Część składników, z których powstają jadalne folie, jest trawiona w przewodzie pokarmowym, pozostałe zaś, np. polisacharydy (celuloza, hemicelulozy, pektyny, gumy, śluzu) i ligniny nie ulegają działaniu enzymów trawiennych.

Opakowania aktywne to materiały, które dzięki zawartym w nich tzw. substancjom aktywnym — powodującym np. niszczenie lub hamowanie wzrostu drobnoustrojów występujących w żywności — zapobiegają niekorzystnym zmianom jakości pakowanego produktu.

Aby zapewnić stały kontakt takiego czynnego składnika z produktem musi on zostać w odpowiedni sposób unieruchomiony w opakowaniu. Najprostsze rozwiązanie stanowi umieszczenie wewnątrz tradycyjnego opakowania specjalnego systemu emitującego tę substancję. Zadanie to może spełniać np. saszetka z mikroporowatym materiałem nasyconym aktywnym związkami. Innym rozwiązaniem jest wbudowanie czynnego dodatku w strukturę samego opakowania lub stworzenie na nim otoczki z takiej substancji. W tego typu systemach wykorzystuje się rozmaite folie — biodegradowalne oraz niebiodegradowalne wytwarzane z syntetycznych tworzyw polimerowych [4].

W charakterze składnika aktywnego jadalnych błon stosuje się też enzymy bakteriobójcze lub bakteriostatyczne, np. lizozym, oraz bakteriocynty, np. nizinę, peditocynę bądź laktocynę. Jako unieruchamiający nośnik substancji aktywnej proponuje się w takim przypadku użycie chitozanu, żelatyny albo polisacharydów.

Celem badań było unieruchomienie enzymów o działaniu bakteriobójczym lub bakteriostatycznym w błonach białkowo-sacharydowych oraz ocena aktywności tak przygotowanych materiałów.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały

Do otrzymywania błon biodegradowalnych użyto kolagenu i żelatyny izolowanych we własnym zakresie ze skór dorsza bałtyckiego oraz κ -karagenu (Fluka)

a także preparatu kolagenowo-karagenowego wytwarzanego wg [5, 6].

Sieciowanie prowadzono przy użyciu *N*-[3-(dimetyloamino)propylo]-*N'*-etylokarbodiimidu (EDC, Sigma-Aldrich).

Jako substancje aktywne zastosowano enzymy: lizostafinę uzyskaną w naszej Katedrze z rekombinowanej bakterii *E. coli* o aktywności 391 U/mg białka [7] oraz lizozym z białka kurzego (BioChemika) o aktywności 97 940 U/mg białka.

Wytwarzanie błon

Błony czysto karagenowe lub żelatynowe uzyskiwano z odpowiednich 2-proc. roztworów wodnych, natomiast błony czysto kolagenowe — z roztworów 0,5 M kwasu octowego.

Błony kolagenowo-karagenowe otrzymywano z 2-proc. wodnej dyspersji preparatu kolagenowo-karagenowego o pH 5,5.

Błony żelatynowo-karagenowe wytwarzano z dyspersji, w których stosunek 5-proc. żelatyny do karagenu wynosił 4,5:1. Do układu dodawano również glicerol w stężeniu 10 % w stosunku do suchej masy składników błony.

Sieciowanie błon prowadzono metodą kodypersyjną polegającą na zhomogenizowaniu dyspersji błonotwórczych zawierających enzymy z czynnikiem sieciującym (przed uformowaniem błon) w takiej ilości aby stężenie EDC w dyspersji wynosiło 15 mM. Zawartości stosowanych enzymów równe były odpowiednio — lizozymu 0,5—2 mg/ml, lizostafiny 7—100 μ g/ml.

W celu odpowietrzenia każdego z układów błonotwórczych wirowano go w ciągu 40 min w temp. 4 °C z szybkością obrotową odpowiadającą 1000 \cdot g. Roztwór błonotwórczy wylewano następnie do form pokrytych warstwą teflonu po czym suszono w temperaturze pokojowej. Wytworzone błony grubości 0,03 mm były nierozpuszczalne w środowisku wodnym.

Metody badań

Aktywność błon oceniano z wykorzystaniem testu płytkowego. Hodowle bakteryjne *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 oraz *Sarcina* S1 wyizolowaną z żywności (w obu przypadkach zbiory naszej Katedry) znajdujące się w logarytmicznej fazie wzrostu (faza, w której wszystkie komórki drobnoustrojów ulegają podziałowi) — wysiewano w ilości 100 μ l odpowiednio na podłoże wybiórczo-różnicujące Chapmana oraz na typowe podłoże mikrobiologiczne LA. Następnie na podłożach tych umieszczano fragmenty błon przycięte do wymiarów 10 \times 10 mm. Oceniane nieuzbrojonym okiem strefy zahamowania wzrostu bakterii mierzono za pomocą standardowego szablonu i wyrażano w milimetrach. Za minimalne stężenie enzymu zapewniające jeszcze aktywność błon przyjmowano najmniej widoczną strefę zaha-

mowania wzrostu mikroorganizmów odpowiadając danemu stężeniu enzymu w błonie. W przypadku wszystkich badanych błon niezawierających enzymu wielkość tej strefy wynosiła 0 mm, co świadczy o zupełnej swobodzie wzrostu mikroorganizmów na danym podłożu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Lizozym

Unieruchomienie enzymu polega na jego makromolekularnym skompleksowaniu z polimerowymi składnikami błon. Obecność czynnika sieciującego (EDC) w błonie może zwiększyć skuteczność takiego unieruchomienia lizozymu. Nie stwierdzono natomiast wyraźnego wpływu EDC na aktywność lizozymu w żadnym z badanych układów (tabela 1).

T a b e l a 1. Porównanie aktywności wobec *Sarcina* S1 lizozymu (1 mg/ml) unieruchomionego w błonach niesieciowanych bądź usieciowanych przy użyciu EDC

T a b l e 1. Comparison of activity of lysozyme (concentration 1 mg/mL) immobilized in non-crosslinked and crosslinked with EDC films toward *Sarcina* S1

Rodzaj błony	Wielkość strefy zahamowania wzrostu, mm ^{*)}
Kolagenowe	
Nisieciowana	8 ± 0,8
Usieciowana	7 ± 0,7
Kolagenowo-karagenowe	
Nisieciowana	2 ± 0,5
Usieciowana	1,5 ± 0,4
Żelatynowo-karagenowe	
Nisieciowana	1,5 ± 0,4
Usieciowana	1,5 ± 0,5

^{*)} Wyniki są średnią z 3 powtórzeń ± odchylenie standardowe.

Z punktu widzenia zastosowania omawianego typu błon do produkcji biodegradowalnych opakowań brak takiej zależności jest korzystny — właściwe, nieograniczające efektywności unieruchomienie substancji aktywnej umożliwia bowiem skuteczne jej oddziaływanie z powierzchnią warstwy żywności.

We wszystkich trzech badanych układach stwierdzono wzrost aktywności błon wraz ze zwiększaniem stężenia lizozymu (tabela 2); błony kolagenowe wykazywały przy tym co najmniej czterokrotnie większą aktywność niż błony żelatynowo-karagenowe i kolagenowo-karagenowe i dlatego wydają się najkorzystniejszym podłożem do unieruchamiania tego enzymu.

Najmniejsze zastosowane stężenie lizozymu pozwalające na zaobserwowanie pojawiających się jeszcze stref zahamowania wzrostu *Sarcina* w standardowych warunkach oceny aktywności usieciowanych błon mieści się w przedziale 0,2—1 mg/ml (tabela 3). Określenie mi-

nimalnego stężenia lizozymu umożliwiła obniżenie kosztów produkcji aktywnego opakowania.

T a b e l a 2. Zależność aktywności wobec *Sarcina* S1 usieciowanych EDC błon od stężenia lizozymu

T a b l e 2. Dependence of crosslinked film activity on lysozyme concentration

Stężenie lizozymu w błonach mg/ml	Wielkość strefy zahamowania wzrostu, mm ^{*)}
Kolagenowe	
0,5	3,8 ± 0,2
1	7,5 ± 0,6
2	8,2 ± 0,8
Kolagenowo-karagenowe	
0,5	1,0 ± 0,4
1	1,5 ± 0,6
2	2,0 ± 0,5
Żelatynowo-karagenowe	
0,5	0
1	1,5 ± 0,3
2	2,0 ± 0,4

^{*)} Wyniki są średnią z 3 powtórzeń ± odchylenie standardowe.

T a b e l a 3. Minimalne stężenie lizozymu zapewniające aktywność usieciowanych EDC błon kolagenowych, kolagenowo-karagenowych i żelatynowo-karagenowych

T a b l e 3. Minimal lysozyme concentration securing the activities of crosslinked collagen, collagen-carrageenan or gelatin-carrageenan films

Rodzaj błony	Minimalne stężenie lizozymu, mg/ml
Kolagenowa	0,2
Kolagenowo-karagenowa	0,5
Żelatynowo-karagenowa	1,0

T a b e l a 4. Wpływ rodzaju składników układu błonotwórczego zawierającego 1 mg/ml lizozymu na wielkość strefy zahamowania wzrostu *Sarcina* S1

T a b l e 4. Effects of the components of film forming system, containing 1 mg/mL of lysozyme, on the value of *Sarcina* S1 growth inhibition zone

Błona	Wielkość strefy zahamowania wzrostu, mm ^{*)}
Karagenowa niesieciowana	0,5 ± 0,2
Karagenowa usieciowana	0
Żelatynowa niesieciowana	4,0 ± 0,3
Żelatynowa usieciowana	3,5 ± 0,6
Żelatynowo-karagenowa niesieciowana	1,5 ± 0,4
Żelatynowo-karagenowa usieciowana	1,5 ± 0,5

^{*)} Wyniki są średnią z 3 powtórzeń ± odchylenie standardowe.

W celu ustalenia przyczyn wspomnianego zjawiska największej aktywności błon kolagenowych sporządzono niesieciowane oraz usieciowane przy użyciu EDC jedno- oraz dwuskładnikowe błony żelatynowo-karagenowe. W układach tych unieruchamiano lizozym.

Wszystkie badane błony zawierające żelatynę wykazywały wyraźną aktywność — zaobserwowano duże strefy zahamowania wzrostu bakterii (tabela 4). W przypadku niesieciowanej błony karagenowej odnotowano aż ośmiokrotnie mniejszą strefę zahamowania wzrostu bakterii w stosunku do niesieciowanej błony żelatynowej, natomiast usieciowana błona karagenowa nie przejawiała żadnej aktywności.

Na podstawie tych danych można wnioskować, że przyczyną dużo mniejszej aktywności dwuskładnikowych błon białkowo-polisacharydowych jest obecność karagenu, który najprawdopodobniej reaguje ze zjonizowanymi aminowymi grupami lizozymu. Najczęściej kompleksy białek z polisacharydami powstają w wyniku niespecyficznych oddziaływań elektrostatycznych między przeciwnie naładowanymi grupami aminowymi białka a siarczanowymi grupami sacharydu (κ -karagenu) [7]. Związanie białka enzymatycznego z karagenem utrudnia lub wręcz uniemożliwia dyfuzję enzymu do otoczenia — bądź nie wpływając przy tym w istotnym stopniu na aktywność enzymu, bądź też powodując utratę aktywności. Zanik aktywności w tym przypadku jest spowodowany albo zmianą struktury trzeciorzędowej białka, albo powstałą na skutek unieruchomienia białka zawadą przestrzenną uniemożliwiającą kontakt substratu z centrum katalitycznym enzymu.

Lizostafyna

Aktywność błon z unieruchomioną lizostafyną oceniano wobec szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 na podłożu Chapmana [8]. Wspomniana już metoda otrzymywania błon kolagenowych z roztworu CH_3COOH nie tylko nie prowadzi do denaturacji enzymu, ale pozwala na zachowanie znacznie większej aktywności w porównaniu z aktywnością błon dwuskładnikowych w odniesieniu do tych samych stężeń lizostafyny (tabela 5).

T a b e l a 5. Porównanie aktywności wobec *Staphylococcus aureus* lizostafyny (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) unieruchomionej w błonach niesieciowanych bądź usieciowanych EDC

T a b l e 5. Comparison of activity of lysostaphine (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) immobilized in non-crosslinked and crosslinked with EDC films toward *Staphylococcus aureus*

Rodzaj błony	Wielkość strefy zahamowania wzrostu, $\text{mm}^{\text{*)}$
Kolagenowa niesieciowana	$6,0 \pm 0,3$
usieciowana	$5,0 \pm 0,4$
Kolagenowo-karagenowa niesieciowana	$1,5 \pm 0,3$
usieciowana	$1,0 \pm 0,4$
Żelatynowo-karagenowa niesieciowana	$2,0 \pm 0,4$
usieciowana	0

^{*)} Wyniki są średnią z 3 powtórzeń \pm odchylenie standardowe.

Widoczny jest wpływ czynnika sieciującego na dezaktywację badanych błon, zwłaszcza wyraźny w przypadku układów żelatynowo-karagenowych.

Zwiększanie efektywności unieruchomienia enzymu w błonie w wyniku usieciowania jej za pomocą EDC może być spowodowane przez dwie przyczyny: po pierwsze, zmniejsza się udział swobodnych przestrzeni w strukturach układu, po drugie zaś może nastąpić związanie enzymu ze składnikami błony. Obydwa te czynniki w istotnym stopniu ograniczają dyfuzję lizostafyny i mogą — ze względów strukturalnych — prowadzić również do utraty jej aktywności.

T a b e l a 6. Zależność aktywności wobec *Staphylococcus aureus* usieciowanych EDC błon kolagenowych od stężenia lizostafyny
T a b l e 6. Dependence of crosslinked film activity on lysostaphine concentration

Stężenie lizostafyny w błonach, $\mu\text{g}/\text{ml}$	Wielkość strefy zahamowania wzrostu, $\text{mm}^{\text{*)}$
0	0
7	$1,5 \pm 0,5$
13	$3,0 \pm 0,3$
26	$4,0 \pm 0,5$
100	$5,5 \pm 0,5$

^{*)} Wyniki są średnią z 3 powtórzeń \pm odchylenie standardowe.

Układy kolagenowe z lizostafyną okazały się aktywne wobec *Staphylococcus aureus* w całym badanym zakresie stężeń. Z tego względu, podobnie jak w przypadku lizozymu, do unieruchomienia lizostafyny najwłaściwsze wydają się błony kolagenowe. Minimalne stężenie lizostafyny, w warunkach którego folia wykazuje aktywność wobec *Staphylococcus aureus*, wynosi zaledwie 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (dolna granica ocenianych przez nas stężeń) (tabela 6), co korzystnie ogranicza koszty.

PODSUMOWANIE

Wykazano, że możliwe jest stabilne unieruchomienie lizozymu w błonach kolagenowych, kolagenowo-karagenowych i żelatynowo-karagenowych. Błony kolagenowe są także odpowiednie do unieruchamiania lizostafyny. Układy dwuskładnikowe wykazują zmniejszoną w wyniku obecności κ -karagenu aktywność, czego przyczyną jest najprawdopodobniej reakcja reaktywnych siarczanowych grup karagenu z aminowymi grupami białek enzymatycznych. W celu uzyskania aktywnych błon dwuskładnikowych do produkcji biodegradowalnych opakowań, konieczne jest zatem zastosowanie dużych stężeń enzymu.

W przypadku lizozymu nie stwierdzono w układach kolagenowych, kolagenowo-karagenowych i żelatynowo-karagenowych wpływu czynnika sieciującego, tj. EDC na dyfuzję enzymu do otoczenia. Umożliwia to polepszenie (w wyniku usieciowania) właściwości mecha-

nicznych błony opakowaniowej bez ograniczenia jej aktywności. Natomiast w przypadku błon z unieruchomioną lizostafyną różnica aktywności pomiędzy błonami niesieciowanymi i usieciowanymi jest zbyt wyraźna.

LITERATURA

1. Żakowska H.: „Opakowania biodegradowalne”, COBRO, Warszawa 2003.
2. Tederko A.: *Przem. Spoż.* 1995, **9**, 343.
3. Yang L., Paulson A. T.: *Food Res. Int.* 2000, **33**, 563.
4. Czajkowska D.: *Przem. Spoż.* 2005, **8**, 88.
5. Sadowska M., Kołodziejska I., Niecikowska C.: *Food Chem.* 2003, **81**, 257.
6. Sadowska M., Kołodziejska I.: *Food Chem.* 2005, **91**, 45.
7. Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S., Hardy J.: *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1998, **38**, 689.
8. Szweda P., Kotłowski R., Kur J.: *J. Biotechnol.* 2005, **117**, 203.

Otrzymano 1 III 2007 r.