



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: mgr inż. Szymon Mania

Dyscyplina naukowa: Technologia chemiczna

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

Otrzymywanie i charakterystyka funkcjonalnych biomateriałów ksero- i hydrożelowych na bazie chitozanu oraz ocena ich możliwości aplikacyjnych.

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

Obtaining and characterization of functional xero- and hydrogel biomaterials based on chitosan and evaluation on their application possibilities.

Promotor <i>podpis</i>	Drugi promotor <i>podpis</i>
Dr hab. inż. Hanna Staroszczyk	Nie dotyczy
Promotor pomocniczy <i>podpis</i>	Kopromotor <i>podpis</i>
Dr inż. Robert Tylingo	Nie dotyczy

Gdańsk, rok 2017

Składam serdeczne podziękowania:

Promotorowi dr hab. inż. Hannie Staroszczyk
za umożliwienie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej,
poświęcony czas, cenne uwagi i sugestie.

Promotorowi pomocniczemu dr inż. Robertowi Tylingo
za zaufanie i koleżeńską atmosferę pracy, okazaną pomoc
i najcenniejsze rady w pracy naukowej i życiu prywatnym.

Doktorantom i Pracownikom Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
za niezapomnianą atmosferę, życzliwość i pomoc.

Dr hab. Ewie Augustin
za współpracę w badaniach nad cytotoksycznością materiałów chitozanowych.

Dr inż. Aleksandrze Szkudlarek i Mgr Paulinie Dederko
za pomoc techniczną w analizie mikroskopowej materiałów chitozanowych techniką SEM.

Dr inż. Piotrowi Bruździakowi
udostępnienie aparatury i pomoc w analizie FTIR materiałów chitozanowych.

Mgr inż. Katarzynie Gucwie
za pomoc w wykonaniu i interpretacji wyników dotyczących właściwości
przeciwdrobnoustrojowych materiałów chitozanowych.

Rodzicom
za nieustanną wiarę w moje możliwości i stawiane cele.

Narzeczonej Paulinie
za cierpliwość, wsparcie i pomoc w sprawdzaniu pracy.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	3
INDEKS STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE.....	8
1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	10
1.1. Wprowadzenie	10
1.2. Biopolimery o wysokim potencjalne naukowym i technologicznym	14
1.2.2. Alginian sodu.....	18
1.2.3. Kolagen.....	19
1.2.4. Żelatyna	21
1.3. Kserożelowe i hydrożelowe materiały polimerowe	23
1.3.1. Kserożele	23
1.3.2. Hydrożele.....	25
1.4. Wykorzystanie biopolimerów w konstrukcji kserożelowych materiałów opatrunkowych.....	29
1.4.1. Rynek tradycyjnych materiałów opatrunkowych	29
1.4.2. Nowe możliwości w tworzeniu kserożelowych materiałów opatrunkowych	30
1.5. Wykorzystanie biopolimerów w formie hydrożeli do ochrony olejów jadalnych	34
1.5.1. Wprowadzenie	34
1.5.2. Przemiany zachodzące w tłuszczach	34
1.5.5. Nowe możliwości ochrony olejów jadalnych z wykorzystaniem hydrożeli	44
2. CEL PRACY	46
3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	48
3.1. Materiały.....	48
3.2. Aparatura	50
3.3. Postępowanie doświadczalne	52
3.3.1. Przygotowanie i charakterystyka preparatów białkowych	52
3.3.1.1. Izolacja kolagenu i żelatyny	52
3.3.1.2. Wydajność ekstrakcji kolagenu i żelatyny	55
3.3.1.3. Oznaczenie składu podstawowego surowca.....	55
3.3.1.4. Oznaczanie zawartości hydroksyproliny i wyznaczenie współczynników przeliczeniowych azotu na białko	55
3.3.1.5. Oznaczenie składu aminokwasowego preparatów białkowych.....	56
3.3.1.6. Analiza struktury chemicznej kolagenów.....	57
3.3.1.7. Elektroforeza SDS-PAGE	57
3.3.1.8. Oznaczanie temperatury denaturacji, skurczu i topnienia kolagenu	58
3.3.1.9. Oznaczanie twardości żeli żelatynowych	59
3.3.1.10. Oznaczanie temperatury topnienia żelatyny.....	59
3.3.1.11. Ocena zdolności żelowania żelatyny	60
3.3.2. Przygotowanie i charakterystyka chitozanowych materiałów kserożelowych.....	60
3.3.2.1. Modyfikacja chitozanu	60
3.3.2.2. Przygotowanie roztworu chitozanu niemodyfikowanego	61

3.3.2.3.	Otrzymywanie kompozytów chitozanowych	61
3.3.2.4.	Morfologia materiałów kserożelowych	62
3.3.2.5.	Porowatość kserożeli	62
3.3.2.6.	Opis struktury chemicznej	63
3.3.2.7.	Właściwości mechaniczne kserożeli	63
3.3.2.8.	Chłonność materiałów	63
3.3.2.9.	Rozpuszczalność materiałów w roztworze imitującym płyn fizjologiczny	64
3.3.3.	Oznaczanie właściwości przeciwutleniających kserożeli	64
3.3.4.	Oznaczanie zdolności kserożeli do sorpcji jonów metali	65
3.3.4.1.	Oznaczanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych kserożeli	66
3.3.4.2.	Oznaczanie cytotoksyczności kserożeli względem komórek L929	67
3.3.5.	Przygotowanie i charakterystyka chitozanowych materiałów hydrożelowych	68
3.3.5.1.	Przygotowanie roztworu płaszczka kapsułek	68
3.3.5.2.	Przygotowanie rdzenia olejowego	68
3.3.5.3.	Przygotowanie roztworów utwardzających	69
3.3.6.	Kapsułkowanie oleju	70
3.3.7.	Dobór optymalnych warunków przepływu mediów przez głowicę aparatury	71
3.3.7.1.	Wpływ prędkości przepływu roztworu płaszczka na zawartość oleju w kapsułkach i ich średnicę	71
3.3.7.2.	Wpływ prędkości przepływu gazu zrywającego krople na zawartość oleju w kapsułkach i ich średnicę	71
3.3.8.	Wyznaczanie średnicy kapsułek	72
3.3.9.	Wyznaczanie zawartości oleju w kapsułkach	72
3.3.10.	Wpływ wilgotności względnej na stopień zatrzymania oleju w kapsułkach	73
3.3.11.	Wpływ podstawowych zmiennych kapsułkowania na stabilność modelowych olejów jadalnych w teście krótkotrwałego przechowywania	74
3.3.12.	Ocena ochronnej roli płaszczka kapsułki na stabilność oksydacyjną olejów jadalnych podczas testów przyspieszonego starzenia	74
3.3.13.	Ocena dodatku przeciwutleniacza na ochronę olejów kapsułkowanych metodą współosiową w testach przyspieszonego starzenia	75
3.3.14.	Pomiar liczb charakterystycznych olejów	75
3.3.14.1.	Oznaczanie liczby nadtlenkowej	75
3.3.14.2.	Oznaczanie liczby anizydynowej	76
3.3.14.3.	Wyznaczanie wskaźnika oksydacji tłuszczu TOTOX	77
3.3.14.4.	Oznaczanie liczby kwasowej	77
3.3.15.	Analiza statystyczna wyników	78
4.	WYNIKI I DYSKUSJA WYNIKÓW	79
4.1.	Otrzymywanie i charakterystyka kserożeli chitozanowych	79
4.1.1.	Otrzymywanie i charakterystyka kolagenu i żelatyny	79
4.1.1.1.	Skład podstawowy skór rybich	79
4.1.1.2.	Genetyczny typ kolagenu	83
4.1.1.3.	Drugorzędowa struktura białek kolagenowych	84
4.1.1.4.	Stabilność termiczna białek kolagenowych	86

4.1.1.5. Twardość żelatyny	89
4.1.1.6. Temperatura topnienia żelatyny	91
4.1.1.7. Temperatura i czas żelowania żelatyny	91
4.1.2. Otrzymywanie i charakterystyka kompozytów chitozanowo-białkowych.....	93
4.1.2.1. Wpływ dodatku kolagenu i żelatyny ze skór rybich na właściwości kompozytów chitozanowo-białkowych	94
4.1.3. Wpływ dodatku fosforylowanej pochodnej chitozanu na właściwości kompozytów chitozanowych	99
4.1.3.1. Morfologia powierzchni kompozytów chitozanowych	100
4.1.3.2. Struktura chemiczna materiałów chitozanowych	103
4.1.3.3. Chłonność i rozpuszczalność materiałów chitozanowych w roztworze soli imitującym płyn fizjologiczny	105
4.1.3.4. Analiza tekstury kserożeli chitozanowych	107
4.1.3.5. Właściwości przeciwutleniające	110
4.1.3.6. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe	113
4.1.3.7. Właściwości cytotoksyczne	117
4.2. Hydrożele chitozanowe w technice kapsułkowania współosiowego	119
4.2.1. Ocena wpływu prędkości przepływu mediów na formowanie kapsułek.....	123
4.2.2. Wpływ wilgotności względnej otoczenia na stopień zatrzymania oleju w kapsułkach	127
4.2.3. Wpływ podstawowych zmiennych kapsułkowania na stabilność modelowych olejów jadalnych w krótkotrwałym przechowywaniu	128
4.2.3.1. Olej rzepakowy	128
4.2.3.2. Olej lniany	132
4.2.4. Ocena ochronnej roli płaszcza kapsułki na stabilność oksydacyjną olejów jadalnych podczas testów przyspieszonego starzenia.....	135
4.2.5. Ocena dodatku przeciwutleniacza na ochronę olejów poprzez kapsułkowanie metodą współosiową w testach przyspieszonego starzenia.....	140
5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	145
6. LITERATURA	150
7. SPIS TABELI I RYSUNKÓW.....	172
7.1. Tabele	172
7.2. Rysunki	174
8. DOROBEK NAUKOWY	176

INDEKS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABTS	kwask 2,2'-azyno-bis-(2- etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
ALA	kwask α -linolenowy
ATCC	amerykańska kolekcja typokulturowa
BHT	butylohydroksytoulen
CFU	jednostka tworząca kolonie
CHI	chitozan
DABA	p-dimetyloaminobeznaldehyd
DAG	diacyloglicerole
DD	stopień deacetylacji chitozanu
D-luc	D-lucyferyna świetlika
DMEM	podłoże hodowlane Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	dimetyosulfotlenek
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
DSC	skaningowa kalorymetria różnicowa
EAS	metoda kapsułkowania z wykorzystaniem pola elektrycznego
EC ₅₀	stężenie związku powodujące neutralizację 50% aktywności rodnika ABTS/DPPH (chelatowanie 50% jonów żelaza Fe ²⁺)
EDC	N, N-(3-dimetyloaminopropyl)-N-etylokarbodiimid
EDTA	kwask wersenowy
EGCG	gallusan epigallokatechiny
ESS	metoda rozpylania z zastosowaniem pola elektrycznego
FCS	plodowa surowica cielęca
FEG	działo elektronowe z emisją polową
FTIR	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
LA	kwask linolowy lub liczba anizydynowa
LK	liczba kwasowa
LOO	liczba nadtlenkowa
MAG	monoacyloglicerole
M _{cz}	masa cząsteczkowa
MMW	średnia masa cząsteczkowa
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu
NNKT	niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe
(¹ O ₂)	tlen singletowy
(³ O ₂)	tlen trypletowy
OD	gęstość optyczna
OG	galusan oktylu
P-AAC	współczynnik przelicznikowy azotu na białko wyznaczony na podstawie różnicy w zawartości hydroksyproliny w surowcu, oznaczonej metodą HPLC i wyizolowanym białku, na podstawie jego profilu aminokwasowego

PBS	roztwór buforu fosforanowego
PCL	polikaprolakton
P-Dia	współczynnik przeliczeniowy azotu na białko obliczony na podstawie zawartości azotu mierzonej w surowcu oraz gotowym, oczyszczonym preparacie białkowym
PG	galusan propylu
PITC	izotiocyanian fenylu
PLA	polilaktyd
PTC	pochodna fenylotiokarbamidowa aminokwasów
scCO ₂	ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym
SDS	siarczan dodecyłu sodu
SDS-PAGE	elektroforeza w warunkach denaturujących
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa
T3P	bezwodnik kwasu n-propylofosfonowego
TEA	trietanoloamina
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
TOTOX	wskaźnik oksydacji tłuszczu
Tris	2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol
TSA	pożywka Tryptic Soy Agar
TSB	bulion kazeinowo-sojowy
UE	Unia Europejska
WKT	wolne kwasy tłuszczowe

STRESZCZENIE

Materiały polimerowe powszechnie wykorzystuje się praktycznie we wszystkich dziedzinach życia. Aspekt ekologiczny związany z utylizacją produktów wytwarzanych na bazie polimerów syntetycznych wywołał bardzo duże zainteresowanie możliwościami zastąpienia ich analogami pochodzenia naturalnego, które uważane są za niemal niewyczerpywalne źródło trwałych materiałów na świecie. Źródłem chitozanu, jednego z czołowych biopolimerów będących obecnie przedmiotem badań naukowych, są m.in. produkty uboczne przetwórstwa morskiego. Stąd ich racjonalne zagospodarowanie jest w pełni uzasadnione.

W pracy przedstawiono nowatorskie rozwiązania dotyczące potencjału aplikacyjnego biopolimerów ze szczególnym uwzględnieniem chitozanu, ukierunkowane na przemysł spożywczy i biomedyczny.

Uzyskane wyniki badań potwierdzają, że chitozan jest odpowiednim surowcem, który z powodzeniem można wykorzystać w projektowaniu i tworzeniu kserożelowych matryc o strukturze i właściwościach wymaganych dla nowoczesnych materiałów opatrunkowych. Co więcej, właściwości użytkowe tworzonych na jego bazie kserożeli, takie jak np. rozpuszczalność, chłonność, parametry tekstury czy właściwości przeciwutleniające lub właściwości przeciwdrobnoustrojowe można modyfikować tworząc kompozyty chitozanu nie tylko z białkami: kolagenem lub żelatyną izolowaną z rybich skór, ale przede wszystkim z fosforylowaną pochodną polimeru, otrzymaną w wyniku jego modyfikacji chemicznej. Pochodna ta znacznie poprawia właściwości funkcjonalne materiałów chitozanowych.

W pracy oceniono także potencjał aplikacyjny chitozanowego hydrożelu, bazujący na zdolności przekształcania polimeru w formę mikrokrystaliczną. Wyniki badań potwierdzają hipotezę, według której chitozanowy hydrożel, w postaci płaszcza kapsułki tworzonej nowatorską metodą kapsułkowania współosiowego, może wykazywać funkcje ochronne w stosunku do składników żywności na przykładzie olejów jadalnych. Przyspieszone testy starzenia potwierdziły, że przechowywanie oleju lnianego i rzepakowego w hydrożelowej otoczce wykonanej z chitozanu powoduje spowolnienie procesów autooksydacyjnych prowadzących do ich jełczenia. Funkcja ochronna związana z przechowywaniem olejów w formie zakapsułkowanej wynika z działania barierowego hydrożelowej formy polimeru, która skutecznie ogranicza dostęp tlenu do oleju. Wzmożoną

funkcję ochronną płaszcza chitozanowego w stosunku do oleju lnianego, w porównaniu z olejem rzepakowym, przypisano właściwościom przeciwutleniającym komponentów kapsułki: chitozanowi oraz olejowi lnianemu. Dowiedziono również, że zastosowanie dodatku przeciwutleniacza do oleju lnianego, przechowywanego w formie kapsułek chitozanowych może wywołać negatywny efekt proutleniający.

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1. Wprowadzenie

W dzisiejszych czasach materiały polimerowe powszechnie wykorzystuje się praktycznie we wszystkich dziedzinach życia. Większość tych zastosowań w dalszym ciągu związana jest z wykorzystaniem tworzyw sztucznych, stanowiących grupę materiałów otrzymywanych w wyniku łączenia polimerów syntetycznych ze związkami pomocniczymi, takimi jak: wypełniacze, stabilizatory, plastyfikatory, barwniki czy środki zmniejszające palność (Thakur i Thakur, 2016).

Polimery syntetyczne produkowane są głównie z monomerów pochodzących z ropy naftowej i procesów opartych na przetwórstwie gazu ziemnego. Według opublikowanych prognoz w połowie XXI wieku zaczną brakować tego rodzaju surowców, a ich ceny zaczną znacznie wzrastać (Bartosik i in., 2016). Do zalet polimerów syntetycznych należą m.in. wysoka wytrzymałość mechaniczna w stosunku do jednostkowej masy czy odporność na czynniki środowiskowe. Natomiast do wad zalicza się problemy związane z procesami wtórnego ich wykorzystania i utylizacji odpadów zalegających na wysypiskach śmieci. Z punktu widzenia ciężaru właściwego, tworzywa sztuczne stanowią około 8% masy wszystkich odpadów, jednak pod względem objętości wartość ta osiąga aż 30%. Do wad materiałów otrzymywanych z tworzyw sztucznych zaliczyć należy także bardzo długi czas ich rozkładu (Mroziński, 2009; Kijeński i in., 2011).

Aspekt ekologiczny wywołał bardzo duże zainteresowanie możliwościami zastąpienia syntetycznych polimerów ich analogami pochodzenia naturalnego, które uważane są za niemal niewyczerpywalne źródło trwałych materiałów na świecie. Zazwyczaj są to białka, takie jak: żelatyna, kolagen, kazeina lub polisacharydy, takie jak: celuloza, skrobia, chityna, chitozan, pektyny. Biodegradowalnym i biozgodnym polimerem, tworzonym jednak drogą polimeryzacji lub polikondensacji, jest też polilaktyd - PLA (Thakur i Thakur, 2016). Już dzisiaj w wielu gałęziach przemysłu obserwuje się tendencję do wypierania polimerów syntetycznych naturalnymi, w różnych rozwiązaniach i produktach. Co więcej, niektóre z zastosowań bazują wyłącznie na wykorzystaniu polimerów naturalnych, np. biozgodne implanty w inżynierii tkankowej czy jadalne osłonki w przetwórstwie mięsa. Biopolimery stają się konkurencyjne nie tylko ze względu na biodegradowalność, biozgodność, bioaktywność, ale także pod względem kosztów i wydajności ich produkcji oraz

poprawy ekonomicznego aspektu związanego z ułatwioną ich utylizacją (Mroziński, 2009). Niestety, możliwość wykorzystania biopolimerów często niesie ze sobą barierę technologiczną w postaci np. wolno zachodzących reakcji sieciowania podczas formowania produktów, dużej podatności na degradację podczas obróbki, niskiej trwałości mechanicznej wytworzonych na ich bazie produktów. Dlatego, aby możliwe było wypieranie rozwiązań opartych na wykorzystaniu wyłącznie polimerów syntetycznych, konieczne jest ciągle prowadzenie badań nad możliwościami aplikacyjnymi, które oferują biopolimery oraz ich modyfikowane pochodne.

Badania nad wykorzystaniem polimerów coraz częściej dotyczą nie tylko charakterystyki tworzonych z nich materiałów, ale przede wszystkim możliwości nadawania im konkretnych funkcji zmieniających się w zależności od bodźca zewnętrznego. Tak otrzymane struktury mogą być wykorzystywane jako nanomechanizmy, sensory, warstwy półprzewodzące, selektywne membrany czy katalizatory membranowe (Kotowski, 2008).

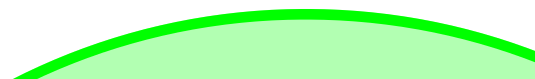
W pracy przedstawiono nowatorskie rozwiązania dotyczące potencjału aplikacyjnego biopolimerów ze szczególnym uwzględnieniem chitozanu, ukierunkowane na przemysł spożywczy i biomedyczny. W realizacji badań wykorzystano także preparaty białkowe uzyskane z produktów ubocznych przetwórstwa surowców pochodzenia morskiego, których funkcjonalny potencjał potwierdzono już w literaturze (Sadowska, 1992; Sadowska i in., 2003; Kołodziejska i in., 2004; Sadowska i Kołodziejska, 2005; Skierka i Sadowska, 2007; Kołodziejska i in., 2008; Żelechowska i in., 2010; Gorczyca i Tylingo, 2011; Staroszczyk i in., 2012; Mania, 2013, Gorczyca i in. 2014; Staroszczyk i in., 2014; Mania i Tylingo, 2016; Tylingo i in., 2016). Stanowi to dodatkowy atut wskazujący na możliwość zagospodarowania rybich skór, częściowo wykorzystywanych w produkcji pasz, a w nadwyżce stanowiących uciążliwe odpady na wysypiskach śmieci.

Kolagen i żelatyna izolowane ze skór rybich charakteryzują się odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi w stosunku do ich odpowiedników pozyskiwanych ze skór wołowych i wieprzowych. Wykorzystanie białek izolowanych z rybich skór, a także oddziaływania wynikające z ładunku biopolimerów były podstawą do charakterystyki tworzonych z nich kompozytów kolagenowo-chitozanowych i żelatynowo-chitozanowych, jako potencjalnych kserożelowych materiałów biomedycznych. Otrzymane wyniki badań stanowiły podłoże do dalszych prac

związanych ze stworzeniem chitozanowego homokompozytu o programowalnej rozpuszczalności. Uzyskanie takiej cechy materiału możliwe było dzięki opracowaniu modyfikowanej pochodnej chitozanu z wykorzystaniem bezwodnika kwasu N-propylofosfonowego, stosowanego do tej pory wyłącznie w syntezie organicznej jako odczynnik sprzęgający.

Druga z koncepcji rozprawy przedstawia możliwość wykorzystania chitozanu w formie hydrożelowej do zastosowań m.in. w przemyśle spożywczym, w ochronie olejów jadalnych. Ze względu na żywieniową rolę olejów oraz inne cechy, takie jak: właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe czy przeciwbakteryjne, właśnie te składniki żywności ostatnimi czasy stały się szczególnym obiektem naukowych zainteresowań (Jeena i in., 2014; Szabo i in., 2014).

Inną niekorzystną cechą opisującą oleje jadalne jest ich podatność na pogarszanie jakości w wyniku reakcji katalizowanych działaniem ciepła, promieniowania ultrafioletowego czy obecnością tlenu z powietrza (Choe i Min, 2006). W przemyśle spożywczym przemiany te są szczególnie istotne. Niektóre oleje stanowią bogate źródło niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), które są jednak nietrwałe i łatwo tracą swoje funkcjonalne właściwości odżywcze. Odnosi się to nie tylko do NNKT obecnych w diecie jako składnik pokarmowy, ale przede wszystkim suplementów zawierających olej. Popularną grupą technik stosowanych w ochronie, dostarczaniu lub maskowaniu związków aktywnych są obecnie metody kapsułkowania, które polegają na fizycznym zamykaniu związków najczęściej w polimerowych nośnikach (Rys. 1) (Poshadri i Kuna, 2010).



Rys. 1. Rodzaje struktur możliwych do uzyskania za pomocą dostępnych metod kapsułkowania
Mikrokapsułka: A - z wyodrębnionym rdzeniem i ścianą, B - z nieregularnym kształtem rdzenia, C - wielordzeniowa, D - z wielowarstwową ścianą (płaszczem), E - mikrosfera (Mania, 2013).

Metody powszechnie stosowane do kapsułkowania to: emulsyfikacja, suszenie rozpyłowe, ekstruzja, koacerwacja, powlekanie złożem fluidalnym lub metody współosiowe (Bakry i in., 2016). Większość z nich obejmuje etapy tworzenia emulsji oleju z nośnikiem oraz odparowanie rozpuszczalnika matrycy w wysokiej temperaturze,

inicjując lub przyspieszając reakcje utleniania. Czynnikiem temperaturowym przyspieszającym procesy utleniania tłuszczów jest obecny także w technologii produkcji szeroko dostępnych twardych i miękkich kapsuł żelatynowo-glicerynowych, w których masa żelatynowa zawierająca plastyfikator, w trakcie procesu kapsułkowania ogrzewana jest nawet do 80°C (Coppola i in., 2008; Głowacz, 2014).

W ostatnich latach w dostępnej literaturze pojawiły się artykuły proponujące wykorzystanie do ochrony olejów także techniki współosiowej, w których bardzo często dąży się do jak największej miniaturyzacji formowanych kapsułek, głównie w skali mikro, np. w wyniku zastosowania pola elektrycznego - EAS (ang. *Electrostatically Assisted Spring*) (Bakry i in., 2016). Do tej pory nie scharakteryzowano jednak metody pozwalającej na formowanie stabilnych struktur typu kropla w kropli na bazie samego chitozanu, wykorzystując jego zdolność do przechodzenia w formę mikrokrystaliczną. Co więcej, nie sprecyzowano także czy taka forma polimeru jest w stanie wywierać ochronny wpływ w stosunku do olejów jadalnych.

Badania naukowców i technologów żywności coraz częściej prowadzą do wytworzenia nowych produktów spożywczych, które do tej pory nie były uznawane za żywność. Tego typu żywność przed wprowadzeniem na rynek powinna także spełnić wymagania bezpiecznej żywności. Rozporządzenie (UE) nr 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 stanowi między innymi, że nowa żywność (niestosowana na szeroką skalę przed wejściem w życie rozporządzenia), zanim zostanie wprowadzona do obrotu w Unii Europejskiej, musi podlegać kontroli oceniającej jej bezpieczeństwo.

Chitozan na terenie UE w dalszym ciągu nie jest dopuszczony jako dodatek do żywności lub do bezpośredniego kontaktu z żywnością. Jedynie w niektórych krajach spoza UE jak np. Japonia i Korea chitozan jest zatwierdzony na liście naturalnych dodatków do żywności (Japan Food Chemical Research Foundation, 2011; KFDA, 2011). Polimer ten często występuje jako składnik suplementów diety. Te jednak podlegają innym regulacjom prawnym, na mocy tzw. oświadczeń zdrowotnych, których wykaz dotyczący żywności przedstawia Rozporządzenie Komisji (UE) NR432/2012 z dnia 16 maja 2012 roku. W oświadczeniu zdrowotnym chitozanu, polimerowi temu przypisuje się utrzymanie prawidłowego poziomu cholesterolu we krwi. Oświadczenie może być stosowane wyłącznie w odniesieniu

do żywności zapewniającej spożycie 3 g chitozanu dziennie, o czym konsument musi zostać poinformowany.

1.2. Biopolimery o wysokim potencjalnie naukowym i technologicznym

1.2.1. Chityna i chitozan

Chityna jest drugim po celulozie, najbardziej rozpowszechnionym polisacharydem w przyrodzie. Z chemicznego punktu widzenia jest ona homopolimerem β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy lub kopolimerem β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy i β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozy, o zawartości drugiej podjednostki poniżej 50% (Rinaudo, 2006). Chociaż chityna nie występuje w organizmach produkujących celulozę, to klasyfikuje się ją jako jej pochodną, w której grupa hydroksylowa jest zastąpiona ugrupowaniem acetamidowym -NHCOCH₃ (Rys. 2). Chityna występuje w ciele wielu bezkręgowców, takich jak skorupiaki, mięczaki, owady, będąc głównym składnikiem ich egzoszkieletu. Jej zawartość w pancerzach bezkręgowców zależy m.in. od gatunku zwierzęcia, miejsc jego bytowania oraz od tego, z jakiej części anatomicznej pochodzi pancerz. Innym źródłem chityny są grzyby, w których polimer ten stanowi główny składnik ścian komórkowych, gdzie w połączeniu z glukanem i mannanem tworzy mikrofibryle nadające komórce odpowiednią wytrzymałość i elastyczność (Shahidi i Synowiecki, 1991).



Rys. 2. Porównanie budowy celulozy, chityny i chitozanu (Rinaudo, 2006).

Każdego roku w przemyśle przetwarza się 10 miliardów ton chityny pochodzącej z mięczaków, skorupiaków, owadów, grzybów i pokrewnych organizmów. Chityna jest produktem ubocznym charakteryzującym się biodostępnością, biokompatybilnością, biodegradowalnością, biofunkcjonalnością, a przy tym będącym przyjaznym dla środowiska (Zargar i in., 2015). Wykorzystanie powyższych zalet polimeru w tworzeniu funkcjonalnych materiałów jest utrudnione ze względu na jego małą rozpuszczalność.

Chityna jest nierozpuszczalna w powszechnie wykorzystywanych rozpuszczalnikach organicznych, rozcieńczonych roztworach kwasów i zasad, a także w zimnych stężonych zasadach. Rozpuszcza się natomiast w bezwodnym kwasie mrówkowym i stężonych kwasach mineralnych (Ravi Kumar, 2000). Powodem niskiej podatności chityny na działanie rozpuszczalników jest występowanie licznych wiązań wodorowych w jej strukturze, łączących łańcuchy polimeru.

Łańcuchy chityny tworzą wysoce uporządkowane struktury krystaliczne, przejawiające się w trzech formach polimorficznych: α , β i γ . Formy te różnią się ułożeniem łańcuchów polisacharydu. W α -chitynie są ułożone antyrównolegle, w β -chitynie równolegle, natomiast w formie γ dwa z trzech łańcuchów są równoległe, a trzeci antyrównoległy. Równoległe ułożenie w formie β powoduje ich luźniejsze upakowanie niż w formie α , w której oprócz wiązań pomiędzy łańcuchami ułożonymi w tej samej płaszczyźnie występują także wiązania „międzyplaszczynowe”. Dlatego też β -chityna wykazuje większą podatność w stosunku do lizozymu niż jej forma α (Struszczyk, 2002). Molekularny układ chityny zależy od jej fizjologicznej roli i rodzaju tkanki, w której występuje. Dla przykładu, chitynowe kolce szczecioszczękich (łac. *Sagitta*) zbudowane są wyłącznie z formy polimorficznej α , aby zapewnić im odpowiednią sztywność do chwytania pokarmu (Rinaudo, 2008).

Chitozan otrzymuje się przez traktowanie oczyszczonej chityny roztworami wodorotlenku sodu lub potasu o stężeniu 40-50% (w/v), w temperaturze 100°C lub wyższej. Właściwości fizykochemiczne otrzymanego chitozanu zależą m.in. od stężenia roztworu wodorotlenku i jego stosunku względem surowca, czasu i temperatury procesu, pochodzenia surowca, a nawet atmosfery, w której prowadzona jest reakcja (Struszczyk, 2002).

Chitozan, będący przedmiotem odkrycia Rougeta z 1859 r., jest heteropolisacharydem składającym się dwóch rodzajów podjednostek

monosacharydowych (Rouget, 1859). Podobnie jak w przypadku chityny są to monomery β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy i β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozy, jednak udział drugiego z nich, w odróżnieniu od chityny, stanowi $\geq 50\%$. Parametrem ilościowo opisującym udział poszczególnych grup w obu polimerach jest stopień deacetylacji (DD). Definiowany jest on jako stosunek liczby grup glukozaminowych do całkowitej liczby grup N-acetyloglukozaminowych i glukozaminowych. Dla komercyjnych preparatów chitozanu wartość DD mieści się przedziale 65 ÷ 95% (Muzzarelli, 2009).

Deacetylacja chityny prowadzi do zmian w rozpuszczalności polimeru. Chitozan, podobnie jak chityna, jest nierozpuszczalny w wodzie, roztworach zasadowych oraz typowych rozpuszczalnikach organicznych. Możliwe staje się jednak rozpuszczenie polimeru w wodnych roztworach kwasów takich jak: kwas octowy, cytrynowy, mrówkowy, solny, mlekowy, spośród których roztwory kwasu octowego są najczęściej wykorzystywane. W celu rozpuszczenia chitozanu niezbędne jest obniżenie pH roztworu poniżej wartości 6,2 (Leffler i in., 2000). Obecność wielu wolnych grup aminowych oraz kwaśnego środowiska zapewnia chitozanowi unikatowy wśród biopolimerów, polikationowy charakter.

Czynnikami decydującymi o jakości i właściwościach użytkowych chitozanu są masa cząsteczkowa, struktura polimorficzna, lepkość jego roztworów i czystość polimeru (Piątkowski i in., 2010).

Chitozan, podobnie jak wiele innych polimerów naturalnych, ma właściwości polidispersyjne. Oznacza to, że charakteryzuje się niejednorodnym rozkładem mas cząsteczkowych (M_{cz}), będącym rezultatem depolimeryzacji zachodzącej na etapie deacetylacji chityny. W jej konsekwencji otrzymany chitozan jest mieszaniną cząsteczek biopolimeru o różnych rozmiarach. Otrzymanie preparatów o ściśle sprecyzowanej masie cząsteczkowej byłoby z jednej strony trudne do osiągnięcia, z drugiej nieopłacalne. Stąd dystrybucja preparatów pod względem mas cząsteczkowych, które mieszczą się w zakresie 10 ÷ 1000 kDa ogranicza się do chitozanów o masie małej, średniej i dużej (Muzzarelli, 2009). Większość metod służących do wyznaczania średniej masy cząsteczkowej opiera się na technikach separacji o wysokiej wydajności, takich jak chromatografia wykluczania. Do wyznaczania tej wielkości w roztworze najmniej skomplikowaną i najszybszą metodą jest pomiar wiskozymetryczny (Rinaudo, 2006). Oznaczana w ten sposób

wiskozymetryczna średnia masa cząsteczkowa (\bar{M}_v) opisana jest równaniem Marka-Houwink'a:

$$[\eta] = k (\bar{M}_v)^\alpha \quad (1)$$

gdzie:

$[\eta]$ - dynamiczna lepkość roztworu (mPas),

(\bar{M}_v) - wiskozymetryczna średnia masa cząsteczkowa (Da),

k i α - stałe, zależne od stopnia deacetylacji chitozanu, natomiast niezależne od masy molekularnej polimeru w szerokim zakresie mas cząsteczkowych.

Dobierając parametry oznaczenia masy cząsteczkowej chitozanu, należy uwzględnić właściwości własne polimeru oraz czynniki eksperymentalne. Czynniki eksperymentalnymi, które mają znaczący wpływ na oznaczenie, są pH i siła jonowa badanego roztworu. Cechy rozpuszczalnika wpływają na jego interakcję z rozcieńczonym biopolimerem, decydując o jego konformacji i hydrodynamicznych właściwościach (Masuelli, 2014). W rozcieńczonych roztworach kwasów makrocząsteczki chitozanu o różnych wartościach DD mogą występować w postaci zwartych sfer, dla których wykładnik α równania Marka-Houwink'a równy jest zeru. Gdy α mieści się w zakresie $0,5 \div 0,8$, makrocząsteczki chitozanu przyjmują formę przypadkowych zwojów, a przy α 1,8 makrocząsteczki polimeru tworzą pręty. Dowiedziono, że chitozany o masie cząsteczkowej mniejszej od 220 kDa tworzą konformację przypadkowych zwojów ($\alpha > 0,65$), a te o masie cząsteczkowej większej od 220 kDa przybierają kształt bardziej zwarty ($\alpha < 0,6$). Zjawisko to przypisuje się faktowi, że wysokocząsteczkowy polimer posiada więcej wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych lub bardziej równomierny rozkład ładunku w porównaniu z polimerem niskocząsteczkowym (Piątkowski i in., 2010). W związku z tym w roztworach o niskiej sile jonowej struktura makrocząsteczek chitozanu jest rozciągnięta ze względu na elektrostatyczne odpychanie pomiędzy segmentami łańcucha. Zwiększenie siły jonowej powoduje, że jony soli neutralizują sprotonowane grupy biopolimeru. Siły elektrostatycznego odpychania zanikają, wskutek czego struktura chitozanu staje się zwartą sferą, bez względu na różnice w masie cząsteczkowej. Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe chitozanu mogą zostać zniszczone np. przez dodatek mocznika. Struktura polimeru staje się wtedy bardziej rozciągnięta niezależnie od jego masy cząsteczkowej (Struszczyk, 2002).

Przestrzenne ułożenie łańcuchów polisacharydu zależy także od temperatury roztworu, której wzrost powoduje obniżenie lepkości układu. Dane dostępne w literaturze naukowej potwierdzają, że właściwości reologiczne roztworów chitozanu silnie zależą również od stężenia polimeru w roztworze i jego stopnia deacetylacji (Hwang i Shin, 2000).

Niewielki wpływ na reologię roztworów chitozanu ma wartość pH. Roztwory te można zatem zaklasyfikować do płynów nienewtonowskich rozrzedzanych ścinaniem. Cechy zbliżone do płynów Newtona spełniają jedynie roztwory o niskich stężeniach i wysokim stopniu deacetylacji polimeru (Zargar i in., 2015).

1.2.2. Alginian sodu

Alginian sodu jest solą kwasu alginowego naturalnie występującego jako składnik ścian komórkowych morskich, brązowych glonów (łac. *Phaeophyceae*), a także w śluzach niektórych gatunków bakterii. Częsteczka alginianu jest liniowym kopolimerem, zbudowanym z dwóch typów monomerów: kwasu α -L-guluronowego (G) i β -D-mannuronowego (M) (Boguń, 2010). Częsteczki monomerów są epimerami i mają odwrotne ułożenie przestrzenne w położeniu węgla C5. Umożliwia to tworzenie wiązań 1,4-glikozydowych, usytuowanych w przestrzeni w czterech możliwych pozycjach (Rys. 3).



Rys. 3. Fragment łańcucha cząsteczki alginianu (Dembczyński i Jankowski, 2004).

Badania prowadzone za pomocą rezonansu magnetycznego, mikroskopii sił atomowych oraz metodami chemicznymi wykazały, że monomery w alginianie ułożone są blokowo. Bloki M i G mogą występować w różnych rozmieszczeniach wzdłuż łańcucha. Możliwe są rozmieszczenia MMMM, GGGG oraz GMGM (Dembczyński i Jankowski, 2004). Zawartość poszczególnych monomerów w cząsteczce i długość poszczególnych bloków

zależy od rodzaju glonów i tkanek, z których ekstrahowany jest polimer.

Geometria dwóch umieszczonych sąsiednie bloków G pozwala na wytworzenie pomiędzy nimi pustej przestrzeni, wielkością odpowiadającej kationom wapnia. Stąd wzajemne oddziaływanie alginianów z dwuwartościowymi kationami, szczególnie z Ca^{2+} , prowadzi do tworzenia żeli. Wyróżniająca się struktura molekularna wynikająca z tych oddziaływań, określona jest jako model „jajka w wytłaczance” (ang. *egg-box*, Rys. 4) (Pielesz, 2009).

Rys. 4. Schemat tworzenia się struktury typu egg-box (Boguń, 2010).

Udział poszczególnych bloków i ich rozmieszczenie w alginianach determinuje właściwości reologiczne tworzonych z nich żeli. Żele sztywne, kruche i ulegające synerezie powstają z alginianu o dużej zawartości bloków G, natomiast alginiany o dużej zawartości bloków M pozwalają na uzyskanie żeli słabych, elastycznych, podatnych na deformację, ale zatrzymujących wodę (Neau i in., 1993). Podobnie jak w przypadku innych polisacharydów różnice we właściwościach alginianów uzależnione są również od ich masy cząsteczkowej i polidispersyjności (Boguń, 2010).

1.2.3. Kolagen

Kolagen znany jest jako włókniste białko, nierozpuszczalne w wodzie, będące jednym z głównych składników tkanek kręgowców i bezkręgowców, w tym m.in. skór, ścięgien, chrząstek, kości i błon łącznotkankowych (Sadowska, 1992; Pamfil i in.,

2015). Kolagen to strukturalne białko zewnątrzkomórkowe, stanowiące niemal 1/3 całkowitej masy białka w organizmie ludzkim. Będąc najważniejszym elementem macierzy zewnątrzkomórkowej, jest dla skóry kluczowym składnikiem, odpowiadającym za jej elastyczność i wytrzymałość (Żelaszczyk i in., 2012).

Do 2017 roku zidentyfikowano 29 typów tego białka, zbudowanych z co najmniej 46 różnych łańcuchów polipeptydowych (Krishnamoorthi i in., 2017). Wspólną cechą wszystkich kolagenów jest ich struktura, będąca potrójną prawoskrętną helisą, utworzoną przez trzy lewoskrętne łańcuchy polipeptydowe. Łańcuchy w potrójnej helisie mogą być identyczne i tworzyć homotrimery, jak np. w kolagenie typu III, lub mogą się różnić tworząc heterotrimery, jak np. w kolagenie typu VI. Zawartość helikalnej formy kolagenu w poszczególnych typach białka waha się od 96% w kolagenie typu I do poniżej 10% w kolagenie typu XII (Shoulders i Raines, 2009).

Pod względem pierwszorzędowej struktury, kolagen zbudowany jest wyłącznie z aminokwasów endogennych, które ułożone są blokowo w postaci powtarzających się sekwencji -Gly-X-Y-, w których X to zwykle prolina, a Y to 4-hydroksyprolina. Skład aminokwasowy wyróżnia kolagen spośród innych białek bardzo dużą zawartością glicyny, proliny i alaniny, a także obecnością 3- i 4-hydroksyproliny i hydroksylizyny. Udział pierwszych czterech z wymienionych reszt stanowi 60% ogólnej ilości aminokwasów tego białka (Sadowska, 1992). Obecność glicyny na co trzecim miejscu polipeptydowego łańcucha, dużej zawartości proliny i jej hydroksylowanej pochodnej tworzących wiązania wodorowe, jest niezbędna do utrzymania prawidłowej konformacji białka. Udział w stabilizacji helisy kolagenu biorą także oddziaływania elektrostatyczne między lizyną a kwasem asparaginowym. Inne aminokwasy, takie jak leucyna, fenyloalanina, zajmują wyłącznie miejsce X, zaś kwas glutaminowy i arginina występują w położeniu Y (Fallas i in., 2009).

Kolagen przybierając dojrzałą i usieciowaną postać tworzy włókna i staje się nierozpuszczalny w wodzie, roztworach buforowych oraz rozcieńczonych, zimnych roztworach kwasów. Rozpuszczenie kolagenu staje się możliwe jedynie w momencie rozdrobienia tkanki oraz po wstępnej obróbce enzymatycznej lub chemicznej, które powodują zniszczenie wiązań sieciujących w białku (Sadowska i Kołodziejska, 2005). Wyizolowane preparaty kolagenowe o zachowanej natywnej formie białka również nie rozpuszczają się w wodzie. Zastosowanie roztworów rozcieńczonych kwasów do

ekstrakcji kolagenu pozwala jednak na rozpuszczenie białka i tworzenie jego roztworów o kilkuprocentowym stężeniu. Rozpuszczalność kolagenu zależy w dużej mierze od jego pochodzenia oraz rodzaju tkanki wykorzystanej do izolacji. Efektywność rozpuszczania, podobnie jak w przypadku białek mięśniowych, zależy od stosunku rozpuszczalnika do surowca, pH środowiska, pochodzenia surowca, czasu ekstrakcji czy też rodzaju kwasu (Sikorski, 1994; Shoulders i Raines, 2009).

Kolagen, podobnie jak wszystkie białka, podczas ogrzewania ulega denaturacji. Proces ten zachodzi dwustopniowo. W pierwszym etapie następuje rozerwanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych, prowadzące do zniszczenia uporządkowanej struktury potrójnej helisy oraz dysocjacja na pojedyncze łańcuchy polipeptydowe (α), dimery (β) i trimery (γ). Drugi etap polega na rozpleceniu helikalnych form odseparowanych łańcuchów peptydowych do kłęбка statystycznego. Podczas denaturacji kolagenu zwykle powstaje mieszanina wszystkich wymienionych form peptydowych. Ich zawartość w mieszaninie zależy od pochodzenia kolagenu, czyli udziału poszczególnych typów genetycznych w tkance poddawanej ekstrakcji. Pierwszy etap denaturacji jest procesem w pełni odwracalnym, gdyż przez renaturację udaje się odtworzyć prawie w całości cząsteczki tropokolagenu. Z chwilą osiągnięcia drugiego etapu denaturacji, renaturacja osiąga niewielki poziom (Heino, 2007).

1.2.4. Żelatyna

Żelatyna nie występuje w przyrodzie, ale jest uzyskiwana na drodze przemian kolagenu, najczęściej przez jego termiczną denaturację.

Żelatyna jest biopolimerem pochodzenia zwierzęcego, tworzonym przez heterogeniczną mieszaninę łańcuchów polipeptydowych o masie cząsteczkowej w zakresie 80 ÷ 250 kDa (Karim i Bhat, 2009). Dostępna handlowo żelatyna jest wytwarzana przy użyciu metody kwasowej lub zasadowej (Thakur i in., 2011). W zależności od rodzaju zastosowanego surowca i sposobu produkcji, wyróżnia się żelatynę spożywczą, farmaceutyczną i fotograficzną. Żelatyna spożywcza (jadalna) wytwarzana jest głównie metodą kwaśną - żelatyna typu A, podczas gdy do celów farmaceutycznych znacznie droższą metodą alkaliczną - żelatyna typu B. Żelatyna typu A otrzymywana jest metodą kwaśną częściowego rozkładu kolagenu, natomiast żelatyna typu B metodą alkaliczną. W zależności od zastosowanej metody

otrzymywania gotowy produkt charakteryzuje się odmiennymi właściwościami (Tab. 1).

W przypadku tkanki kolagenowej złożonej w większości z wiązań ketoiminowych, wydajność ekstrahowanej żelatyny maleje, a uzyskane białko zawiera składniki o różnych ciężarach cząsteczkowych, w konsekwencji tworząc żele o wysokim stopniu polidispersyjności (Wybór i Zaborski, 2000). Surowcami do produkcji żelatyny są głównie osseina oraz skóry i kości świń i bydła. W metodzie alkalicznej surowiec poddaje się działaniu ługu sodowego bądź nasyconego mleka wapiennego przez okres od 14 do 60 dni. Etap ten, dla którego wartość pH wynosi 12,5, pozwala na rozluźnienie usieciowanej struktury kolagenu, szczególnie w przypadku skór pochodzących ze starego bydła. Proteiny niekolagenowe ulegają rozpuszczeniu, a tłuszcz resztkowy zmydleniu. Następnie surowiec przemywa się wodą w celu zobojętnienia. W kolejnym etapie surowiec zakwasza się i ponownie przemywa wodą w celu wypłukania powstałych soli i rozpuszczonych zanieczyszczeń. Kolejnym etapem procesu jest ekstrakcja wodą (Kowalski i in., 2011).

Tab. 1. Porównanie niektórych właściwości żelatyn typu A i B (Rutkowski, 1999).

Cecha	Żelatyna typu A	Żelatyna typu B
Źródło kolagenu użytego do produkcji	skóra świńska	kości lub skóra bydła
Metoda wytwarzania	kwasowa	zasadowa
Punkt izoelektryczny	8,0 ÷ 9,0	4,8 ÷ 5,4
Zdolności pianotwórcze	dobrze	niewielkie
Lepkość	niska	wysoka
Twardość w skali Blooma	190 ÷ 220	150 ÷ 175
Siła żelowania	większa	mniejsza
Klarowność roztworu	większa	mniejsza
Stabilność w środowisku	kwasowym	zasadowym

Metodę kwaśną wykorzystuje się głównie do obróbki skór świń, a także osseiny, ze względu na mniejszy stopień usieciowania kolagenu. W przypadku metody kwaśnej stosuje się jednodniowe, wstępne moczenie surowca w roztworze kwasu siarkowego(VI) w celu uzyskania odpowiedniej ekstraktywności kolagenu. Następnie kwas zobojętnia się, a powstałe sole wymywa w trakcie płukania surowca wodą, po którym poddaje się go właściwej ekstrakcji wodnej w podwyższonej temperaturze (Kowalski i in., 2011). Proces powstawania żelu jest rozumiany jako próba powrotu

pojedynczych łańcuchów polipeptydowych żelatyny do postaci natywnego kolagenu. Moc żelu wzrasta wykładniczo wraz ze zwiększeniem stężenia roztworu oraz z obniżeniem temperatury. Żelatyna w zimnej wodzie pęcznieje, a po podgrzaniu do temperatury powyżej 40°C ulega rozpuszczeniu. W przeciwieństwie do alginianów lub pektyn, żelatyna nie wymaga obecności aktywatorów do tworzenia żelu. Tworzy się on bezpośrednio po ochłodzeniu roztworu tego białka (Waszkiewicz-Robak i Świdorski, 2001).

Preparaty na bazie żelatyny wykazują umiarkowane właściwości mechaniczne (Krochta i De Mulder-Johnston, 1997). Zastosowanie reakcji sieciowania powoduje zmiany strukturalne, prowadzące do stabilizacji mechanicznej i termicznej żeli (Thakur i in., 2011).

1.3. Kserożelowe i hydrożelowe materiały polimerowe

1.3.1. Kserożele

Ze względu na formę końcową, aplikacyjne produkty na bazie biopolimerów zaklasyfikować można do dwóch głównych grup, materiałów wysuszonych - kserożeli oraz ich form, w których woda stanowi integralną część materiału - hydrożeli.

Kserożele są ciałami stałymi uzyskanymi przez delikatne suszenie żelu i usunięcie z niego czynników spęczniających tak, aby zachowana została jego mikrostruktura. Kserożele są materiałami o porowatości rzędu 15 ÷ 50% i dużym stopniu rozwinięcia powierzchni w zakresie 150 ÷ 900 m²/g. Wielkość porów kserożeli waha się między 1 a 100 nm (Kennedy i Philipps, 2001).

Zgodnie z Międzynarodową Unią Chemii Czystej i Stosowanej materiały porowate dzielą się na 3 grupy różniące się wielkością porów: materiały mikroporowate o średnicy < 2 nm, materiały mezoporowate: 2 ÷ 50 nm oraz materiały makroporowate, gdy średnica porów przekracza 50 nm (Rouquero i in., 1994). Kolejna klasyfikacja dotyczy charakterystyki porów materiału, które mogą być: zamknięte lub otwarte, o kształcie cylindrycznym otwartym na obu końcach, ślepe, w kształcie lejka lub nacięcia (Kumzerov i Vakhrushev, 2003). Kserożele określać można także jako „materiały nanoporowate”, ponieważ posiadając pory o średnicy mieszczącej się w granicach od 1 do 100 nm, obejmują wszystkie z wymienionych grup materiałów.

Kserożele charakteryzują się unikalnym zestawem cech, takich jak: wysoka powierzchnia właściwa, przepuszczalność dla cieczy oraz kształtoselektywność (Oszust i in., 2012). W postaci odwodnionej polimerowe kserożele mają postać zwiniętego kłęбка. Kłębek ten pod wpływem cząsteczek wody rozluźnia się, grupy funkcyjne ulegają solwatacji, a następnie dysocjują. Jony o ładunku dodatnim odłączają się, natomiast ładunki ujemne odpychają się na skutek działania sił elektrostatycznych. Powoduje to rozluźnienie struktury polimeru, dzięki czemu ma on możliwość dalszego wchłaniania cieczy i tworzenia w ten sposób żelu. Proces kończy się, gdy łańcuchy polimerowe tworzące trójwymiarową sieć maksymalnie się wydłużą (Tyliszczak i Pielichowski, 2007).

Powyższe cechy sprawiły, że kserożele znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle medycznym i farmaceutycznym. Stosowane są one jako nośniki pozwalające na selektywny transport leków i substancji biologicznie czynnych. Wykorzystywane są do tego m.in. kserożele krzemionkowe (silikażele), wytwarzane przy użyciu metody zol-żel opartej na katalizowanej hydrolizie i kondensacji alkoksylanów, której skutkiem jest otrzymanie usieciowanej struktury żelu. Tego typu kserożele mogą występować np. w postaci nanokapsulek. Metoda zol-żel umożliwia włączenie do matrycy labilnych cząstek substancji aktywnej poprzez umieszczenie jej w porach kserożelu. Pozwala to na opóźnienie uwalniania leku, co w niektórych przypadkach jest bardzo pożądane (da Fonseca i in., 2008). Polimerowe kserożele mają zdolność do pochłaniania cieczy, toksyn i innych podobnych substancji, co znalazło zastosowanie w produkcji materiałów opatrunkowych. Wykorzystywane są również opatrunki z polimerów naturalnych zawierające krzemionkowe nanocząsteczki kserożelowe, które zapobiegają problemom zbyt szybkiego uwolnienia leku z opatrunku, co mogłoby być toksyczne dla pacjenta (Costache i in., 2010).

W przeciwieństwie do metod wytwarzania membran hydrożelowych wytworzenie struktur gąbczastych wymaga wykorzystania dodatkowego etapu, za którego pośrednictwem następuje usunięcie wykorzystanego rozpuszczalnika. Najbardziej powszechne metody wytwarzania struktur gąbczastych obejmują procesy suszenia sublimacyjnego wcześniej zamrożonych roztworów biopolimerowych lub procesy elektroprzędzenia (Jayakumar i in., 2011). Są to stosunkowo proste, niedrogie i wydajne metody wytwarzania.

W metodzie suszenia sublimacyjnego rozpuszczalnik usuwany jest z wcześniej wymrożonego roztworu polimeru, w obniżonej temperaturze i pod zmniejszonym ciśnieniem. Warunki suszenia sublimacyjnego umożliwiają zatem suszenie materiałów zawierających składniki podatne na degradację termiczną.

Metody elektroprzędzenia polegają na otrzymaniu nanowłókien ze stopionych polimerów lub z ich roztworów za pomocą pola elektrycznego i prowadzą do uzyskania materiałów gąbczastych bądź włóknistych, o wysokoporowatej strukturze. Dzięki temu materiały te zdolne są do wiązania znacznie większych ilości cieczy w porównaniu z kserożelami tworzonymi innymi metodami. Jest to wysoce pożądana właściwość materiałów wykorzystywanych np. jako opatrunki, zwłaszcza w terapiach leczenia obficie sączących się ran.

Nieco inną metodę otrzymywania wysoko porowatych struktur gąbczastych na bazie chitozanu, a także innych biopolimerów, zaproponowali Dehghani i Annabi (2011) wykorzystując do tego celu ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym ($scCO_2$). Zgodnie z metodą autorów materiały otrzymywane są na drodze spieniania wcześniej przygotowanych roztworów polimerowych, w obecności lub bez udziału czynnika sieciującego, po uprzednim nasyceniu dyspersji $scCO_2$. Spienienie następuje na drodze kontrolowanej dekompresji reaktora w jakim przeprowadzany jest proces, co skutkuje gwałtownym uwolnieniem rozpuszczonego w dyspersji polimerów ditlenku węgla w postaci gazowej. W wyniku tego procesu tworzą się liczne pęcherzyki gazu, które na skutek rozszczelnienia układu wydostają się z dyspersji polimeru, pozostawiając suchą, porowatą strukturę.

1.3.2. Hydrożele

Najpowszechniejsza definicja opisuje hydrożel jako spęczniałą wodą, polimeryczną sieć wytwarzaną w wyniku prostej reakcji monomerów. Zgodnie z inną definicją, hydrożel to materiał polimerowy wykazujący zdolność do pęcznienia i zatrzymywania wody w swojej strukturze, nie ulegając w niej jednocześnie rozpuszczeniu. Hydrożele można traktować także jako układy koloidalne, w których woda stanowi ośrodek dyspersyjny (Ahmed, 2015).

Ze względu na sposób sieciowania hydrożeli, materiały te można podzielić na chemiczne i fizyczne. Hydrożele chemiczne, o dużej odporności chemicznej i termicznej, powstają gdy podczas ich sieciowania tworzą się trwałe wiązania

kowalencyjne. Usieciowanie chemiczne może zachodzić na drodze rodnikowej polimeryzacji monomerów o małych masach cząsteczkowych, w obecności czynnika sieciującego. Inna metoda tworzenia hydrożeli chemicznych polega na reakcji komplementarnych grup polimerów rozpuszczalnych w wodzie, posiadających ugrupowania hydroksylowe, karboksylowe lub aminowe. Przykładem tego typu reakcji jest tworzenie wiązań peptydowych, zasad Schiffa lub reakcja z aldehydem glutarowym. W innych metodach wykorzystuje się reakcje kondensacji, np. przy użyciu N,N-(3-dimetyloaminopropyl)-N-etylokarbodiimidu (EDC) czy sieciowanie monomerów za pomocą promieniowania o wysokiej energii, np. promieniowania γ . W ten sposób można otrzymać hydrożel z alkoholu poliwinylowego, glikolu polietylenowego czy kwasu poliakrylowego. Do metod chemicznych sieciowania często zalicza się także procedury wykorzystujące aktywność preparatów enzymatycznych jak np. wykorzystanie enzymu transglutaminazy w tworzeniu wiązań peptydowych (Hennink i van Nostrum, 2002).

Hydrożele fizyczne powstają na skutek oddziaływań fizycznych i tworzą przestrzenną strukturę, w której łańcuchy polimeru połączone są przez wiązania wodorowe oraz oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne. Do grupy metod fizycznych tworzenia hydrożeli zalicza się m.in. krystalizację. Przykładem zastosowania tej metody jest tworzenie hydrożeli z polialkoholu winylowego, w wyniku cyklicznych etapów zamrażania i odmrażania. Właściwości otrzymanego w taki sposób materiału zależą od masy cząsteczkowej polimeru, jego stężenia, temperatury oraz czasu i ilości cykli zamrażania. Dużego znaczenia nabierają obecnie hydrożele na bazie kompleksów polielektrolitowych, w których główną rolę odgrywiają oddziaływania jonowe pomiędzy przeciwnie naładowanymi polimerami (Gierszewska-Drużyńska i Ostrowska-Czubenko, 2016).

Inna klasyfikacja obejmuje podział hydrożeli na dwie kategorie, tzw. hydrożele konwencjonalne i wrażliwe. Pierwsze z nich składają się z luźno połączonych hydrofilowych, najczęściej niejonowych polimerów o znacznym stopniu pęcznienia w wodzie. Z kolei hydrożele wrażliwe podatne są na niewielkie zmiany pH, temperatury, pola elektrycznego czy zmiany światła. Żele tego typu, np. żele wrażliwe na zmiany pH, są powszechnie stosowane w przemyśle farmaceutycznym, m.in. do ochrony leków wrażliwych na kwaśny odczyn żołądka (Pluta i Karolewicz, 2004). Na właściwości fizyczne hydrożeli ma wpływ wiele czynników takich jak rodzaj polimeru,

z którego zostały wytworzone, ilość i charakter grup funkcyjnych tego polimeru, jego stopień usieciowania czy siła jonowa pochłanianej cieczy (Bialik-Wąs i Pielichowski, 2011).

Pojawienie się pierwszego hydrożelu datowane jest na rok 1960 i dotyczy wykorzystania hydrofilowych sieci z 2-hydroksyetylometakrylanem do produkcji soczewek kontaktowych (Pluta i Karolewicz, 2004). Wysoka zawartość wody w hydrożelach sprawia, że cząsteczki różnych związków mogą dyfundować do wewnątrz i na zewnątrz ich struktury, co z powodzeniem wykorzystano w projektowaniu systemów kontrolowanego dostarczania leków. Dodatkowe cechy hydrożeli, takie jak miękkość i plastyczność, upodabniają je do żywych tkanek. W pełni uzasadnione jest więc wykorzystanie takiej formy polimerowych produktów szczególnie w branży biomedycznej i aplikacjach farmaceutycznych (Gupta i in., 2002).

Szczególnie użyteczną grupą hydrożeli są te wytworzone z polimerów o charakterze polielektrolitowym, na których łańcuchach zgromadzony jest ładunek. Cecha ta umożliwia występowanie elektrostatycznych oddziaływań z przeciwnie naładowanymi cząsteczkami, co znacznie poszerza możliwości aplikacyjne hydrożeli. Poza zastosowaniami medycznymi wiele uwagi poświęca się m.in. wykorzystaniu hydrożeli w inteligentnych zaworach, czujnikach bazujących na właściwości reagowania materiału na zmianę środowiska zewnętrznego, wskutek czego możliwa jest jego zmiana objętości bądź kształtu. Hydrożele znalazły także zastosowanie jako materiały codziennego użytku: opatrunki, środki higieny osobistej, uszczelniacze w budownictwie i górnictwie, preparaty do granulacji pasz i materiałów pylistych. W kosmetyce wykorzystuje się je do pielęgnacji włosów i skóry. W uprawie roślin wprowadzone do gleby stanowią magazyny wody, zapewniając roślinom wilgoć w czasie suszy i gorących dni (Kazimierska-Drobny, 2011). Hydrożele z powodzeniem mogą być również wykorzystywane do usuwania organicznych zanieczyszczeń ze środowiska wodnego. Działanie takie możliwe jest dzięki zastosowaniu termoczułych polimerów, które powyżej pewnej krytycznej temperatury zmieniają charakter chemiczny z hydrofilowego na hydrofobowy, desorbując wodę i zatrzymując niepożądane związki hydrofobowe (Baranowski, 2006).

W przemyśle spożywczym hydrożele mogą pełnić funkcję żywieniową, ponieważ uwodnione biopolimery, takie jak np. guma ksantanowa, chitozan czy alginian sodu, w przewodzie pokarmowym zachowują się jak włókno pokarmowe -

blonnik (Ahmed, 2015). Główna ścieżka wykorzystania hydrożeli ukierunkowana jest jednak na poszukiwanie nowych przyjaznych środowisku rozwiązań dotyczących opakowań do żywności. Opracowanie koncepcji długoterminowego przechowywania żywności jest związane z użyciem polimerów o różnym składzie chemicznym i strukturze, determinujących ich funkcjonalność. Oprócz wymaganych właściwości użytkowych takich jak trwałość chemiczna, właściwości fizykochemiczne i technologiczne, materiały polimerowe stosowane w bezpośrednim kontakcie z żywnością powinny spełniać wysokie wymagania higieniczne (Kołodzyńska i Franus, 2016). Obecny trendem w projektowaniu opakowań do żywności jest stosowanie mieszanek różnych polimerów jak skrobia-PLA czy skrobia-PCL (polikaprolakton). Obiecujące zastosowanie hydrożeli w przemyśle spożywczym obejmuje tworzenie opakowań o ściśle określonej barierowości dla gazów, właściwościach przeciwbakteryjnych, przedłużających trwałość pakowanej żywności, sygnalizujących jakość produktu czy wreszcie chroniących wybrane składniki żywności (Kołodzyńska i Franus, 2016).

Hydrożele na bazie chitozanu są obiektem szczególnego zainteresowania ze względu na szereg pozytywnych cech tego polimeru, takich jak: bioaktywność, nietoksyczność, biogodność, biodegradowalność, duża pojemność sorpcyjna (Muzarelli, 2009). Hydrożele tworzone wyłącznie z chitozanu posiadają również wady takie jak: stosunkowo niska wytrzymałość mechaniczna i chemiczna. Ograniczają one stosowalność wyrobów formowanych z chitozanu, np. w postaci membran, błon, itp. W celu podwyższenia trwałości mechanicznej tworzonych z chitozanu materiałów hydrożelowych, w większości zastosowań aplikacyjnych polimer ten poddaje się reakcjom sieciowania chemicznego lub łączy się go z innymi polimerami, najczęściej polisacharydami lub białkami o przeciwnym ładunku. Podczas wzajemnego oddziaływania polielektrolitów o przeciwnych ładunkach, np. chitozanu z alginianem sodu lub kolagenem/żelatyną, zachodzi reakcja żelowania bądź strącanie osadu. Możliwość wystąpienia obu procesów zależy od stężenia reagentów oraz siły jonowej roztworów biopolimerów oraz pH mieszanych roztworów (Simsek-Ege i in., 2003).

1.4. Wykorzystanie biopolimerów w konstrukcji kserożelowych materiałów opatrunkowych

1.4.1. Rynek tradycyjnych materiałów opatrunkowych

Rynek materiałów opatrunkowych w ostatnich latach dynamicznie się rozwija. W roku 2014 wartość rynkowa opatrunków wyniosła 9,9 miliardów dolarów. Szacuje się, że do roku 2020 wzrośnie do 14,9 miliardów, z czego większość to wartość rynków amerykańskiego i europejskiego (Espicom Business Intelligence, 2015). Czynniki takie jak wprowadzanie nowych, aktywnych produktów do pielęgnacji ran wraz z ogromnym wsparciem w formie funduszy i dotacji z różnych instytucji rządowych na całym świecie są motorem rozwoju tego rynku.

Opatrunkiem nazywa się sterylny materiał lub kompres nakładany na ranę w celu jej ochrony przed dalszym uszkodzeniem i osłony przed środowiskiem zewnętrznym. Opatrunek może zawierać substancje przeciwbakteryjne i lecznicze, przyspieszające gojenie (Tian i in., 2014; Ali Hassan, 2016; Levi-Polyachenko i in., 2016). Tradycyjne opatrunki, takie jak bandaże i gazy, mają za zadanie utrzymywać rany w stanie suchym przez wchłonięcie wysięku oraz zapobieganie wnikaniu drobnoustrojów do jej wnętrza. Badania Wintera (1962) nad procesem gojenia się wykazały, że odbudowę naskórka przyspiesza ciepłe i wilgotne środowisko. Na tej podstawie opracowano model idealnego opatrunku, nazywanego opatrunkiem aktywnym. Opatrunek taki ma:

- zapewniać ranie środowisko gojenia o odpowiedniej termoregulacji, wilgotności, pH oraz wymianie gazowej,
- działać bakteriostatycznie,
- oczyszczać ranę z martwych tkanek poprzez zapoczątkowanie procesu autolizy,
- chłonać wysięk i wydzielinę z rany,
- stanowić barierę ochronną przed nadmierną stratą płynów ustrojowych, zabrudzeniem lub infekcją,
- nie przywierać do rany, aby umożliwić łatwą zamianę opatrunku bez uszkodzenia nowopowstałych tkanek,
- wykazywać właściwości hipoalergiczne, wspomagające proces leczenia,

- być przezroczysty, aby można było kontrolować stan rany bez potrzeby zdejmowania opatrunku, gdy nie jest to konieczne (Bialik-Wąs i Pielichowski, 2011).

Do czasów obecnych powstały trzy generacje opatrunków opierających się na odkryciu Wintera. Do I generacji materiałów opatrunkowych, pochodzących z lat sześćdziesiątych XX wieku, należą filmy polimerowe wykonane z polietylenu, polipropylenu i poliestru. Charakteryzują się one jednak brakiem przepuszczalności dla wilgoci, co wiąże się z gromadzeniem płynów ustrojowych na powierzchni rany i spowolnieniem jej gojenia. Obecnie ich głównym zastosowaniem jest wstępne, czasowe osłonięcie rany przed właściwym opatrzeniem jej przez personel medyczny. Do II generacji opatrunków, powstałej w latach siedemdziesiątych XX wieku, należą opatrunki z karboksymetylocelulozy lub czystego poliuretanu. Początkowo stosowano je powszechnie do leczenia chronicznych ran, ale przylepiały się do nowopowstałych tkanek, często powodując ich uszkodzenie. Nie wykazywały też działania leczniczego. III generacja opatrunków obejmuje hydrofilowe filmy poliuretanowe oraz hydrożele, odznaczające się większością cech idealnego opatrunku aktywnego (Bialik-Wąs i Pielichowski, 2011).

1.4.2. Nowe możliwości w tworzeniu kserożelowych materiałów opatrunkowych

Ze względu na znamienne różnice między poszczególnymi fazami procesu leczenia rany, w tym przede wszystkim różne ilości wydobywającego się z niej wysięku, a także odmienny stan zdrowia poszczególnych pacjentów, nie jest możliwe zaprojektowanie idealnego opatrunku medycznego. Odpowiedzią na brak uniwersalności jednego opatrunku do różnego typu ran jest wypieranie standardowych materiałów ich odpowiednikami tworzonymi na bazie polimerów naturalnych.

Zastosowanie biopolimerów do wytwarzania opatrunków pozwala na otrzymywanie materiałów o właściwościach zbliżonych do matrycy pozakomórkowej - miękkiej, mocnej i elastycznej sieci zbudowanej z glikoprotein, zapewniającej stabilność mechaniczną i integralność strukturalną tkanek i narządów ciała (Olędzka i in., 2007). Dodatkowo, zaletą tego rodzaju materiałów jest ich biokompatybilność, brak toksyczności i mała skłonność do wywoływania odczynów alergicznych (Amidi, 2010). Często materiały biopolimerowe odgrywają także bardzo specyficzną rolę w procesie odbudowywania tkanek skóry, np. stanowiąc miejsce adhezji komórek

(Wang i in., 2009). Taka charakterystyka a ponadto stosunkowo niska cena, czyni polimery naturalne atrakcyjnymi surowcami uwzględnianymi w projektowaniu nowoczesnych materiałów opatrunkowych.

Do produkcji porowatych materiałów opatrunkowych z powodzeniem wykorzystać można biopolimery takie jak: celuloza, skrobia, pektyny, karageny, alginiany, gumy, kolagen, żelatyna, chitozan (Singh, 2011). Większość komercyjnie wykorzystywanych polisacharydów wykazuje charakter obojętny lub kwasowy, a jedynie chitozan jest polisacharydem zasadowym.

Literatura naukowa dowodzi, że chitozan w kontakcie z raną może aktywować elementy układu odpornościowego, przyspieszać koagulację krwi w miejscu uszkodzonej tkanki, natomiast w kontakcie z leukocytami intensyfikować aktywność monocytów, makrofagów i fibroblastów w procesach angiogenezy (Uragami i Tokura, 2010). Inną pozytywną funkcją chitozanu jest zdolność do inhibicji metaloproteinaz utrudniających procesy odbudowy tkanek, m.in. w wyniku kompleksowania jonów cynku będących kofaktorami tych enzymów (Gorzelanny i in., 2007).

Innym cennym źródłem naturalnych surowców do produkcji materiałów opatrunkowych mogą być białka pozyskiwane z produktów ubocznych przetwórstwa rybnego. Szczególne dotyczy to białek tkanki łącznej izolowanych ze skór łososia, którego wzrost w światowej produkcji w ubiegłych dwudziestu latach wyniósł ok. 1,13 mln ton (Larsen, 2009). W wyniku jego przetwórstwa, w Polsce rocznie powstaje ok. 20 tys. ton odpadów, z czego prawie 20% stanowią skóry (Głowacz, 2014). Dodatkowym atutem wykorzystania rybich skór jest fakt, że jeden rodzaj surowca może zostać wykorzystany do otrzymywania dwóch rodzajów produktów białkowych o odmiennych właściwościach fizykochemicznych i użytkowych, czyli kolagenu i żelatyny. W badaniach nad membranami chitozanowo-kolagenowymi wykazano, że kolagen bydłęcy w testowanych kompozytach może powodować zwiększoną proliferację i adhezję komórek w stosunku do samej matrycy chitozanowej, co wynika z hydrofilowej natury białka, uwarunkowanej dużą zawartością dikarboksyłowych reszt aminokwasowych (Cuy i in., 2003). Inną rolą białka jest odtwarzanie trójwymiarowej sieci przestrzennej, w której kolagen, w naturalnych warunkach, obok elastyny i retikuliny zapewnia odpowiednią stabilność mechaniczną.

Dokonanie przeglądu literaturowego pod kątem właściwości preparatów białkowych i ich wpływu na matryce tworzone z polisacharydami często stanowi duże

wyzwanie, ze względu na różnice w stosowanych przez autorów publikacji metodach izolacji kolagenu i żelatyny. Uzasadnionym działaniem w toku badawczym było więc przygotowanie preparatów żelatyny i kolagenu nie tylko z potencjalnego surowca, jakim są skóry z łososia łatwo dostępnego w regionie północnej Polski, ale także ze skór dorsza bałtyckiego i suma afrykańskiego, bytujących w wodach o odmiennych temperaturach. Wykonanie charakterystyki porównawczej kolagenów i żelatyn ze skór różnych gatunków ryb było działaniem koniecznym. Surowce tego typu mogą wykazywać dużą zmienność parametrów fizykochemicznych, które warunkowane są pochodzeniem surowca oraz metodami jego przetwarzania. Dopiero takie działanie było podstawą do oceny wpływu dodatku wyizolowanych białek na właściwości użytkowe chitozanowo-białkowych kserożeli.

W wynikach badań przedstawiono propozycję wprowadzenia do kserożelu chitozanowego dodatkowej funkcji w postaci programowalnej rozpuszczalności materiału, wykorzystując do tego celu metodę chemicznej modyfikacji polimeru za pomocą bezwodnika kwasu N-propylofosfonowego.

Bezwodnik kwasu N-propylofosfonowego (T3P) jest łagodnym odczynnikiem pochłaniającym wodę (Rys. 5). Charakteryzuje się niską toksycznością oraz niewielkim potencjałem alergennym. Dotychczas znalazł zastosowanie wyłącznie jako reagent sprzęgający peptydy w syntezie organicznej (Augustine i in., 2009).

Rys. 5. Wzór chemiczny cząsteczki bezwodnika kwasu N-propylofosfonowego (T3P).

T3P jest wyjątkowo skutecznym odczynnikiem w procesie tworzenia wiązań amidowych, które w modyfikacji układów biopolimerowych odgrywają kluczową rolę. Jest łatwy w użyciu i pozwala osiągnąć wysoką selektywność reakcji z dużą wydajnością oraz niewielkim stopniem epimeryzacji. Dodatkowo, produkt reakcji sprzęgania z użyciem T3P charakteryzuje się wysoką czystością. Przykładem

zastosowania bezwodnika kwasu N-propylofosfonowego jest użycie go w prostej reakcji chemiluminescencji lucyferyny świetlika (D-luc). Metoda ta została opisana przez zespół Kato i współpracowników (2012). Przedstawiona przez autorów procedura polegała na wytworzeniu fotonu luminescencyjnego w wyniku reakcji obejmującej mieszanie substratu (D-luc), T3P, oraz słabej zasady organicznej. Przy odpowiednim doborze zasady można otrzymać dostateczną intensywność emitowanego światła. Otrzymane widma emisyjne przebiegu reakcji chemiluminescencji potwierdzają wzrost sygnału luminescencji z zastosowaniem T3P. Pomimo, iż autorzy nie przedstawili jeszcze zastosowania dla wyników uzyskanych badań podstawowych, system ten może być przydatny w celu otrzymania barwnej struktury wiążącej pochodne D-luc i nie posiada ograniczeń związanych ze specyfiką substratu lucyferazy świetlika w katalizowanych reakcjach bioluminescencji. Dodatkowo, w obecności fluoryzującego chromoforu, kwas karboksylowy może emitować światło. Wyjaśnienie warunków, które powodują emisję światła w innym organicznym lub wodnym środowisku jest wciąż w toku.

Innym z dotychczasowych zastosowań T3P jest modyfikacja tiazolidynonów. 4-tiazolidynony stanowią ważną klasę związków heterocyklicznych z punktu widzenia ich szerokiej aktywności biologicznej i działania farmakologicznego. Kumar i współpracownicy (2012) przedstawili alternatywną ścieżkę syntezy tych biologicznie czynnych związków z użyciem T3P i dimetyosulfotlenku (DMSO). Okazało się, że przy zastosowaniu łagodnych warunków otrzymano wysoką wydajność syntezy 4-tiazolidynonów, bez względu na rzędowość użytych w reakcji substratów. Dodatkowymi zaletami tej metody jest prowadzenie jej w jednym naczyniu, krótki czas reakcji, szeroka tolerancja funkcjonalna grup oraz łatwość oczyszczania produktu (Kumar i in., 2012). Wykorzystanie T3P w celu otrzymywania biologicznie aktywnych materiałów biopolimerowych nie zostało jeszcze poznane i opisane. Jedynym wykazanym do tej pory praktycznym wykorzystaniem T3P była modyfikacja chitozanu, przyłączonego w dalszej kolejności do membrany polisulfonowej, co miało na celu poprawę jej hydrofilowości, chłonności, a także właściwości przeciwpoporostowych, zabezpieczających przed zarastaniem membran grzybami i algami (Kumar i in., 2013).

1.5. Wykorzystanie biopolimerów w formie hydrożeli do ochrony olejów jadalnych

1.5.1. Wprowadzenie

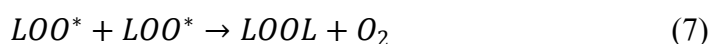
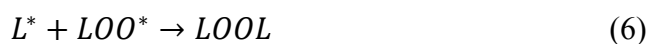
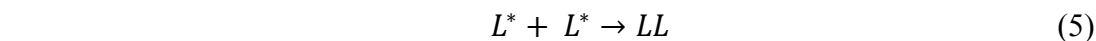
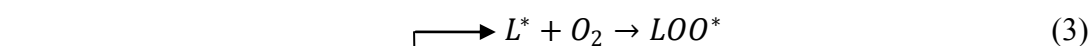
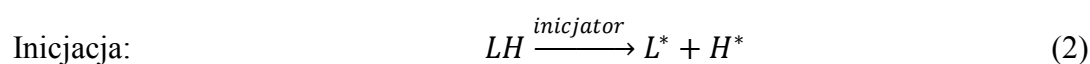
Ze względu na hydrofilowy charakter hydrozele mogą znaleźć ciekawe zastosowanie w nowych technikach kapsułkowania, w których nacisk do tej pory kładziony był głównie na możliwości otrzymywania suchych kapsulek w skali mikro. Różnicę w charakterze chemicznym hydrożeli i olejów wykorzystać można natomiast jako jedną z sił napędowych procesu kapsułkowania, która wspomaga formowanie się kapsulek typu kropla w kropli. Brak zdolności mieszania się rdzenia i płaszcza tłoczonych koncentrycznie do głowicy kapsułkującej oraz utwardzanie kapsulek w roztworze hydrofilowym, stanowi pewną analogię do tworzenia struktur micelarnych.

1.5.2. Przemiany zachodzące w tłuszczach

Tłuszcze zawarte w diecie przeciętnego dorosłego człowieka dostarczają nawet do 40% całkowitej energii dziennej racji pokarmowej, pełniąc jednocześnie trzy podstawowe funkcje w organizmie człowieka. Są one źródłem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), stanowią nośnik witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K), a także są głównym i najbardziej skoncentrowanym źródłem energii (Sikorski, 2013). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe obecne w olejach, jak i substancje im towarzyszące, są nietrwałe, łatwo ulegają utlenianiu, hydrolizie, degradacji lub polimeryzacji, przez co tracą swoją aktywność biologiczną (Scrimgeour, 2005). Szybkość utleniania tłuszczów zależy od stopnia nienasycenia obecnych w nich kwasów tłuszczowych. W wyniku utleniania tłuszczów tworzą się w nich związki, które wpływają na obniżenie wartości odżywczej, a także mają istotny wpływ na bezpieczeństwo żywności. Te niekorzystne procesy zachodzą w obecności enzymów lub są wynikiem przemian nieenzymatycznych. Utlenianie tłuszczów to zespół złożonych reakcji o różnym podłożu, które w zależności od mechanizmu prowadzą do różnych produktów wtórnych. Wyróżnić można dwa zasadnicze mechanizmy utleniania nieenzymatycznego: autooksydację i utlenianie fotosensybilizowane (Gray, 1978).

Autooksydacja jest to rodnikowa reakcja łańcuchowa. Rodniki mogą być generowane z różnych źródeł, głównie w wyniku działania wysokiej temperatury podczas procesu przetwarzania tłuszczów, w wyniku działania promieniowania UV,

przez jony metali czy utleniacze (Gaonkar i in., 2014). Autooksydacja należy do wyjątkowo skomplikowanych i wciąż nie w pełni poznanych procesów. Mechanizm autooksydacji wynika z labilności produktów pośrednich oraz złożonego wpływu katalizatorów i przeciwutleniaczy biorących udział w tych reakcjach utleniania (Sikorski, 2013). Można wyróżnić trzy zasadnicze etapy tego procesu: inicjację, propagację i terminację (Rys. 6) (Choe i Min, 2006; Sikorski, 2013). Zapoczątkowanie autooksydacji nazywane jest inicjacją. Jest to etap obejmujący homolityczne oderwanie atomu wodoru i utworzeniu rodnika alkilowego (Sikorski, 2013). Początkowo inicjacja przebiega wolno, ze stałą szybkością charakterystyczną dla oleju, która zależy od składu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Oderwanie atomu wodoru w wielonienasyconych kwasach tłuszczowych wymaga mniejszego nakładu energii ze względu na stabilizującą powstający rodnik alkilowy migrację wiązania podwójnego.



Rys. 6. Schemat mechanizmu autooksydacji (Sikorski, 2013).

Po przekroczeniu krytycznego stężenia rodników, utlenianie wchodzi w kolejną fazę zwaną propagacją. Podczas propagacji zachodzą dwie główne reakcje: reakcja rodnika alkilowego z tlenem trypletowym (3O_2) oraz reakcja utworzenia rodnika nadtlenkowego, który następnie może reagować z nienasyconym lipidem tworząc wodoronadtlenek i rodnik lipidowy (Choe i in., 2006). Powstałe wodoronadtlenki są nietrwałe, a w wyniku ich rozpadu powstają kolejne rodniki inicjujące. Propagacja ma charakter rodnikowej reakcji łańcuchowej o dużej prędkości. W momencie, gdy ilość rodników w oleju staje się coraz większa, istnieje szansa, że zajdą reakcje pomiędzy samymi rodnikami, w wyniku których powstaną produkty niebędące ani inicjatorami,

ani propagatorami. Oznacza to rozpoczęcie terminacji reakcji autooksydacji. Reakcja łańcuchowa zostaje przerwana, co nie oznacza zaprzestania procesu utleniania oleju. Gdy autooksydacja wchodzi w fazę terminacji, utlenianie ulega jedynie spowolnieniu. Analizując zmianę liczby nadtlenków podczas utleniania, w fazie terminacji widać spowolnienie wzrostu ilości nadtlenków, a następnie obniżenie ich stężenia, wynikające z przewagi procesów rozpadu pierwotnych produktów utlenienia nad ich generowaniem (Dobarganes i Velasco, 2002).

Drugim potencjalnym mechanizmem utleniania jest utlenianie fotosensybilizowane. Zakłada on występowanie rozpuszczonego w tłuszczu uczulacza (sensybilizatora), czyli naturalnego barwnika, jak: chlorofil a, feofityna a, mioglobina lub hemoglobina (Sikorski, 2013). Sensybilizatory pod wpływem światła powodują transformację stabilnej cząsteczki tlenu trypletowego (3O_2) w reaktywny tlen singletowy (1O_2) (Choe i in., 2006). Tlen w stanie singletowym reaguje z podwójnym wiązaniem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych prowadząc do powstania wodoronadtlenków.

Utlenianie fotosensybilizowane jest znacznie szybsze od autooksydacji. Uważa się ponadto, że powstałe według tego mechanizmu wodoronadtlenki, rozpadając się na rodniki, mogą być inicjatorami reakcji autooksydacji. Wodoronadtlenki są nietrwałe i mogą ulegać różnym przemianom w szereg produktów wtórnych. W skutek rozerwania łańcucha węglowego powstają zarówno nasycone, jak i nienasycone produkty krótkołańcuchowe: węglowodory, ketony, aldehydy, estry, laktony, alkohole, etery (Sikorski, 2013). W wyniku przyłączenia cząsteczki tlenu do wiązania podwójnego kwasu tłuszczowego następuje jego przegrupowanie, natomiast produkty rozpadu nadtlenków, rodniki, posiadają formy mezomeryczne. Skutkiem tych zjawisk jest powstanie układów sprzężonych *cis-trans* lub nawet *trans-trans* (Choe i in., 2006). Mogą tworzyć się także dimery, oligomery, związki cykliczne, cykliczne nadtlenki, w tym też aromatyczne związki pierścieniowe (Frankel, 2005). Wtórne produkty utleniania lipidów nadają tłuszczom charakterystyczny zjełczały zapach. Szczególnie niskim progiem wrażliwości sensorycznej charakteryzują się nienasycone aldehydy (Sikorski, 2013).

Rozpad wodoronadtlenków może być przyśpieszany przez promieniowanie o dużej energii, energię cieplną lub katalityczne działanie metali ciężkich, np.: Cu, Fe, Co, Mn, Cr. (Frankel, 2005). Metale te nawet w ilościach śladowych bardzo silnie

przyspieszają rozpad wodoronadtlenków, ponadto katalizują wszystkie reakcje utleniania (Sikorski, 2013).

Procesy biochemiczne, które zachodzą w tłuszczach pod wpływem działania enzymów, prowadzą do hydrolizy triacylogliceroli tzw. jęlczenia hydrolitycznego. Enzymy te należą do klasy hydrolaz i nazywane są lipazami triacyloglicerolowymi (Drozdowski, 2007). Reakcja hydrolizy enzymatycznej przebiega na granicy faz – wodnej, w której rozpuszczone są lipazy, i lipidowej. Produktem reakcji są diacyloglicerole (DAG), monoacyloglicerole (MAG), glicerol oraz wolne kwasy tłuszczowe (WKT), które uwalniane są na każdym etapie reakcji. Reakcja enzymatyczna wpływa na pogorszenie walorów sensorycznych. Wynika to z tworzących się wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), dla których typowy jest nieprzyjemny smak i zapach. WKT charakteryzują się także wyższą podatnością na utlenianie niż zestryfikowane kwasy tłuszczowe. Według niektórych autorów wolne kwasy tłuszczowe działają także jako prooksydanty olejów jadalnych (Sielicka, 2014). Dzieje się tak, ponieważ zawierają one w cząsteczce zarówno grupy hydrofilowe jak i hydrofobowe. Hydrofilowe grupy karboksylowe nie rozpuszczają się w oleju jadalnym i są obecne na powierzchni oleju. Przyczynia się to do zwiększenia szybkości dyfuzji tlenu z fazy gazowej znajdującej się nad olejem i przyspieszenia procesu utleniania (Choe i in., 2006).

1.5.3. Sposoby spowolnienia procesów utlenienia w tłuszczach

W tłuszczach następują procesy, które powodują pogarszanie się ich jakości, potocznie nazywane jęlczeniem. W normalnych warunkach, procesu tego nie da się zatrzymać, ale można go znacznie spowolnić i dzięki temu nawet kilkukrotnie wydłużyć termin przydatności użytkowej tłuszczu. Według badań przynajmniej 40% olejów spożywczych znajdujących się w sprzedaży detalicznej nie spełnia norm pod względem wskaźników stopnia ich utlenienia (Sielicka, 2014). Dopuszczalne wartości liczb charakterystycznych olejów, determinujące ich przydatność do spożycia, często są przekraczane, mimo tego że olej ma jeszcze bardzo długi termin ważności. Data przydatności nie zawsze jest więc rzetelną informacją, która potwierdzałaby świeżość i jakość oleju (Czechowska-Liszka, 2006).

Efektem poprawy stabilności oksydacyjnej tłuszczów jest wydłużenie okresu indukcyjnego, pierwszego etapu, w którym zachodzą zmiany inicjujące procesy

autooksydacji. Najprostszym sposobem spowolnienia tych procesów jest obniżenie temperatury przechowywania, ograniczenie dostępu światła oraz zastosowanie odpowiedniego systemu pakowania tłuszczów, np. zastosowanie opakowań próżniowych lub wprowadzenie do opakowań gazów obojętnych np. azotu (Górska i Krupa, 2013). Inną metodą wydłużania czasu indukcji olejów jest stosowanie dodatków, naturalnych bądź syntetycznych przeciwutleniaczy lub ich mieszanin (Hęś i in., 2001).

Przeciwutleniaczem może być związek chemiczny, który stosowany w niskim stężeniu rzędu 0,001÷ 0,1% opóźnia reakcję utleniania lipidów (Zawirska-Wojtasiak, 2005). Ze względu na mechanizm działania wyróżnia się dwie grupy przeciwutleniaczy, tj. pierwotne i wtórne. Pierwotne przerywają reakcję łańcuchową poprzez dostarczenie wodoru lub elektronów i przemianę rodników do bardziej stabilnych chemicznie związków. Zazwyczaj są to związki z ugrupowaniem fenolowym lub zawierające grupy aminowe, np. naturalne i syntetyczne tokoferole, galusany propylu (PG) lub oktylu (OG), butylohydroksytoulen (BHT) oraz związki polifenolowe i kwas rozmarynowy (Śledziński i in., 2013). Wtórne przeciwutleniacze, obejmują substancje, których mechanizm działania polega na opóźnieniu procesów utleniania w inny sposób niż przerwanie łańcucha autooksydacji m.in. poprzez tworzenie kompleksów z jonami metali, które katalizują procesy autooksydacji tzw. środki chelatujące, np. kwas cytrynowy, kwas fosforanowy(V) i jego pochodne, EDTA. Innym sposobem opóźnienia procesów utleniania jest tworzenie granicznej powierzchni pomiędzy olejem a powietrzem, np. przez fosfolipidy lub rozkład nadtlenu do produktów nierodnikowych, a także tzw. gaszenie tlenu singletowego np. przez β -karoten (Śledziński i in., 2013). Aktywność wtórnych przeciwutleniaczy polega na przywróceniu pierwotnej aktywności przeciwutleniającej. Zaliczamy do nich m.in. kwas askorbinowy, witaminę A, flawonoidy, selen (Grajek, 2004).

Ostatnimi czasy obserwuje się coraz większe zainteresowanie konsumentów żywnością, która jest minimalnie przetworzona. W branży tłuszczowej dotyczy to szczególnie olejów tłoczonych na zimno, wzbogacających dietę w kwasy tłuszczowe z rodziny n-3. Częstym sposobem poprawy stabilności oksydacyjnej takich produktów jest tworzenie mieszanek olejów z różnych surowców roślinnych np. oleju lnianego i oleju z rokitnika, który wykazuje wysoką aktywność przeciwutleniającą, ze względu na obecne w nim tokoferole (139 mg/100 g oleju), karotenoidy (35 mg/100 g oleju),

a także fitosterole. Pacholek i współpracownicy (2014) w testach przyspieszonego starzenia oleju lnianego w temperaturze 40°C, prowadzonych przez dwa tygodnie w otwartych naczyniach i w obecności dodatków oleju z rokitnika wykazali, że najniższą zawartość nadtlenków charakteryzowała się mieszanka zawierająca 5% dodatek oleju z rokitnika w stosunku do próby kontrolnej, czyli oleju lnianego bez żadnego dodatku.

W literaturze naukowej wiele uwagi na temat ochrony olejów jadalnych poświęcono metodom kapsułkowania (Bakry i in., 2016). Ogólna zasada tych metod polega na tworzeniu fizycznej bariery pomiędzy kapsułkowanym związkiem a środowiskiem zewnętrznym. Hipotezy stawiane w artykułach dotyczących powyższej tematyki z reguły zakładają, że otoczenie oleju odpowiednim materiałem pozwoli ograniczyć przepuszczalność tlenu do wnętrza kapsułki i w ten sposób przedłużyć jego jakość. Na przestrzeni ostatnich 60 lat, w praktyce związanej z kapsułkowaniem związków aktywnych można spotkać się z problemami takimi jak: dobór odpowiedniego nośnika względem substancji kapsułkowanej, kształt i wielkość kapsułki, sposób umieszczenia rdzenia w kapsułce, liczba rdzeni w kapsułce, itd. Stąd w kolejnym rozdziale dokonano przeglądu technik kapsułkowania wykorzystanych do tej pory jako alternatywne rozwiązanie problemu wysokiej podatności olejów jadalnych, szczególnie tych bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe, na utlenianie.

1.5.4. Metody kapsułkowania olejów jadalnych

Kapsułkowanie stanowi jedną z kilku podstawowych metod prowadzących do częściowego lub całkowitego ograniczenia mobilności zamykanych związków, dzięki zastosowaniu odpowiedniego nośnika oraz na drodze określonych operacji fizycznych lub reakcji chemicznych (Renken i Hunkeler, 1998).

Kapsułki stanowią obecnie ważne narzędzie w dostarczaniu związków aktywnych, zapewniając jednocześnie ochronę tym niestabilnym. Wszechstronność metod kapsułkowania umożliwia ich wykorzystanie w wielu gałęziach przemysłu, m.in. w przemyśle farmaceutycznym, biomedycznym, spożywczym, kosmetycznym, ochronie roślin, a nawet w budownictwie (Bartkowiak i Brylak, 2006; Kontturi i in., 2011; Masuda, 2011; Yang i in., 2011, Nazzaro i in., 2012; Azizia i in., 2014). Najprostszy model mikrokapsułki stanowi struktura, w której wyróżnić można dwie odrębne składowe: rdzeń, zawierający immobilizowaną substancję oraz otaczający

go płaszcz, określane w literaturze także mianem membrany, nośnika, otoczki lub powłoki. Rozmiary cząsteczek klasyfikowanych jako mikrokapsułki nie mają ściśle ustalonych granic, jednak w doniesieniach literaturowych nazwa ta stosowana jest w przypadku mikrocząstek o rozmiarze w zakresie $1 \div 1000 \mu\text{m}$ lub nawet kilku milimetrów (Bakry i in., 2016). Obecnie ilość metod stosowanych do produkcji mikrokapsulek jest bardzo duża. Wybór jednej z nich nie jest łatwym zadaniem, gdyż zagadnienie mikrokapsułkowania jest typowym przykładem interdyscyplinarnego wykorzystania teoretycznej i praktycznej wiedzy, obejmującej podstawy nauk takich jak chemia materiałów (polimerów, biopolimerów), chemia leków, biochemia związków spożywczych i biologicznych, inżynieria procesowa oraz specjalistyczne metody i sposoby analizy jakości surowców i produktów procesu. W literaturze naukowej opublikowanych zostało wiele prac poświęconych metodom kapsułkowania stanowiących rozwiązanie dla różnych grup związków, w tym składników żywności. Najpopularniejszymi metodami, które do tej pory poddano testom w stosunku do kapsułkowania olejów jadalnych są: koacerwacja, polimeryzacja międzyfazowa, inkluzja w liposomach lub cyklodekstrynach, ekstruzja, suszenie rozpyłowe, powlekanie złożem fluidalnym, tworzenie emulsji oraz metody współosiowe (Barbosa-Cànovas, 2005). Zalety i wady wymienionych metod przedstawiono w tabeli 2.

Szczególnym uznaniem w ostatnich latach cieszy się wytwarzanie kapsulek metodami wkrapiania, wykorzystującymi współosiowy transport roztworów nośnika i związku kapsułkowanego. Wspólną cechą tych metod jest sposób formowania kapsulek. Polega on na wytworzeniu strumienia cieczy, który przepływając przez cienką kapilarę fragmentowany jest na krople. Oddzielane krople, grawitacyjnie lub dzięki zastosowaniu dodatkowego pola siłowego, spadają do roztworu utwardzającego/sieciującego, w którym szybka reakcja chemiczna pozwala zachować sferyczną strukturę związku unieruchamianego w danym nośniku. Krople mogą być też rozpylane w komorze zapewniającej szybkie odparowanie roztworu, w którym rozpuszczony był nośnik (Kontturi i in., 2011; Wen i in., 2013; Liu i in., 2014).

Systemem współosiowym testowanym dotychczas w kapsułkowaniu olejów jadalnych jest metoda EAS (ang. *Electrostatically Assisted Spring*), w której formowanie kropli kontrolowane jest za pomocą pola elektrycznego (Li i in., 2014).

W metodzie tej pomiędzy dyszę dostarczającą roztwór/emulsję nośnika z substancją aktywną a roztwór utwardzający przykładane jest napięcie. Wymusza ono spadek kropli, zanim zdąży ona nabrać większych rozmiarów i spaść pod wpływem własnego ciężaru. Metoda ta pozwala na otrzymywanie kapsulek charakteryzujących się jednakowym rozkładem wielkości (rzędu kilku μm), wysoką wydajnością i potwierdzoną skutecznością w ochronie związków bioaktywnych (Bakry i in., 2016). Większość metod kapsułkowania charakteryzuje się łączeniem substancji aktywnej z roztworem nośnika przed wkropleniem do roztworu utwardzającego /siecącego lub przed rozpyleniem stosowanym w celu wysuszenia. W ten sposób możliwe jest otrzymanie jedynie struktur zwanych sferami, w których związek aktywny inkorporowany jest w całej objętości nośnika (Dobarganes i Velasco, 2002; Gades i Stern, 2004; Domian i Wasak, 2008; Kontturi i in., 2011; Gallardo i in., 2013; Kruszewski i in., 2013; Przybysz i in., 2014).

Ze względu na dużą porowatość wykorzystywanych nośników, szybkie utlenianie się olejów jest nadal nieuniknione, zwłaszcza w warstwie sfery graniczącej z jej zewnętrznym otoczeniem zawierającym tlen. W literaturze brakuje informacji dotyczących metod współosiowych tworzenia kapsulek charakteryzujących się rdzeniem i płaszczem jako dwiema odrębnymi składowymi o rozmiarze większym niż kilkaset mikrometrów.

Często wykorzystywanym w różnych metodach kapsułkowania etapem jest tworzenie emulsji oleju z nośnikiem. Wykazano, że utlenianie tłuszczów podczas suszenia rozpyłowego i dalszego przechowywania gotowego produktu przypisuje się w głównej mierze dostępności tlenu wprowadzanego z powietrzem podczas tworzenia emulsji, a dopiero w dalszej kolejności z obecnością tlenu w komorze suszarni, w której dodatkowym czynnikiem przyspieszającym utlenianie jest wysoka temperatura - ok. 200°C (Nazzaro i in., 2012). Niektórzy autorzy potwierdzili, że nośniki uzyskane poprzez wytłaczanie metodą ekstruzji charakteryzują się niższą porowatością, mogą więc lepiej chronić oleje przed działaniem niekorzystnych czynników (Saleeb i Arora, 1999; Kaushik i in., 2014). Koszty zastosowania tej metody są jednak dwukrotnie większe w porównaniu z suszeniem rozpyłowym.

Tab. 2. Porównanie cech różnych metod kapsułkowania oraz rozmiarów tworzonych za ich pomocą kapsułek.

Metoda kapsułkowania (Forma gotowego produktu)	Zalety metody	Wady metody	Rozmiar kapsułek [μm]	Wydajność kapsułkowania [%]	Literatura
Tworzenie emulsji (Ciecz - emulsja)	- tania - nieskomplikowana,	- produkty o czasowej stabilności podatne na zmiany temperatury i pH	0,1÷100	do 88	Fang i Bhandari, 2010 Chan i in., 2000
Polimeryzacja międzyfazowa/<i>in situ</i> (Kapsułki z rdzeniem olejowym otoczone np. produktem reakcji melaminy i formaldehydu)	- polimeryzacja na granicy faz, - żadne reagenty nie są wprowadzane do oleju	- konieczność stosowania rozpuszczalników organicznych i tworzenia emulsji oleju w wodzie z użyciem sonikacji	< 2	do 87	Bakry i in., 2016 Hwang i in., 2006
Ekstruzja (Olej rozproszony w polimerowej masie, przetłoczony i wysuszony)	- dłuższy okres przydatności oleju do spożycia w porównaniu z metodą susz. rozpyłowego	- kosztowna, - konieczność stosowania wysokiej temperatury i wysokiego ciśnienia	150 ÷ 2000	do 94	Desai i Jin Park, 2005 Soliman i in., 2013
Suszenie rozpyłowe (Mikrosfery w postaci proszku)	- tania, - szybka, - łatwa do przeskalowania, - praca w sposób ciągły	- wysoka temperatura w komorze suszarni, - konieczność tworzenia emulsji i stosowania emulgatorów, - niewielka liczba materiałów dobrze rozpuszczalnych w wodzie do tworzenia otoczki	5 ÷ 150	do 99	Bakry i in., 2016 Sanguansri i in., 2013



Tab. 2 cd. Porównanie cech różnych metod kapsułkowania oraz rozmiarów tworzonych za ich pomocą kapsułek.

Metoda kapsułkowania (Forma gotowego produktu)	Zalety metody	Wady metody	Rozmiar kapsułek [μm]	Wydajność kapsułkowania [%]	Literatura
Liofilizacja (Suche pellety)	- nadaje się do termolabilnych związków	- kosztowna, - czasochłonna, - wysoka porowatość nośnika po suszeniu	600	do 99	Anwar i Kuntz, 2011 Karaca i in., 2013a
Powlekanie złożem fluidalnym (Suche kapsułki z powłoką zawierającą olej w nośniku)	- niskie koszty, - intensywna wymiana masy, - duży wybór nośników do powlekania	- podwyższona temperatura podczas immobilizacji	300 ÷ 10000	do 98	Madene i in., 2006 Anwar i in, 2010
Koacerwacja (Kapsułki z rdzeniem olejowym, powstałe w wyniku osadzenia się na nim cząsteczek koloidu w roztworze)	- nieskomplikowana, - tania, - wolna od rozpuszczalników organicznych, - kapsułki o mniejszej powierzchni międzyfazowej oleju z otoczeniem i większej zawartości oleju w porównaniu z suszeniem rozpyłowym (olej stanowi do 99% masy kapsułki)	- wysokie koszty procesowe, - czasochłonność, - tendencja do agregacji mikrokapsułek, szczególnie w skali technicznej	10 ÷ 250	do 99	Lasoń i Ogonowski, 2012 Agnihotri, 2012

1.5.5. Nowe możliwości ochrony olejów jadalnych z wykorzystaniem hydrożeli

Podsumowując powyższe informacje, w podjętym toku badawczym zaproponowano szybką metodę współosiową pozwalającą na otrzymywanie kapsułek z olejem o średnicy kilku milimetrów, których płaszcz stanowi chitozan w formie hydrożelowej. Takie rozwiązanie jak dotąd nie było przedmiotem badań naukowych w próbie przedłużania stabilności olejów jadalnych. Kluczowym czynnikiem zasady działania proponowanej techniki jest wykorzystanie właściwości fizykochemicznych polimeru do szybkiego formowania żeli, jak dotąd poznane i prezentowane najczęściej na przykładzie oddziaływania alginianów z dwuwartościowymi kationami Ca^{2+} (Pielesz, 2009). W dalszym ciągu nie został rozwiązany problem możliwości szybkiego formowania hydrożeli żelatynowych pod wpływem wybranego bodźca, nawet z udziałem odczynników sieciujących. Stąd w technologii produkcji kapsułek żelatynowych w dalszym ciągu stosuje się łączenie tego polimeru z plastyfikatorem, głównie glicerolem, a następnie zgrzewanie dwóch wstęg materiału z umieszczonym wewnątrz olejem.

Przeprowadzone przeze mnie wstępne badania nad możliwością stosowania dodatków żelatyny rybnej w kompozytach z alginianem jako płaszczem kapsułek zawierających oleje jadalne wypadły negatywnie ze względu na żelatynę ulegającą rozpuszczeniu podczas przechowywania kapsułek w środowisku wodnym. Zdolność do szybkiego tworzenia żelu przez chitozan w prezentowanej metodzie kapsułkowania osiągnięto wykorzystując jego zdolność do przechodzenia w formę mikrokryształiczną, czyli strącenie w postaci uwodnionego osadu z kwaśnego roztworu, po umieszczeniu uformowanej kapsułki z olejowym rdzeniem w zasadowym roztworze alkoholu etylowego. Etanol wykorzystano jako dodatkowy czynnik desolwujący łańcuchy polisacharydowe chitozanu. Dodatkowym atutem wykorzystanym podczas formowania się struktur typu kropla w kropli zawierających olej jest wykorzystanie oddziaływań wynikających z hydrofobowej natury oleju i hydrofilowego charakteru chitozanowej otoczki, co stabilizuje kapsułkę nie tylko podczas formowania, ale także w pierwszych sekundach po jej zanurzeniu w roztworze utwardzającym.

W badaniach nad wpływem kapsułkowania w otoczce chitozanowej na stabilność zamykanych olejów jadalnych jako model wykorzystano olej lniany, który jest bardzo dobrym źródłem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych n-3,

zawierającym ponad 50% kwasu α -linolenowego (ALA), ok. 21% jednonienasyconego kwasu oleinowego oraz ok. 14% kwasu linolowego (LA). Skład taki czyni olej lniany produktem szczególnie podatnym na wczesne rozpoczęcie procesów utlenienia (Rubilar i in., 2012a). Ponadto olej ten wykazuje działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne (Dagani i in., 2008). Wpływa też pozytywnie na gospodarkę lipidową, obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy krwi, niweluje choroby zapalne poprzez zahamowanie prostaglandyny PGE₂, a także czynników, które są uzyskiwane w wyniku odpowiedzi na stan zapalny (Dzięciół i Przysławski, 2013).

W celu porównania uzyskanych wyników testom poddano także kapsułki formowane z wykorzystaniem alginianu sodu oraz rdzeniem z oleju rzepakowego o znacznie niższej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

2. CEL PRACY

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania chitozanu w nowatorskich zastosowaniach ukierunkowanych na przemysł medyczny i spożywczy w postaci materiałów ksero- i hydrożelowych.

Oceniono możliwość konstruowania uniwersalnych kserożelowych matryc chitozanowych o strukturze i właściwościach wymaganych dla nowoczesnych materiałów opatrunkowych i programowalnej rozpuszczalności. Jako składniki dodatkowe determinujące rozpuszczalność opatrunku na bazie chitozanu zaproponowano: kolagen i żelatynę otrzymane ze skór dorsza, łososia i suma afrykańskiego, a także fosforylowaną pochodną chitozanu.

Realizacja powyższego celu pośredniego obejmowała:

- izolację kolagenu i żelatyny ze skór dorsza, łososia i suma afrykańskiego, będących produktem ubocznym przetwórstwa rybnego, dokonania charakterystyki właściwości fizykochemicznych otrzymanych białek, a na tej podstawie ocenę ich przydatności technologicznej do tworzenia kompozytów z chitozaniem jako potencjalnych materiałów opatrunkowych,
- ocenę możliwości modyfikacji właściwości fizykochemicznych i bioaktywnych kserożeli chitozanowych poprzez tworzenie kompozytów tego polimeru z kolagenami i żelatynami otrzymanymi ze skór ryb,
- ocenę możliwości modyfikacji chitozanu bezwodnikiem kwasu N-propylofosfonowego w celu otrzymania pochodnej polimeru rozpuszczalnej w środowisku wodnym o pH 7,
- ocenę możliwości modyfikacji właściwości fizykochemicznych i bioaktywnych kserożeli chitozanowych poprzez tworzenie kompozytów tego polimeru z fosforylowaną pochodną chitozanu.

Oceniono możliwość wykorzystania chitozanu w postaci hydrożelowej membrany w pełnieniu funkcji ochronnej w stosunku do składników żywności na przykładzie olejów jadalnych. Zgodnie z hipotezą badawczą zaproponowane rozwiązanie techniczne ma na celu wykorzystanie nowatorskiej techniki kapsułkowania współosiowego w przedłużaniu stabilności oksydacyjnej olejów jadalnych, ze szczególnym uwzględnieniem wysokolinolenowego oleju lnianego tłoczonego na zimno. W badaniach tych chitozan wykorzystano jako płaszcz kapsulek, tworzący barierę dla zamykanego wewnątrz oleju lnianego oraz rzepakowego o znacznie

mniejszej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczonych. Do tej pory nie sprawdzono jednak efektu ochronnego chitozanu w formie hydrożelowej w takim rozwiązaniu. Realizacja powyższego celu pośredniego obejmowała:

- stworzenie prototypu aparatury służącej do kapsułkowania metodą współosiową i ocena możliwości formowania struktur typu kropla w kropli o hydrofobowym rdzeniu,
- dobór optymalnych warunków przepływu poszczególnych mediów podczas kapsułkowania,
- ocena wpływu wilgotności względnej na stopień zatrzymania oleju w kapsułkach,
- ocena wpływu podstawowych zmiennych kapsułkowania na stabilność olejów lnianego i rzepakowego w teście przechowywania,
- ocena ochronnej roli płaszcza chitozanowego i alginianowego na stabilność oksydacyjną olejów lnianego i rzepakowego podczas testu przyspieszonego starzenia,
- ocena ochronnej roli płaszcza chitozanowego i alginianowego na stabilność oksydacyjną olejów lnianego i rzepakowego zawierających dodatek przeciwutleniacza podczas testu przyspieszonego starzenia.

3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

3.1. Materiały

Wykaz surowców i odczynników wykorzystanych do realizacji badań przedstawiono w tabeli 3.

Tab. 3. Wykaz surowców i odczynników wykorzystywanych podczas badań laboratoryjnych.

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
Kolagen z dorsza bałtyckiego (<i>Gadus morhua</i>) łososia atlantyckiego (<i>Salmo salar</i>) suma afrykańskiego (<i>Clarias gariepinus</i>)	Wytworzone z surowca - skóry Morpol S.A.
Żelatyna z dorsza bałtyckiego (<i>Gadus morhua</i>) łososia atlantyckiego (<i>Salmo salar</i>) suma afrykańskiego (<i>Clarias gariepinus</i>)	
Olej rzepakowy rafinowany Kujawski	
Olej lniany wysokolinolenowy Wielkopolski	SemCo
Chlorek sodu	
Chlorek wapnia	
Chloroform	
Etanol (96 % v/v)	
Eter dietylowy	
Eter naftowy	
Kwas borowy(III)	
Kwas chlorowy(VI)	
Kwas mlekowy	
Kwas octowy, lodowaty	Avantor Performance Materials Poland S. A.
Kwas siarkowy(VI)	
Kwas solny	
Metanol	
Nadsiarczan amonu	
n-propanol	
Octan sodu	
Perhydrol	
Siarczan (VI) sodu	
Skrobia rozpuszczalna	
Trimetyloamina	
Wodorotlenek potasu	
Wodorotlenek sodu	
Membrany do dializy	Bionovo

Benzyna ekstrakcyjna	
Fenoloftaleina	Chempur
Węgiel aktywny	
Wskaźnik Tashiro	
Rozmaryn (<i>Rosmarini folium</i>)	Flos
Azot (gaz)	Linde Gaz Polska Sp. z o.o.
Ditlenek węgla (gaz).	
Bezwodnik kwasu N-propylofosfonowego (T3P)	Merck
Mieszanina selenowa (katalizator)	
Woda demineralizowana Mili-Q	Mili-Q
Kwas cytrynowy	P.P.H. Stanlab sp. z o.o.
ABTS	
Alginian sodu	
β-merkaptoetanol	
Błękit bromofenolowy	
Bufor fosforanowy	
Chitozan MMW	
Chloramina T	
Chlorek żelaza (II)	
Comassie Brilliant Blue R-250	
DPPH	
Ferrozyna	
Glicyna	
Hydroksybenzotriazol	
Hydroksyprolina	
Izooktan	Sigma-Aldrich
Izopropanol	
Jodek potasu	
MTT	
Nadsiarczan potasu	
p-anizydyna	
PBS	
p-dimetyloaminobeznaldehyd (DABA)	
PITC	
SDS	
TEA	
TEMED	
Tiosiarczan sodu	
Tris	
Żelatyna ze skóry bydlęcej 75, 175, 225, 300°Bloom	
Akryloamid	VWR
Bisakryloamid	

Wykaz szczepów bakteryjnych i drożdżowych oraz linii komórkowych i pożywek wykorzystanych do realizacji badań przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Wykaz szczepów i podłoża bakteryjnych wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Pożywki po przygotowaniu sterylizowano w autoklawie w 120°C, przy ciśnieniu 1,5 atm przez 30 minut. Dodatki dodawano do sterylnych pożywek przed przygotowaniem podłoża.

Nazwa podłoża/szczepu	Producent
<i>E. coli</i> ATCC 25922	TCS Bioscience Ltd., Botolph Claydon, Buck UK
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
Komórki L-929 (NCTC clone 929: CCL 1, American Type Culture Collection)	ECACC No. 88102702, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK
Bulion kazeinowo-sojowy (TSB) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Płodowa surowica cielęca (FCS) Podłoże Sabourauda Pożywka Tryptic Soy Agar (TSA)	Sigma-Aldrich

3.2. Aparatura

Wykaz aparatury laboratoryjnej wykorzystanej do realizacji badań przedstawiono w tabeli 5.

Tab. 5. Wykaz aparatury wykorzystywanej podczas badań laboratoryjnych.

Nazwa	Producent
Aparatura do kapsułkowania metodą współosiową	Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności WCH PG
Autoklaw Systec VB	De Ville
Blender Omega 8004	BOSCH
Czytnik mikroplętek Hercules	Bio-Rad
Destylarka z parą wodną K-350	BÜCHI
HPLC Agilent 1200 Series*	Agilent
Inkubator z atmosferą CO ₂	Binder
Inkubatory z wytrząsarką KS 3000	Equimed
Komora laminarna BioTectum 1.2 ADVANTAGE	ALCHEM
Komora termostatyczna ST 1 BASIC	Pol-Eko
Komora wilgotnościowa HCP 108	Memmert
Lampa analityczna UV 254 nm 2x 6 W	Merazet
Liofilizator CHRIST Alpha 1-4 LD Plus,	CHRIST
Łaźnia wodna TC-502	Brookfield

Maszyna wytrzymałościowa Instron model 5543	Instron
Mieszadło magnetyczne MR Hei-Mix S	Heidolph
Mieszadło magnetyczne z płytą grzejącą MR Hei-Tec	Heidolph
Mieszadło mechaniczne RZR 2020	Heidolph
Mieszadło mechaniczne specjalnej konstrukcji BMX 10s (z wydrążonym wałem)	BIOMIX
Mikroskop optyczny EVOLUTION 100 z przystawką HDCE-50B	DELTA optical
Mikroskop optyczny odwrócony TELAVAL 3	Carl Zeiss
pH-metr (CP-315M)	Elmetron
Piec do mineralizacji	Foss Tecator
Piec muflowy	MULTISERW-Morek
Pompa próżniowa KNF N811KN.18	Merck
Skaningowy kalorymetr różnicowy CSC 6300 Nano – DSC III*	Calorimetry Sciences Corp.
Skaningowy kalorymetr różnicowy TA 3000	Mettler
Skaningowy mikroskop elektronowy Dual Beam Versa 3D, FEI, wyposażony w działo elektronowe z emisją polową tzw. FEG**	Labsoft
Spektrofotometr Helios α	Thermo Spectronic
Spektrometr FTIR Nicolet 8700****	Thermo Electron Corp
Suszarka laboratoryjna	BINDER
Termoblok	Grant
Urządzenie do destylacji wody Mili-Q	Milipore
Waga elektroniczna	RADWAG
Wiskozymetr Brookfield'a – model DV-III+	Brookfield
Wirówka laboratoryjna MPW-350R	MPW Med Instruments
Wyparka próżniowa BüchiRotavapor R-134	BÜCHI
Vortex WL-1	DHN
Zestaw do ekstrakcji metodą Soxhleta	Chemland
Zestaw do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym	Syngen

* aparatura stanowiąca wyposażenie laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, którego zakup został częściowo sfinansowany z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego – Wzrost Konkurencyjności Przedsiębiorstw (Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej)

** aparatura stanowiąca wyposażenie Akademickiego Centrum Materiałów i Nanotechnologii, AGH w Krakowie.

*** aparatura stanowiąca wyposażenie Katedry Chemii Fizycznej PG.

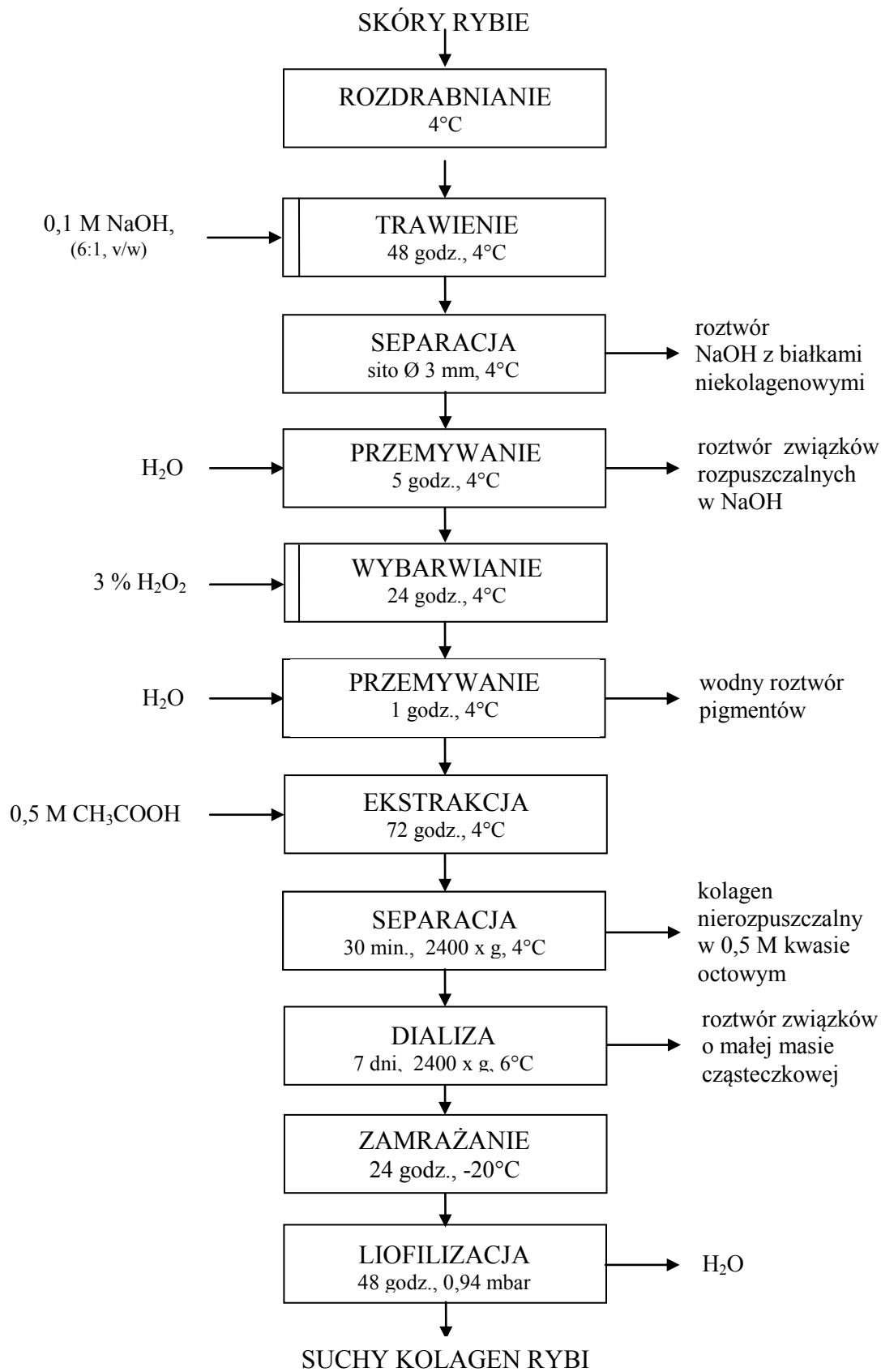
3.3. Postępowanie doświadczalne

3.3.1. Przygotowanie i charakterystyka preparatów białkowych

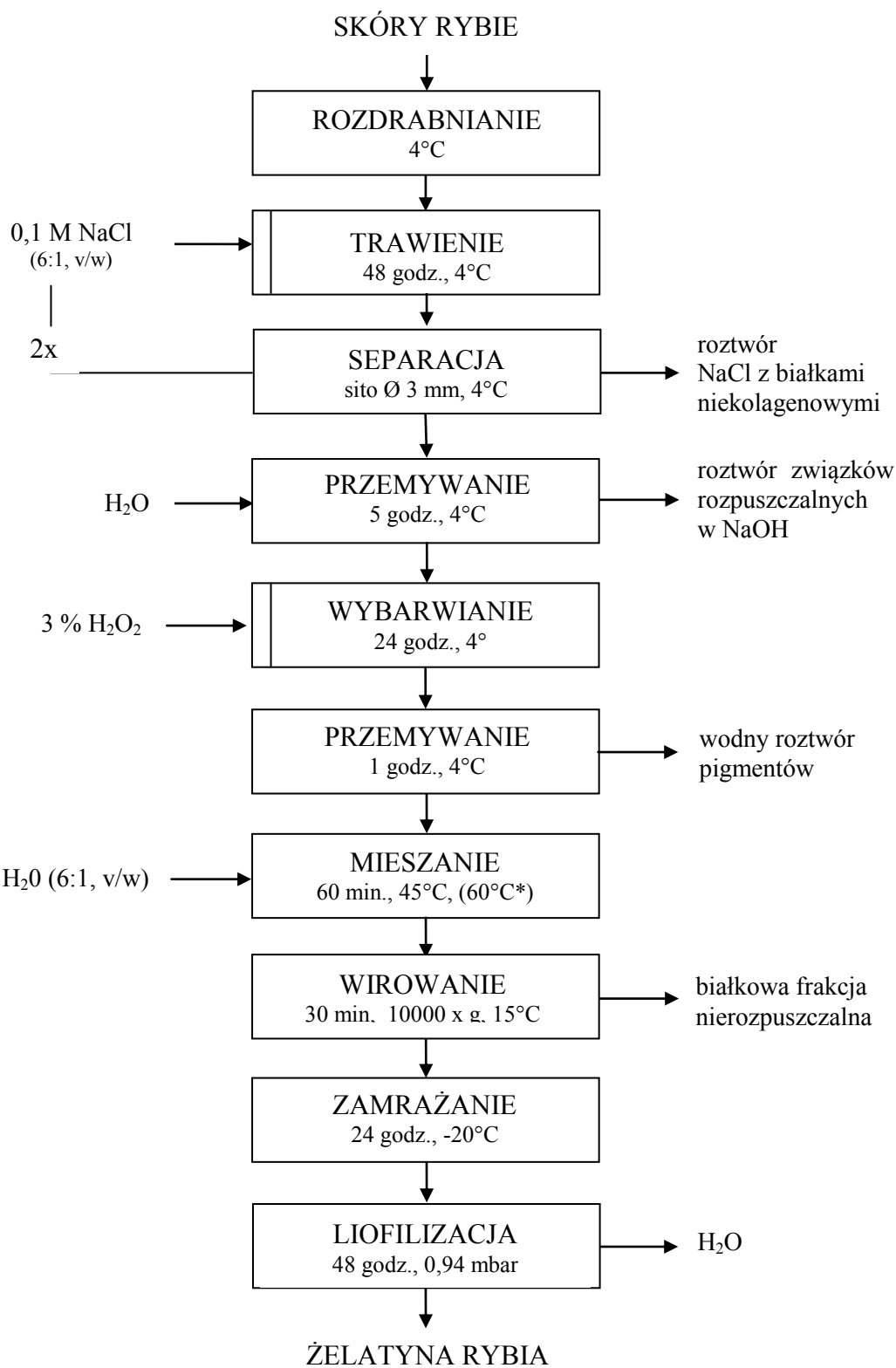
3.3.1.1. Izolacja kolagenu i żelatyny

Do izolacji kolagenu i żelatyny wykorzystano skóry z sumy afrykańskiego, łososia i dorsza. Średnia długość ciała i masa ryb wynosiła dla sumy, odpowiednio, 0,7 m i 1 kg, dla łososia 0,8 m i 2,5 kg oraz dla dorsza 0,5 m i 1 kg. Skóry wykorzystane do badań pochodziły od świeżych ryb i zostały od ich ciał oddzielone mechanicznie. W taki sam sposób ze skór oddzielono pozostałości tkanki mięśniowej. W dalszym kroku skóry zamrożono i wysuszono sublimacyjnie (0,94 mbar, temp. próby: 5°C, temp. kondensatora: - 50°C). Z wysuszonych skór usunięto tłuszcz zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Tynek i współpracowników (2010), skóry wypłukano, a następnie wyizolowano białko zgodnie z przedstawionymi poniżej schematami ideowymi.

Do izolacji kolagenu (Rys. 7) zastosowano metodę ekstrakcji kwasem organicznym poprzedzoną obróbką chemiczną, w celu usunięcia barwników i białek niekolagenowych oraz rozluźnienia struktury włókien izolowanego białka (Sadowska, 1992). W pierwszym etapie mokre skóry rozdrobniono nożyczkami chirurgicznymi tworząc kwadraty o boku 3 cm. Pocięte skóry poddano działaniu wodorotlenku sodu w celu rozpuszczenia białek niekolagenowych. Supernatant z niepożądanymi białkami oddzielono od skór za pomocą sita, a skóry przemyto zimną wodą destylowaną (4°C) do osiągnięcia neutralnego odczynu. W kolejnym etapie surowiec poddano wybarwianiu stosując 3% roztwór perhydrolu w czasie 24 godzin i ponownie przemyto wodą destylowaną do całkowitego wymycia rozpuszczonych barwników. Ekstrakcję kolagenu prowadzono rozcieńczonym roztworem kwasu octowego w warunkach chłodniczych. Spęczniałą frakcję rozpuszczonego kolagenu oddzielono od nierozpuszczonych pozostałości za pomocą wirowania (2400 x g, 4°C, 30 min.). Oddzielony kolagen poddano dializie w celu oczyszczenia białka z małocząsteczkowych związków obecnych w preparacie z poprzednich etapów izolacji, zamrożono i wysuszono sublimacyjnie. We wszystkich etapach izolacji zachowano odpowiednio niską temperaturę - 4°C aby nie dopuścić do denaturacji białka. W celu izolacji żelatyny (Rys. 8) skóry ryb do momentu pierwszego etapu rozdrobnienia przygotowano zgodnie z opisaną powyżej metodyką izolacji kolagenu. Pocięte skóry



Rys. 7. Schemat ideowy procesu otrzymywania kolagenu ze skór rybich (Sadowska, 2003).



*optimalna temperatura dla ekstrakcji żelatyny ze skór sumy afrykańskiego

Rys. 8. Schemat ideowy procesu otrzymywania żelatyny ze skór rybich (Kołodziejka i in., 2008).

poddano dwóm cyklom płukania w roztworze chlorku sodu, a następnie w wodzie destylowanej. W kolejnym etapie skóry odbarwiono i ponownie wypłukano. Ekstrakcję żelatyny prowadzono przez 60 minut, a następnie żelatynę oddzielano w postaci supernatantu po etapie wirowania. Roztwór żelatyny zamrożono i wysuszono sublimacyjnie. W charakterystyce żelatyn uwzględniono także preparaty uzyskane poprzez cieplną denaturację kolagenu uzyskanego zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdz. 3.2.1.1. Czas i temperatura denaturacji odpowiadały warunkom ekstrakcji żelatyny w wodzie bezpośrednio z wstępnie przygotowanego surowca.

3.3.1.2. Wydajność ekstrakcji kolagenu i żelatyny

Wydajność otrzymywania suchych preparatów żelatyny i kolagenu obliczono na podstawie poniższego równania:

$$W (\%) = \frac{M_s}{M_p} \cdot 100 \quad (8)$$

gdzie:

M_s - masa suchego surowca wykorzystanego do izolacji kolagenu/żelatyny po odtłuszczeniu (o składzie podstawowym zgodnym z danymi w tab. 7, rozdz. 4.1.1) [g],

M_p - masa suchego gotowego preparatu kolagenu/żelatyny [g].

3.3.1.3. Oznaczenie składu podstawowego surowca

Do oznaczeń składu podstawowego surowca do produkcji kolagenu/żelatyny wykorzystano metody zawarte w Official Methods of Analysis of AOAC International (Helrich, 1990). Suchą masę oznaczono metodą suszarkową w temperaturze 105°C. Zawartość tłuszczu oznaczono metodą Soxhleta, prowadząc ekstrakcję eterem naftowym przez 6 godzin. Popiół oznaczono metodą wagową polegającą na spalaniu próbek w kwarcowych tyglach w płomieniu palnika gazowego, a następnie ich spopieleniu w piecu muflowym w temperaturze 650°C. Zawartość azotu ogółem oznaczono metodą Kjeldahla wg PN-75/A-04018.

3.3.1.4. Oznaczanie zawartości hydroksyproliny i wyznaczenie współczynników przeliczeniowych azotu na białko

Zawartość hydroksyproliny (Hyp) w surowcu oraz preparatach białkowych oznaczono na podstawie normy PN ISO 3496:2000. Hydrolizę znanej masy próbki kolagenu

przeprowadzono w szczelnie zamkniętych szklanych ampułkach z teflonowymi nakrętkami w środowisku 6 M kwasu solnego w temp. 105°C przez 6 godzin. Po tym czasie ostudzone próbki przesączono przez karbowany sącdek z węglem aktywnym do kolbek miarowych. Objętość kolbek należało dobrać adekwatnie do zawartości kolagenu w próbce, tak aby końcowe stężenie Hyp znalazło się w zakresie 0,5 ÷ 2,0 µg/mL. Następnie klarowne roztwory zneutralizowano wodorotlenkiem sodu wobec fenoloftaleiny.

W 500 mL wody destylowanej rozpuszczono 26 g kwasu cytrynowego monowodnego, 14 g wodorotlenku sodu i 78 g bezwodnego octanu sodu w celu sporządzenia roztworu buforowego. Roztwór przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 1000 mL, dodano 250 mL n-propanolu i uzupełniono do kreski wodą destylowaną. W gotowym buforze rozpuszczono chloraminę T w ilości 0,141 g na 10 mL roztworu. Następnie przygotowano roztwór barwiący: 1 g DABA rozpuszczono w 6,5 mL 60% kwasu chlorowego(VII) 60% i sukcesywnie dodawano 3,5 mL izopropanolu.

W szklanej wialce o pojemności 20 mL umieszczono 2 mL badanego roztworu, a następnie dodano 1 mL roztworu chloraminy T. Reakcję utleniania Hyp prowadzono przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Do roztworu utlenionej Hyp, otrzymanego w poprzednim etapie, dodano 1 mL roztworu barwiącego. Wialki szczelnie zamknięto i umieszczono w łaźni o temperaturze 60°C na 20 minut. Stężenie Hyp wyznaczono na podstawie pomiaru absorbancji barwnej pochodnej aminokwasu, próby odniesienia (przygotowanej w ten sam sposób, ale bez dodatku wzorca) oraz obliczeniu stężenia na podstawie przygotowanej wcześniej zależności wartości absorbancji od stężenia Hyp. Pomiar absorbancji prowadzono przy długości fali równej 558 nm.

Przeliczniki azotu na białko dla każdego z surowców wyznaczono na podstawie składu aminokwasowego oraz na podstawie różnicy w zawartości Hyp w surowcu i otrzymanym preparacie białkowym oczyszczanym z wykorzystaniem dializy.

3.3.1.5. Oznaczenie składu aminokwasowego preparatów białkowych

Suche preparaty kolagenowe poddano hydrolizie w atmosferze pozbawionej tlenu z użyciem 6 M kwasu solnego, w temp. 110°C przez 24 godziny. Uwolnione aminokwasy przekształcono następnie w fenylotiokarbamidowe (PTC) pochodne

(McClung i Frankenberger, 1988) i analizowano techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej z wykorzystaniem kolumny PicoTag 3,9 x 300 mm. Analizę prowadzono w systemie elucji gradientowej. Jako eluent A zastosowano 0,14 M octan sodu zawierający 0,5 mL/L TEA o pH 6,35. Eluentem B był 60% roztwór acetonitrylu w wodzie destylowanej. Podczas 10 minutowego rozdzielania chromatograficznego zastosowano gradient eluentu B w zakresie 10% ÷ 50%. Objętość próbki dozowanej na kolumnę wynosiła 8 μ L, a przepływ eluentu przez kolumnę wynosił 1 mL/min. Detekcję aminokwasów prowadzono przy długości fali równej 254 nm. Proces rozdzielania monitorowano za pomocą oprogramowania Waters Millennium 32 Chromatography Software v. 4,0.

3.3.1.6. Analiza struktury chemicznej kolagenów

Analizę struktury chemicznej preparatów wykonano stosując spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Do przeprowadzenia pomiarów zastosowano spektrometr FTIR Nicolet 8700; Thermo Electron Corp., Waltham, MA, wyposażony w przystawkę GoldenGate ATR z kryształem diamentu o pojedynczym odbiciu. Temperatura kryształu była utrzymywana na poziomie $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ za pomocą automatycznego regulatora temperatury, połączonego z elementem ATR. W każdym pomiarze zbierano 64 skany przy rozdzielczości 4 cm^{-1} i zakresie długości fali $4000 \div 750\text{ cm}^{-1}$. Do pomiaru wykorzystano suche próbki preparatów. Po uzyskaniu wszystkich widm FTIR dla każdego powtórzenia badanych próbek i odjęciu tła, obliczono średnią wartość widma. Próby przed wykonaniem pomiarów kondycjonowano w ekzykatorze w obecności P_2O_5 przez 5 dni.

3.3.1.7. Elektroforeza SDS-PAGE

Elektroforezę prowadzono w żelu poliakrylamidowym nieciągłym, złożonym z warstwy 8% żelu rozdzielającego i 5% żelu zagęszczającego. Żel rozdzielający przygotowano przez zmieszanie 4,6 mL wody destylowanej, 2,7 mL 30% roztworu akrylamidu, 2,5 mL buforu 1,5M Tris-HCl o pH 8,8, 0,1 mL 10% SDSu, 0,1 mL 10% roztworu nadsiarczanu amonu i 0,006 mL TEMEDu. Żel zagęszczający przygotowano przez zmieszanie 5,5 mL wody destylowanej, 1,3 mL 30% roztworu akrylamidu, 1 mL 0,5M buforu Tris-HCl o pH 6,8, 0,08 mL 10% SDSu, 0,08 mL 10% roztworu nadsiarczanu amonu i 0,008 mL TEMEDu. Póbkę kolagenów o stężeniu 10 mg/mL przygotowano

przez rozpuszczenie białek w 1,5M buforze Tris-HCl o pH 6,8, zawierającym 2% SDSu i 5% β -merkaptotolanu, 25% glicerolu i 0,5 % błękitu bromofenolowego. Następnie próbki inkubowano przez 10 minut w 50°C w celu denaturacji białek. Próbki nanoszono do studzienek w objętości po 10 μ L. Elektroforezę prowadzono w buforze zawierającym 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicynę i 0,1% SDS w temperaturze pokojowej przy natężeniu prądu 50 mA. Po zakończeniu elektroforezy, żel barwiono przez 1 godzinę odczynnikiem barwiącym o stężeniu 0,1% rozpuszczonym w mieszaninie wody destylowanej, metanolu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 4:5:1. W celu odbarwienia tła, żel przemywano mieszaniną wody destylowanej, metanolu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 1:8:1 (Laemmli, 1970; Eckert, 2013).

3.3.1.8. Oznaczanie temperatury denaturacji, skurczu i topnienia kolagenu

Temperaturę denaturacji kolagenu wyznaczono metodami wiskozymetryczną oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej.

Wiskozymetryczną temperaturę denaturacji kolagenu oznaczono na podstawie pomiaru lepkości wiskozymetrem Brookfield'a, przy użyciu wrzeciona LV SC4 – 27 i szybkości ścinania 33,00 s^{-1} . Wyszuszone sublimacyjnie próby kolagenu o stężeniu 20 mg/mL rozpuszczono w 0,5 M kwasie octowym, w temp. 4°C. Roztwór mieszało magnetycznym przez 2 godziny. Pomiar wykonano w zakresie temperatur 18 ÷ 38°C, 5 ÷ 25°C i 20 ÷ 22°C, odpowiednio, dla kolagenów ze skór sumy, łososia i dorsza. Przyrost temperatury wynosił 0,5°C/minutę. Objętość próby użytej do oznaczeń wynosiła 10,4 mL.

Do oznaczenia temperatury denaturacji metodą kalorymetryczną wykorzystano różnicowy kalorymetr skaningowy (N – DSC III) CSC. Próby kolagenu o stężeniu 10 mg/mL rozpuszczono w temperaturze 4°C. Po rozpuszczeniu białka przeprowadzono dializę, wykorzystując jako rozpuszczalnik 0,5 M kwas octowy. Dializę prowadzono 96 godzin w 4°C. W kolejnym etapie próby odwirowano w celu oddzielenia frakcji rozpuszczalnej od nierozpuszczalnej. Pomiar temperatury denaturacji prowadzono w zakresie temperatur 2 ÷ 60°C, z szybkością ogrzewania 1°C/minutę.

Temperatury topnienia i skurczu włókien kolagenowych wyznaczono przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej, z zastosowaniem kalorymetru TA 3000 firmy Mettler. W celu wykonania pomiaru, suche preparaty naważano do aluminiowych

tygielków w ilości 1 ÷ 2 mg. Pomiar temperatury topnienia wykonano w zakresie temperatur 25 ÷ 140°C, z szybkością grzania 5°C/minutę. Pomiar temperatury skurczu wykonano w zakresie temperatur 25 ÷ 50°C, z szybkością grzania 1°C/minutę. W drugim przypadku białka zawieszano w 20 µL 0,05 M kwasu octowego i szczelnie zamykano tygle.

3.3.1.9. Oznaczanie twardości żeli żelatynowych

Twardość żeli żelatynowych oznaczono za pomocą uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Instron. Żelatyny z trzech surowców uzyskane metodą ekstrakcji wodą oraz denaturacji kolagenu odważono w ilości potrzebnej do przygotowania roztworu o stężeniu 6,67%, w standardowych butelkach Bloom zaopatrzonych w zatyczki. Otrzymane zawiesiny wymieszano i pozostawiono do spęcznienia przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Butelki ze spęczniałą żelatyną umieszczono w łaźni o temp. 65°C na czas 20 minut, od czasu do czasu mieszając ich zawartość w celu całkowitego rozpuszczenia białka. Po wyciągnięciu naczyń z żelatynami z łaźni, pozostawiono je przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie kondycjonowano w łaźni wodnej o temp. 10°C przez 16 godzin. W taki sam sposób przygotowano żele z żelatyn wzorcowych o znanych twardościach: 75, 175, 225 i 300°Bloom. Następnie przygotowane żele poddano ścisaniu trzpieniem aparatu o średnicy 0,5" z prędkością 0,5 mm/s na głębokość 4 mm. Twardość żelu wyznaczono w oparciu o równanie krzywej zależności twardości w skali Bloom od wartości przypisanej maksimum pikowi zarejestrowanego podczas pierwszego cyklu ścisania próby.

3.3.1.10. Oznaczanie temperatury topnienia żelatyny

Temperaturę topnienia żelatyny wyznaczono w oparciu o metodę Wainwrighta (1977). W pierwszej kolejności przygotowano żele zgodnie z metodyką opisaną w rozdz. 3.2.1.9. Następnie na powierzchnię żelu naniesiono kilka kropli mieszaniny zawierającej 75% chloroformu i 25% czerwonego barwnika, żel umieszczono w łaźni wodnej w temp. 10°C i zwiększano temperaturę łaźni z prędkością 0,2°C/min. Za temperaturę topnienia przyjęto temperaturę, dla której krople barwnika zaczęły swobodnie poruszać się w objętości badanego żelu (Ninan i in., 2014).

3.3.1.11. Ocena zdolności żelowania żelatyny

Ocenę zdolności żelatowania otrzymanych żelatyn dokonano na podstawie metodyki zaproponowanej przez Muyonga i współpracowników (2004). Roztwór żelatyny o stężeniu 10% (w/w) przygotowano w cienkościennej próbówce o wymiarach 12 x 75 mm, zgodnie z metodyką opisaną w rozdz. 3.2.1.9. Rozpuszczoną próbkę umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 40°C i rozpoczęto jej chłodzenie z prędkością 0,2°C/min. W próbce umieszczono termometr, który wyjmowano z roztworu żelatyny w 30 sekundowych odstępach w celu określenia czasu przejścia roztworu w żel. Temperaturę mieszaniny, w której roztwór żelatyny przestał spływać z końca termometru rejestrowano jako temperaturę żelowania białka. Czas żelowania żelatyn określono wykorzystując tę samą procedurę analityczną. Rozpuszczoną próbkę żelatyny umieszczano w łaźni wodnej o temp. 10°C, a następnie do roztworu białka wprowadzono cienką bagietkę, którą wyciągano z roztworu co 15 sekund. Czas, w którym bagietka nie mogła odłączyć się od roztworu żelatyny rejestrowano jako czas żelowania. Na podstawie uzyskanych punktów pomiarowych dla każdego z badanych białek stworzono wykres zależności temperatury żelowania od czasu żelowania. Pozwala to na wyznaczenie czasu potrzebnego do zżelowania białka w określonej temperaturze.

3.3.2. Przygotowanie i charakterystyka chitozanowych materiałów kserożelowych

3.3.2.1. Modyfikacja chitozanu

Modyfikację chitozanu przeprowadzono zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Kumara i współpracowników (2013). Do mieszaniny 15,89 g bezwodnika N-propylofosfonowego i 3,72 g hydroksybenzotriazolu dodano 3,68 g trimetyloaminy. Reagenty mieszano przez 2 godziny w temp. 30°C, po czym do mieszaniny dodano 20 g wody destylowanej i 5 g chitozanu przez 24 godz. utrzymując temp. 30°C. Modyfikowany chitozan oczyszczono z mieszaniny reakcyjnej nadmiarem acetonu i przemyto mieszaniną metanol:aceton użytą w stosunku objętościowym 1:1, wykorzystując do tego celu zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem. Przemycanie zakończono w momencie, kiedy kolejna objętość mieszaniny rozpuszczalników nie ulegała zabarwieniu przez mieszaninę poreakcyjną.

3.3.2.2. Przygotowanie roztworu chitozanu niemodyfikowanego

Roztwór chitozanu niemodyfikowanego przygotowywano wykorzystując metodę rozpuszczania polimeru w wodzie destylowanej nasycanej ditenkiem węgla (Gorczyca i in., 2014). W tym celu 1,5 g chitozanu rozpuszczano w 100 mL 0,1 M roztworu kwasu mlekowego, po czym dodawano stopniowo 0,5 M roztworu wodorotlenku sodu, przy ciągłym mieszaniu, do momentu osiągnięcia pH 8,5, w którym następuje całkowite strącenie chitozanu z roztworu. Osad odwirowano (9000 x g, 30 min), trzykrotnie przemyto wodą destylowaną i ponownie odwirowano. Uzyskany osad ważono i zawieszano w wodzie destylowanej, tak aby całkowita masa roztworu wraz z osadem wynosiła 150 g. Przygotowaną zawiesinę osadu mieszano z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego wyposażonego w dyfuzor, nasycając jednocześnie ditenkiem węgla do momentu całkowitego rozpuszczenia osadu.

3.3.2.3. Otrzymywanie kompozytów chitozanowych

Skład kompozytów chitozanowych poddanych testom przedstawiono w tabeli 6.

Tab. 6. Zestawienie testów wykonanych do oceny właściwości otrzymanych kompozytów chitozanowych oraz odpowiadające im warianty prób .

Material	Zawartość chitozanu modyfikowanego w suchym kompozycie [%]	Badane właściwość materiału
CHI (kontrola)	0	morfologia (SEM*, porowatość) struktura chemiczna (FTIR)** właściwości mechaniczne (twardość, elastyczność) właściwości cytotoksyczne*** właściwości przeciwtleniające***
p-CHI ₂₅	25	
p-CHI ₅₀	50	
p-CHI ₇₅	75	
p-CHI ₁₀₀	100	
CHI (kontrola)	0	chłonność rozpuszczalność właściwości przeciwdrobnoustrojowe
p-CHI ₁₅	15	
p-CHI ₂₅	25	
p-CHI ₄₀	40	

* z wyjątkiem próby p-CHI₅₀,

** z wyjątkiem prób p-CHI₂₅ i p-CHI₇₅,

*** z wyjątkiem prób p-CHI₂₅, p-CHI₅₀ i p-CHI₇₅.

Materiały wykonane wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego oznaczono skrótem CHI, natomiast materiały zawierające określony dodatek modyfikowanej pochodnej chitozanu jako p-CHI_x, w których indeks „x” oznacza procentowy udział masowy fosforylowanej pochodnej w kompozycie.

Chitozan modyfikowany odczynnikiem T3P rozpuszczono w odpowiedniej ilości wody do uzyskania stężenia 2%, wykorzystując w tym celu mieszadło mechaniczne. 1% roztwór chitozanu niemodyfikowanego przygotowywano zgodnie z metodyką opisaną w rozdz. 3.2.2.2. Tak przygotowane roztwory chitozanów łączono ze sobą za pomocą mieszadła mechanicznego według ustalonych stosunków masowych (Tab. 6), a następnie przelewano do płytek 12-dołkowych, zamrażano i suszono sublimacyjnie (0,94 mbar, temp. próby: 20°C, temp. kondensatora: - 50°C).

3.3.2.4. Morfologia materiałów kserożelowych

Zmiany w morfologii powierzchni materiałów powstałe na skutek modyfikacji chitozanu grupami fosforowymi pochodzącymi z bezwodnika kwasu N-propylofosfonowego zbadano techniką skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Badane próby obrazowano skaningowym mikroskopem elektronowym, wyposażonym w działo elektronowe z emisją polową tzw. FEG w trybie wysokiej próżni przy napięciu przyspieszającym wiązki 5 kV oraz prądzie 1,6 lub 3,3 pA.

3.3.2.5. Porowatość kserożeli

Porowatość kserożeli chitozanowych wyznaczono na podstawie metody zaprezentowanej przez Yang'a i współpracowników (2010). Przygotowane wcześniej roztwory chitozanów w odpowiednim stosunku masowym (wg. 3.2.2.3), przelano do form w kształcie walca o średnicy podstawy 2,5 cm i wysokości 2 cm, zamrożono i wysuszono sublimacyjnie. Suche próby zważono, a następnie umieszczono w płytkach dołkowych i zalano etanolem w taki sposób, aby w całości były one zanurzone w alkoholu. Płytki z próbami zamknięto, aby zapobiec parowaniu etanolu i przechowywano w temperaturze 25°C przez 24 godz., a następnie ponownie zważono. Porowatość obliczono na podstawie równania:

$$P (\%) = \frac{(W_{24} - W_0) \cdot \rho}{V_m} \cdot 100 \quad (9)$$

gdzie:

P – porowatość materiału [%],

W_{24} – masa materiału po 24 godz. inkubacji w etanolu [g],

W_0 – masa początkowa materiału [g],

ρ – gęstość etanolu w 25°C [0,803 g/mL].

3.3.2.6. Opis struktury chemicznej

Do wykonania analizy struktury chemicznej materiałów wykorzystano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera. Pomiary wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdz. 3.2.1.6.

3.3.2.7. Właściwości mechaniczne kserożeli

Właściwości mechaniczne materiałów chitozanowych badano z wykorzystaniem uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Instron, zgodnie z powszechnie stosowaną metodologią (Bi i in., 2011; Hoyer i in. 2012).

Cylindryczne formy materiałów poddawano dwukrotnemu ścisłaniu do 50% odkształcenia. Siłę powstającą w trakcie ścisłania mierzono przy szybkości przesuwu głowicy 0,5 mm/s. W oparciu o uzyskane wyniki wyznaczono wartości parametrów profilu tekstury: twardość oraz elastyczność - szybkość odzyskiwania kształtu po ściśnięciu. Wyniki pomiarów stanowią wartość średnią uzyskaną z 5 pięciu powtórzeń niezależnych prób.

3.3.2.8. Chłonność materiałów

Do badania chłonności chitozanowych gąbek wykorzystano metodę grawimetryczną zgodną z normą PN-EN 13726-1:2005. Chłonność mierzono poprzez dwukrotne ważenie materiałów: przed zanurzeniem oraz po inkubacji w wodnym roztworze soli, imitującym płyn fizjologiczny. Roztwór ten przygotowano poprzez rozpuszczenie 8,298 g NaCl i 0,368 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ w 1000 mL wody destylowanej. Próbki zważono, a następnie inkubowano przez 24 godz. w 37°C w roztworze soli, w szczelnie zamkniętych falkonach. Po inkubacji każdą z gąbek powtórnie zważono, poprzedzając ten etap 30-sekundową przerwą po wyciągnięciu materiału z roztworu, w celu usunięcia jego niewchłoniętego nadmiaru. Chłonność materiału obliczono według równania:

$$S(\text{g/g}) = \frac{w_1 - w_0}{w_0} \quad (10)$$

gdzie:

S – chłonność materiału [g/g],

w₁ – masa materiału po 24 godz. inkubacji w roztworze soli [g],

w₀ – masa początkowa materiału [g].

3.3.2.9. Rozpuszczalność materiałów w roztworze imitującym płyn fizjologiczny

Rozpuszczalność materiałów zbadano wykorzystując metodę gravimetryczną z normą PN-EN 13726-1:2005. Gąbki zanurzono w wodnym roztworze soli imitującym płyn fizjologiczny. Roztwór ten przygotowano poprzez rozpuszczenie 8,298 g NaCl i 0,368 g CaCl₂·2H₂O w 1000 mL wody destylowanej. Próbkę zważono i poddano inkubacji w 37°C. Badane materiały wyjmowano po jednym i siedmiu dniach inkubacji z roztworu soli, zamrażano i suszono, po czym ponownie ważono. Rozpuszczalność w roztworze imitującym płyn fizjologiczny obliczono według równania:

$$D(\%) = \frac{w_0 - w_2}{w_0} \cdot 100 \quad (11)$$

gdzie:

D – rozpuszczalność materiału [%],

w₀ - masa początkowa materiału [g],

w₂ – masa materiału po suszeniu sublimacyjnym [g].

3.3.3. Oznaczanie właściwości przeciwutleniających kserożeli

Zdolność otrzymanych materiałów do neutralizacji kationo-rodników ABTS i wolnych rodników tlenowych DPPH badano według zmodyfikowanej metody zaproponowanej przez Re i współpracowników (1999). W tym celu próbki o różnej masie testowych materiałów zawieszano w 5 mL przygotowanego uprzednio roztworu ABTS, rozcieńczonego metanolem do wartości absorbancji równej 1,00 ± 0,01 przy długości fali 734 nm i roztworu DPPH rozcieńczonego metanolem do wartości absorbancji równej 1,00 ± 0,01 przy długości fali 540 nm, a następnie inkubowano przez 2 godz. w ciemności, w temp. 37°C przy ciągłym delikatnym wytrząsaniu. Roztwór ABTS przygotowano przez rozpuszczenie 3,48 g soli ABTS i 0,66 g nadsiarczanu potasu w 0,01 M buforze fosforanowym o pH 7,4 i inkubację w ciemności przez 15 godz. w temperaturze pokojowej. Roztwór DPPH przygotowano przez bezpośrednie

rozpuszczenie odczynnika w metanolu. Stopień neutralizacji (SN) kationo-rodnika ABTS i rodnika DPPH wyznaczano według równania:

$$SN = \left[1 - \frac{A_p}{A_k}\right] \cdot 100 \quad (12)$$

gdzie:

SN - stopień neutralizacji kationo-rodnika ABTS lub rodnika DPPH [%],

A_p - absorbancja próby badanej,

A_k - absorbancja próby kontrolnej.

W oparciu o równanie regresji liniowej wyznaczano wartość EC_{50} , jako masę próby materiału potrzebną do neutralizacji 50% rodnika zawartego w 1 mL roztworu ABTS lub DPPH po 2 godzinach inkubacji. Kontrolę stanowił odpowiednio roztwór kationo-rodnika ABTS lub roztwór rodnika DPPH. Każdy eksperyment powtarzano trzy razy.

3.3.4. Oznaczanie zdolności kserożeli do sorpcji jonów metali

Zdolność sorpcji jonów metali przez materiały kserożelowe oceniono na podstawie zdolności do chelatowania jonów Fe^{2+} w oparciu o metodę opisaną przez Yen i współpracowników (2008). W tym celu próbki o różnej masie testowych materiałów zawieszano w 4 mL roztworu stanowiącego kompleks ferrozyny z jonami Fe^{2+} , inkubowano w ciemności przez 2 godz. w temp. $37^{\circ}C$, przy ciągłym delikatnym wytrząsaniu. Roztwór ferrozyny z jonami Fe^{2+} otrzymywano przez zmieszanie 3,7 mL metanolu, 0,1 mL 2mM metanolowego roztworu $FeCl_2$ i 0,2 mL 5mM wodnego roztworu ferrozyny. Roztwór rozcieńczano metanolem do wartości absorbancji równej $1,00 \pm 0,01$ przy długości fali 540 nm. Stopień chelatowania (SC) jonów Fe^{2+} wyznaczano według równania:

$$SC = \left[1 - \frac{A_p}{A_k}\right] \cdot 100 \quad (13)$$

gdzie:

SC - stopień chelatowania jonów Fe^{2+} [%],

A_p - absorbancja próby badanej,

A_k - absorbancja próby kontrolnej.

W oparciu o równanie regresji liniowej wyznaczano wartość EC_{50} , jako masę próby materiału potrzebną do chelatowania 50% kationów Fe^{2+} zawartych w 1 mL ich roztworu po 2 godz. inkubacji. Kontrolę stanowił roztwór kompleksu jonów Fe^{2+} z ferrozyną. Każdy eksperyment powtarzano trzy razy.

3.3.4.1. Oznaczanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych kserożeli

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe materiałów wykonano zgodnie z normą JIS L 1902 z drobnymi modyfikacjami. W pierwszym etapie odświeżono hodowlę bakterii *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* na płytkach z podłożem TSB oraz drożdży *C. albicans* na podłożu Sabourauda. W tym celu jedno oczko ezy przesiano na podłoże stałe i inkubowano w cieplarni w temp. $37^{\circ}C$ przez 24 godz. Z hodowli na płycie przygotowano zawiesiny komórek w roztworze PBS o liczebności w przedziale od $1,5 \times 10^7$ do 5×10^7 CFU/ml w przypadku bakterii oraz $0,5 \times 10^6$ do 2×10^6 CFU/ml w przypadku drożdży. Liczebność komórek w zawiesinie określano na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru gęstości (OD), która mierzona dla zawiesiny bakterii przy długości fali 600 nm wynosiła $0,08 \div 0,1$, natomiast dla drożdży mierzona przy długości fali 660 nm wynosiła 0,1. Z testowanych materiałów wycięto kwadraty o boku 2,5 cm i grubości 0,5 cm i jałowiono je światłem UV przez 30 minut. Kwadraty umieszczano w jałowej wodzie destylowanej, a po czasie 1 godz. przenoszono na płytki Petriego. Na każdym z kwadratów umieszczonych na płytkach Petriego rozprowadzono równomiernie po 0,2 mL inokulum. Bezpośrednio po inokulacji materiały kontrolne przenoszono do 10 mL roztworu PBS i wytrząsano pięciokrotnie po 5 sekund przy użyciu wortexa. Wykonano seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia oraz posiewy na podłożu TSA. Płytki inkubowano w cieplarni 24 godz. w temp. $37^{\circ}C$. Materiały badane inkubowano z inokulum w cieplarni przez 24 godz. w temp. $37^{\circ}C$, a następnie wykonywano dla nich taką samą procedurę jak dla prób. Po inkubacji zliczano kolonie bakteryjne i drożdżowe, które wyrosły na płytkach Petriego z odpowiednimi podłożami. Do obliczenia liczby komórek przypadającej na mL zawiesiny wyjściowej wykorzystano wyniki zliczeń kolonii, których ilość po inkubacji na płytkach mieściła się w zakresie $30 \div 300$ jednostek. Aktywność przeciwdrobnoustrojową w skali logarytmicznej obliczono według równania:

$$R = \log \frac{B}{C} \quad (14)$$

gdzie:

R - wartość aktywności przeciwdrobnoustrojowej w skali logarytmicznej,

B - średnia liczba żywych komórek w próbce kontrolnej po 24 godzinach,

C - średnia liczba żywych komórek w próbce badanej po 24 godzinach.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową, określoną jako procent redukcji bakterii/drożdży przez kompozyty chitozanowe w stosunku do materiału kontrolnego, obliczono wiedząc, że redukcja o jeden dwa i trzy stopnie logarytmiczne powoduje odpowiednio 90, 99 i 99,9% redukcję wzrostu drobnoustrojów w skali procentowej.

3.3.4.2. Oznaczanie cytotoksyczności kserożeli względem komórek L929

Cytotoksyczność otrzymanych materiałów chitozanowych oceniano za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej bromku 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu (MTT) zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-5:2009. Komórki fibroblastów mysich L929 wysiano do 96-dółkowej płytki do hodowli tkankowej, w ilości 1×10^4 komórek/studzienkę. Do studzienek peryferyjnych wprowadzono wyłącznie po 100 μL pożywki hodowlanej jako odniesienie. Komórki inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C przy wilgotności względnej $>90\%$, w atmosferze o stężeniu 5% CO_2 , w celu wytworzenia półpłynnej monowarstwy komórek (Coecke i in., 2005). Po 24-godzinnej inkubacji pożywkę hodowlaną usunięto z komórek i dodano do nich po 100 μL pożywki, zawierającej odpowiednie stężenie próbek lub pozytywną kontrolę, wywołującą efekt cytotoksyczny. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano 0,1% roztwór fenolu. Testowane materiały podawano do komórek w postaci ekstraktów uzyskanych zgodnie z normą BS-EN ISO 10993-12:2004. Próbki materiałów chitozanowych wykonanych w 100% z polimeru modyfikowanego oraz niemodyfikowanego zawieszono w soli fizjologicznej w ilości 0,2 g/mL. Ekstrakcję prowadzono w sterylnych pojemnikach z zamknięciem w temp. $37 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 24 godziny. Zamknięte próbki po zakończonej ekstrakcji poddawano wirowaniu (1000 x g, 3 min.) w celu ułatwienia poboru próbki podawanej komórkom. Po kolejnych 24 godzinach inkubacji zbadano żywotność i morfologię komórek. Zdjęcia komórek wykonano mikroskopem optycznym przy powiększeniu 125x. Znad hodowli usunięto pożywkę zawierającą dodatek ekstraktów, a następnie do dołków płytki naniesiono po 50 μL roztworu MTT. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w temp. 37°C w atmosferze o stężeniu 5% CO_2 . Po inkubacji roztwór MTT usunięto z dołków, a kryształy

formazanu w każdej studziencie zawieszono w 100 μ L izopropanolu. Płytkę z komórkami wytrząsano przez 10 minut, a następnie zmierzono absorbcję za pomocą czytnika płytek przy długości fali 570 nm. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach. Ilość powstałego niebieskofioletowego formazanu, mierzonego spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm była zależna od liczby żywych komórek po zakończonej inkubacji. Żywotność komórek poddanych działaniu ekstraktów chitozanu modyfikowanego w rozcieńczeniach 1:1, 1:5 i 1:10 w stosunku do ilości dodawanej pożywki hodowlanej i w odniesieniu do próby ślepej obliczono według równania:

$$\text{Żywotność komórek (\%)} = 100 \times OD_{570e} / OD_{570pc} \quad (15)$$

gdzie:

OD_{570e} - średnia wartość gęstości optycznej próbek,

OD_{570pc} - średnia wartość gęstości optycznej pozytywnej kontroli (komórki L929) w pożywce hodowlanej.

3.3.5. Przygotowanie i charakterystyka chitozanowych materiałów hydrożelowych

3.3.5.1. Przygotowanie roztworu płaszcza kapsulek

Do formowania płaszcza kapsułki stosowano 2% roztwór chitozanu lub 4% roztwór alginianu sodu. Odpowiednią masę chitozanu, o DD równym 75 ÷ 85%, rozpuszczano w 0,1M roztworze kwasu mlekowego z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego do momentu uzyskania klarownego roztworu.

4% roztwór alginianu sodu przygotowywano wprowadzając sukcesywnie odpowiednią masę polimeru do wody destylowanej mieszanej z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego. W celu rozbicia tworzących się nierozpuszczonych aglomeratów alginianu, roztwór homogenizowano trzykrotnie po 5 sekund. Roztwory polimerów były gotowe do użycia po 3 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej, która miała na celu usunięcie pęcherzyków powietrza uwieczonych w roztworze podczas intensywnego mieszania.

3.3.5.2. Przygotowanie rdzenia olejowego

Jako rdzeń kapsulek w badaniach wykorzystano oleje rzepakowy rafinowany i wysokolinolenowy lniany tłoczony na zimno, które nie były poddawane żadnej

obróbce przed zakapsułkowaniem. Wyjątek stanowiły próby oleju wykorzystane w teście opisanym w rozdz. 3.3.13, w którym kapsułkowaniu poddano oba wymienione oleje z 0,03% dodatkiem ekstraktu z rozmarynu (Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2011 r.). Ekstrakt w olejach rozprowadzano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 20 minut, bezpośrednio przed ich kapsułkowaniem.

Ekstrakt rozmarynu przygotowano w następujący sposób: do kolby okrągłodennej o pojemności 250 mL odważono 15 g rozmarynu i dodano 150 mL 80% etanolu. Kolbę umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 80°C, a jej zawartość ekstrahowano 3-krotnie po godzinie. Pomędzy kolejnymi ekstrakcjami zawartość kolby energicznie wytrząsano (Sielicka, 2014). W celu oddzielenia wyciągu od rozpuszczalnika po przeprowadzonej ekstrakcji próbki przesączono, a otrzymane wyciągi zagęszczono za pomocą wyparki rotacyjnej. Zagęszczone ekstrakty umieszczono w kolbach miarowych o pojemności 25 mL i dopełniono do kreski 96% alkoholem etylowym. Przygotowane roztwory ekstraktów przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analizy (Małecka i in., 2003). W tak przygotowanych ekstraktach oznaczano zawartość suchej masy. Oznaczenie polegało na wysuszeniu 1 mL próbki ekstraktu do stałej masy w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 105°C i zważeniu pozostałości. Aby wprowadzić ekstrakt do oleju, rozpuszczono go w odpowiedniej objętości 80% etanolu. Próbkę olejów z dodatkiem ekstraktu z rozmarynu otrzymano poprzez wymieszanie ich w odpowiednim stosunku objętościowym oleju do roztworu ekstraktu przy użyciu mieszadła magnetycznego, jednocześnie przedmuchując azotem do całkowitego zaniku zapachu etanolu. Taką samą procedurę zastosowano również dla próbek kontrolnych. Ilość ekstraktu dodanego do olejów wynosiła 30 mg suchego ekstraktu na 1 kg oleju.

3.3.5.3. Przygotowanie roztworów utwardzających

Formujące się kapsułki chitozanowe zbierano do roztworu utwardzającego, który przygotowano przez zmieszanie 173,6 g 96% alkoholu etylowego, 206,4 wody destylowanej oraz 20 g wodorotlenku sodu. Podczas przygotowywania roztworu utwardzającego w pierwszej kolejności rozpuszczano wodorotlenek sodu w wodzie destylowanej, a dopiero po ochłodzeniu mieszaniny dodawano do tego odpowiednią

masę czystego etanolu. Zjawisko kontrakcji podczas mieszania etanolu z wodą uwzględniono posługując się stężeniami masowymi tak, aby finalne objętościowe stężenie alkoholu etylowego wynosiło 50% (Sano i in., 1999). Formujące się kapsułki alginianowe zbierano do 4% wodnego roztworu mleczanu wapnia.

3.3.6. Kapsułkowanie oleju

W celu zamknięcia oleju w hydrożelowych kapsułkach posłużono się współosiową metodą enkapsulacji, opracowaną w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej (Kat. ChTiBŻ). W metodzie tej przepływ poszczególnych mediów przez głowicę odbywa się w sposób uniemożliwiający ich wzajemne mieszanie się (Tylingo i in., 2016).

Ze względu na fakt, że projekt aparatury do kapsułkowania i jego realizacja stanowią jeden z wyników pracy, dokładny opis aparatury umieszczono w części rozprawy dotyczącej wyników i ich dyskusji (rozdz. 4.3).

W celu wyprodukowania hydrożelowych kapsułek o strukturze kropla w kropli, olej i roztwór chitozanu lub alginianu sodu umieszczono w odpowiednich kolbach ssawkowych. Instalację uruchamiano przez odkręcenie zaworów butli z azotem, a następnie regulację prędkości przepływu roztworu chitozanu i oleju za pomocą rotametrów do momentu uzyskania struktury kropla w kropli. W dalszej kolejności pod głowicą aparatury umieszczano szklany krystalizator o średnicy 150 mm, wypełniony 250 mL roztworu utwardzającego. Krystalizator umieszczony był na płycie mieszadła magnetycznego, ponieważ mieszanie roztworu podczas kapsułkowania zapobiegało zlepianiu się wpadających do roztworu utwardzającego kapsułek. Odległość między lustrem roztworu utwardzającego a wylotem igieł głowicy wynosiła 5 cm. Spadek kropli do roztworu następował grawitacyjnie lub wspomagany był strumieniem gazu inertnego, w zależności od zamierzonego celu eksperymentu. Gotowe kapsułki chitozanowe utwardzano w tym samym roztworze przez kolejne 2 godziny, następnie przemywano wodą destylowaną do momentu osiągnięcia pH 7,0. Kapsułki alginianowe utwardzano także przez 2 godziny, a następnie płukano wodą destylowaną w objętości 10-krotnie większej w stosunku do masy uformowanych kapsułek. Czynność powtarzano 3-krotnie.



3.3.7. Dobór optymalnych warunków przepływu mediów przez głowicę aparatury

Dobór optymalnych warunków przepływu roztworów płaszczu i rdzenia dokonano na podstawie kapsułkowania oleju rzepakowego w płaszczu chitozanowym. Ze względu na brak istotnych różnic w lepkościach oleju rzepakowego i lnianego w tych samych warunkach temperatury i szybkości ścinania wykonanie oddzielnych pomiarów nie było konieczne. Stężenie roztworu alginianu dobrano w taki sposób, aby jego lepkość w warunkach kapsułkowania odpowiadała 2% roztworowi chitozanu.

3.3.7.1. Wpływ prędkości przepływu roztworu płaszczu na zawartość oleju w kapsułkach i ich średnicę

Wpływ prędkości przepływu roztworu chitozanowego płaszczu na średnicę kapsułek oraz ilość zamkniętego w nich oleju określono stosując metodykę tworzenia kapsułek zgodną z rozdz. 3.3.6. Do pomiarów zebrano sześć partii kapsułek, dla utworzenia których zastosowano następujące prędkości przepływu gazu tłoczącego roztwór płaszczu: 0,6 L/godz., 1,2 L/godz., 1,8 L/godz., 2,4 L/godz., 3,0 L/godz., 3,6 L/godz. Wartością stałą podczas trwania testu była prędkość przepływu gazu tłoczącego olej wynosząca 0,2 L/godz. Podczas doświadczenia monitorowano masę kapsułek wpadających do roztworu utwardzającego. Pomiar ten umożliwił określenie masowych prędkości przepływu mediów przez głowicę.

3.3.7.2. Wpływ prędkości przepływu gazu zrywającego krople na zawartość oleju w kapsułkach i ich średnicę

Wpływ prędkości przepływu roztworu zrywającego krople do roztworu utwardzającego na średnicę kapsułek oraz ilość zamkniętego w ich wnętrzu oleju określono stosując metodykę tworzenia kapsułek zgodną z rozdz. 3.3.6. Do pomiarów zebrano pięć partii kapsułek, dla utworzenia których zastosowano następujące prędkości przepływu gazu zrywającego krople: 0 L/godz., 200 L/godz., 400 L/godz., 600 L/godz. i 800 L/godz. Wartością stałą podczas trwania testu była prędkość przepływu gazu tłoczącego olej wynosząca 0,2 L/godz. oraz optymalna wartość przepływu roztworu płaszczu wyznaczona na podstawie doświadczenia opisanego w rozdz. 3.2.7.1. Podczas doświadczenia monitorowano masę kapsułek

wpadających do roztworu utwardzającego. Pomiar ten umożliwił określenie masowych prędkości przepływu mediów przez głowicę.

3.3.8. Wyznaczanie średnicy kapsułek

Średnicę hydrożelowych kapsułek zmierzono za pomocą mikroskopu optycznego z przystawką do zapisywania obrazu. Do pomiaru wybierano kapsułki w sposób losowy. Każdą kapsułkę bezpośrednio przed pomiarem pobierano ze zlewki z wodą destylowaną. Osuszano z nadmiaru wody na sączku filtracyjnym, umieszczano na szkiełku podstawowym, które wprowadzano pod obiektyw mikroskopu i po wykonaniu zdjęcia dokonywano pomiaru średnicy wykorzystując funkcję programu Scope Image Advanced. Wynik pomiaru średnicy stanowiła wartość średnia z dwudziestu odczytów sporządzonych z tej samej partii kapsułek.

3.3.9. Wyznaczanie zawartości oleju w kapsułkach

Zawartość oleju w kapsułkach oznaczono wykorzystując metodę ekstrakcji na gorąco z eterem naftowym. Ok. 5 g hydrożelowych kapsułek ważono z dokładnością do 0,001 g, zamrożono i poddano suszeniu sublimacyjnemu. Suche kapsułki ponownie ważono, niszczone i przenoszono ilościowo do gilzy ekstrakcyjnej. Kolbę okrągłodenną o pojemności 250 mL ważono, a następnie uzupełniano 50 mL eteru naftowego. Kolbę umieszczono pod chłodnicą zwrotną oraz w płaszczu grzejnym. Gilzę z kapsułkami zawieszono w kolbie nad lustrem cieczy i uruchamiono płaszcz grzejny. Ekstrakcję prowadzono 60 minut od momentu rozpoczęcia wrzenia rozpuszczalnika. W kolejnym etapie eter odparowywano z użyciem obrotowej wyparki próżniowej. W celu usunięcia ewentualnych pozostałości rozpuszczalnika, wewnątrz kolby z olejem osuszano strumieniem azotu, a następnie ponownie ważono. Zawartość oleju dla każdej partii kapsułek oznaczano w trzech powtórzeniach.

Zawartość oleju w odniesieniu do hydrożelowych kapsułek obliczono według równania:

$$OC (\%) = \frac{M_{02} - M_{01}}{M_k} \cdot 100 \quad (16)$$

gdzie:

OC - zawartość oleju w hydrożelowych kapsułkach [%],

M_{O2} – masa oleju w kolbie okrągłodennej po ekstrakcji i odparowaniu rozpuszczalnika [g],

M_{O1} – masa pustej kolby okrągłodennej z kaolinem [g],

M_k – masa kapsułek przed suszeniem [g].

Warunki oznaczania zawartości oleju zgodnie z powyższą metodą ustalono w odniesieniu do standardowej metody ekstrakcji w aparacie Soxhleta (Manirakiza i in., 2001)

Porównania wydajności kapsułkowania oleju we wszystkich otrzymanych rodzajach kapsułek dokonano na podstawie stosunku masy oleju przypadającej na suchą masę polimeru potrzebną do jego zakapsułkowania (M_o/M_p). Wprowadzenie takiego parametru było konieczne ze względu na fakt występowania dwóch zmiennych: prędkości przepływu roztworu płaszczu i prędkości gazu zrywającego krople. Stosunek M_o/M_p obliczono dzieląc wynik równania 18 przez wynik równania 19 dla danego rodzaju kapsułek. Parametry M_o i M_p wyznaczono według poniższych równań:

$$M_o = \frac{\frac{4}{3}\left(\frac{CD}{2}\right)^3 \cdot \pi \cdot \rho_o \cdot OC}{1000} \quad (17)$$

$$M_p = \left(\frac{\frac{4}{3}\left(\frac{CD}{2}\right)^3 \cdot \pi}{1000} - \frac{\frac{4}{3}\left(\frac{CD}{2}\right)^3 \cdot \pi \cdot \rho_o \cdot OC}{1000} \right) \cdot 0,02 \quad (18)$$

gdzie:

$\frac{CD}{2}$ – promień kapsułki [mm],

ρ_o – gęstość oleju rzepakowego w temperaturze 25°C [0,915 g/mL],

OC – zawartość oleju w kapsułkach [%] (wg rozdz. 3.3.9),

0,02 – stężenie chitozanu w roztworze płaszczu [%].

3.3.10. Wpływ wilgotności względnej na stopień zatrzymania oleju w kapsułkach

W celu określenia wpływu wilgotności względnej otoczenia na stopień zatrzymania oleju, kapsułki wytworzone metodą współosiową zgodnie z procedurą opisaną w rozdz. 3.3.6 rozmieszczono po 100 sztuk, w 3 powtórzeniach, na szalkach Petriego o średnicy 100 mm, dla wilgotności względnych: 30, 40, 50, 60, 70 %. Szalki pokryto materiałem zapobiegającym przywieraniu prób do podłoża. Kapsułki w szalkach umieszczono w komorze wilgotnościowej z wymuszonym obiegiem powietrza

w temp. 40°C na czas 48 godzin. Po zakończonej inkubacji obliczano procentową ilość kapsułek, które w dalszym ciągu utrzymywały olej w swoim wnętrzu.

3.3.11. Wpływ podstawowych zmiennych kapsułkowania na stabilność modelowych olejów jadalnych w teście krótkotrwałego przechowywania

Stabilność rafinowanego oleju rzepakowego oraz tłoczonego na zimno oleju lnianego badano na podstawie pomiaru liczby nadtlenkowej oraz anizydynowej, świadczących o zawartości pierwotnych i wtórnych produktów utleniania. W teście porównano szybkość utleniania się oleju po zakapsułkowaniu go za pomocą głowicy szklanej oraz głowicy wykonanej ze stali. Dla każdej z głowic sprawdzono następujące 3 warianty: olej przetłoczony wewnętrzną igłą bez tworzenia otoczki, olej kapsułkowany w nośniku chitozanowym oraz olej kapsułkowany w nośniku alginianowym. Oznaczenia charakterystycznych liczb wykonano bezpośrednio po każdej operacji obróbki, a także po tygodniowym przechowywaniu prób w temp. 4, 25 i 40°C. Kapsułki z olejem zamknięte były w szklanych butelkach zawierających wodę destylowaną, niezbędną do utrzymania struktury hydrożelu. Próbę kontrolną stanowił olej termostatowany w dokładnie takich samych warunkach, jak opisane powyżej próby oleju w postaci kapsułek.

3.3.12. Ocena ochronnej roli płaszcza kapsułki na stabilność oksydacyjną olejów jadalnych podczas testów przyspieszonego starzenia

Ocenę ochronnej roli płaszcza kapsułek na stabilność oksydacyjną olejów jadalnych zamykanych w hydrożelowych otoczkach z chitozanu lub alginianu sodu przeprowadzono stosując testy przyspieszonego starzenia. Kapsułki chitozanowe oraz alginianowe zawierające olej rzepakowy lub lniany przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdz. 3.3.6. Próby wszystkich rodzajów kapsułek umieszczono w komorze termostatycznej, w temp. 40°C i przechowywano je przez 4 tygodnie. Kapsułki z olejem zamknięte były w szklanych butelkach zawierających wodę destylowaną, niezbędną do utrzymania struktury hydrożelu. Termostatowaniu poddano także oleje niekapsułkowane, stanowiące próby odniesienia i zamknięte w identycznych szklanych butlach. Zmiany oksydacyjne olejów zmierzono na podstawie liczby nadtlenkowej, anizydynowej, wskaźnika TOTOX oraz liczby kwasowej. Pomiary dla prób kontrolnych wykonano bezpośrednio po otwarciu olejów. Pomiary dla olejów kapsułkowanych

wykonano bezpośrednio po zakapsułkowaniu oraz po 2 i 4 tygodniach przechowywania w temp. 40°C.

3.3.13. Ocena dodatku przeciwutleniacza na ochronę olejów kapsułkowanych metodą współosiową w testach przyspieszonego starzenia

Ocenę wpływu dodatku przeciwutleniacza do oleju lnianego i rzepakowego, obu kapsułkowanych metodą współosiową, na przedłużenie ich stabilności dokonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale (3.2.12). Różnica w doświadczeniu polegała na wprowadzeniu do każdego z kapsułkowanych olejów 0,03% dodatku ekstraktu z rozmarynu, zgodnie z rozdziałem 3.2.5.2.

3.3.14. Pomiar liczb charakterystycznych olejów

3.3.14.1. Oznaczanie liczby nadtlenkowej

Pomiar liczby nadtlenkowej wykonano zgodnie z metodyką zawartą w farmakopei polskiej (Farmakopea Polska, 2006).

Ok. 5 g oleju odważono z dokładnością do 0,001 g do kolby stożkowej ze szlifem i rozpuszczono w 12 mL chloroformu.

W celu oznaczenia liczby nadtlenkowej zakapsułkowanego oleju, ok. 15 g hydrożelowych kapsułek naważono z dokładnością do 0,001 g, a następnie niszczone w moździerzu i ekstrahowano 3-krotnie sumaryczną objętością chloroformu równą 12 mL. Chloroform z rozpuszczonym olejem przeniesiono do kolby stożkowej ze szlifem. Kolejne etapy procedury oznaczania liczby nadtlenkowej przeprowadzono w jednakowy sposób.

Do rozpuszczonego w chloroformie oleju dodano 18 mL lodowatego kwasu octowego, a następnie 0,5 mL nasyconego roztworu jodku potasu. Kolbę zamykano korkiem ze szlifem, mieszano przez 1 minutę, dodawano 30 mL wody destylowanej i 5 mL 0,5% roztworu skrobi. Całość po wymieszaniu miareczkowano mianowanym roztworem tiosiarczanu sodu. Równocześnie przeprowadzono pomiar próby ślepej. Wartość liczby nadtlenkowej [meqO₂/kg] dla badanych próbek obliczano według równania:

$$LOO = \frac{M \cdot (V_1 - V_2) \cdot 1000}{m} \quad (19)$$

gdzie:

M - miano roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,002N),

V_1 - objętość roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zużyta do miareczkowania analizowanej próby [mL],

V_2 - objętość roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zużyta do miareczkowania próby ślepej [mL],

m - masa analizowanej próby oleju, w przypadku oleju kapsułkowanego wyznaczona doświadczalnie jako masa pomnożona przez średnią procentową zawartość oleju w badanej partii kapsułek, wyznaczona zgodnie z rozdz. 3.3.9 [g].

3.3.14.2. Oznaczanie liczby anizydynowej

Liczbę anizydynową w badanych olejach oznaczono zgodnie z normą PN-EN ISO 6885:2016-04.

Ok. 4 g oleju odważono do kolby miarowej o pojemności 25 mL z dokładnością do 0,001 g, a następnie rozpuszczono w izooktanie i dopełniono do kreski.

W celu wyznaczenia liczby anizydynowej zakapsułkowanego oleju, ok. 12 g próbki kapsułek naważono z dokładnością do 0,001 g, a następnie niszczone w moździerzu i ekstrahowano 3-krotnie sumaryczną objętością izooktanu równą 12 mL. Następnie próbkę przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 25 mL i dopełniano izooktanem do kreski. Kolejne etapy procedury oznaczania liczby anizydynowej przeprowadzono w jednakowy sposób.

Następnie z tak przygotowanej mieszaniny pobrano do dwóch probówek po 5 mL, kolejno wprowadzając do jednej 1 mL odczynnika anizydynowego, a drugiej 1 mL lodowatego kwasu octowego. Próbę ślepą przygotowano przez zmieszanie 5 mL izooktanu i 1 mL odczynnika anizydynowego. Wszystkie próbki zamknięto korkiem i wymieszano z użyciem wortexa. W kolejnym kroku, próbki inkubowano w temperaturze $23 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 8 minut. Po tym czasie przeprowadzano pomiar spektrofotometryczny wobec izooktanu jako tła przy długości fali 350 nm. Liczbę anizydynową obliczono według równania:

$$LA = \frac{100 \cdot Q \cdot V}{m} \cdot [1,2 \cdot (A_1 - A_2 - A_0)] \quad (20)$$

gdzie:

V - objętość, w jakiej została rozpuszczona próbka oleju do badań [mL],

Q - stężenie p-anizydyny w mierzonych roztworach oleju [0,01 g/mL],

m - masa analizowanej próby, w przypadku oleju kapsułkowanego wyznaczona doświadczalnie jako masa przemnożona przez średnią procentową zawartość oleju w badanej partii kapsułek, wyznaczona zgodnie z rozdz. 3.3.9 [g],

A₀ - absorbancja nieprzereagowanego roztworu do badań,

A₁ - absorbancja przereagowanego roztworu do badań,

A₂ - absorbancja próby ślepej,

1,2 - współczynnik korekcyjny wynikający z rozcieńczenia roztworu do badań za pomocą 1 ml odczynnika anizydynowego lub lodowatego kwasu octowego.

3.3.14.3. Wyznaczanie wskaźnika oksydacji tłuszczu TOTOX

Wskaźnik oksydacji tłuszczu TOTOX wyraża całkowity stopień utlenienia tłuszczów i zgodnie z normą PN-EN ISO 6885:2016-04 obliczany jest jako suma dwukrotnej wartości liczby nadtlenkowej (wyrażonej jako meq O₂/kg) oraz liczby anizydynowej według równania:

$$\text{TOTOX} = 2 \cdot \text{LOO} + \text{LA} \quad (21)$$

w którym:

LOO – liczba nadtlenkowa [meq O₂/kg),

LA – liczba anizydynowa.

3.3.14.4. Oznaczanie liczby kwasowej

Liczbę kwasową w badanych olejach oznaczono zgodnie z normą PN-EN ISO 660:2010.

Ok. 10 g próbki oleju odważano z dokładnością do 0,001 g do kolby stożkowej ze szlifem i rozpuszczono w 50 mL mieszaniny rozpuszczalników etanol : eter etylowy w stosunku 1:1 v/v.

W celu oznaczenia liczby kwasowej zakapsułkowanego oleju ok. 30 g próbki kapsułek naważono z dokładnością do 0,001g, a następnie niszczone w moździerzu i ekstrahowano 3-krotnie sumaryczną objętością mieszaniny rozpuszczalników etanol : eter etylowy w stosunku 1:1 v/v równą 50 mL. Kolejne etapy procedury oznaczania liczby anizydynowej przeprowadzono w jednakowy sposób.

Uzyskany roztwór miareczkowano 0,1N KOH wobec fenoloftaleiny do momentu pojawienia się jasnorożowego zabarwienia utrzymującego się przez co

najmniej 15 sekund. Równocześnie przeprowadzono pomiar próby ślepej. Wartość liczby kwasowej (mg KOH/g oleju) dla badanych próbek obliczano według równania:

$$LK = \frac{56,1 \cdot (V_1 - V_2) \cdot C}{m} \quad (22)$$

gdzie:

V_1 - objętość roztworu wodorotlenku potasu użytego na zmiareczkowanie próby oleju [mL],

V_2 - objętość roztworu wodorotlenku potasu użytego na zmiareczkowanie próby ślepej [mL],

C - stężenie roztworu KOH (0,1N),

m - masa tłuszczu, w przypadku oleju kapsułkowanego wyznaczona doświadczalnie jako masa pomnożona przez średnią procentową zawartość oleju w badanej partii kapsułek, wyznaczona zgodnie z rozdz. 3.3.9 [g].

3.3.15. Analiza statystyczna wyników

Wyniki przedstawione w tabelach lub rysunkach są wartością średnią z trzech do pięciu oddzielnych prób \pm odchylenie standardowe. W wybranych wariantach zastosowano jednoczynnikową analizę wariacyjną. Istotność różnic oceniono testem t-Studenta dla przedziału ufności $p < 0,05$.

4. WYNIKI I DYSKUSJA WYNIKÓW

4.1. Otrzymywanie i charakterystyka kserożeli chitozanowych

4.1.1. Otrzymywanie i charakterystyka kolagenu i żelatyny

4.1.1.1. Skład podstawowy skór rybich

Surowcem do produkcji preparatów kolagenowych i żelatynowych były skóry z suma afrykańskiego (łac. *Clarias gariepinus*), łososia atlantyckiego (łac. *Salmo salar*) oraz dorsza bałtyckiego (łac. *Gadus morhua*), ryb o różnej zawartości tłuszczu, bytujących w wodach o różnych temperaturach. Surowce scharakteryzowano w celu późniejszego zbadania wpływu ich dodatku w kserożelowych kompozytach z chitozaniem.

Wydajność izolacji kolagenu rozpuszczalnego w kwasie octowym (ang. *Acid Soluble Collagen*) ze skór suma afrykańskiego, łososia i dorsza, obliczona na podstawie różnicy suchych mas kolagenu w produkcie i surowcu użytym do ekstrakcji, wyniosła odpowiednio: 75%, 73% i 68% (Tylingo i in., 2016). Wydajność izolacji żelatyny ze skór tych samych gatunków ryb wyniosła odpowiednio: 85%, 80% i 75%.

Tab. 7. Skład podstawowy skór z suma afrykańskiego, łososia i dorsza bałtyckiego. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$).

Próba	Sucha masa [%]	Białko [%]	Tłuszcz [%]	Popiół [%]
Dorsz	$30,0 \pm 0,7^a$	$28,12 \pm 0,08^a$	$1,03 \pm 0,18^a$	$2,2 \pm 0,03^a$
Łosoś	$31,0 \pm 0,7^a$	$26,94 \pm 0,09^b$	$0,91 \pm 0,23^a$	$3,1 \pm 0,04^b$
Sum	$29,2 \pm 0,6^a$	$29,50 \pm 0,11^c$	$1,01 \pm 0,15^a$	$2,3 \pm 0,01^c$

Wszystkie badane surowce charakteryzowały się podobną zawartością suchej masy (Tab. 7). Największą zawartość białka miały skóry suma afrykańskiego, zaś największą zawartość popiołu zanotowano dla skór łososia. Skóry użyte do ekstrakcji kolagenu i żelatyny pozyskano jako surowiec oczyszczony z pozostałości tkanki mięśniowej oraz wstępnie odtłuszczony. Zawartość tłuszczu w surowcu różniła się nawet w obrębie różnych partii skór pochodzących z tego samego gatunku. Z tego względu konieczne było zastosowanie dodatkowej procedury odtłuszczania (rozdz. 3.3.1.1, str. 52), która umożliwiła obniżenie zawartości tłuszczu w wybranych surowcach do wartości ok. 1%, niezależnie od jego pochodzenia. Dane zebrane w tabeli 7 świadczą o dobrej wydajności metody wstępnego przygotowywania surowców do

izolacji białek, natomiast uzyskane różnice, istotne statystycznie, np. zawartość popiołu, mogą być spowodowane m.in. mniej dokładnym oddzieleniem łusek ze skór łososia niż ze skór dwóch pozostałych gatunków ryb.

Oznaczenia zawartości Hyp wykazały, że największą i zarazem porównywalną zawartością tego aminokwasu w przypadku surowca charakteryzowały się skóry z łososia i suma, natomiast najniższą skóry z dorsza (Tab. 8).

Tab. 8. Wydajność ekstrakcji kolagenu oraz wartości wyznaczonych współczynników przeliczeniowych azotu na białko. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$).

Próba	Zawartość Hyp w [%]		P-Dia*	P-AAC**
	skórze	preparacie kolagenowym		
Dorsz	1,41 ± 0,032 ^a	6,50 ± 0,142 ^a	15,38	15,41
Łosoś	1,71 ± 0,032 ^b	8,03 ± 0,151 ^b	12,45	12,66
Sum	1,61 ± 0,04 ^b	8,25 ± 0,173 ^b	12,12	12,01

*P-Dia - współczynnik przeliczeniowy azotu na białko obliczony na podstawie różnicy zawartości Hyp w surowcu i gotowym preparacie kolagenowym, oczyszczanym z wykorzystaniem dializy.

**P-AAC - współczynnik przeliczeniowy azotu na białko obliczony na podstawie różnicy w zawartości Hyp w surowcu, oznaczonej metodą HPLC i wyizolowanym białku, na podstawie jego profilu aminokwasowego.

Różnice w zawartości Hyp w skórkach suma afrykańskiego i łososia wykazano dopiero na podstawie profilu aminokwasowego surowców (Tab. 9), oznaczonego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej o większej czułości niż metoda spektrofotometryczna.

Jedną z najczęściej stosowanych metod w oznaczaniu zawartości białka w surowcu jest metoda Kjeldahla. Polega ona na określeniu zawartości azotu ogólnego, a następnie przeliczeniu go na białko przy użyciu odpowiednich współczynników przeliczeniowych. Przeciętna zawartość azotu w białkach wynosi ok. 16%, stąd wartość uniwersalnego współczynnika przeliczeniowego równa jest 6,25 ($100:16 = 6,25$). Białka wybranych produktów różnią się składem jakościowym i ilościowym, dlatego różna jest w nich także zawartość azotu. Dla poszczególnych produktów konieczne jest zatem stosowanie wyznaczonych doświadczalnie wskaźników przeliczeniowych (PN-75/A 04018).

W tabeli 8 zamieszczono współczynniki przeliczeniowe azotu na białko dla skór suma afrykańskiego, łososia i dorsza. Współczynniki te wyznaczono na podstawie

różnicy w zawartości azotu mierzonej w surowcu oraz gotowym, oczyszczonym preparacie białkowym (P-Dia) oraz na podstawie różnicy w zawartości Hyp w surowcu, oznaczonej metodą HPLC i wyizolowanym białku, na podstawie jego profilu aminokwasowego (P-AAC). Wartości obliczonych współczynników dla każdego z surowców nie różnią się więcej niż o 0,2 jednostki i są od 1,9 do 2,5 razy wyższe od uniwersalnego współczynnika przeliczeniowego. Świadczy to o wysokiej zawartości białka w skórach, które stanowi około jednej trzeciej ich masy (Tylingo i in., 2016).

W tabeli 9 przedstawiono skład aminokwasowy wyizolowanych preparatów białkowych, jako liczbę poszczególnych reszt aminokwasowych obecnych w danym białku w przeliczeniu na 1000 aminokwasów. Biorąc pod uwagę fakt, że pierwszorzędowa struktura żelatyny i kolagenu izolowanych z tego samego surowca są identyczne, wyniki przedstawiono w odniesieniu jedynie do rodzaju użytego surowca.

Każdy z oznaczanych preparatów charakteryzował się największą zawartością glicyny, która stanowiła średnio około 35% wszystkich oznaczonych aminokwasów. Ilość ta wynika z regularności triad aminokwasowych białka: Gly-X-Y, będących cechą charakterystyczną budowy kolagenu (Cheng i in., 2017). Innymi aminokwasami występującymi w większości były kolejno prolina, alanina, kwas glutaminowy i hydroksyprolina, które stanowiły odpowiednio $9,6 \div 12,3\%$, $10,1 \div 10,9\%$, $7,1 \div 7,8\%$ i $5,4 \div 7,0\%$ profilu aminokwasowego preparatów białkowych (Tab. 9).

Największą zawartość iminokwasów, proliny i hydroksyproliny, charakteryzował się kolagen ze skór suma afrykańskiego bytującego w wodach ciepłych, natomiast najniższą zawartość wspomnianych reszt aminokwasowych zanotowano dla kolagenu ze skór dorsza bałtyckiego, ryby żyjącej w wodach zimnych. W dalszym ciągu są to wartości niższe niż w przypadku kolagenów izolowanych ze skór ssaków lub tropikalnych gatunków ryb, co tłumaczy różnice w ich stabilności termicznej (Foegeding i in., 1996).

Iminokwasy przyczyniają się do trwałości kolagenu, ponieważ jego potrójne helisy utrzymywane są m.in. dzięki wiązaniom wodorowym występującym pomiędzy atomami wodoru, a pierścieniami pirolidynowymi wspomnianych reszt aminokwasowych (Shoulders i Raines, 2009). Poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych wewnątrz- i międzycząsteczkowych typu aldiminowego lub estrowego, na stabilność struktury kolagenu wpływ mają także takie reszty aminokwasowe jak: lizyna, hydroksylizyna czy histydyna (Sadowska, 1992). Największą zawartość tych aminokwasów zidentyfikowano w kolagencie ze skór dorsza (Tab. 9). W tym przypadku

potwierdzenie stabilizującej roli tworzących się wiązań kowalencyjnych na strukturę kolagenu nie jest jednak możliwe, gdyż temperatura denaturacji preparatu ze skór dorsza była najniższa (Tab. 10).

Tab. 9. Skład aminokwasowy kolagenów/żelatyn wyizolowanych ze skór dorsza, łosia i suma afrykańskiego. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$).

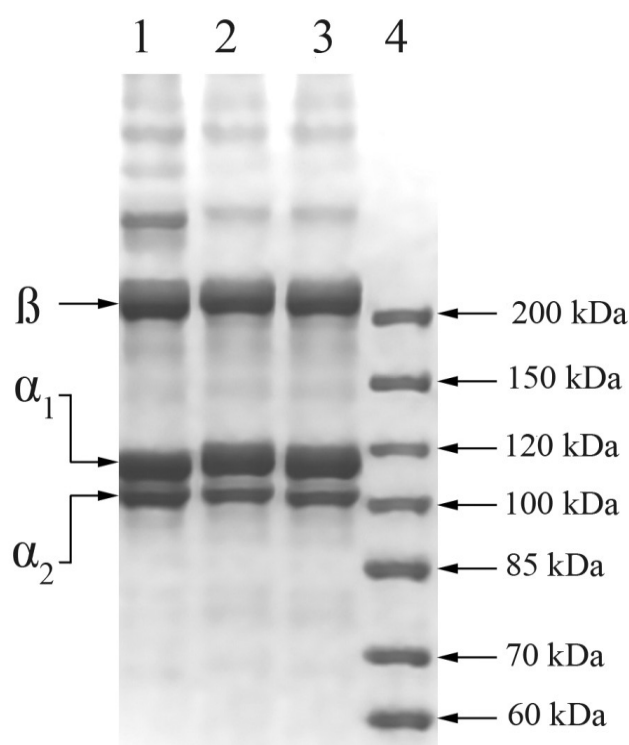
Aminokwas	Liczba reszt aminokwasowych/1000 reszt aminokwasowych		
	Dorsz	Łosoś	Sum
Hydroksyprolina	54,1 ± 0,5	65,0 ± 0,4	70,0 ± 0,5
Kwas asparaginowy	49,3 ± 0,6	56,0 ± 0,3	47,2 ± 0,2
Treonina	22,3 ± 0,2	20,4 ± 0,2	29,3 ± 0,3
Seryna	65,4 ± 0,4	51,0 ± 0,2	33,4 ± 0,2
Kwas glutaminowy	71,0 ± 0,5	71,9 ± 0,5	78,1 ± 0,1
Glicyna	347,9 ± 0,2	370,7 ± 1,0	321,6 ± 0,2
Alanina	101,4 ± 0,1	101,6 ± 0,9	109,6 ± 0,4
Cysteina	0	0	0
Walina	15,2 ± 0,1	13,6 ± 0,5	22,1 ± 0,3
Metionina	19,2 ± 0,2	17,1 ± 0,6	14,0 ± 0,1
Izoleucyna	10,5 ± 0,1	10,2 ± 0,4	12,1 ± 0,3
Leucyna	23,6 ± 0,5	21,0 ± 0,1	27,8 ± 0,4
Tyrozyna	5,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	5,5 ± 0,1
Fenylalanina	19,3 ± 0,3	12,2 ± 0,4	19,2 ± 0,2
Lizyna	27,3 ± 0,3	20,1 ± 0,1	31,2 ± 0,6
Histydyna	6,0 ± 0,1	12,5 ± 0,6	7,5 ± 0,1
Arginina	53,2 ± 0,7	55,9 ± 0,2	48,9 ± 0,3
Prolina	102,2 ± 0,8	95,8 ± 0,1	122,5 ± 0,2
Hydroksylizyna	7,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	0
Tryptofan	0	0	0
Masa cząsteczkowa [Da]	109027 ± 11	107809 ± 15	110146 ± 13

Żaden z charakteryzowanych kolagenów nie zawierał cysteiny, co oznacza, że wiązania disulfidowe nie brały udziału w stabilizacji trzeciorzędowej struktury białka (Ali i in., 2017). Zawartość pozostałych zidentyfikowanych aminokwasów była zbliżona do ich zawartości w innych białkach kolagenowych izolowanych z rybich skór

metodą ekstrakcji rozcieńczonymi roztworami kwasów (Senaratne i in., 2006; Liu i in., 2007; Thuy i in., 2014).

4.1.1.2. Genetyczny typ kolagenu

Do tej pory wyodrębniono 29 genetycznych typów kolagenu (Krishnamoorthi i in., 2017). Różnią się one parametrami takimi jak: masa i długość cząsteczki, skład i sekwencja aminokwasowa, stopień hydroksylacji reszt lizyny i proliny, struktura przestrzenna, lokalizacja tkankowa czy wreszcie specyfika biosyntezy i posttranslacyjnej modyfikacji (Sadowska, 1992; Hulmes, 2008). Jedną z metod pozwalających na klasyfikację kolagenu do danego typu genetycznego jest analiza składu podjednostkowego z wykorzystaniem rozdziału elektroforetycznego.



Rys. 9. Elektroforetyczna charakterystyka uzyskanych białek kolagenowych wyizolowanych z rybich skór (1 - Sum afrykański, 2 - Łosoś, 3 - Dorsz, 4 - Wzorzec masy cząsteczkowej).

Na podstawie otrzymanego elektroforegramu stwierdzono, że wszystkie z badanych preparatów kolagenowych składały się z co najmniej dwóch różnych podjednostek α : α_1 i α_2 , których masa cząsteczkowa wyniosła odpowiednio 118 i 106 kDa, oraz podjednostki β o masie cząsteczkowej 215 kDa (Rys. 9).

Uzyskany na elektroforegramie rozkład mas odpowiada kolagenowi typu I, będącemu heterotrimerem złożonym z dwóch identycznych podjednostek α_1 i jednej

podjednostki α_2 (Wu i in., 2011). W powyższym typie genetycznym kolagenu podjednostki te mogą przyjmować strukturę $[\alpha_1]_2 \alpha_2$, zwaną γ -kolagenem lub tworzyć tzw. β -frakcję złożoną z dimerów np. $\alpha_1\alpha_2$, $\alpha_1\alpha_1$ (Deyl i Mikšík, 2000).

Podobne do uzyskanych wartości mas cząsteczkowych podjednostek α w kolagenie izolowanym z rybich skór, deklarowały w swoich pracach także inne zespoły badawcze (Suárez i in., 2015; Kozłowska i in., 2015). Pierwszy etap denaturacji kolagenu może prowadzić do powstania nie tylko polipeptydów w postaci monometrów (α) i dimerów (β), mogą one występować także w postaci trimerów (γ). Składniki γ powstają, gdy wszystkie łańcuchy kolagenu połączone są ze sobą kowalencyjnymi wiązaniami sieciującymi (Skierka, 2008). Na elektroforegramie nie zaobserwowano pasma pochodzącego od tej podjednostki, co oznacza, że wiązanie kowalencyjne występuje tylko między dwoma łańcuchami polipeptydowymi.

4.1.1.3. Drugorzędowa struktura białek kolagenowych

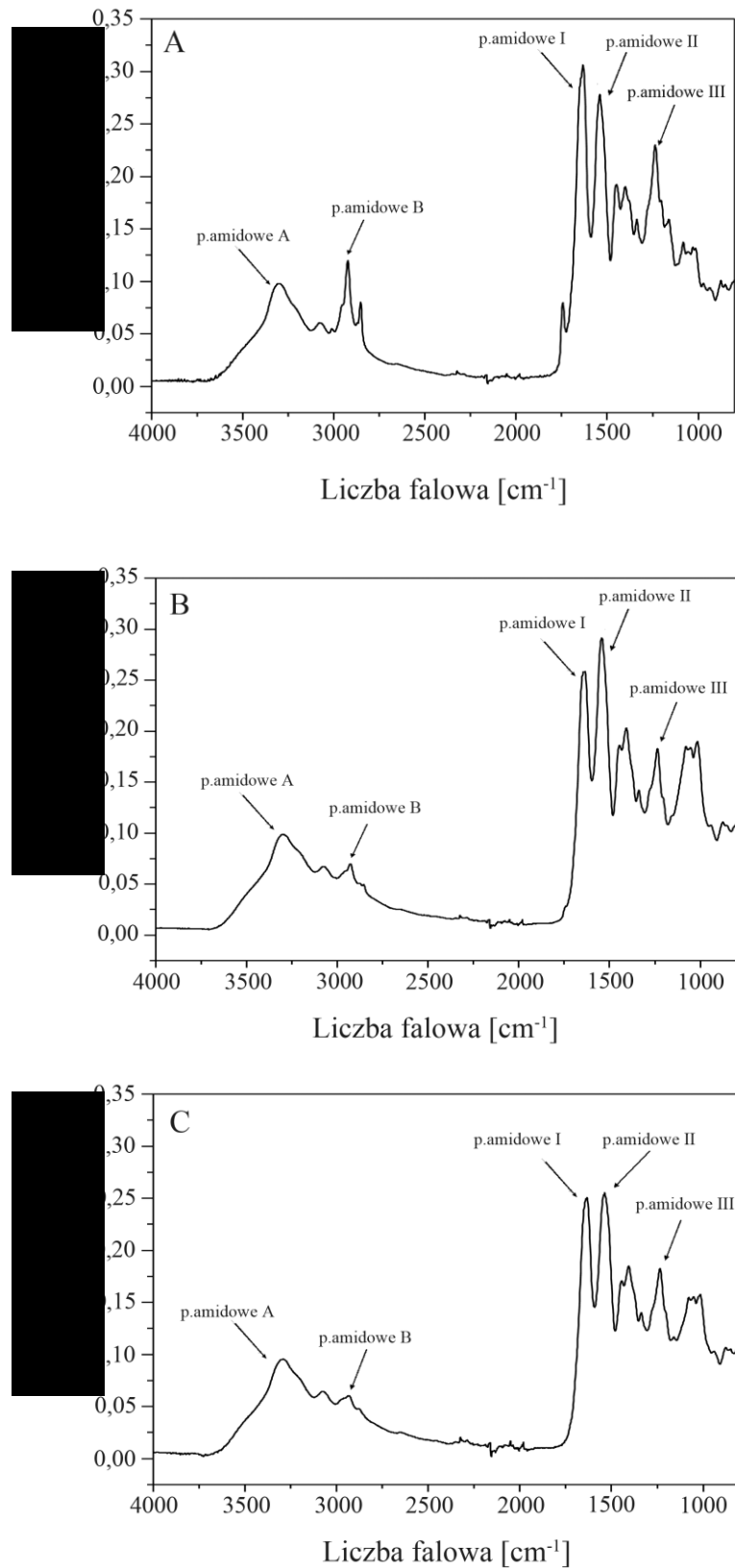
Strukturę drugorzędową kolagenów zbadano wykorzystując technikę spektroskopii w podczerwieni z transformacją Furiera. Samo wiązanie peptydowe jest źródłem dziewięciu pasm spektralnych, z których największe znaczenie w analizie struktury drugorzędowej mają tzw. pasma amidowe (Silverstein i in., 2007).

Na trzech przedstawionych poniżej widmach kolagenu wykryto pasmo amidowe A, któremu dla kolagenu ze skór suma afrykańskiego odpowiadała liczba falowa 3300 cm^{-1} , a ze skór łososia i dorsza odpowiednio: 3295 cm^{-1} i 3290 cm^{-1} (Rys. 10) (Tylingo i in., 2016). Pasma te związane jest z występowaniem drgań rozciągających grupy -NH, biorącej udział w tworzeniu wiązań wodorowych występujących w kolagenie. Drgania rozciągające tej samej grupy nieuczestniczącej w tworzeniu wiązań wodorowych występują w zakresie liczb falowych $3400 \div 3440 \text{ cm}^{-1}$ (Doyle i in., 1975).

Wystąpienie w widmie pasma amidowego B w kolagenie ze skór suma: 2924 cm^{-1} , łososia: 2920 cm^{-1} i dorsza: 2925 cm^{-1} świadczy o pojawiających się rozciągających drganiach asymetrycznych grup alkilowych. Zbliżone wartości liczb falowych dla wszystkich charakteryzowanych kolagenów dowodzą, że drgania te pochodzą od jednakowych grup funkcyjnych.

Pasma amidowe I występujące w widmie w zakresie liczb falowych $1600 \div 1700 \text{ cm}^{-1}$ i zarejestrowane dla kolagenu ze skór suma, łososia i dorsza, odpowiednio przy liczbie falowej: 1633 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} i 1649 cm^{-1} związane jest z obecnością drgań

rozciągających grup karbonylowych wzdłuż łańcucha polipeptydowego cząsteczki kolagenu i stanowi marker drugorzędowej struktury białka (Surewicz i Mantch, 1988).



Rys. 10. Widma FTIR kolagenów otrzymanych z rybich skór (A - sum afrykański, B - łosoś, C - dorsz).

Pasma drgania amidowego I na każdym z widm charakteryzują się różną intensywnością. Wynika to z heterogenicznej natury grup karbonylowych wiązania peptydowego iminokwasów. Pasma o największej intensywności zarejestrowano na widmie kolagenu wyizolowanego ze skór suma afrykańskiego. Według de Campo Vidal i Mello (2011) intensywność pasma aminowego I jest tym większa, im więcej w kolagenie obecnych jest reszt iminokwasowych. W kolagenie ze skór dorsza i łososia występuje mniej iminokwasów, więc intensywność pasma amidowego I jest mniejsza niż dla kolagenu ze skór suma afrykańskiego.

Wszystkie widma przedstawiają także sygnały charakterystyczne dla pasma amidowego II i III (Silverstein, 2007), które odpowiadają drganiom deformacyjnym wiązania N-H i rozciągającym C-N. Wartości liczb falowych pasma amidowego II dla kolagenu ze skór suma, łososia i dorsza wyniosły odpowiednio: 1540 cm^{-1} , 1539 cm^{-1} i 1543 cm^{-1} , natomiast dla pasma amidowego III odpowiednio: 1250 cm^{-1} , 1248 cm^{-1} , i 1245 cm^{-1} (Rys. 10). Wymienione wyżej pasma amidowe (I, II i III) w literaturze naukowej opisywane są mianem "odcisku palca" (ang. *fingerprint*) kolagenu typu I (Silva i in., 2015). Trzy piki w zakresie liczb falowych $1450\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ odpowiadają stereochemii pierścieni pirolidynowych proliny i hydroksyproliny (δasCH_3) (Silva i in., 2015).

4.1.1.4. Stabilność termiczna białek kolagenowych

Stabilność termiczną kolagenów określono na podstawie temperatury denaturacji białka (T_d) i temperatury skurczu (T_s) włókien kolagenowych. Na wartości tych temperatur wpływ mają takie czynniki jak: pH roztworu białka, obecność elektrolitów i ich rodzaj, szybkość ogrzewania, naturalna temperatura życia organizmu, zawartość wody w kolagenie, stopień jego usieciowania oraz zawartość iminokwasów (Sadowska, 1992).

Temperaturę denaturacji kolagenu otrzymanego ze skór suma afrykańskiego, łososia i dorsza bałtyckiego oznaczono na podstawie pomiaru wiskozymetrycznego i kalorymetrycznego (Tab. 10).

Temperatura denaturacji kolagenu kręgowców mieści się w zakresie $5\text{--}50^\circ\text{C}$ (Privalov, 1982). Najwyższą wartość temperatury denaturacji badanych prób odnotowano dla kolagenu ze skór suma afrykańskiego, natomiast najniższa odpowiadała kolagenowi ze skór dorsza, niezależnie od zastosowanej metody

oznaczenia. Wyższe temperatury denaturacji związane są z większą zawartością iminokwasów, co znajduje potwierdzenie w przedstawionych w tabeli 10 wynikach.

Tab. 10. Porównanie temperatur denaturacji kolagenu suma afrykańskiego, łososa, dorsza bałtyckiego uzyskane na podstawie pomiaru wiskozymetrycznego i kalorymetrycznego oraz temperatura skurczu włókien kolagenowych uzyskana przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej. Wartości poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$).

Kolagen	Temperatura denaturacji [°C]		Temperatura skurczu [°C]
	pomiar wiskozymetryczny	pomiar kalorymetryczny	
Dorsz	14,10 ± 0,11 ^a	15,17 ± 0,08 ^a	32,11 ± 0,09 ^a
Łosoś	20,05 ± 0,09 ^b	20,58 ± 0,07 ^b	26,03 ± 0,06 ^b
Sum	28,61 ± 0,07 ^c	29,28 ± 0,09 ^c	25,50 ± 0,10 ^c

Wartość T_d kolagenu ze skór dorsza jest charakterystyczna dla ryb bytujących w zimnych wodach i jest porównywalna do wartości uzyskanych dla kolagenu ze skór mintaja *Theragra chalcogramma* - 17°C (Zhang i in., 2007). Z kolei T_d kolagenu ze skór suma afrykańskiego jest porównywalna z T_d kolagenu ze skór ryby z rodziny rozdymkowatych *Diodon holocanthus*, żyjących w ciepłych wodach - 29°C (Huang i in., 2011). Dla kolagenu ze skór łososa uzyskano wynik pośredni między T_d kolagenu suma afrykańskiego, a T_d kolagenu dorsza.

Zarówno temperatury denaturacji jak i skurczu włókien prezentowanych kolagenów są znacznie niższe niż odpowiednie temperatury kolagenu zwierząt stałocieplnych. T_d kolagenu otrzymanego ze skór świni wynosi 37°C (Rodziewicz-Motowidło i in., 2007), a kolagenu wołowego 40,8°C (Yan i in., 2008). Temperatura skurczu włókien kolagenu bydlęcego waha się od 61°C do 67°C, w zależności od rodzaju tkanki (Sadowska, 1992). Kolagen ryb tropikalnych charakteryzuje się wyższą temperaturą denaturacji niż tych, które żyją w zimnych wodach. Tropikalna ryba *Aluterus monocerous* charakteryzuje się denaturacją kolagenu w temperaturze 32°C (Ahmad i Benjakul, 2011), a kolagen pozyskany ze skóry wieloryba, który jest zwierzęciem stałocieplnym, denaturuje w temperaturze 31,5°C (Nagai i in., 2008).

Znając temperatury denaturacji badanych ryb, możliwe jest wprowadzanie chemicznych i enzymatycznych modyfikacji w celu otrzymania kompozytów o pożądanych właściwościach fizykochemicznych. Aby podwyższyć stabilność

kolagenu łososia czy dorsza bałtyckiego możliwy jest dodatek kolagenu suma afrykańskiego, który ma wyższą temperaturę denaturacji.

Wyniki pomiarów temperatury topnienia włókien kolagenu wołowego wykazały, że jest on semikrystalicznym, wysokocząsteczkowym polimerem, zbudowanym z trzech regionów o różnej strukturze. Struktury te topią się w różnych temperaturach. Region o słabo uporządkowanej strukturze charakteryzuje się zakresem topnienia w granicach 80-100°C, a krystaliczny obszar topi się w pobliżu 120°C (Sadowska,1992).

Tab. 11. Porównanie temperatur topnienia włókien kolagenowych suma afrykańskiego, łososia i dorsza bałtyckiego uzyskanych przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$).

Kolagen	Temperatura topnienia [°C]
Sum afrykański	100,01 ± 0,09 ^a
Łosoś	90,46 ± 0,10 ^b
Dorsz bałtycki	86,67 ± 0,10 ^c

Porównując dane literaturowe i wyniki przedstawione w tabeli można stwierdzić, iż kolagen ryb składa się głównie z regionu o słabo uporządkowanej strukturze, gdyż temperatury topnienia włókien kolagenowych omawianych ryb mieszczą się w zakresie 80-100°C. Podczas endotermicznego procesu na termogramie obserwuje się odparowanie zaadsorbowanej wody oraz przemiany odpowiedzialne za termiczny skurcz kolagenu. Temperatury topnienia włókien kolagenowych ryb są niższe niż zwierząt stałocieplnych (Sadowska, 1992). W przypadku kolagenu ryb można obserwować jedno wyraźne przejście fazowe, co wskazuje na inną budowę tych białek niż białek zwierząt stałocieplnych.

Otrzymane wyniki wskazują, iż helisa kolagenu skór suma afrykańskiego, łososia i dorsza bałtyckiego jest mniej stabilna od kolagenu ssaków. Wiąże się to z zawartością hydroksyproliny w cząsteczce białka. Zadaniem tego specyficznego aminokwasu jest stabilizacja trójniciowej helisy kolagenu. Stabilizacja ta zachodzi na skutek tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy poszczególnymi helisami, z których zbudowane jest białko. W przypadku wyższej zawartości hydroksyproliny niezbędne jest dostarczenie większej ilości energii, w celu rozerwania dużej ilości wiązań wodorowych powstałych pomiędzy grupami –OH hydroksyproliny a tlenem grupy karbonylowej z wiązania peptydowego.

4.1.1.5. Twardość żelatyny

Przydatność technologiczną żelatyn rybich jako składnika do tworzenia funkcjonalnych kompozytów z chitozaniem oceniono na podstawie parametrów takich jak: temperatura topnienia i twardość żelu, zależność temperatury żelowania od czasu żelowania. Do testów wykorzystano żelatyny otrzymane w wyniku ekstrakcji wodą, a także będące produktem cieplnej denaturacji kolagenów.

Twardość żelu wyrażoną w stopniach Bloom definiuje się jako masę w gramach, niezbędną do zanurzenia w żelu żelatynowym o stężeniu 6,67 % w/w i stabilizowanego w temperaturze 10°C przez 16-18 godzin, cylindrycznego trzpienia o średnicy 0,5" na głębokość 4 mm (Schrieber i Gareis, 2007). Zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 12, większą twardością charakteryzowały się żelatyny otrzymane w wyniku ekstrakcji wodą niż żelatyny pochodzące z tego samego surowca, ale otrzymane w wyniku cieplnej denaturacji kolagenu. Niezależnie od metody otrzymywania żelatyny, największą twardość żeli zanotowano dla preparatów uzyskanych ze skór suma afrykańskiego, a najniższą dla żelatyn otrzymanych ze skór dorsza bałtyckiego (Tab. 12).

Wartości Bloom handlowych żelatyn wynoszą 50-300, jednak te mieszczące się w zakresie 200-300, o wysokiej twardości, są wykorzystywane najczęściej (Holzer, 1996). Żelatyny o wyższych wartościach Bloom mają wyższą temperaturę topnienia i żelowania oraz wykazują krótszy czas potrzebny do zżelowania. Charakteryzują się także jaśniejszą barwą oraz neutralnym smakiem i zapachem (Sikorski, 2013). Wyższa twardość żeli umożliwia użycie niższych stężeń żelatyny w celu osiągnięcia pożądanej sztywności żelu w gotowych produktach (Schrieber i Gareis, 2007).

Żelatyny ryb testowane zgodnie ze standardowymi parametrami testu Bloom charakteryzują się twardościami w zakresie 40-270°Bloom, nie mniej jednak od wskazanego zakresu występują odstępstwa. Np. zespół Cho (2005) dla żelatyny otrzymanej ze skóry tuńczyka żółtopłetwego zanotował twardość żelu równą 426°Bloom. Istotny jest jednak fakt, że temperatura stabilizacji żelu w zastosowanej przez autorów metodyce była o 3°C niższa niż w standaryzowanych metodach. W pewnym stopniu zawyżyło to wynik oznaczenia twardości żelatyny w stosunku do standardowej procedury badawczej. Wartości literaturowe twardości żelatyn pozyskanych ze skór suma, łososia i dorsza przez inne zespoły badawcze, wynoszą odpowiednio: 243-256°Bloom (Liu i in., 2008), 108°Bloom (Arnesen i Gildberg, 2007)

i 71-90°Bloom (Gómez-Guillén i in., 2010) i są zbliżone do wyników przedstawionych w tabeli 12.

Na właściwości fizykochemiczne żelatyny znaczny wpływ ma pochodzenie surowca wykorzystanego w procesie, a także metoda izolacji. Zależność ta wiąże się z różnicami w zawartości specyficznych aminokwasów – proliny i hydroksyproliny (Tab. 9).

Tab. 12. Porównanie twardości żelatyny otrzymanej ze skór suma afrykańskiego, łososa i dorsza w wyniku ekstrakcji wodą oraz denaturacji kolagenu. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$).

Żelatyna Metoda otrzymywania	Twardość żelatyny [°Bloom]	
	Ekstrakcja	Denaturacja
Sum afrykański	240 ± 3 ^a	210 ± 6 ^a
Łosoś	112 ± 5 ^b	100 ± 5 ^b
Dorsz bałtycki	60 ± 2 ^c	40 ± 3 ^c

Badii i Howell (2006) wykazali, że twardość żeli może być również uwarunkowana stosunkiem hydrofobowych reszt aminokwasowych do reszt hydrofilowych. Według Gómez-Guillén i współpracowników (2010) stosunek ten, a także rozmieszczenie reszt hydrofobowych w łańcuchach polipeptydowych decyduje o twardości żelu w większym stopniu niż zawartość iminokwasów w profilu aminokwasowym.

See i współpracownicy (2015) badając wpływ obróbki wstępnej skór suma afrykańskiego na wydajność ekstrakcji żelatyny i jej właściwości fizykochemiczne stwierdzili, że niższe pH roztworu sprzyja wydajności ekstrakcji żelatyny, jednak otrzymanie najtwardszych żeli możliwe jest tylko wtedy, gdy pH ekstraktu jest neutralne. W pracy do ekstrakcji żelatyny wykorzystano metodę opracowaną przez Kołodziejską i współpracowników (2008) z niewielkimi modyfikacjami (Rys. 8). W metodzie tej do usunięcia białek niekolagenowych wykorzystano wyłącznie roztwór chlorku sodu, bez udziału kwasów i zasad. Zapewnienie łagodnych warunków wstępnej obróbki surowca pozwoliło na uzyskanie żelatyn o pH ok. 7, co przełożyło się na uzyskanie żeli o wysokiej twardości (Tab. 12).

Roztwór żelatyny ze skór suma afrykańskiego uzyskany w wyniku cieplnej degradacji kolagenu, charakteryzował się niższym pH niż roztwór żelatyny uzyskany z tego samego surowca ale poprzez wodną ekstrakcję. Obecnością kwasu w połączeniu z obróbką termiczną było przyczyną pogorszenia właściwości funkcjonalnych żelatyny,

wskutek wzmożonej degradacji białka i tworzenia peptydów o mniejszej masie molekularnej. Analogiczne różnice związane z metodą otrzymywania żelatyny występują także w przypadku białek uzyskanych ze skór łososia oraz dorsza bałtyckiego (Tab. 12).

4.1.1.6. Temperatura topnienia żelatyny

Główne różnice we właściwościach żelatyny otrzymywanej z tkanek łącznych ssaków i ryb polegają na tym, że ta druga charakteryzuje się niższymi temperaturami topnienia i żelowania. Typowe punkty żelowania oraz topnienia żelatyny wieprzowej i bydlęcej mieszczą się odpowiednio w zakresach temperatur: 20 ÷ 25°C oraz 28 ÷ 31°C. Dla porównania, te same temperatury dla żelatyny rybiej wynoszą odpowiednio: 8 ÷ 25°C i 11 ÷ 28°C (Karim i Bhat, 2009). Najwyższą temperaturę topnienia spośród badanych żelatyn miała żelatyna izolowana ze skór suma afrykańskiego, najniższą zaś ze skór dorsza (Tab. 13). Co więcej, temperatura topnienia żelatyny otrzymanej poprzez cieplną denaturację była o ok. 1 ÷ 1,5°C niższa niż żelatyny otrzymanej w wyniku wodnej ekstrakcji, co również zgodnie z literaturą naukową wynika z obecności kwasu w żelatynie będącej produktem termicznej degradacji białka kolagenowego (See i in., 2015).

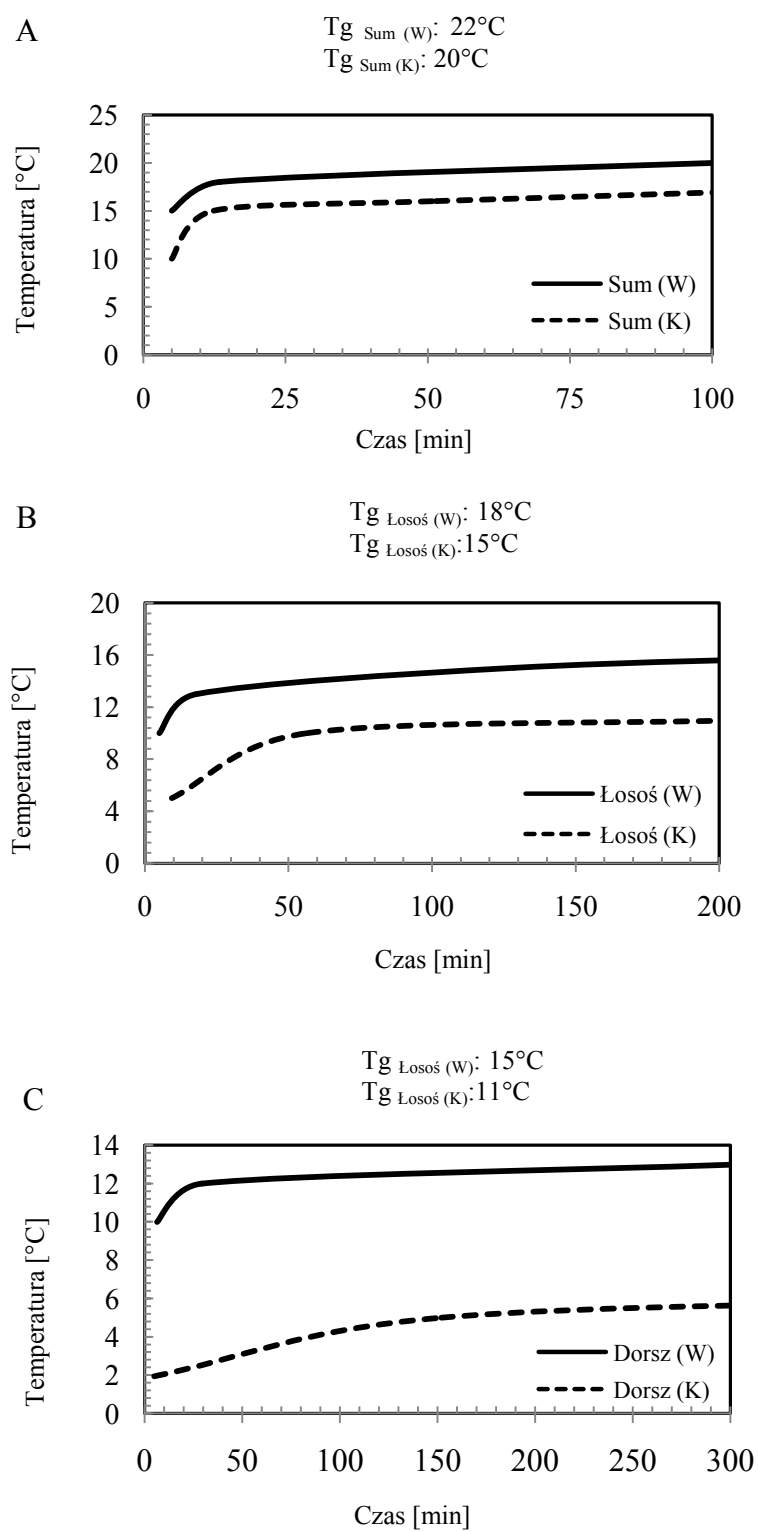
Tab. 13. Porównanie temperatur topnienia żelatyn otrzymanych ze skór suma afrykańskiego, łososia i dorsza, w wyniku ekstrakcji wodą oraz denaturacji kolagenu. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$).

Żelatyna Metoda otrzymywania	Temperatura topnienia żelatyny [°C]	
	Ekstrakcja	Denaturacja
Sum afrykański	27,2 ± 0,1 ^a	26,7 ± 0,1 ^a
Łosoś	25,0 ± 0,2 ^b	24,0 ± 0,3 ^b
Dorsz bałtycki	24,3 ± 0,2 ^c	22,4 ± 0,2 ^c

4.1.1.7. Temperatura i czas żelowania żelatyny

Rysunek 11 przedstawia wykresy zależności temperatury żelowania żelatyny od czasu potrzebnego do uzyskania żelu. Dodatkowo nad wykresami umieszczono informacje na temat granicznych temperatur (T_g), w których zdolność żelowania otrzymanych białek zanika. Najwyższą temperaturę graniczną zanotowano dla żelatyny otrzymanej ze skór

suma afrykańskiego w wyniku ekstrakcji wodą (Rys. 11A), najniższą zaś dla żelatyny będącej produktem obróbki skór dorsza bałtyckiego po termicznej denaturacji kolagenu (Rys. 11C).



Rys. 11. Wykres zależności temperatury od czasu żelowania żelatyny ze skór A - suma afrykańskiego, B - łososa, C - dorsza, otrzymanych w wyniku ekstrakcji wodą (W) oraz denaturacji kolagenu (K).

Żelatyna organizmów z wód cieplejszych żeluje zatem szybciej niż żelatyna organizmów zimnolubnych. Dodatkowo, temperatury żelowania żelatyny uzyskanej z kolagenu o wyższej stabilności termicznej są wyższe. Wskazują na to wyniki uzyskane dla żelatyny pozyskanej ze skóry sumy afrykańskiego. Żelatyna dorsza bałtyckiego uzyskana na skutek cieplnej denaturacji kolagenu nie ulega żelowaniu w temperaturze $\geq 10^{\circ}\text{C}$ (Rys. 11 C).

Zarówno kolagen jak i żelatyna tej ryby są najmniej stabilne. Porównanie żelatyn uzyskanych w odmienny sposób wskazuje na różnice w ich budowie, gdyż wykazują one inne temperatury i czasy żelowania. Żelatyna uzyskana poprzez ekstrakcję wodą o temperaturze 50°C lub 60°C w przypadku sumy afrykańskiego, wykazuje wyższe temperatury żelowania.

Temperatura żelowania żelatyny powiązana jest z temperaturą denaturacji kolagenu. Przy wyższej stabilności termicznej kolagenu, żelatyna ulegają żelowaniu w temperaturze wyższej, a czas procesu jest krótszy (Rys. 11).

4.1.2. Otrzymywanie i charakterystyka kompozytów chitozanowo-białkowych

*Wyniki rozdz. 4.1.2. stanowią fragment rozprawy doktorskiej dr Grzegorza Gorczycy oraz publikacji w czasopiśmie *Reactive and Functional Polymers*, pt. *Preparation and characterisation of porous scaffolds from chitosan-collagen-gelatin composite*, której oboje jesteśmy współautorami (doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.04.008). Wyniki te stanowiły podstawę do realizacji badań związanych z otrzymywaniem i charakterystyką kompozytów chitozanowych zawierających fosforylowaną pochodną tego polimeru.*

Jednym z celów pracy jest ocena możliwości wykorzystania skór z łososia, jako produktu ubocznego przetwórstwa przemysłu rybnego. Dokonując jednak porównania właściwości uzyskanych kolagenów i żelatyn z surowcami pochodzącymi z ryb bytujących w wodach o różnych temperaturach, zaobserwowano bezpośredni wpływ warunków bytowania na temperatury denaturacji izolowanego kolagenu oraz na temperatury żelowania żelatyn. Są to informacje niezbędne w projektowaniu kompozytów homo- lub heteropolimerowych o zdefiniowanych parametrach chłonności i rozpuszczalności. Tworzenie kompozytów kolagenowo-chitozanowych i żelatynowo-chitozanowych pozwoli poznać odpowiedź na pytanie, czy białka te są odpowiednim substratem do modyfikacji fizyko-chemicznej chitozanu w tworzeniu materiałów kserożelowych.

Materiał opatrunkowy w formie wysuszonej gąbki nie powinien rozpuszczać się w temperaturze jego przechowywania (max. 25°C), a dopiero po aplikacji na ranie, gdzie temperatura wzrasta do ok. 37°C. Z technologicznego punktu widzenia, w dalszej części testów uzasadnione więc było wykorzystanie kolagenów, a także żelatyn otrzymywanych metodą wodnej ekstrakcji ze skór łososia i suma afrykańskiego, czyli białek o najlepszej charakterystyce temperaturowej. Powodem, dla którego w dalszej części badań nie wykorzystano kolagenu oraz żelatyny izolowanych ze skór dorsza była nie tylko ich najgorsza, względem pozostałych białek, charakterystyka temperaturowa, ale również sezonowa dostępność surowca.

W literaturze naukowej dostępne są prace opisujące możliwość tworzenia kompozytów polisacharydowo-białkowych, w tym także chitozanowo-białkowych, szczególnie pod kątem możliwości sterowania szybkością uwalniania uwieczonych w ich strukturze związków biologicznie aktywnych (Shelke i in., 2014; Jao i in., 2017). Ze względu na różnice we właściwościach użytych biopolimerów, wyniki oznaczeń dla materiałów otrzymywanych według tej samej metodologii, nie zawsze są jednak oczywiste. O właściwościach stosowanych biopolimerów decyduje ich pochodzenie, czystość, metoda otrzymywania, masa cząsteczkowa, DD (chitozan), skład aminokwasowy (kolagen, żelatyna). Stąd, określenie wpływu nawet pojedynczego składnika na właściwości gotowego kompozytu, w oparciu wyłącznie o dane literaturowe często jest bardzo trudne.

Określenie wpływu dodatku kolagenu i żelatyny na podstawowe parametry fizykochemiczne kserożeli miało na celu nie tylko poznanie efektu związanego z modyfikacją chitozanu białkami izolowanymi z wybranych surowców, ale także miało stanowić odniesienie do materiałów kserożelowych otrzymywanych z udziałem modyfikowanej pochodnej chitozanu, których charakterystykę przedstawiono w kolejnym rozdziale (4.1.3).

4.1.2.1. Wpływ dodatku kolagenu i żelatyny ze skór rybich na właściwości kompozytów chitozanowo-białkowych

Materiały kserożelowe poddawane są na ogół szeregom testów, których dobór podyktowany jest ich przeznaczeniem. Jednak bez względu na docelowe wykorzystanie do podstawowych parametrów opisujących kserożele należą m.in.: chłonność,

rozpuszczalność, właściwości mechaniczne (twardość i elastyczność) czy właściwości przeciwulteniające.

Wszystkie kserożele poddane testom w celu określenia wpływu dodatku kolagenu i żelatyny ze skór rybich na właściwości otrzymanych materiałów utworzono w taki sposób, aby stosunek masowy chitozanu do białka, w przeliczeniu na suchą masę polimerów wynosił 1:1. Materiałem odniesienia była gąbka wykonana w 100% z chitozanu. Testom poddano również gąbki utworzone wyłącznie z kolagenu lub żelatyny izolowanych z obu gatunków ryb: suma afrykańskiego i łososia. Podczas przygotowywania materiałów do badań, w każdej z dyspersji biopolimerów poddanej suszeniu sublimacyjnemu zastosowano jednakowy dodatek aldehydu glutarowego.

Wykorzystane do otrzymania kompozytów z chitozaniem kolagen i żelatyna ze skór suma afrykańskiego i łososia nie wpłynęły na ostateczny wygląd zewnętrzny materiałów chitozanowo-białkowych, w porównaniu do tych otrzymanych wyłącznie z chitozanu (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016).

W procesie izolacji kolagenu i żelatyny występuje etap wybarwiania skór rybich, podczas którego rozdrobnione skóry poddawane były działaniu 3% roztworu nadtlenu wodoru przez okres 24 godzin. Jednakowa barwa otrzymanych kompozytów świadczy zatem o odpowiednim doborze warunków prowadzenia tego procesu. Etap usuwania barwników z jednej strony może być odpowiedzialny za zmiany w grupach funkcyjnych poszczególnych aminokwasów w wyniku ich utlenienia, a z drugiej badania nad wpływem działania nadtlenu wodoru na białka glutenu pszennego wykazały, że jest on odpowiedzialny wyłącznie za tworzenie mostków disiarczkowych (Manu i Prasada Rao, 2011). Zgodnie z uzyskanym profilem aminokwasowym (Tab. 9) w izolowanych ze skór rybich białkach nie występują reszty cysteiny, pomiędzy którymi możliwe jest tworzenie się połączeń S-S. Wpływ tego etapu obróbki surowca na strukturę kompozytów można więc wykluczyć.

Materiały uzyskane w 100% z chitozanu charakteryzowały się najmniejszą średnicą porów, największą zaś materiały wykonane wyłącznie z kolagenów, których pory dodatkowo były bardziej regularne niż w materiałach chitozanowych. Gąbki utworzone wyłącznie z żelatyn charakteryzowały się pośrednią wielkością porów w stosunku do gąbek chitozanowych i kolagenowych (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016).

Struktura porów była jednym z głównych czynników, który wpływał bezpośrednio na teksturę otrzymanych materiałów. Kserożele o większych porach

charakteryzowały się mniejszą twardością i większą elastycznością w stosunku do materiałów o mniejszych porach. Jest to podstawa do wyjaśnienia, dlaczego materiały kolagenowe w stosunku do żelatynowych i chitozanowych łatwiej odzyskiwały pierwotny kształt po ściśnięciu i były mniej twarde bez względu na pochodzenie polimeru białkowego. Tą samą prawidłowość zaobserwowano także w przypadku materiałów białkowo-chitozanowych. Materiały otrzymane w 100% z chitozanu okazały się być twardsze od materiałów kolagenowych średnio o 30% i ponad dwukrotnie mniej elastyczne. Natomiast w stosunku do materiałów żelatynowych cechowały się mniejszymi wartościami obu mierzonych parametrów średnio o 40% i 30% (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016).

Innymi czynnikami decydującymi o parametrach tekstury otrzymanych materiałów są stopień usieciowania oraz struktura przestrzenna białek. Żelatyna występuje w postaci kłęбка statystycznego, co zapewnia lepszą dostępność wolnych grup aminowych reszt lizyny dla czynnika sieciującego niż w przypadku regularnej struktury kolagenu, dlatego też materiały otrzymane z tych biopolimerów wykazywały wyższą twardość, mimo że ilość użytego aldehydu glutarowego w stosunku do suchej masy polimerów w kserożelach była jednakowa (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016).

Kolejnym czynnikiem decydującym o właściwościach kserożeli chitozanowo-białkowych jest skład aminokwasowy otrzymanych białek. Okazało się, że wyższa zawartość lizyny i hydroksyproliny, może dodatkowo przyczyniać się do większej twardości i mniejszej elastyczności materiałów białkowych i chitozanowo-białkowych z udziałem kolagenu ze skór z suma afrykańskiego w stosunku do kolagenu izolowanego ze skór ryb bytujących w niższych temperaturach (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016). Skład aminokwasowy obok przestrzennej struktury białek stanowi także podstawę do wyjaśnienia różnic w chłonności i rozpuszczalności otrzymanych materiałów porowatych.

Największą chłonnością charakteryzowały się materiały zawierające w składzie chitozan, najmniejszą zaś gąbki otrzymane wyłącznie z białek. Dodatek białka do dyspersji chitozanu spowodował obniżenie chłonności kserożeli chitozanowych w stosunku do roztworu soli imitującego płyn fizjologiczny o średnio 30%. Najmniejszą rozpuszczalność w roztworze soli imitującej płyn fizjologiczny wykazywały materiały wykonane w 100% z kolagenu, największą zaś materiały wyłącznie z żelatyny. Kserożele w 100% chitozanowe rozpuściły się w 11% w stosunku do ich wyjściowej masy, czyli 3-krotnie mniej w stosunku do materiałów żelatynowych,

a 2-krotnie i ponad 4-krotnie bardziej w stosunku do materiału kolagenowego wyizolowanego ze skór łososia i suma afrykańskiego (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016).

Kolagen i żelatyna izolowane z tego samego surowca nie różnią się składem aminokwasowym. Mała chłonność i rozpuszczalność materiałów spowodowana jest oddziaływaniami stabilizującymi natywną helisę, w tym wiązaniami wodorowymi oraz punktem izoelektrycznym przy pH 7, dzięki czemu kolagen jest nierozpuszczalny w wodzie. Żelatyna jest produktem otrzymywanym w wyniku denaturacji kolagenu, czyli procesu, podczas którego następuje całkowite bądź częściowe zniszczenie oddziaływań stabilizujących strukturę białka. W trakcie denaturacji następuje także częściowa fragmentacja kolagenu, w wyniku czego fragmenty zdenaturowanego białka występują w postaci kłęбка statystycznego, a to powoduje, że jest ono rozpuszczalne w wodzie (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016).

W ocenie właściwości przeciwutleniających badanych materiałów porowatych wykorzystano testy DPPH, ABTS oraz zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} . Zasada pierwszych dwóch testów opiera się na pomiarze absorpcji roztworów rodnika, którego zanik barwy w obecności badanej próby świadczy o neutralizacji rodników, czyli przeciwutleniającym działaniu badanego związku. Zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} obserwowana jest również na podstawie zaniku barwy roztworu wynikającej z niszczenia kompleksu jonów Fe^{2+} z ferrozyną, w wyniku silniejszego oddziaływania tych jonów np. z biopolimerami.

Aktywność materiałów chitozanowych, białkowych i ich kompozytów przedstawiono w formie wartości EC_{50} , która określa masę próby materiału, jaka powoduje neutralizację wolnego rodnika bądź chelatowanie jonów Fe^{2+} w 50%, w czasie 2 godzin od momentu rozpoczęcia testu.

Otrzymane wyniki wskazują, że wszystkie testowane biopolimery działają przeciwutleniająco oraz wykazują zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} . Właściwości te wynikają z czynników takich jak: budowa chemiczna, struktura przestrzenna czy masa cząsteczkowa. Według Alemána i współpracowników (2011) aktywność przeciwutleniająca w przypadku białek zależy od ich profilu aminokwasowego. Wzrost zdolności wymiatania wolnych rodników zwiększa się wraz ze wzrostem zawartości w białku takich aminokwasów jak: prolina, hydroksyprolina, walina, leucyna, izoleucyna, alanina, histydyna, metionina.

Porównując aktywność przeciwutleniającą otrzymanych kserożeli białkowych oraz uwzględniając skład aminokwasowy białek wykorzystanych do ich otrzymania, większa moc przeciwutleniająca kolagenu i żelatyny wyizolowanych ze skór sumy afrykańskiego w stosunku do tych samych białek wyizolowanych ze skór łososia wydaje się być zasadna. Różnica w strukturze przestrzennej kolagenu i żelatyny prawdopodobnie wpływa na poziom wyeksponowania grup funkcyjnych poszczególnych łańcuchów bocznych aminokwasów, a przez to na częstość oddziaływań z cząsteczkami rodnika DPPH czy kationo-rodnika ABTS. W rezultacie kompozyty zawierające w składzie kolagen wyizolowany z obu gatunków ryb cechują się mniejszymi wartościami trzech mierzonych parametrów w odniesieniu do kompozytów zawierających żelatynę (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016).

Wielu peptydom różnego pochodzenia przeciwutleniające właściwości przypisuje się występowaniu w ich strukturze hydrofobowych aminokwasów: waliny, izoleucyny, proliny, histydyny, tryptofanu, metioniny i tyrozyny (Dávalos i in., 2004). Kim i współpracownicy (2001) zasugerowali, że wyższe aktywności przeciwutleniające peptydów zawierających więcej hydrofobowych aminokwasów mogą być związane z ich wyższą rozpuszczalnością w tłuszczach.

Materiały wykonane w 100% z chitozanu charakteryzują się najmniejszą aktywnością przeciwutleniającą, a także najmniejszą zdolnością do chelatowania jonów Fe^{2+} , które wynikają z reaktywności grup hydroksylowych i aminowych obecnych w chitozanie, a więc także ze stopnia deacetylacji polimeru. Zespół Gómez-Guillén (2010) wykazał zależność zwiększającej się aktywności przeciwutleniającej wraz ze zmniejszającą się masą cząsteczkową różnych frakcji hydrolizatów wyizolowanych ze skór kałamarnicy.

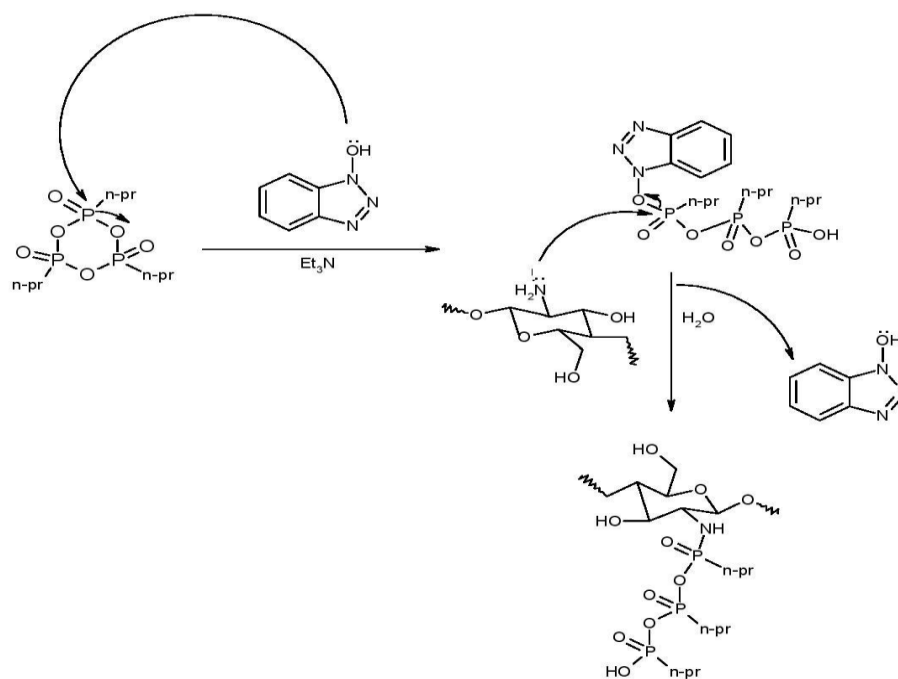
Aktywność przeciwutleniająca z reguły dotyczy związków o małych masach cząsteczkowych, dlatego aktywność ta w przypadku badanych kserożeli powinna maleć w kolejności: żelatyna > kolagen > chitozan. Warunek ten spełniono częściowo: białko > chitozan. Oznacza to, że struktura przestrzenna białek w tym przypadku ma większe znaczenie w przewidywaniu aktywności przeciwutleniających preparatów białkowych niż ich masa cząsteczkowa (Gorczyca, 2015; Tylingo i in., 2016).

Profil aminokwasowy według Saiga i współpracowników (2003) wpływa także na zdolność chelatowania jonów metali przejściowych, która wzrasta wraz ze wzrostem takich reszt aminokwasowych jak: hydroksyprolina, prolina i histydyna. Prawdopodobnie tę potwierdzają także wyniki uzyskane dla wykorzystanych białek. Bez względu na

mechanizm leżący u podstaw właściwości chelatujących w stosunku do chitozanu, właściwości te są znacznie słabsze w porównaniu z materiałami otrzymanymi z polimerów białkowych.

4.1.3. Wpływ dodatku fosforylowanej pochodnej chitozanu na właściwości kompozytów chitozanych

Dostępność grup aminowych i hydroksylowych w chitozanie powoduje, że biopolimer ten podatny jest na modyfikacje chemiczne, których głównym celem jest możliwość kontrolowanej zmiany właściwości użytkowych pod kątem konkretnego zastosowania. Zaletą takiego podejścia w tworzeniu kompozytów składających się wyłącznie z jednego polimeru jest przede wszystkim wykorzystanie wyłącznie jednego surowca. Inną zaletą jest możliwość rezygnacji z konieczności stosowania odczynników sieciujących podczas formowania dyspersji do produkcji kserozeli, których rolą jest zabezpieczanie gotowego układu kompozytowego przed zbyt szybką destabilizacją. Przykładem takiego układu są opisane wcześniej kompozyty utworzone z chitozanu i żelatyny rybiej, która bez dodatku aldehydu glutatowego uległaby nadmiernemu rozpuszczeniu w gotowym materiale.



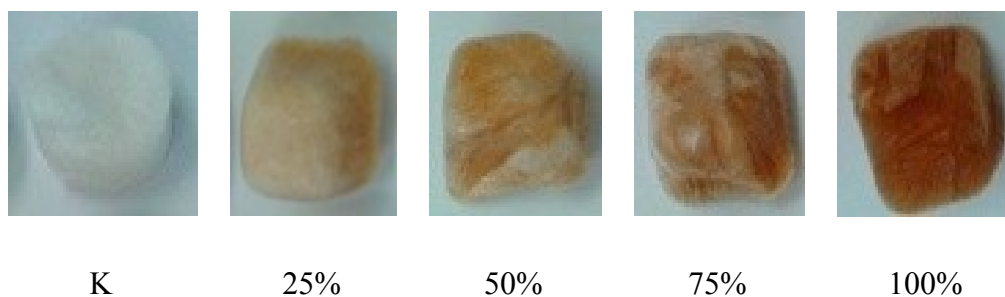
Rys. 12. Schemat przedstawiający mechanizm reakcji tworzenia N-propylofosfonowej pochodnej chitozanu (Kumar, 2013).

Modyfikacja chitozanu przeprowadzona została na podstawie metodyki zaproponowanej przez Kumara i współpracowników (2013) (Rys. 12).

Istotą modyfikacji chitozanu w toku przeprowadzonych badań było wytworzenie pochodnej polimeru rozpuszczalnej w wodzie, którą w następnym kroku wykorzystano w tworzeniu kompozytów o określonej rozpuszczalności. W związku z tym w pracy nie podjęto się określenia stopnia modyfikacji polimeru, ze względu na osiągnięcie pożądanej funkcji chitozanu.

4.1.3.1. Morfologia powierzchni kompozytów chitozanowych

Wygląd zewnętrzny otrzymanych materiałów różnił się wizualnie pod względem barwy suchych preparatów (Rys. 13). Próby kontrolne wykonane wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego były białe (CHI), natomiast te wykonane wyłącznie z chitozanu fosforylowanego brązowe (p-CHI₁₀₀) (Rys. 13).



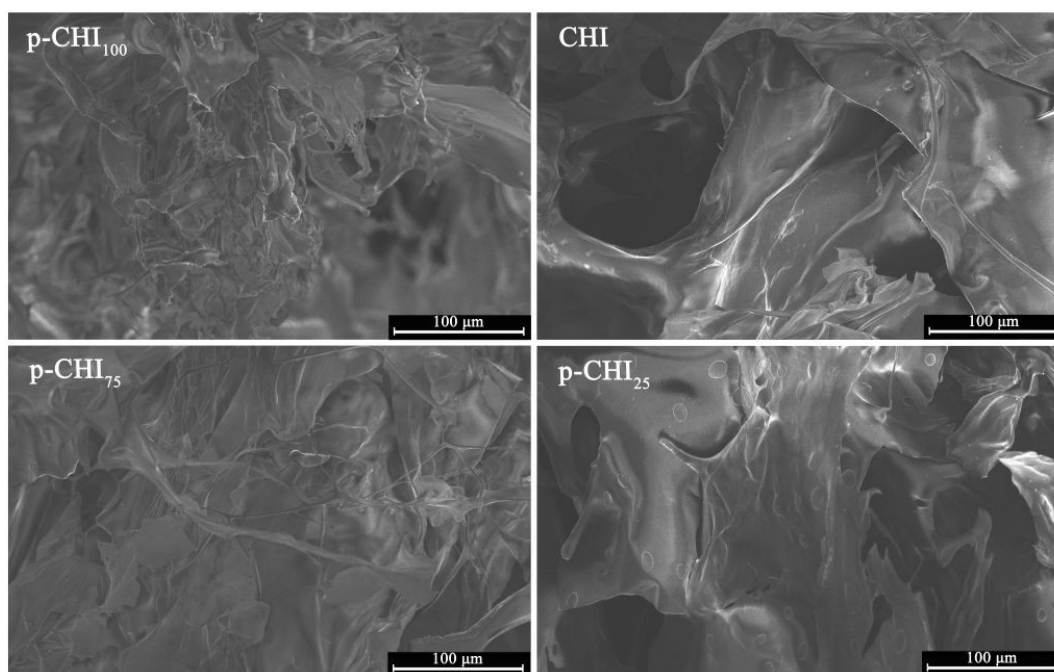
Rys. 13. Kserożele chitozanowe o rosnącym udziale modyfikowanej pochodnej chitozanu w przeliczeniu na suchą masę kompozytu (K - próba kontrolna bez dodatku modyfikowanej pochodnej).

W materiałach kompozytowych intensywność brązowego zabarwienia zwiększała się wraz ze wzrostem udziału modyfikowanego chitozanu. Barwa ta prawdopodobnie wynika ze struktury elektronowej odczynnika, bogatego w grupy chromoforowe w postaci układów zawierających wiązania wielokrotne. Zarówno odczynnik jak i modyfikowany polimer wykazują maksimum absorpcji przy długości fali równej 298 nm. Podobne maksima obserwuje się dla grup C=O i N=O, które wynoszą odpowiednio 279 nm i 278 nm (Silverstein i in., 2007).

Analiza mikrostruktury za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej wykazała, że wszystkie materiały mają charakter wysokoporowaty (Rys. 14). W materiale kontrolnym zaobserwowano bardziej regularne pory o wielkości ok. 80 μm . W przypadku chitozanu modyfikowanego (p-CHI₁₀₀) struktura polimeru była nieregularna, przypominająca płataninę nici. Z tego względu trudne było określenie wielkości porów materiału. Z całą pewnością są one mniejsze niż uzyskane dla

chitozanu niemodyfikowanego. Obraz próby p-CHI₂₅ przedstawia większe jednolite fragmenty polimeru, podobnie jak w próbie kontrolnej (CHI), wewnątrz których widnieją w mniejszości zagnieżdżone lokalnie, charakterystyczne nitkowate obszary. Te ostatnie dotyczące próby p-CHI₇₅ występują w większości (Rys. 14).

Na morfologię powierzchni materiałów otrzymywanych z wykorzystaniem suszenia sublimacyjnego ma wpływ wiele zmiennych. Poza budową chemiczną wpływ mają m.in.: stężenie poszczególnych polimerów w dyspersji przed zamrożeniem, efekt związany z modyfikacją, stopień modyfikacji, rodzaj wykorzystanego czynnika sprzęgającego, a także warunki samego procesu otrzymywania kompozytów, poczynając od profilu temperatury zamrażania, kończąc na parametrach procesu suszenia.



Rys. 14. Obrazy powierzchni struktury materiałów chitozanowych uzyskane z wykorzystaniem elektronowej mikroskopii skaningowej (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHI_x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 25, 75 lub 100).

W warunkach prowadzonego doświadczenia, zmienność wynikająca z tych czynników została zminimalizowana zachowując prze wszystkim jednakowy sposób przygotowywania roztworów polimerów i ich łączenia, jednakową temperaturę zamrażania roztworu polimerów i jednakowe warunki suszenia sublimacyjnego. Wszystkie próby zamrażano w temperaturze -24°C, a następnie suszono sublimacyjnie pod ciśnieniem 0,94 mbar. W celu zapewnienia jednakowego gradientu temperatury

próby suszono na tej samej półce, w jednakowej odległości od kondensatora w komorze liofilizatora. Dlatego można założyć, że różnice w morfologii związane są wyłącznie z budową chemiczną otrzymanych biopolimerów (Rys. 14).

Największą porowatością charakteryzowały się materiały kontrolne, natomiast najmniejszą materiały wykonane w 100% z chitozanu modyfikowanego (Tab. 14). W miarę rosnącego udziału polimeru modyfikowanego w kompozytach porowatość malała.

Tab. 14. Porowatość materiałów chitozanowych. (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHI_x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 25, 75, 50 lub 100). Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco, p<0,05, n=3).

Próbka	Porowatość [%]
CHI	77,5 ± 1,8 ^a
p-CHI ₂₅	71,1 ± 2,3 ^b
p-CHI ₅₀	65,5 ± 1,3 ^c
p-CHI ₇₅	60,4 ± 1,9 ^d
p-CHI ₁₀₀	55,0 ± 1,1 ^e

Porowatość jest ważnym parametrem w materiałach opatrunkowych. Odpowiednia porowatość jest istotna z punktu widzenia wymiany gazowej, uwalniania związków leczniczych i składników odżywczych inkorporowanych w opatrunek. Idealny opatrunek powinien charakteryzować się porowatością na poziomie co najmniej 80% (Ikeda i in., 2014). Z punktu widzenia wymiany gazowej, lepsze parametry osiągały kompozyty chitozanowo-białkowe, których porowatość mieściła się w zakresie 85-88% (Tylingo i in., 2016). Badania Ikedy i współpracowników (2014) dowodzą także, że obniżenie porowatości gąbek chitozanowych następuje wraz ze wzrostem stężenia polimeru w dyspersji przed zamrożeniem i wysuszeniem opatrunku. Można więc na tej podstawie stwierdzić, że osiągnięcie większej porowatości w otrzymanych kompozytach możnaby osiągnąć stosując podczas ich przygotowywania chitozan o wyższej masie molekularnej i niższym stężeniu polimeru w dyspersji. Większą porowatość materiałów można osiągnąć także dzięki zamrażaniu dyspersji w temperaturach zbliżonych do 0°C, co skutkuje tworzeniem się możliwie dużych kryształów lodu.

4.1.3.2. Struktura chemiczna materiałów chitozanowych

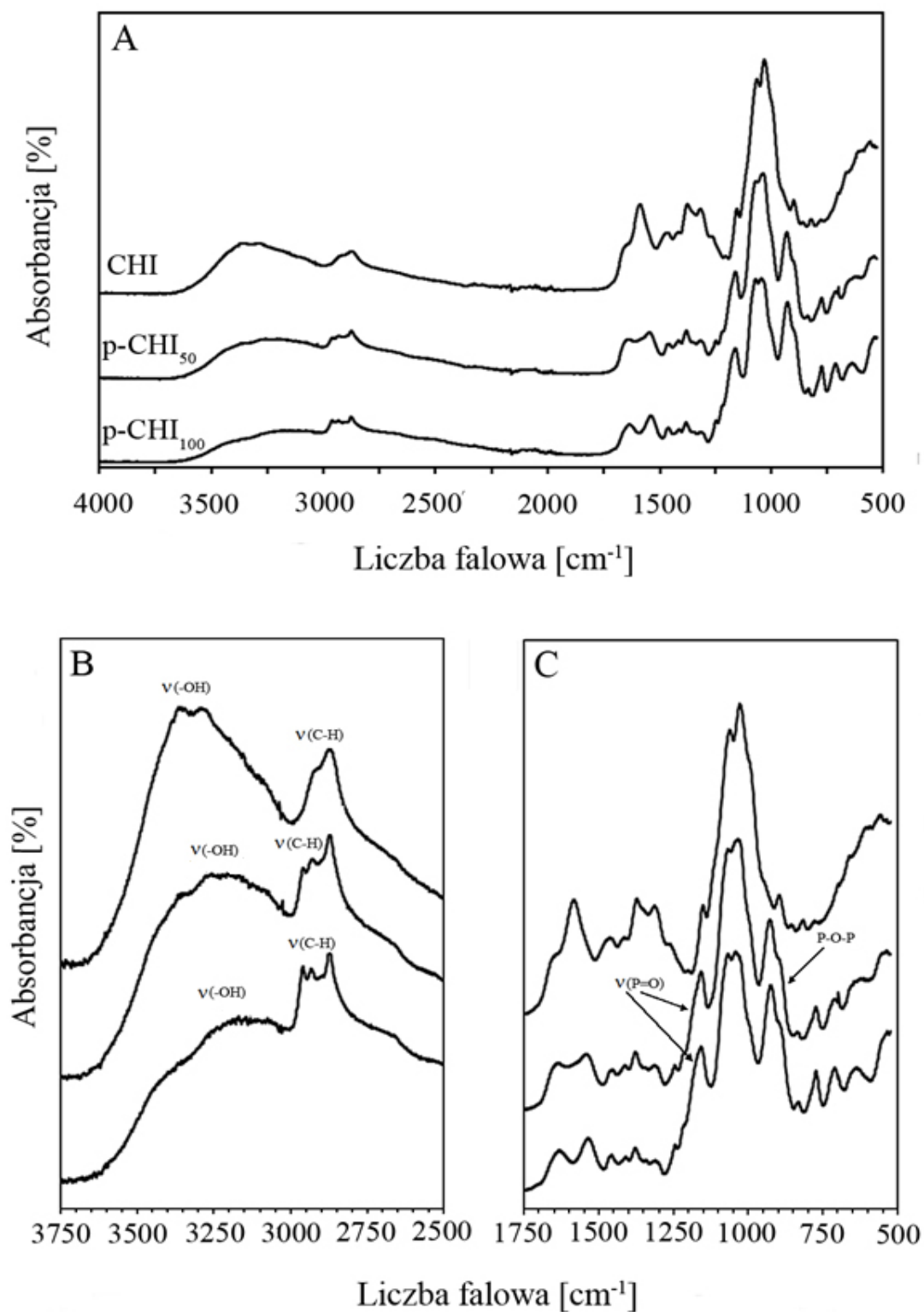
W widmie FT-IR chitozanów można zaobserwować szerokie pasmo w zakresie liczb falowych $3600-3000\text{ cm}^{-1}$, które jest charakterystyczne dla drgań rozciągających $\nu(\text{OH})$ i pokrywających się z nimi drgań $\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$ (Rys. 15). Pasma oznaczone jako $\nu(\text{C-H})$ przy liczbie falowej 2870 cm^{-1} dla wszystkich trzech materiałów (Rys. 15B) pochodzą od drgań rozciągających wiązań węgiel wodór w grupach alifatycznych.

W widmach materiałów zawierających fosforylowany chitozan pojawiają się dodatkowe dwa pasma o niewielkiej intensywności przy liczbach falowych 2970 cm^{-1} i 2935 cm^{-1} , które odpowiadają drganiom rozciągającym C-H pochodzącym z grup propylowych bezwodnika kwasu propylofosfonowego, co także potwierdzili w swoich badaniach Kumar i współpracownicy (2013).

Pasma widoczne przy liczbach falowych 1635 cm^{-1} , 1522 cm^{-1} i 1315 cm^{-1} , przypisywane odpowiednio pasmom amidowemu I, amidowemu II i amidowemu III, potwierdziły, że chitozan jest produktem częściowej deacetylacji chityny (Kumirska i in., 2010). Świadczy o tym szczególnie pasmo amidowe I, obecne w widmie na skutek występowania drgań rozciągających wiązania C=O, ponieważ wskazuje ono na obecność ugrupowania $\text{CH}_3\text{-C=O}$ w chitozanie.

Według Kasaai (2010) podczas postępującej N-deacetylacji chityny intensywność tego pasma stopniowo się zmniejsza, a aminowego, występującego zwykle przy 1590 cm^{-1} , zwiększa, wskazując na rosnącą przewagę grup NH_2 nad ugrupowaniem $\text{CH}_3\text{-C=O}$. Na rysunku 15C można zaobserwować, że pasmo przy 1522 cm^{-1} , odpowiedzialne za drgania rozciągające wiązania N-H, wykazuje nieco większą intensywność niż pasmo amidowe I, jednak występuje ono przy niższej liczbie falowej niż ma to zwykle miejsce w przypadku drgań rozciągających w grupach $-\text{NH}_2$ chitozanu. W obszarze I i II pasma amidowego nastąpiło także przesunięcie pasm i spadek ich intensywności w przypadku materiałów zawierających modyfikowany chitozan. Pasma występujące przy liczbie falowej 1375 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym wiązania C-O występującego w ugrupowaniu $-\text{CH}_2\text{-OH}$ chitozanu. Silny sygnał obecny przy liczbie falowej 928 cm^{-1} oznacza obecność wiązania P-O-P (Heras i in., 2001). Jego intensywność wzrasta wraz z udziałem modyfikowanego chitozanu w kompozycji (Rys. 15C). Kolejnym potwierdzeniem wbudowania się T3P

w strukturę polimeru jest obecność pasma przy liczbie falowej 1157 cm^{-1} odpowiadającemu drganiom rozciągającym wiązania -P=O (Ilieva i in., 2001).



Rys. 15. Widmo FTIR materiałów chitozanowych. (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHI_x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 50 lub 100. Części A, B i C różnią się zakresem liczb falowych).

4.1.3.3. Chłonność i rozpuszczalność materiałów chitozanowych w roztworze soli imitującym płyn fizjologiczny

W celu określenia chłonności i rozpuszczalności kompozytów chitozanowych wykorzystano materiały o zmniejszonym udziale chitozanu modyfikowanego w stosunku do materiałów wykorzystanych w pozostałych testach (Tab. 6). Działanie takie było konieczne, ponieważ określenie chłonności materiałów zawierających ponad 40% rozpuszczalnej formy chitozanu miało się z celem.

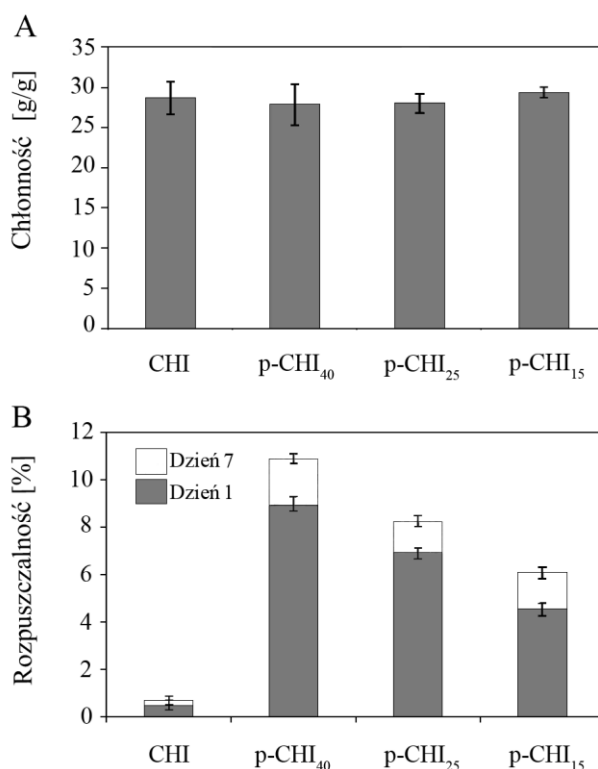
Zgodnie z wykresem (Rys. 16A), chłonność badanych materiałów niezależnie od składu była zbliżona i nie różniła się statystycznie. W oznaczaniu parametru chłonności wzięto także pod uwagę masę rozpuszczonego polimeru po inkubacji. Oznacza to, że wszystkie badane materiały zawierające do 40% modyfikowanego chitozanu, były w stanie związać ciecz o masie prawie 30-krotnie przekraczającej masę własną. Porównywalne wartości chłonności podobnych materiałów chitozanowych wykazał także Gorczyca i współpracownicy (2014). Z kolei w części badań dotyczących wpływu dodatku preparatów białkowych na właściwości ich kompozytów z chitozanem (rozdz. 4.1.2.1) stwierdzono, że zarówno dodatek kolagenu jak i żelatyny powoduje obniżenie chłonności kserożeli.

Według badań Tiğh i Karakecili'ego (2007) chłonność gąbek wykonanych z chitozanu mieści się w zakresie 27-40 g/g i zależy od stopnia deacetylacji polimeru. Oznacza to, że 1 g polimeru może związać od 27 do 40 g roztworu. Dobrą chłonność materiałów chitozanowych można tłumaczyć hydrofilowym charakterem polisacharydu oraz zdolnością utrzymywania trójwymiarowej struktury kserożelu. W procesie deacetylacji grupy acetamidowe ulegają konwersji do bardziej hydrofilowych pierwszorzędowych grup aminowych. Zatem zastosowanie chitozanu o wyższym stopniu deacetylacji spowoduje wzrost chłonności materiału (Tiğh i Karakecili, 2007).

Zwiększenia chłonności możnaby także oczekiwać wprowadzając do struktury polimeru dodatkowe grupy o charakterze hydrofilowym w postaci reszt N-propylofosfonowych. Jednakże porównywalne wartości chłonności badanych materiałów mogą sugerować, że wzrost hydrofilowości kompensowany jest przyłączaniem się reszt fosforanowych do grup aminowych, co potwierdzałoby mechanizm reakcji zaproponowany przez Kumara i współpracowników (2013).

Dimida i współpracownicy (2015) potwierdzili, że chłonność materiałów chitozanowych uwarunkowana jest dwoma głównymi czynnikami wynikającymi

z polielektrolitowej natury polimeru. Większa liczba stałych ładunków polimeru powoduje wzrost pojemności sorpcyjnej chitozanu. Natomiast wzrost siły jonowej roztworu, w którym inkubowany jest materiał wykonany z chitozanu, skutkuje obniżeniem jego chłonności. Wynika to z neutralizacji kationowych grup chitozanu przez wolne jony obecne w roztworze, co obniża efekt odpychania się łańcuchów polimerowych oraz obrzęk materiału wywołany osmotycznym wyrównywaniem się stężeń jonów (Dimida i in., 2015).



Rys. 16. Chłonność i rozpuszczalność materiałów chitozanowych po 1 i 7 dniach inkubacji w roztworze soli imitującym płyn fizjologiczny. (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHI_x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 15, 25 lub 40. Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe; p<0,05, n=3).

Rozpuszczalność chitozanu zależy od ilości wolnych grup aminowych oraz grup N-acetylowych. W niemodyfikowanej postaci chitozan rozpuszcza się w rozcieńczonych kwaśnych roztworach o pH <6 w wyniku protonowania grup aminowych. Modyfikacja chitozanu bezwodnikiem kwasu propylofosfonowego powoduje połączenie wolnych grup aminowych z podstawnikiem o dużej hydrofilowości, łatwym do solwatacji przez cząsteczki wody, umożliwiając tym samym rozpuszczanie chitozanu w obojętnym pH.

Wyniki badania rozpuszczalności materiałów zawierających fosforylowaną pochodną chitozanu przedstawiono na rysunku 16B. Masa próbki kontrolnej (CHI) w trakcie całego testu uległa niewielkiej zmianie. Największą rozpuszczalnością charakteryzowała się próba p-CHI₄₀ zawierająca 40% chitozanu modyfikowanego, a następnie próby o malejącym udziale tego polimeru, tj. 25% i 15%. Największy ubytek masy kompozytów zaobserwowano po pierwszym dniu testu. Inkubacja opatrunków przez kolejne 6 dni spowodowała wzrost rozpuszczalności materiału średnio o kolejne 1,5% dla każdej z badanych prób. Zakładając, że rozpuszczeniu ulega jedynie frakcja modyfikowanego chitozanu, to rozpuszczalność w przeliczeniu na tę frakcję w próbach p-CHI₄₀, p-CHI₂₅, p-CHI₁₅ wyniosła odpowiednio: 27,5, 34 i 40%. Oznacza to, że nawet w ciągu 7 dni testu rozpuszczalna frakcja chitozanu nie została całkowicie wypłukana z materiału. Zaobserwowano także, że wraz z obniżeniem udziału chitozanu modyfikowanego w materiale, większa ilość tego polimeru ulega rozpuszczeniu i uwolnieniu z kompozytu. Chitozan fosforylowany rozpuszcza się w wodzie tworząc żel o lepkości ok. 1000-krotnie większej od wody, w tych samych warunkach temperatury: 25°C i szybkości ścinania: 22 1/s. Powoduje to utrudnione wypłukiwanie pochodnej z wnętrza materiału, czyli trójwymiarowej siatki tworzonej przez chitozan niemodyfikowany.

4.1.3.4. Analiza tekstury kserożeli chitozanowych

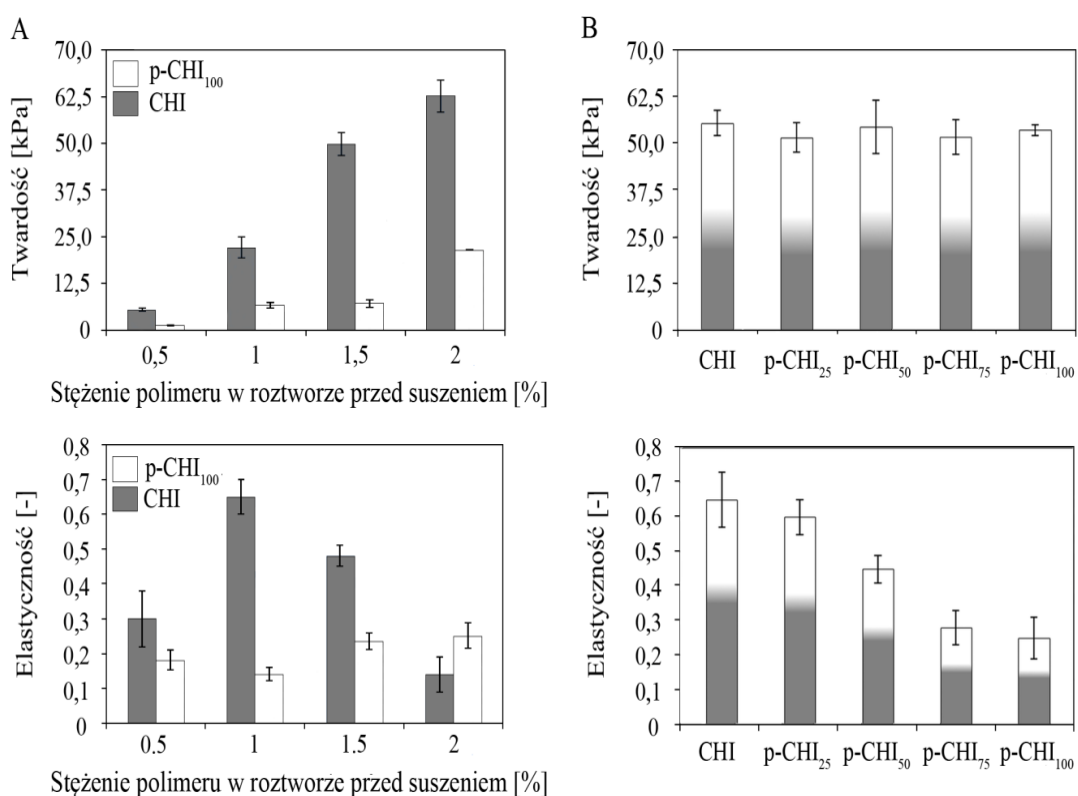
Tekstura kompozytów została scharakteryzowana na podstawie dwóch głównych parametrów, tzn. twardości i elastyczności. Część poświęconą analizie tych parametrów podzielono na dwie sekcje. Pierwsza dotyczyła pomiaru twardości i elastyczności materiałów wykonanych wyłącznie z jednego rodzaju polimeru o wybranych stężeniach w roztworze, tj.: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%, zamrożonych i wysuszonych sublimacyjnie (Rys. 17A). Druga sekcja dotyczy pomiaru twardości i elastyczności kompozytów wykonanych z mieszanin roztworów obu chitozanów, o składzie przedstawionym w tabeli 6, następnie zamrożonych i wysuszonych sublimacyjnie (Rys. 17B).

W przypadku obu rodzajów chitozanu obserwuje się zależność wzrostu twardości materiału wraz ze wzrostem stężenia polimeru w roztworze, przy czym wartości twardości próby kontrolnej (CHI) dla każdego stężenia polimeru są wyższe od wartości uzyskanych dla chitozanu modyfikowanego (p-CHI₁₀₀). Dla przykładu, twardości gąbki utworzonej z 1% roztworu chitozanu niemodyfikowanego jest



porównywalna z wartością uzyskaną dla gąbki utworzonej z 2% chitozanu modyfikowanego (Rys. 17). Mniejsza twardość kserozeli utworzonych z chitozanu modyfikowanego w stosunku do gąbek otrzymanych z polimeru niemodyfikowanego, związana jest z mniejszą porowatością tych pierwszych, potwierdzoną także obrazami wykonanymi techniką SEM (Rys. 14).

Elastyczność jest parametrem wyrażanym jako stosunek odległości, jaką przemieszcza trzpień od początku ściskania do momentu uzyskania maksymalnej siły nacisku, między drugim a pierwszym cyklem ściskania próby. Największą elastycznością charakteryzowały się materiały uzyskane po wysuszeniu 1% roztworu chitozanu niemodyfikowanego. Mniejsza elastyczność gąbki uzyskanej z 0,5% roztworu chitozanu niemodyfikowanego była spowodowana mniejszą ilością polimeru w tej samej objętości gąbki. Oznacza to, że do jej ściśnięcia w pierwszym cyklu potrzebna była niewielka siła, która zniszczyła porowatą, trójwymiarową strukturę materiału w pierwszym cyklu ściskania i z tego powodu nie powrócił on już do swojego pierwotnego kształtu.



Rys. 17. Twardość i elastyczność materiałów chitozanowych: A - wykonanych wyłącznie z polimeru kontrolnego lub wyłącznie z polimeru modyfikowanego, zamrożonych i wysuszonych sublimacyjnie, B - wykonanych poprzez zmieszanie roztworów polimeru kontrolnego i modyfikowanego w odpowiednich stosunkach masowych, zamrożonych i wysuszonych. Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe; $p < 0,05$, $n = 5$).

Obniżenie elastyczności może być wywołane także wzrostem stężenia polimeru w dyspersji, co osiągnięto w przypadku pomiaru próby kontrolnej. Powyższą zależność potwierdzili także w swoich badaniach Ikeda i współpracownicy (2014). Z kolei zespół Kim (2009) wykazał, że wzrost stężenia polimeru w roztworze powoduje wzrost twardości materiałów po ich wysuszeniu, co odzwierciedlają także wyniki zaprezentowane na rysunku 17.

Można zatem stwierdzić, że po przekroczeniu pewnego granicznego stężenia, w tym przypadku 1% chitozanu niemodyfikowanego w roztworze, wraz ze wzrostem twardości kserożelu maleje jego elastyczność. W przypadku elastyczności gąbek uzyskanych z roztworów chitozanu modyfikowanego nie da się sprecyzować zależności twardości gąbek od ich elastyczności, ponieważ dla każdego z badanych stężeń, po uwzględnieniu odchylenia standardowego, wartość ta jest zbliżona (Rys. 17).

Następnie ocenie poddano właściwości mechaniczne materiałów kompozytowych otrzymanych przez zmieszanie 1% roztworu chitozanu niemodyfikowanego oraz 2% chitozanu modyfikowanego w odpowiednich stosunkach masowych (Tab. 6). Dobór stężeń roztworów był podyktowany faktem, że gąbki wytworzone z roztworów obu chitozanów charakteryzowały się praktycznie jednakową twardością równą ok. 55 kPa. Pozwoliło to ocenić zmianę wartości parametrów twardości i elastyczności w kompozytach utworzonych z obu polimerów (Rys. 17).

Testy te wykazały, że kompozyty, niezależnie od udziału w nich modyfikowanego chitozanu, zachowują twardość na takim samym poziomie jak w przypadku materiałów wykonanych w 100% jedynie z jednego z polimerów. Oznacza to, że pomiędzy chitozaniem modyfikowanym oraz niemodyfikowanym nie występują oddziaływania mogące mieć wpływ na końcową twardość otrzymywanych kserożeli.

Takie wyjaśnienie wydaje się być słuszne, ponieważ modyfikacja chitozanu z użyciem bezwodnika kwasu propylofosfonowego nie zmienia jego polikationowego charakteru, mimo wprowadzenia do struktury polimeru grup fosforanowych wykazujących ładunek ujemny. Potwierdzeniem tego jest fakt, że połączenie chitozanu modyfikowanego ze związkami o charakterze polianionowym, jak kolagen, żelatyna, alginian sodu, prowadzi do utworzenia żelu stabilizowanego silnymi wiązaniami jonowymi (Shen i in., 2008).

Elastyczność otrzymanych kompozytów mieściła się w zakresie wartości odpowiadającym materiałom wytworzonym wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego

oraz chitozanu modyfikowanego i wzrastała wraz z udziałem tego pierwszego w kompozycie (Rys. 17).

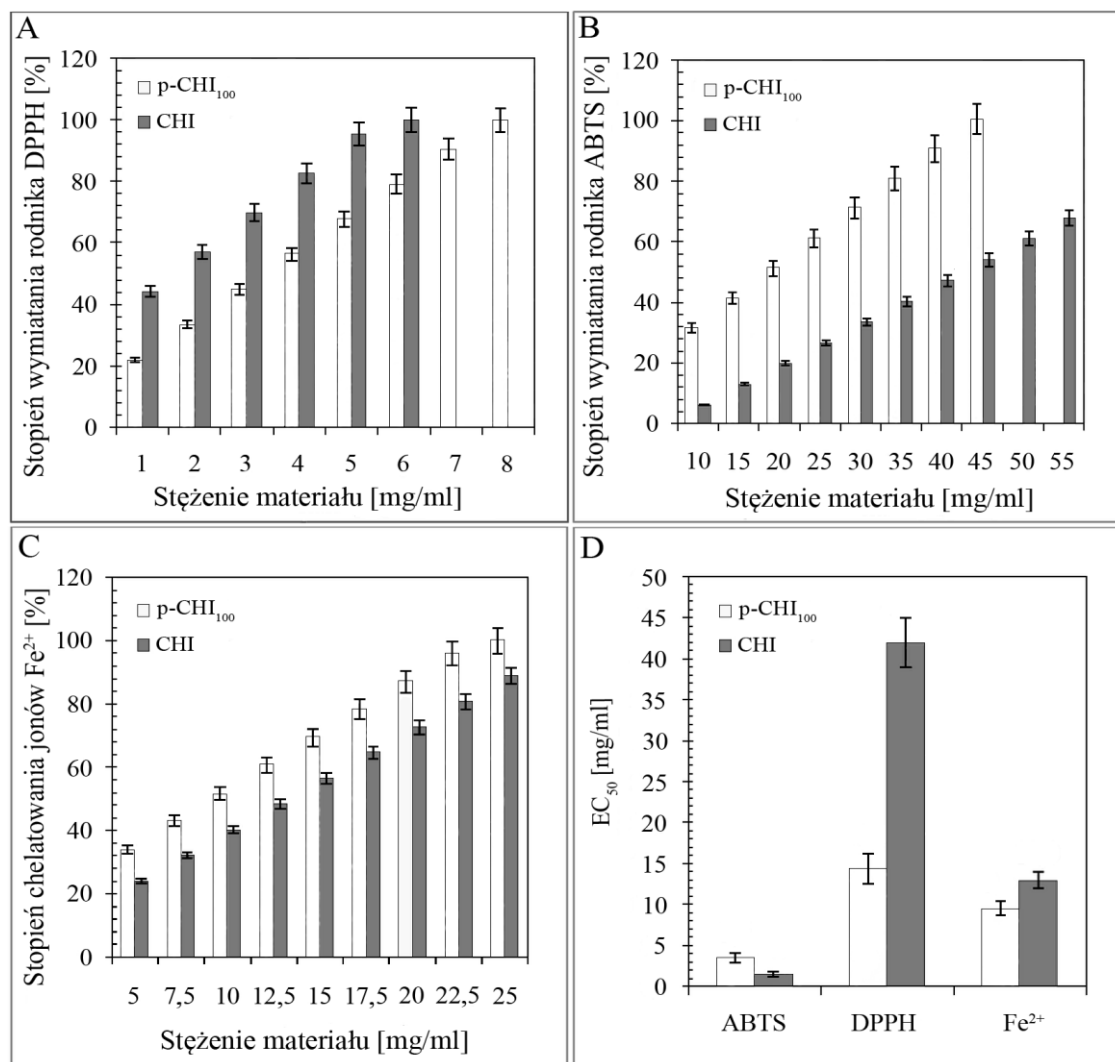
Podsumowując, powyższe testy wykazały, że twardość i elastyczność gąbek wykonanych z chitozanu oraz jego posforylowanej pochodnej można kontrolować w łatwy sposób stosując odpowiednie stężenie każdego z nich w dyspersji przed etapem suszenia.

4.1.3.5. Właściwości przeciwutleniające

Do oceny właściwości przeciwutleniających otrzymanych materiałów biopolimerowych wykorzystano trzy powszechnie stosowane testy: test DPPH, ABTS i zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} (Rys. 18). O ile reakcje rodnikowe postępują z czasem, o tyle zanik zabarwienia spowodowany właściwościami kompleksującymi badanych materiałów w przypadku jonów Fe^{2+} szybko osiąga stan równowagi. Po dwóch godzinach trwania doświadczenia nie obserwuje się dalszej zmiany zabarwienia roztworów (Gorczyca i in., 2014). Do porównania wszystkich mierzonych efektów wykorzystano wartości EC_{50} (Rys. 18D). Wartości dla tego parametru wyznaczono na podstawie regresji liniowej wyników otrzymanych z zależności wartości stopnia wymiatania wolnych rodników bądź stopnia chelatowania jonów Fe^{2+} , uzyskanych dla różnych naważek badanych materiałów. Większa wartość EC_{50} oznacza, że dany materiał wykazuje mniejsze zdolności do neutralizacji wolnych rodników bądź chelatowania jonów żelaza.

Dowiedziano, że wszystkie otrzymane materiały posiadają zdolność do neutralizacji rodników DPPH, kationo-rodników ABTS, a także wykazują zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} (Rys. 18). W każdym z badanych przypadków wzrostowi stężenia materiału chitozanowego towarzyszył wzrost zdolności do neutralizacji rodników/chelatowania jonów Fe^{2+} w badanym układzie. Zaobserwowano także, iż pomiędzy chitozaniem modyfikowanym i niemodyfikowanym występuje niewielka różnica w zdolności neutralizacji kationo-rodnika ABTS. Są to jednocześnie wartości zbliżone do aktywności chitozanu wykazanej w testach kompozytów białkowo-chitozanowych (Tylingo i in., 2016). Największą różnicę pomiędzy działaniem przeciwutleniającym obu chitozanów wykazał test DPPH, gdzie modyfikowany polimer wykazuje taki sam efekt neutralizacji rodnika w 3-krotonie niższym stężeniu w stosunku do próby kontrolnej. Innymi słowy modyfikowany chitozan posiada

3-krotnie wyższe działanie przeciwutleniające w stosunku do polimeru przed modyfikacją. Aktywność próby p-CHI₁₀₀ w tym samym teście odpowiada aktywności uzyskanej dla żelatyny ze skór łososia i suma afrykańskiego, które podobnie jak modyfikowana pochodna chitozanu są dobrze rozpuszczalne w wodzie.



Rys. 18. Porównanie właściwości przeciwutleniających i zdolności do chelatowania jonów Fe²⁺ przez chitozan modyfikowany p-CHI₁₀₀ i materiał kontrolny CHI. Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe; p<0,05, n=3)

Zdolność chelatowania jonów Fe²⁺ przez chitozan niemodyfikowany oraz po modyfikacji różni się nieznacznie i także odpowiada zdolności chelatującej wspomnianych białek (rozdz. 4.1.2.1). Chitozan tworzy chelaty z jonami metali, w których jako ligandy zaangażowane są grupy hydroksylowe oraz atomy tlenu w resztach D-glukozaminowych. Inny mechanizm polega na wiązaniu jednego jonu metalu przez grupy aminowe pochodzące z pojedynczego łańcucha polisacharydowego.

Zwiększenie zawartości wolnych grup aminowych w wyniku deacetylacji chityny nie przekłada się jednak bezpośrednio na wzrost zdolności wiązania jonów metali. Możliwość adsorpcji metalu może być zwiększona przez sieciowanie, kontrolowaną N-acetylację lub przez współdziałające wiązanie z innymi polimerami (Piątkowski i in., 2010). Wprowadzenie dodatkowych grup -OH pochodzących z reszt N-propylofosfonowych nie wpłynęło znacząco na zdolność chelatowania jonów Fe^{2+} .

Reakcja substytucji grupy N-propylofosfonowej powoduje wprowadzenie do struktury związku dodatkowych podstawników, w tym szczególnie grup hydroksylowych, które mogą być powodem zwiększonej aktywności przeciwutleniającej modyfikowanego chitozanu, wykazanej w teście z DPPH. Ponadto, badania aktywności przeciwutleniającej chitozanów o różnej masie cząsteczkowej wykonane przez Chien i współpracowników (2007) wskazały na porównywalną zdolność do neutralizacji wolnych rodników wykazywaną przez chitozan o niskiej masie cząsteczkowej (12 kDa) z roztworami kwasu askorbinowego.

Z kolei Yen i współpracownicy (2007) skorelowali wzrost właściwości przeciwutleniających chitozanów wyizolowanych ze ściany komórkowej grzybów shitake ze wzrostem stopnia deacetylacji tego preparatu. Co więcej, ta sama grupa badaczy wykazała także bardzo duże zdolności chitozanu do chelatowania jonów Fe^{2+} , na poziomie porównywalnym z EDTA i kilkunastokrotnie wyższym w stosunku do kwasu cytrynowego. Czynniki wpływające na właściwości chelatujące chitozanu nie są do końca wyjaśnione. Znane są doniesienia literaturowe sugerujące, że dwuwartościowe jony metali chelatowane są poprzez oddziaływania z grupą hydroksylową na atomie węgla C6 oraz z grupą aminową na atomie węgla C2 glukozaminy (Inoue i in., 1988).

Rola wolnych rodników i wpływ substancji przeciwutleniających w procesach regeneracyjnych jest jednym z najbardziej aktualnych tematów w wyznaczaniu nowych strategii leczenia (Fitzmaurice i in., 2011). Spośród wielu czynników wpływających na opóźnienia w procesie regeneracji ubytku skórnoego, te związane z występowaniem i skutkami stresu oksydacyjnego okazały się mieć duże znaczenie. Z tego powodu uważa się, że nowoczesny materiał o przeznaczeniu biomedycznym, poza funkcjami typowymi dla materiałów tradycyjnych, powinien zapewniać odpowiednią równowagę oskwydo-redukcyjną. Wykazano bowiem, że zarówno nadmiar wolnych rodników, jak i ich całkowita neutralizacja prowadzi do zaburzenia prawidłowego przebiegu gojenia rany (Roy i in., 2006).

Zaprezentowane w pracy kompozyty chitozanowe charakteryzują się zdolnością do neutralizacji rodników na dużo niższym poziomie w stosunku do niskocząsteczkowych związków przeciwutleniających, takich jak glutation, witamina E, witamina C i flawonoidy, dla których wartości EC_{50} zawarte są na poziomie kilku $\mu\text{g/mL}$. Gąbka wykonana wyłącznie z chitozanu modyfikowanego posiada porównywalną zdolność zmiatania rodników w teście DPPH do chitozanu funkcjonalizowanego gallusanem epigallokatechiny (EGCG), będącym polifenolem pochodzenia roślinnego i jednocześnie 100-krotnie silniejszym przeciwutleniaczem niż witamina C (Moreno-Vásquez i in., 2017). Jest to wartość wyższa niż przedstawiona w innych dotychczasowych pracach, np. badaniach Puoci'ego i współpracowników (2008), w których oceniano wpływ stężenia kopolimeru kwasu ferulowego i kwasu metakrylowego na zdolność wygaszania rodnika DPPH: 30% i 80% wygaszanie rodnika DPPH przy stężeniu 8000 g/mL odpowiednio chitozanu i kopolimeru.

Gąbka wykonana wyłącznie z chitozanu modyfikowanego neutralizuje kationo-rodnik ABTS w 100% przy stężeniu 102 mg/mL . Dla pochodnej chitozanu funkcjonalizowanej gallusanem wartość ta wynosi 4 mg/mL i spowodowana jest wprowadzeniem do łańcucha polimerowego podstawnika o dużej zawartości protonodonorowych grup hydroksylowych (Moreno-Vásquez i in., 2017).

4.1.3.6. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Dostępnych jest wiele doniesień literaturowych świadczących o przeciwdrobnoustrojowym działaniu chitozanu w roztworach (Benhabiles i in., 2012; Malinowska-Pańczyk i in., 2015; Verlee i in., 2017). Aktywność ta zależy od stopnia deacetylacji chitozanu, jego masy cząsteczkowej, jego stężenia w roztworze oraz pH i siły jonowej roztworu (Kong i in., 2010). Chitozan w roztworze o pH poniżej 6 jest dodatnio naładowany z powodu protonowania grup aminowych w resztach glukozaminy, a głównym powodem przeciwdrobnoustrojowej aktywności polimeru jest oddziaływanie jego dodatnio naładowanych łańcuchów z anionowymi składnikami mikroorganizmów - lipopolisacharydami: bakterie Gram-ujemne i kwasami tejchojowymi: bakterie Gram-dodatnie, co powoduje lizę komórek (Kong i in., 2010). W przypadku, gdy pH roztworu w którym znajduje się chitozan jest neutralne, według niektórych autorów aktywność przeciwdrobnoustrojowa polimeru wygasa ze względu

na dominującą ilość nienaładowanych grup aminowych chitozanu oraz brak rozpuszczalności polimeru (Sudarshan i in., 1992).

Tab. 15. Średnia liczba komórek mikroorganizmów w skali logarytmicznej dla materiałów kontrolnego i kompozytów po 24 godzinach kontaktu innokulum z testowanym materiałem (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHI_x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 15, 25, 40). Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco, p<0,05, n=3).

Materiał	Czas oddziaływania [godz.]	Liczba komórek [log CFU/mL]		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
CHI	0	6,69 ^a	5,91 ^a	4,64 ^a
CHI	24	7,00 ^b	7,62 ^b	6,00 ^b
p-CHI ₁₅	24	1,69 ^c	6,69 ^c	1,69 ^c
p-CHI ₂₅	24	1,69 ^c	6,47 ^d	1,69 ^c
p-CHI ₄₀	24	1,69 ^c	4,47 ^e	1,69 ^c

Podsumowując, wyniki oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych potwierdzają, że wszystkie badane materiały zawierające modyfikowaną pochodną chitozanu wykazują zdolność do hamowania wzrostu drobnoustrojów, szczególnie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich oraz drożdży. Niższą aktywność kompozytów zaobserwowano w przypadku *E. coli* reprezentującej bakterie Gram-ujemne, szczególnie gdy udział modyfikowanego chitozanu w kompozycie stanowił 15% jego masy. Materiał kontrolny nie zapobiegał dalszemu rozwojowi obu wskaźnikowych szczepów bakteryjnych oraz grzybów (Tab. 15).

W tabeli 16 przedstawiono aktywność przeciwdrobnoustrojową kompozytów wyrażoną jako logarytmiczny stopień redukcji bakterii/drożdży (R) oraz wartość procentową tego współczynnika w celu liczbowego zobrazowania stopnia redukcji komórek wywołaną 24 godzinną inkubacją materiału z innokulum. Można zaobserwować, że kompozyty zawierające 40% masowych chitozanu poddanego modyfikacji zapewniają prawie 100% zdolność redukcji komórek drobnoustrojów namnożonych na kserożelu wykonanym wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego w czasie 24 godzin.

Ze względu na budowę chemiczną chitozanu, jego aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest wyższa w środowisku o niższym pH, kiedy grupy

aminowe ulegają protonowaniu i obniżają się w miarę zbliżania się do wartości pKa 6,3 – 6,5.

Tab. 16. Porównanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej kompozytów chitozanu w odniesieniu do próbki kontrolnej (p-CHI_x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 15, 25, 40). Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco, p<0,05, n=3).

Materiał	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	R	Redukcja liczby komórek bakterii [%]	R	Redukcja liczby komórek bakterii [%]	R	Redukcja liczby komórek drożdży [%]
p-CHI ₁₅	5,3	99,9 ^a	0,9	88,1 ^a	4,3	99,9 ^a
p-CHI ₂₅	5,3	99,9 ^a	1,2	92,9 ^b	2,7	99,9 ^a
p-CHI ₄₀	5,3	9,9 ^a	3,2	99,9 ^c	4,3	99,9 ^a

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań potwierdzają, że wbudowanie bezwodnika kwasu N-propylofosfonowego w strukturę polimeru zapewnia kompozytom chitozanowym wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową w środowisku o neutralnym pH (Tab. 16).

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa chitozanu opisywana jest jako działanie bakteriostatyczne a nie bakteriobójcze, chociaż właściwy mechanizm tego pierwszego nie został do końca sprecyzowany (Goy i in., 2009).

Zaproponowano trzy modele opisujące tę aktywność. Pierwszy z nich związany jest z występowaniem oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy pozytywnie naładowanymi cząsteczkami chitozanu, a negatywnie naładowaną błoną komórkową bakterii. Oddziaływania te mogą prowadzić do zmian przepuszczalności błony komórkowej wywołując w ten sposób zaburzenie równowagi osmotycznej wewnątrz komórki, a w konsekwencji zahamować wzrost mikroorganizmów. Mogą one także odpowiadać za hydrolizę peptydoglikanu w ścianie komórkowej bakterii, co prowadzi do wycieku wewnątrzkomórkowych elektrolitów, takich jak: jony potasu, białka, kwasy nukleinowe, glukoza (Raafat i in., 2008; Goy i in., 2009).

Drugi z mechanizmów opiera się o wiązanie chitozanu z DNA bakterii, co prowadzi do zahamowania syntezy białek w wyniku penetracji chitozanu do jądra komórkowego mikroorganizmów. Model ten zakłada, że chitozan może przechodzić

przez ścianę i/lub błonę komórek bakteryjnych, co potwierdzono stosując techniki skaningowej mikroskopii konfokalnej (Sebti i in., 2005).

Trzeci mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego chitozanu związany jest z jego zdolnością do chelatowania jonów metali. Polega on na wiązaniu się polimeru ze składnikami odżywczymi, niezbędnymi do wzrostu mikroorganizmów (Goy i in., 2009). Mechanizm ten dotyczy w szczególności środowiska zasadowego, ponieważ grupy aminowe występują w stanie niesprotonowanym, a para elektronowa obecna na azocie tych grup może oddziaływać z kationami.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa chitozanu, niezależnie od przedstawionych mechanizmów, zależy od wielu czynników: masy cząsteczkowej polimeru, jego stopnia deacetylacji, pH środowiska oraz od zmian wywołanych modyfikacją. Przyłączenie reszt N-propylofosfonowych do struktury chitozanu powoduje redukcję wolnych grup aminowych w wyniku tworzenia się wiązania z fosforem pochodzącym od bezwodnika (Kumar i in., 2013). Modyfikacja ta nie powoduje jednak zmiany polikationowego charakteru chitozanu rozpuszczonego w wodzie. Oznacza to, że nie wszystkie grupy aminowe biorą udział w tworzeniu połączeń N-P, czego powodem jest występowanie dużej zawady sterycznej wynikającej z obecności grup N-propylofosfonowych, szczególnie w przypadku, gdy dwie grupy N-glukozaminy występują w łańcuchu polisacharydu obok siebie.

Zatem na zwiększoną aktywność przeciwbakteryjną modyfikowanego chitozanu wpływać będzie: rozpuszczalność polimeru w neutralnym pH, jego polikationowy charakter, a także obecność grup fosforanowych, które w myśl trzeciego mechanizmu odpowiedzialne są za chelatowanie kationów, w tym składników niezbędnych do rozwoju mikroorganizmów. Istotnym czynnikiem jest także obecność grup propylowych pochodzących z bezwodnika T3P. W neutralnym pH niewielka ilość grup aminowych występuje w postaci sprotonowanej. W takich warunkach efekt odpychania pomiędzy grupami $-NH_3^+$ jest słaby. Sprzyja to tworzeniu między- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, które przy okazji wytwarzają hydrofobowe mikroprzestrzenie w obrębie łańcucha polimeru. Lokalny podział obszaru polimeru na hydrofobowe i hydrofilowe fragmenty sprzyja, pod względem strukturalnym, powinowactwu pomiędzy bakteryjną ścianą komórkową a pochodną chitozanu (Goy i in., 2009). Powyższe przypuszczenia potwierdzone zostały w pracy Rabea i współpracowników (2003), którzy dodatkowo dowiedli, że aktywność

przeciwbakteryjna zwiększała się wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w pochodnej.

Podobnie jak w przypadku bakterii uważa się, że aktywność chitozanu przeciwko grzybom związana jest raczej z zahamowaniem ich wzrostu niż z działaniem grzybobójczym (Raafat i in., 2008). Chitozan działa jako inhibitor kiełkowania i wydłużania zarodników grzybów oraz wzrostu w kierunku własnego promienia. Mechanizm działania obejmuje morfogenezę ściany komórkowej, podczas której oligomery chitozanu dyfundują do wnętrza strzępki, zakłócając aktywność enzymów odpowiedzialnych za wzrost grzyba (Goy i in., 2009).

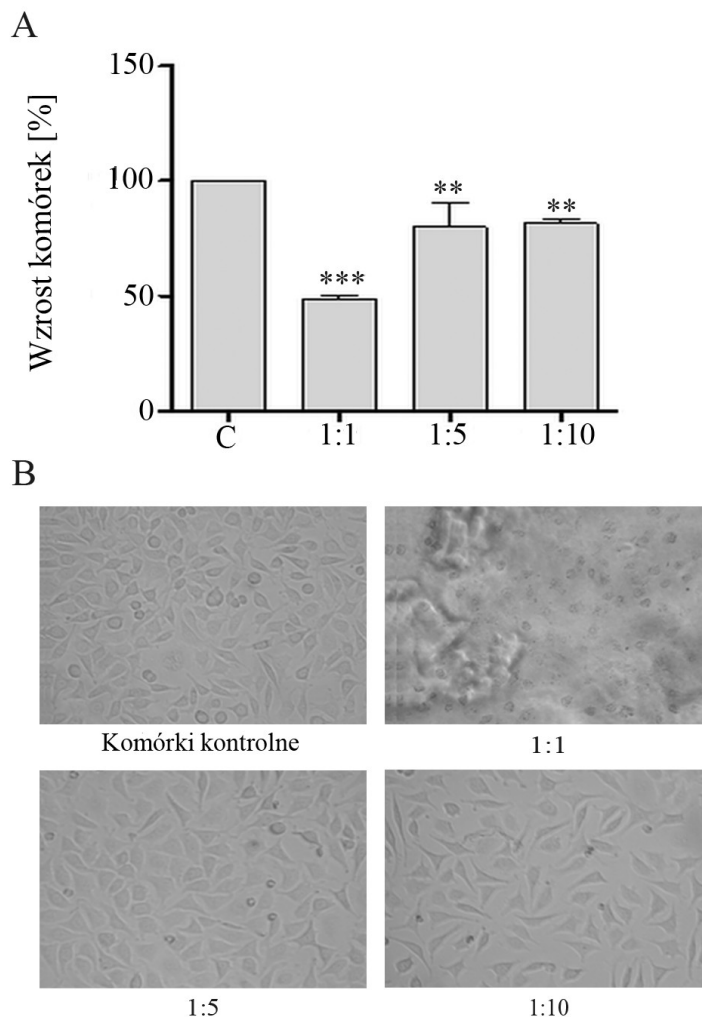
4.1.3.7. Właściwości cytotoksyczne

Cytotoksyczny efekt związany z działaniem chitozanowej pochodnej określono z wykorzystaniem testu MTT względem mysich komórek fibroblastów (L929) zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-5:2009. Jest to standardowa metoda *in vitro*, która opiera się na pomiarze aktywności mitochondrialnej żywych komórek (Pariante i in., 2001). Wyniki badań przedstawiono na rysunku 19 i wyrażono jako procent żywych komórek po 24 godzinach prowadzenia testu, w obecności pochodnej chitozanu w porównaniu z pozytywną kontrolą bez materiału (Rys. 19A).

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że obecność ekstraktu badanego materiału w rozcieńczeniach pożywki hodowlanej 1:5 oraz 1:10, dla których stężenie modyfikowanego chitozanu wynosi odpowiednio 0,033 g/mL oraz 0,018 g/mL spowodowało tylko 20% zahamowanie wzrostu komórek w odniesieniu do próby kontrolnej, czyli komórek bez materiału. Z kolei żywotność komórek traktowanych chitozaniem modyfikowanym w stężeniu 0,1 g/mL, czyli o rozcieńczeniu ekstraktu materiału w pożywce hodowlanej 1:1, po zakończonym teście osiągnęła wartość 50%.

Analiza mikroskopowa komórek fibroblastów mysich L929 poddanych inkubacji z pochodną chitozanu potwierdziła dane przedstawione na rysunku 19A. Zgodnie z rysunkiem 19B morfologia fibroblastów hodowanych w obecności modyfikowanego chitozanu w rozcieńczeniach 1:5 i 1:10 nie uległa zmianie w stosunku do komórek kontrolnych. Co więcej, w przypadku rozcieńczenia 1:10 komórki były skurczone i odłączone od płytki hodowlanej, co wskazuje, że mogły proliferować i utrzymywać morfologię w obecności modyfikowanego chitozanu, w zależności od jego stężenia. Próbką chitozanu niemodyfikowanego otrzymanego w analogiczny sposób nie

wykazała działania cytotoksycznego w żadnym z badanych rozcieńczeń. Nie powodowała zahamowania wzrostu komórek względem kontroli negatywnej.



Rys. 19. (A) Wyniki testu MTT dla chitozanu modyfikowanego bezwodnikiem kwasu propylofosfonowego (rozcieńczenia p-CHI₁₀₀: 1:1, 1:5, 1:10), po 24 godz. inkubacji z linią komórkową L929, **p<0.01, ***p<0.001. Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe; n=3) (B) Zdjęcia mikroskopowe komórek bez obecności materiału (kontrola komórki L929) oraz w obecności badanego materiału p-CHI₁₀₀ w rozcieńczeniach 1:1, 1:5, 1:10 (powiększenie x 150).

Rozpatrując badane kompozyty chitozanowe jako potencjalne materiały opatrunkowe, w ocenie ich działania cytotoksycznego należy wziąć pod uwagę także parametry takie jak chłonność i rozpuszczalność. Materiały do wszystkich badań przygotowywano w formie gąbek o średnicy 20 mm i wysokości 5 mm, gdzie średnia masa jednej gąbki wynosiła $0,05 \pm 0,002$ g. Zgodnie z uzyskanymi wynikami badane kompozyty były w stanie wchłonąć 30-krotność masy własnej wysięku z rany, a ich

rozpuszczalność nie przekraczała 11%. Stąd stężenie modyfikowanego chitozanu w kontakcie z raną, wynosi ok. 0,005 g/L. Na tej podstawie można stwierdzić, że ilość modyfikowanego chitozanu stosowana w otrzymanych kompozytach nie wpływa negatywnie na gojącą się ranę.

4.2. Hydrożele chitozanowe w technice kapsułkowania współosiowego

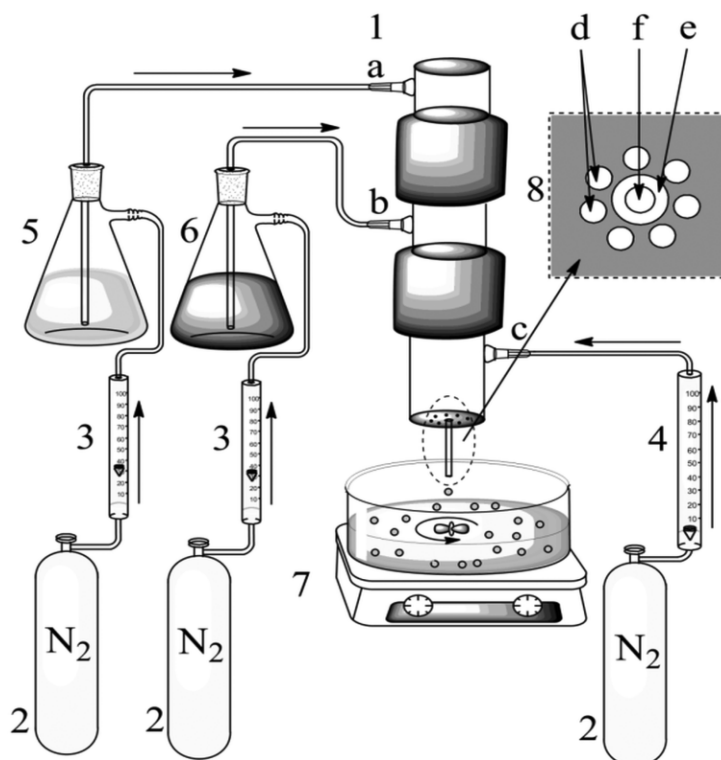
Umieszczenie wewnątrz hydrożelowej membrany związków o charakterze hydrofobowym w fazie ciekłej z technologicznego punktu widzenia jest trudne do wykonania. Rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie modelu kuli, w której zewnętrzna powłoka stanowi uwodnioną membranę utworzoną z biopolimeru. W rdzeniu membrany oddzielonym od zewnętrznego otoczenia możliwe jest zamykanie związków bez względu na ich charakter chemiczny. Sposób ten stanowi podstawę wielu metod kapsułkowania związków aktywnych w celu kontrolowania ich właściwości i aktywności.

Dotychczas najbardziej popularną metodą kapsułkowania olejów również poza skalą mikro jest produkcja twardych i miękkich kapsułek żelatynowych. Różnica w ich twardości wynika z rodzaju plastyfikatora dodawanego do żelatyny podczas procesu. Obecność plastyfikatora zwiększa jednak przepuszczalność tlenu do wnętrza kapsułek (Sagiri i in., 2016). Do tej pory nie zbadano podobnych układów będących nośnikami olejów jadalnych w postaci hydrożeli z wykorzystaniem popularnych aktualnie biopolimerów jak chitozan czy alginian sodu.

W pierwszym etapie realizacji założeń badawczych pracy doktorskiej związanych z oceną wpływu kapsułkowania olejów jadalnych na ich stabilność oksydacyjną przygotowano aparaturę do kapsułkowania metodą współosiową oraz dokonano doboru optymalnych parametrów przepływu poszczególnych mediów (Tylingo i in., 2016).

Najważniejszym elementem aparatury jest głowica (Rys. 20.1). Składa się ona z dwóch igieł o różnych średnicach umieszczonych jedna w drugiej. Wewnętrzne i zewnętrzne średnice igieł wynoszą odpowiednio 0,70 mm i 1,25 mm dla igły wewnętrznej oraz 2,20 mm i 3,00 mm dla igły zewnętrznej. Głowica wyposażona jest w trzy króćce wlotowe dostarczające odpowiednie media. Pierwszy z nich (Rys. 20.1a) połączony jest z igłą wewnętrzną i służy do transportu związku stanowiącego rdzeń kapsułki, w tym przypadku oleju. Kolejny (Rys. 20.1b) połączony z igłą

zewnątrzną umożliwia transport roztworu płaszcza. Natomiast ostatni (Rys. 20.1c), zaprojektowano w celu transportu strumienia gazu inertnego, którego zadaniem jest zrywanie formujących się u ujścia igieł kropeł spadających do roztworu utwardzającego.



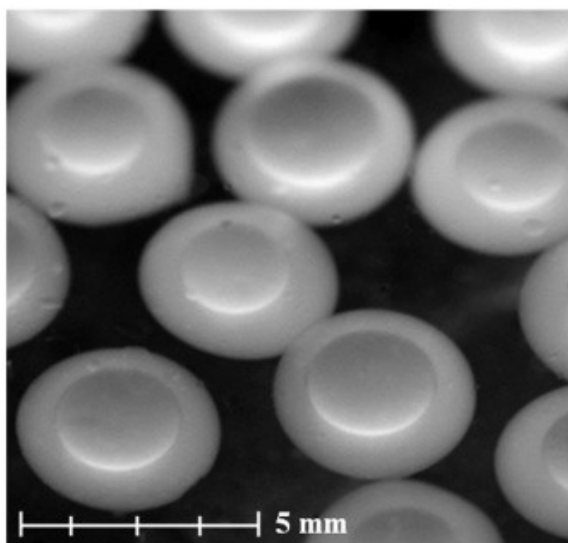
1	Głowica
a	Króciec doprowadzający rdzeń (olej)
b	Króciec doprowadzający roztwór płaszcza (chitozanu, alginianu sodu)
c	Króciec doprowadzający gaz inertny (zrywający formujące się krople)
2	Butle ciśnieniowe z azotem
3	Precyzyjne rotametry do regulacji prędkości przepływu roztworów i gazu inertnego
4	Rotametr o szerokim zakresie pomiarowym
5	Naczynie z olejem
6	Naczynie z roztworem płaszcza
7	Mieszadło magnetyczne
8	Widok głowicy od spodu
d	Otwory wylotowe gazu inertnego (zrywającego krople)
e	Wylot roztworu płaszcza
f	Wylot rdzenia kapsułki

Rys. 20. Schemat zestawu do kapsułkowania metodą współosiową wykonany w ramach realizacji pracy doktorskiej w Kat. ChTiBŻ.

W systemie zastosowano transport pneumatyczny, w którym media poprzez głowicę tłoczono za pomocą sprężonego azotu (Rys. 20. 2). Prędkość przepływu mediów

mierzona jest rotametrami na podstawie prędkości przepływu gazu włączanego do butli z roztworami lub włączanego do ostatniego z króćców (Rys. 20.1c). Roztwory rdzenia i płaszcza umieszcza się odpowiednich kolbach ssawkowych (Rys. 20.5 i Rys. 20.6). Formujące się kapsułki zbierane są w roztworze utwardzającym, znajdującym się w szklanym krystalizatorze i umieszczonym na płycie mieszadła magnetycznego (Rys. 20.7). W celu lepszego zrozumienia koncepcji działania zestawu, na rysunku 20 zamieszczono widok głowicy od spodu (Rys. 20.8.d-f).

Formowanie się struktur typu kropla w kropli jest zależne od wielu zmiennych, takich jak konstrukcja urządzenia: średnice igieł, ich wzajemne koncentryczne ułożenie, odległość pomiędzy igłami, a roztworem utwardzającym czy właściwości fizykochemiczne związków kapsułkowanych i matrycy do ich immobilizacji: lepkość, oddziaływania chemiczne. Pomimo występowania wielu zmiennych, przeprowadzone testy potwierdziły, że prototyp urządzenia może służyć do otoczkowania związków hydrofobowych (Rys. 21).



Rys. 21. Zdjęcie chitozanowych kapsulek z olejowym rdzeniem bezpośrednio po utwardzeniu w roztworze utwardzającym (Kapsułki wykonane zgodnie z metodyką zawartą w pracy - rozdz. 3.3.6. Prędkość przepływu gazu tłoczącego roztwór płaszcza $V_S = 4,45$ g/godz., prędkość przepływu oleju $V_C = 2,00$ g/godz.).

Jako materiał płaszcza kapsułki zastosowano 2% roztwór chitozanu w 0,1M kwasie mlekowym. Wybór tego polimeru uzasadniony był szeregiem jego pozytywnych właściwości takich jak: biodegradowalność, biokompatybilność, brak toksycznego oddziaływania na organizmy żywe, aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec wybranych rodzajów bakterii i grzybów (Rinaudo, 2006). Pozwala to na wszechstronne zastosowanie polimeru (Ravi Kumar, 2000). W literaturze dostępne są także prace na

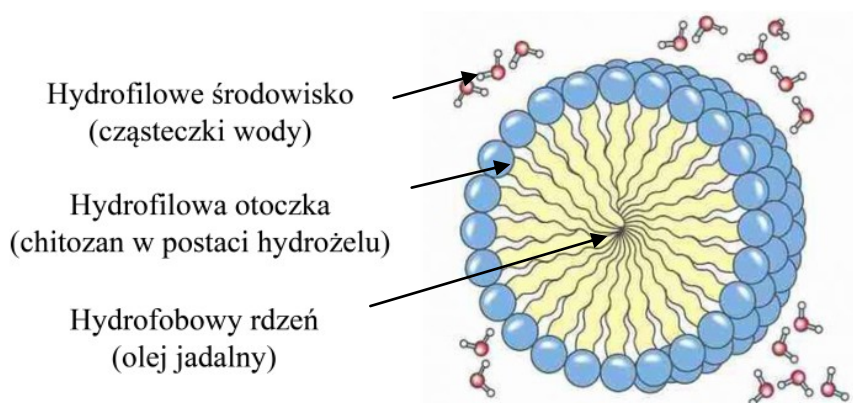
temat oddziaływań chitozanu z tłuszczami (Gades i Stern, 2002; Gades i Stern, 2004). Polisacharydy, w tym chitozan są szeroko stosowane do kapsułkowania związków ze względu na ich umiarkowanie niską przepuszczalność tlenu (Sandoval-Castilla i in., 2010).

Właściwościami chitozanu podyktowany został także skład roztworu utwardzającego struktury kropla w kropli. Chitozan rozpuszcza się wyłącznie w kwaśnych roztworach, dlatego jednym ze składników roztworu utwardzającego był wodorotlenek sodu, w obecności którego chitozan wypada w postaci żelu wiążącego wodę, czyli hydrożelu (Rinaudo, 2006).

Rozpuszczalność chitozanu maleje także wraz z obniżaniem się polarności rozpuszczalnika, ponieważ wzrasta wartość ciepła jego rozpuszczania, a jednocześnie maleje ilość grup hydroksylowych wody, solwujących grupy aminowe polimeru (Sano i in., 1999). Stąd wniosek, że stężenie krytyczne rozpuszczalnika obniżającego polarność roztworu utwardzającego będzie zależało od jego budowy.

Jeżeli przeznaczeniem kapsulek z olejem byłaby suplementacja diety, to jedynym możliwym i akceptowalnym dodatkiem obniżającym polarność roztworu utwardzającego spośród alkoholi jest etanol, dla którego stężenie krytyczne rozpuszczania chitozanu wynosi 50% (Sano i in., 1999).

Dodatkowym atutem metody jest charakter chemiczny wszystkich roztworów użytych w procesie. Hydrofobowy rdzeń w kombinacji z hydrofilowym roztworem płaszcza oraz roztworem utwardzającym blokuje wyciek oleju podczas wypadania chitozanu z roztworu i jego utwardzania. Także przechowywane kapsulek w formie hydrożelowej w wodzie destylowanej, wskazuje pewną analogię do budowy miceli w środowisku hydrofilowym (Rys. 22).



Rys. 22. Schemat miceli w środowisku hydrofilowym (www.bifi.es).

4.2.1. Ocena wpływu prędkości przepływu mediów na formowanie kapsulek

Kluczowym czynnikiem mającym wpływ na jakość formowania się kapsulek była lepkość rdzenia i płaszczka tłoczonych przez głowicę aparatury. Niewielka wartość lepkości oleju jadalnego: $60 \div 80$ mPas, przy szybkości ścinania 22,00 1/s, $T=25^\circ\text{C}$, pomimo niewielkiej średnicy tłoczącej go igły – 0,7 mm, powodowała trudności z ustaleniem jednostajnego przepływu. Przepływ oleju poniżej 1g/godz. skutkowało jego zawartością w kapsułce rzędu kilku procent. Natomiast zbyt wysoka prędkość przepływu oleju, tzn. powyżej 3g/godz., powodowała przebijanie warstwy płaszczka podczas formowania kapsulek. Z tego względu jako optymalną prędkość przepływu oleju ustalono wartość pośrednią równą 2 g/godz., której odpowiadała prędkość gazu tłoczącego olej przez głowicę równa: 0,45 L/godz.

Z jednej strony do wytworzenia płaszczka kapsułki izolującego rdzeń od środowiska zewnętrznego logiczne byłoby użycie roztworu polimeru w możliwie największym stężeniu, aby zapewnić maksymalną barierowość. Niestety, duża lepkość roztworów chitozanu przy relatywnie niskim stężeniu polimeru w roztworze, max. 5% w/v, stanowi czynnik limitujący.

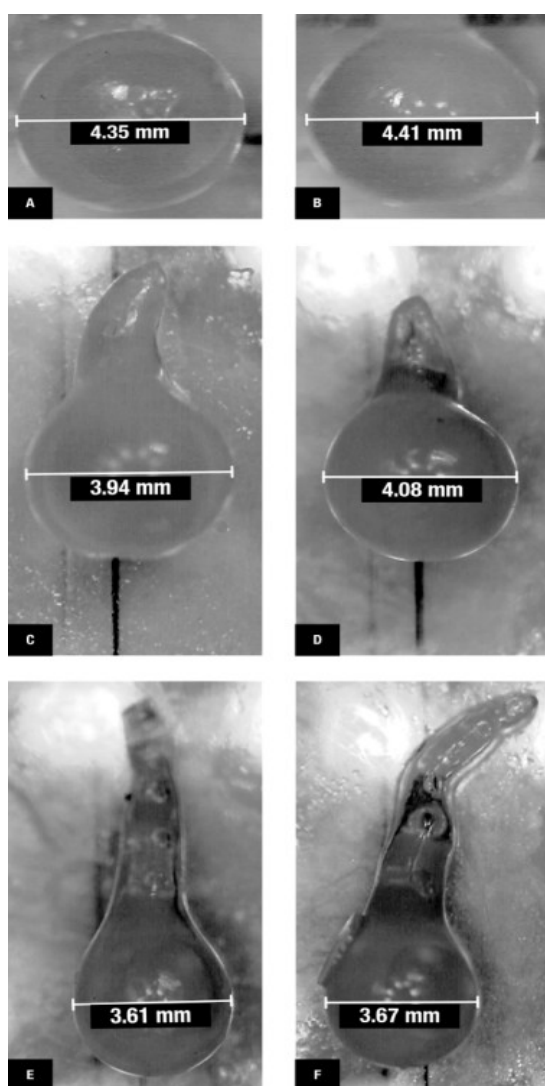
Tab. 17. Wpływ prędkości przepływu roztworu płaszczka na zawartość oleju w kapsułkach oraz ich średnicę. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

Prędkość gazu tłoczącego roztwór płaszczka [L/godz.]	*Rzeczywista prędkość przepływu roztworu płaszczka (V_s) [g/godz.]	Zawartość oleju w kapsułkach (OC) [% w/w]	Średnica kapsulek (CD) [mm]	Stosunek masy oleju do masy suchego polimeru w kapsułkach [w/w]
0,6	$2,64 \pm 0,02^a$	$42,13 \pm 0,87^a$	$4,35 \pm 0,07^a$	$31,37^a$
1,2	$4,45 \pm 0,03^b$	$45,23 \pm 1,00^a$	$4,41 \pm 0,05^a$	$35,30^a$
1,8	$13,52 \pm 0,03^c$	$14,78 \pm 0,63^b$	$3,94 \pm 0,24^b$	$7,82^b$
2,4	$14,48 \pm 0,02^d$	$14,52 \pm 0,04^b$	$4,08 \pm 0,12^b$	$7,66^b$
3,0	$23,21 \pm 0,01^e$	$6,96 \pm 0,40^c$	$3,61 \pm 0,10^c$	$3,40^c$
3,6	$27,24 \pm 0,02^f$	$8,65 \pm 0,54^d$	$3,67 \pm 0,02^c$	$4,30^c$

Prędkość przepływu rdzenia podczas formowania kapsulek była stała i wynosiła $V_c=2\text{g/godz}$;
* wartości uzyskane na podstawie pomiarów grawimetrycznych kapsulek spadających do roztworu utwardzającego.

Kształt, średnica kapsułek i zawartość oleju w ich wnętrzu, silnie zależą od prędkości przepływu poszczególnych mediów przez głowicę aparatury (Tab. 17).

Zgodnie z powyższą tabelą, każdej prędkości gazu tłoczącego roztwór płaszcz odpowiada rzeczywista prędkość masowego przepływu roztworu płaszcz (V_s) w jednostce czasu. Mimo że wzrost prędkości gazu tłoczącego powoduje także wzrost parametru V_s , nie jest to zależność liniowa. Przyczyną tego są wahania ciśnienia w układzie aparatury, związane z kompresją azotu w jej martwej przestrzeni. Im większa jest lepkość roztworu, tym większa jest kompresja gazu i tym większe jest ciśnienie potrzebne do transportu roztworu w aparaturze.



Rys. 23. Wpływ prędkości przepływu roztworu płaszcz na średnicę i kształt kapsułek (Prędkość przepływu gazu tłoczącego roztwór: A-0,6 L/godz., B-1,2 L/godz., C-1,8 L/godz., D-2,4 L/godz., E-3,0 L/godz., F-3,6 L/godz.)

kapsułek uzyskanych dla stałego przepływu oleju i jednocześnie wybranych

Największą zawartość oleju w kapsułkach osiągnięto dla rzeczywistego przepływu roztworu chitozanu w zakresie prędkości $2,64 \div 4,45$ g/godz. Dalszy wzrost prędkości przepływu roztworu płaszcz powodował obniżenie udziału oleju jako rdzenia kapsułki, nawet poniżej 10% (Tab. 17). Formujące się kapsułki wpadały do roztworu utwardzającego pod wpływem własnego ciężaru, niezależnie od stosunku masy polimeru do masy oleju. Oznacza to, że w zakresie prędkości przepływu roztworu chitozanu $2,64 \div 4,45$ g/godz., kropla chitozanu maksymalnie wypełniła się olejem, zanim osiągnęła masę potrzebną do oderwania od igły. W optymalnych warunkach przepływu powyższych mediów 1 g chitozanu w przeliczeniu na suchą masę polimeru wystarcza do zakapsułkowania $31 \div 35$ g oleju.

W tabeli 17 zamieszczono średnice

prędkości przepływu roztworu płaszcz, dla których uzyskano średnice mieszczące się w zakresie 3,6 - 4,4 mm. Konfrontując te wyniki z kształtem kapsułek odpowiadającym wybranej prędkości przepływu roztworu płaszcz widać, że jego wzrost powodował nieznaczne obniżenie średnicy kapsułek (Rys. 23). Różnice te są wynikiem odchylenia od modelu kształtu kuli. Podyktowane są one czynnikami takimi jak: wysoka wartość lepkości roztworu, odpowiedzialna za wydłużanie się kropli, zanim osiągnie ona masę niezbędną do oderwania się od igły, a także deformowaniem się kropli podczas uderzania o powierzchnię roztworu utwardzającego, pomimo niewielkiej odległości pomiędzy ujściem igieł a lustrem roztworu: 5 cm. Co więcej, przekroczenie prędkości gazu tłoczącego roztwór chitozanu powyżej 3 L/godz. powodował tworzenie się tzw. struktur wielordzeniowych, których mniejsze rdzenie umiejscowione były w ogonie kapsułki (Rys. 23).

W doborze optymalnych warunków kapsułkowania uwzględniono także dodatkową zmienną jaką jest możliwość regulacji średnicy kapsułek za pomocą strumienia azotu skierowanego ku wylotowi igieł. Zmiana prędkości tego strumienia wywołuje szybszy spadek formujących się kapsułek do roztworu utwardzającego, zanim osiągną one masę potrzebną do spadku grawitacyjnego.

Tab. 18. Wpływ prędkości przepływu gazu inertnego zrywającego krople na zawartość oleju w kapsułkach oraz ich średnicę. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

Prędkość przepływu gazu inertnego zrywającego krople (V_N) [L/godz.]	*Rzeczywista prędkość przepływu roztworu płaszcz (V_S) [g/godz.]	Zawartość oleju w kapsułkach (OC) [% w/w]	Średnica kapsulek (CD) [mm]	Stosunek masy oleju do masy suchego polimeru w kapsułkach [w/w]
0		$45,23 \pm 1,00^a$	$4,41 \pm 0,06^a$	$31,37^a$
200		$44,31 \pm 1,02^a$	$4,32 \pm 0,05^a$	$34,08^a$
400	4,45	$42,12 \pm 0,33^b$	$3,82 \pm 0,02^b$	$31,35^a$
600		$29,58 \pm 1,63^c$	$2,81 \pm 0,02^c$	$18,56^b$
800		bd.	bd.	bd.

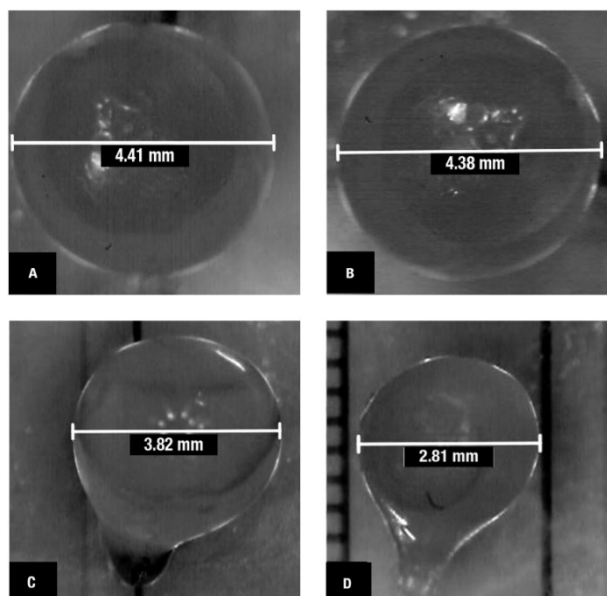
Prędkość przepływu rdzenia podczas formowania kapsułek była stała i wynosiła $V_c=2$ g/godz.

* wartości uzyskane na podstawie pomiarów grawimetrycznych kapsułek spadających do roztworu utwardzającego.

bd. - brak danych ze względu na niską wydajność procesu kapsułkowania.

Pomiary wykonano dla stałych wartości przepływu roztworu płaszcza i rdzenia, ustalonych w poprzednim punkcie za wartości optymalne, kapsułek najbardziej zbliżonych kształtem do kuli i o największej zawartości oleju: $V_S=4,45$ g/godz., $V_c=2,00$ g/godz. Zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 18 można zaobserwować, że wzrost prędkości przepływu strumienia gazu zrywającego krople powodował zmniejszenie średnicy kapsułek. Znaczna zmiana średnicy nastąpiła jednak dopiero powyżej prędkości 400 L/godz. Poniżej tej wartości strumień gazu nie stanowi wystarczającej siły napędowej, aby możliwe było odrywanie kropli z igły głowicy (Tylingo i in., 2016). Najmniejsza, możliwa do osiągnięcia średnica kapsułek wyniosła 2,8 mm i była mniejsza o ok. 36% w stosunku to kapsułek otrzymanych w warunkach optymalnych bez użycia strumienia gazu inertnego.

Kapsułki, których formowanie wspomagano strumieniem gazu inertnego charakteryzowały się bardziej sferycznym kształtem (Rys. 24). Oznacza to, że regulacja średnicy kapsułek strumieniem gazu zapobiega tworzeniu się kapsułek z ogonami.



Rys. 24. Wpływ prędkości strumienia gazu inertnego zrywającego krople na średnicę oraz kształt kapsułek. (Prędkość przepływu gazu inertnego: A-0 L/godz., B-200 L/godz., C-400 L/godz., D-600 L/godz., pomiary wykonane dla optymalnych przepływów roztworów płaszcza i rdzenia).

Zawartość oleju w kapsułkach otrzymanych w zakresie prędkości strumienia azotu 0 ÷ 200 L/godz. nie różniła się statystycznie. Wzrost prędkości gazu do 600 L/godz. powodował ok. 30% obniżenie zawartości oleju w kapsułkach, w stosunku do wartości maksymalnej (Tab. 17). Wydajność tworzenia się kapsułek dla prędkości

strumieniu gazu zrywającego równej 800 L/godz. była tak niewielka, że wynik ten uznano wyłącznie za jakościowy i określono jako wartość graniczną powodującą niszczenie struktur kropla w kropli przed ich utwardzeniem. Porównując wartości stosunku masy oleju do masy suchego polimeru zawartych w tabelach 17 i 18 ustalono, że optymalne warunki tworzenia kapsułek z olejem dotyczą: prędkości przepływu rdzenia $V_c = 2,00$ g/godz., prędkości przepływu roztworu płaszczka $V_s = 4,45$ g/godz. oraz odpowiadającym im prędkościom gazów tłoczących: 0,2 L/godz. i 1,2 L/godz., a także rezygnacji z użycia gazu zrywającego krople do roztworu utwardzającego ze względu na generowane koszty gazu.

4.2.2. Wpływ wilgotności względnej otoczenia na stopień zatrzymania oleju w kapsułkach

W kolejnym etapie badań określono wpływ wilgotności względnej powietrza na zdolność płaszczka chitozanowego do retencji oleju wewnątrz utworzonych kapsułek, po usunięciu ich z hydrofilowego, wodnego środowiska. Wyniki badań wskazują, że wraz z obniżeniem wilgotności względnej maleje również stopień zatrzymania oleju w kapsułkach. Parowanie wody z hydrożelowego płaszczka kapsułek prowadzi do wytworzenia cienkiego filmu polimeru, podatnego na pęknięcia już w trakcie wysychania. Minimalna akceptowalna retencja oleju w kapsułkach jest możliwa do osiągnięcia, gdy wilgotność względna otoczenia wynosi co najmniej 50% (Tab. 19).

Tab. 19. Wpływ wilgotności względnej otoczenia na stopień zatrzymania oleju w kapsułkach chitozanowych. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

Wilgotność względna [%]	Stopień zatrzymania oleju w kapsułkach [%]
30	43,11 ± 2,71 ^a
40	52,21 ± 3,03 ^b
50	90,45 ± 3,28 ^c
60	97,66 ± 2,19 ^d
70	97,00 ± 2,99 ^d

W celu zapewnienia jednakowych warunków wysycenia hydrożelowej otoczki wodą, innymi słowy jednakowej masy wody przypadającej na jednostkową masę polimeru w hydrożelu, w dalszych testach kapsułki przechowywano w zamkniętych

naczyniach z dodatkiem wody destylowanej, której ilość dobierano na podstawie masy kapsułek i chłonności polimeru.

4.2.3. Wpływ podstawowych zmiennych kapsułkowania na stabilność modelowych olejów jadalnych w krótkotrwałym przechowywaniu

Wyniki wstępnych testów stabilności olejów jadalnych kapsułkowanych metodą współosiową wykazały dużą zmienność. Dlatego w kolejnej części pracy dokonano oceny wpływu materiału konstrukcyjnego głowicy, rodzaju polimeru stanowiącego płaszcz kapsułki wraz z roztworem utwardzającym, a także warunków temperaturowych podczas krótkotrwałego testu przechowywania zakapsułkowanych olejów w wybranych temperaturach na ich stabilność oksydacyjną.

Materiał badawczy stanowił rafinowany olej rzepakowy „Kujawski”, posiadający co najmniej roczny termin przydatności do spożycia oraz tłoczony na zimno, wysokolinolenowy olej lniany „Wielkopolski”, dla którego termin przydatności do spożycia wynosił co najmniej pół roku. We wszystkich testach wykorzystano jednorodne partie olejów rzepakowego i lnianego uzyskane przez połączenie i wymieszanie 5 litrów olejów pochodzących z mniejszych opakowań jednostkowych. Dalsza obróbka polegała na utworzeniu kapsułek chitozanowych i alginianowych (rozdz. 3.3.6), przy użyciu szklanej i stalowej głowicy wchodzących w skład aparatury do kapsułkowania, a także przetłoczenie olejów przez wewnętrzne igły tychże głowic bez tworzenia polimerowego płaszcza. Próby kontrolne stanowiły oleje niepoddane żadnej obróbce i przechowywane przez ten sam czas w wybranych temperaturach: 4°C, 25°C i 40°C.

4.2.3.1. Olej rzepakowy

Wyjściowa wartość liczby nadtlenkowej oleju rzepakowego była mała (Tab. 20). W sposób nieznaczący wartość tej liczby zmieniła się bezpośrednio po przetłoczeniu oleju przez szklaną głowicę, a także po zamknięciu go w strukturze kapsułek alginianowych i chitozanowych za pomocą tej głowicy. Wykorzystanie do obróbki oleju głowicy stalowej spowodowało 2-krotny wzrost liczby nadtlenkowej, mierzonej bezpośrednio po utworzeniu kapsułek lub jego przetłoczeniu wewnętrzną igłą, co wskazuje na negatywny wpływ materiału konstrukcyjnego głowicy (Tab. 20).

Tab. 20. Zmiany liczby nadtlenkowej oleju rzepakowego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszcza kapsułki i temperatury termostatowania prób. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

	Rodzaj obróbki	Bezpośrednio po otwarciu/ kapsułkowaniu	Po tygodniu przechowywania w temperaturze		
			4°C	25°C	40°C
Kontrola		1,26 ± 0,02 ^a	1,37 ± 0,02 ^a	2,10 ± 0,05 ^a	3,10 ± 0,08 ^a
Głowica szklana	BP	1,28 ± 0,03 ^a	1,41 ± 0,05 ^a	2,09 ± 0,08 ^a	3,15 ± 0,11 ^a
	CHI	1,34 ± 0,05 ^a	2,00 ± 0,10 ^b	2,84 ± 0,02 ^b	3,97 ± 0,08 ^b
	ALG	1,29 ± 0,03 ^a	1,50 ± 0,04 ^a	2,30 ± 0,02 ^c	3,21 ± 0,05 ^a
Głowica stalowa	BP	2,63 ± 0,10 ^b	2,37 ± 0,14 ^c	4,13 ± 0,12 ^d	5,10 ± 0,07 ^c
	CHI	2,70 ± 0,08 ^b	2,54 ± 0,02 ^d	4,60 ± 0,09 ^e	5,56 ± 0,11 ^d
	ALG	2,69 ± 0,03 ^b	2,36 ± 0,08 ^c	4,24 ± 0,06 ^d	5,15 ± 0,12 ^c

BP - przetłoczenie oleju przez wewnętrzną igłę głowicy przez formowania kapsułek

CHI - wytworzenie kapsułek z płaszczem chitozanowym

ALG - wytworzenie kapsułek z płaszczem alginianowym

Zgodnie z normą PN-A-86908 maksymalna dopuszczalna wartość liczby nadtlenkowej dla oleju rzepakowego rafinowanego wynosi 5 mEq O₂/kg oleju. Wartość ta w czasie trwania testów została przekroczona jedynie w przypadku kapsułek tworzonych za pomocą głowicy stalowej i termostatowanych w ciągu 1 tygodnia w temp. 40°C. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wzrost temperatury w odniesieniu do wszystkich badanych układów wpływał proporcjonalnie na wzrost ilości tworzących się nadtlenczków w tej samej jednostce czasu. Biorąc pod uwagę istotność wyników, wykorzystanie podczas kapsułkowania głowicy stalowej powodowało generowanie się największej liczby nadtlenczków w oleju rzepakowym, szczególnie gdy jako płaszcz kapsułki stosowano roztwór chitozanu. Za szybsze utlenianie oleju kapsułkowanego głowicą stalową mogą odpowiadać zanieczyszczenia stali zwane domieszkami przypadkowymi, w których obecne są np. miedź lub chrom.

Przetłaczanie oleju przez głowicę szklaną bez tworzenia kapsułek, a także kapsułkowanie z wykorzystaniem obu polimerów jako płaszcza nie wpływało na zmianę zawartości pierwotnych produktów utlenienia w oleju bezpośrednio po każdym z zakończonych procesów (Tab. 20). Olej rzepakowy zamknięty w postaci kapsułek chitozanowych charakteryzował się wyższą liczbą nadtlenkową w stosunku do próby kontrolnej po tygodniowym przechowywaniu we wszystkich testowanych temperaturach. Najniższe wartości liczby nadtlenkowej w przypadku głowicy

szklanej uzyskano dla kapsułek formowanych z alginianu sodu, dla wszystkich temperatur termostatowania prób i jest to jednocześnie układ, w którym liczba nadtlenkowa podczas trwania testu wzrosła w najmniejszym stopniu (Tab. 20). W układzie z alginianem sodu i głowicą szklaną istotną różnicę zarejestrowano jedynie dla próby przechowywanej w temp. 25°C, gdzie wartość liczby nadtlenkowej była wyższa niż wartość dla próby kontrolnej. Różnicy tej nie zaobserwowano dla temp. 4°C i 40°C.

Wyniki oznaczeń liczby anizydynowej są spójne z wynikami uzyskanymi podczas pomiarów liczby nadtlenkowej (Tab. 21). Początkowo wszystkie próby oleju po obróbce wykazywały bardzo małą zawartość wtórnych produktów utlenienia, co związane jest z koniecznością wygenerowania w pierwszej kolejności produktów pierwotnych przemian oksydacyjnych. Najwyższą wartość liczby anizydynowej bezpośrednio po kapsułkowaniu uzyskano dla kapsułek chitozanowych otrzymanych z wykorzystaniem głowicy stalowej.

Tab.21. Zmiany liczby anizydynowej oleju rzepakowego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszcza kapsułki i temperatury termostatowania prób. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

	Rodzaj obróbki	Bezpośrednio po otwarciu/kapsułkowaniu	Po tygodniu przechowywania w temperaturze		
			4°C	25°C	40°C
Kontrola		0,14 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,30 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,02 ^a
Głowica szklana	BP	0,14 ± 0,04 ^a	0,21 ± 0,03 ^a	0,33 ± 0,07 ^a	0,50 ± 0,12 ^a
	CHI	0,36 ± 0,03 ^b	0,78 ± 0,10 ^b	1,02 ± 0,02 ^b	1,40 ± 0,02 ^b
	ALG	0,20 ± 0,03 ^a	0,30 ± 0,04 ^a	0,45 ± 0,02 ^c	0,76 ± 0,05 ^c
Głowica stalowa	BP	0,24 ± 0,10 ^a	1,26 ± 0,05 ^c	1,55 ± 0,03 ^d	2,13 ± 0,04 ^d
	CHI	0,42 ± 0,05 ^b	1,44 ± 0,02 ^d	1,98 ± 0,09 ^e	3,34 ± 0,08 ^e
	ALG	0,32 ± 0,03 ^a	1,35 ± 0,05 ^c	1,58 ± 0,04 ^d	2,77 ± 0,10 ^f

BP - przetłoczenie oleju przez wewnętrzną igłę głowicy przez formowania kapsułek
 CHI - wytworzenie kapsułek z płaszczem chitozanowym
 ALG - wytworzenie kapsułek z płaszczem alginianowym

Co więcej, wartość ta była podobna do wyniku otrzymanego dla próby kontrolnej po jej tygodniowym termostatowaniu w 40°C. Makareviciene i Janulis (1999) podają, że wartość liczby anizydynowej w olejach rafinowanych nie powinna przekraczać 8

jednostek. Nie została ona osiągnięta w żadnym z badanych układów. Konieczne było jednak sprawdzenie efektu długotrwałego przechowywania (rozdz. 4.2.4).

Najniższą wartość liczby anizydynowej przypisuje się dla oleju kapsułkowanego w strukturze żelu alginianowego przy użyciu głowicy wykonanej ze szkła (Tab. 21). Uzyskane wyniki potwierdzają, że przy zastosowaniu optymalnych warunków przepływu roztworów, szklanej głowicy i alginianu sodu jako płaszcza kapsułki, wzrost liczby anizydynowej wywołany procesem kapsułkowania i jego tygodniowym termostatowaniem w wybranych temperaturach wynosi ok. 0,3 jednostki. Zastosowanie takich samych warunków, lecz wykorzystanie jako płaszcza kapsułki hydrożelu chitozanowego powoduje, że wartość badanego parametru wzrasta w stosunku do prób kontrolnych o $0,6 \div 1$ jednostki.

Oznaczenie LOO i LA umożliwiło wyliczenie wskaźnika TOTOX, który umownie określa stopień utlenienia olejów. Uznaje się, że graniczny poziom determinujący dobrą jakość olejów jadalnych, to wartość wskaźnika TOTOX równa 10 (Wroniak i in., 2006). Zgodnie z tabelą 22, wszystkie próby poddane obróbce, poza olejem przetłoczonym przez głowice szklaną bez kapsułkowania, charakteryzowały się wyższym wskaźnikiem utlenienia w stosunku do próby kontrolnej. Dopuszczalna wartość wskaźnika została przekroczona wyłącznie w próbach oleju poddanych obróbce z wykorzystaniem głowicy stalowej (Tab. 22).

Tab.22. Zmiany wskaźnika TOTOX oleju rzepakowego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszcza kapsułki i temperatury termostatowania prób.

	Rodzaj obróbki	Bezpośrednio po otwarciu/kapsułkowaniu	Po tygodniu przechowywania w temperaturze		
			4°C	25°C	40°C
Kontrola		2,63	2,93	4,50	6,64
Głowica szklana	BP	2,70	3,03	4,51	6,80
	CHI	3,04	4,78	6,70	8,94
	ALG	2,78	3,30	5,05	7,18
Głowica stalowa	BP	5,50	6,00	9,81	12,33
	CHI	5,82	6,52	11,18	14,46
	ALG	5,70	6,07	10,06	13,07

BP - przetłoczenie oleju przez wewnętrzną igłę głowicy przez formowania kapsulek
 CHI - wytworzenie kapsulek z płaszczem chitozanowym
 ALG - wytworzenie kapsulek z płaszczem alginianowym

4.2.3.2. Olej lniany

Wyjściowa wartość liczby nadtlenkowej oleju lnianego była mała. W sposób nieznaczący wartość tej liczby zmieniła się bezpośrednio po przetłoczeniu oleju przez szklaną głowicę, a także po zamknięciu go w strukturze kapsulek z wykorzystaniem obu polimerów za pomocą tej głowicy (Tab. 23).

Tab. 23. Zmiany liczby nadtlenkowej oleju lnianego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszcza kapsułki i temperatury termostatowania prób. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

	Rodzaj obróbki	Bezpośrednio po otwarciu/kapsułkowaniu	Po tygodniu przechowywania w temperaturze		
			4°C	25°C	40°C
Kontrola		0,98 ± 0,02 ^a	1,17 ± 0,02 ^a	1,58 ± 0,11 ^a	2,10 ± 0,08 ^a
Głowica szklana	BP	1,00 ± 0,03 ^a	1,20 ± 0,08 ^a	1,74 ± 0,12 ^a	2,02 ± 0,06 ^a
	CHI	1,10 ± 0,09 ^a	1,84 ± 0,05 ^b	2,02 ± 0,06 ^b	2,59 ± 0,08 ^b
	ALG	1,12 ± 0,05 ^a	2,51 ± 0,08 ^c	2,37 ± 0,07 ^c	4,92 ± 0,08 ^c
Głowica stalowa	BP	1,20 ± 0,14 ^b	2,39 ± 0,13 ^c	11,98 ± 0,09 ^d	52,69 ± 0,85 ^d
	CHI	2,56 ± 0,21 ^c	3,65 ± 0,41 ^d	10,66 ± 0,95 ^e	24,23 ± 0,78 ^e
	ALG	3,45 ± 0,18 ^d	4,91 ± 0,12 ^e	14,33 ± 1,07 ^f	32,57 ± 1,02 ^f

BP - przetłoczenie oleju przez wewnętrzną igłę głowicy przez formowania kapsulek

CHI - wytworzenie kapsulek z płaszczem chitozanowym

ALG - wytworzenie kapsulek z płaszczem alginianowym

Wykorzystanie do obróbki oleju głowicy stalowej spowodowało ok. 2,5-krotny wzrost liczby nadtlenkowej oleju otoczonego płaszczem chitozanowym w stosunku do próby kontrolnej bezpośrednio po kapsułkowaniu. W przypadku oleju zamkniętego w strukturze hydrożelu alginianowego wartość ta wzrosła ok. 3,5-krotnie. W odróżnieniu od testu z olejem rzepakowym (rozdz. 4.2.3.1), tygodniowe termostatowanie prób wykazało, że największa wartość liczby nadtlenkowej uzyskana została w przypadku kapsulek w otoczce alginianowej, lecz także formowanych przy użyciu głowicy stalowej, dla wszystkich badanych wariantów temperaturowych (Tab. 23).

Dopuszczalna wartość liczby nadtlenkowej dla olejów i tłuszczów tłoczonych na zimno wynosi 15 mEq O₂/kg oleju (Codex Standard, 2013). W czasie trwania testów wartość ta została przekroczona w przypadku wszystkich prób poddanych obróbce z wykorzystaniem głowicy stalowej i termostatowanych w temperaturze 40°C.

Przetłaczanie oleju przez głowicę szklaną bez tworzenia kapsułek, a także kapsułkowanie z wykorzystaniem obu polimerów jako płaszcza, nie wpływało na zmianę zawartości pierwotnych produktów utlenienia w oleju, bezpośrednio po każdym z zakończonych procesów (Tab. 23). Olej lniany zamknięty w postaci kapsułek alginianowych charakteryzował się najwyższą liczbą nadtlenkową w stosunku do prób otrzymanych z wykorzystaniem głowicy szklanej oraz w odniesieniu do próby kontrolnej. Dotyczyło to wszystkich testowanych temperatur. Układ, w którym liczba nadtlenkowa podczas trwania testu wzrosła w najmniejszym stopniu dotyczy kapsułek chitozanowych formowanych za pomocą głowicy szklanej.

Najwyższą wartość liczby anizydynowej dla prób oleju bezpośrednio po obróbce zanotowano jednocześnie dla oleju lnianego przetłoczonego wyłącznie przez wewnętrzną igłę głowicy stalowej oraz dla olejów w otoczkach chitozanowych i alginianowych utworzonych z wykorzystaniem tej głowicy (Tab. 24).

Tab. 24. Zmiany liczby anizydynowej oleju lnianego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszcza kapsułki i temperatury termostatowania prób. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

	Rodzaj obróbki	Bezpośrednio po otwarciu/ kapsułkowaniu	Po tygodniu przechowywania w temperaturze		
			4°C	25°C	40°C
Kontrola		0,27 ± 0,02 ^a	0,75 ± 0,02 ^a	1,10 ± 0,02 ^a	1,85 ± 0,02 ^a
Głowica szklana	BP	0,30 ± 0,02 ^a	0,69 ± 0,05 ^a	1,03 ± 0,07 ^a	1,98 ± 0,12 ^a
	CHI	0,35 ± 0,06 ^a	2,34 ± 1,10 ^b	2,12 ± 0,02 ^b	2,53 ± 0,02 ^b
	ALG	0,31 ± 0,05 ^a	2,42 ± 0,04 ^b	4,91 ± 0,02 ^c	5,87 ± 0,05 ^c
Głowica stalowa	BP	0,89 ± 0,09 ^b	1,64 ± 0,05 ^c	5,79 ± 0,03 ^d	10,35 ± 0,04 ^d
	CHI	0,94 ± 0,11 ^b	2,27 ± 0,02 ^b	2,19 ± 0,09 ^b	5,01 ± 0,08 ^e
	ALG	0,90 ± 0,05 ^b	2,30 ± 0,05 ^b	4,22 ± 0,04 ^e	8,96 ± 0,10 ^f

BP - przetłoczenie oleju przez wewnętrzną igłę głowicy przez formowania kapsułek

CHI - wytworzenie kapsułek z płaszczem chitozanowym

ALG - wytworzenie kapsułek z płaszczem alginianowym

Była to wartość 3-krotnie większa w stosunku do próby kontrolnej i wszystkich prób po obróbce z wykorzystaniem głowicy szklanej, które nie różniły się statystycznie. Odmiernym wynikiem w stosunku do analogicznych badań z udziałem oleju rzepakowego było osiągnięcie niższej wartości liczby anizydynowej w przypadku oleju lnianego kapsułkowanego w hydrożelu chitozanowym, w stosunku do tego samego oleju w kapsułkach alginianowych. Wyniki te dotyczą prób po tygodniowym termostatowaniu

w temperaturze 25°C i 40°C. Najniższą wartość liczby anizydynowej przypisuje się olejowi kapsułkowanemu w strukturze żelu chitozanowego przy użyciu głowicy wykonanej ze szkła (Tab. 24). Makarevičiene i Janulis (1999) wskazują, że maksymalna wartość liczby p-anizydynowej dla olejów z pierwszego tłoczenia nie powinna przekraczać 3 jednostek, natomiast według Subramaniana i współpracowników (2000) wartość ta dotyczy jedynie 2 jednostek. Jak dotąd nie określono górnego limitu liczby p-anizydynowej wyłącznie dla olejów tłoczonych na zimno.

Wskaźnik TOTOX obliczony dla prób oleju lnianego osiągnął znacznie większe wartości niż w przypadku rafinowanego oleju rzepakowego. Graniczna wartość wskaźnika została przekroczona dla wszystkich prób oleju lnianego, poddanych obróbce głowicą stalową i termostatowanych w 40°C i 25°C. Uzyskane wartości TOTOX w drugiej z wymienionych temperatur były prawie 3-krotnie wyższe w porównaniu z próbami oleju rzepakowego (Tab. 25).

Tab.25. Zmiany wskaźnika TOTOX oleju lnianego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszczu kapsułki i temperatury termostatowania prób.

	Rodzaj obróbki	Bezpośrednio po otwarciu/ kapsułkowaniu	Po tygodniu przechowywania w temperaturze		
			4°C	25°C	40°C
Kontrola		2,21	3,09	4,26	6,05
Głowica szklana	BP	2,30	3,09	4,51	6,02
	CHI	2,55	6,02	6,16	7,71
	ALG	2,55	7,44	9,65	15,71
Głowica stalowa	BP	3,29	6,42	29,75	115,73
	CHI	6,06	9,57	23,51	53,47
	ALG	7,80	12,12	32,88	74,1

BP - przetłoczenie oleju przez wewnętrzną igłę głowicy przez formowania kapsułek
 CHI - wytworzenie kapsułek z płaszczem chitozanowym
 ALG - wytworzenie kapsułek z płaszczem alginianowym

Jednym z wniosków wyciągniętych na podstawie powyższych wyników jest konieczność rezygnacji z wykorzystania stalowej głowicy podczas kapsułkowania olejów jadalnych, ze względu na możliwość przyspieszania zachodzących w nich procesów utleniania. W kolejnych etapach eksperymentu do produkcji kapsułek wykorzystana została wyłącznie głowica szklana. Obecnie w Kat. ChTiBŻ trwają prace nad wytworzeniem głowic teflonowych. W przypadku głowicy wykonanej ze szkła, operacja przetłaczania oleju przez jej wewnętrzną igłę nie powodowała niekorzystnych

zmian związanych z utlenianiem się olejów rzepakowego i lnianego, co dotyczy wszystkich temperatur, w których termostatowano próby. Oznacza to, że zastosowanie w aparaturze do kapsułkowania transportu pneumatycznego ze sprężonym azotem jest w pełni uzasadnione. Najmniejsze straty jakości rafinowanego oleju rzepakowego w stosunku do próby odniesienia nastąpiły po zakapsułkowaniu i przechowywaniu prób w otoczce alginianowej. W przypadku tłoczonego na zimno oleju lnianego zależność taką wykazano po zakapsułkowaniu w strukturze hydrożelu chitozanowego.

Wykorzystując powyższe wnioski, w kolejnym etapie badań ochronną rolę płaszczka kapsułek w stosunku do olejów jadalnych określono wykorzystując przyspieszone testy starzenia, imitując w ten sposób efekt długotrwałego przechowywania.

4.2.4. Ocena ochronnej roli płaszczka kapsułki na stabilność oksydacyjną olejów jadalnych podczas testów przyspieszonego starzenia

Ocenę ochronnej roli płaszczka kapsułek na stabilność oksydacyjną olejów jadalnych zamykanych w hydrożelowych otoczkach z chitozanu i alginianu sodu przeprowadzono podczas testów przyspieszonego starzenia. Kapsułki alginianowe oraz chitozanowe zawierające olej rzepakowy lub lniany przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdz. 3.3.6. Próby kapsułek umieszczono następnie w komorze termostatycznej w temperaturze 40°C i przechowywano przez 4 tygodnie. Kapsułki z olejem zamknięte były w szklanych butelkach z nakrętką zawierających odpowiednią objętość wody destylowanej, niezbędnej do utrzymania struktury hydrożelu, zgodnie z wynikami zaprezentowanymi w rozdz. 4.2.2. Jako próby odniesienia wykorzystano także oleje niekapsułkowane, zamknięte w identycznych szklanych butelkach i poddane termostataowaniu. Zmiany oksydacyjne olejów zmierzono na podstawie liczby nadtlenkowej, anizydynowej, dla których wyznaczono wskaźnik TOTOX oraz liczby kwasowej bezpośrednio po zakapsułkowaniu olejów, a także po 2 i 4 tygodniach przechowywania prób w 40°C.

Początkowa wartość liczb nadtlenkowych olejów rzepakowego i lnianego w próbach odniesienia oraz w kapsułkach przed rozpoczęciem termostatowania była niewielka i porównywalna z wartościami mierzonymi bezpośrednio po zakapsułkowaniu w poprzednich testach (rozdz. 4.2.3). Największą wartość LOO w przypadku oleju rzepakowego uzyskano po 28 dniu termostatowania



dla próby kontrolnej (Tab. 26). W przypadku tego samego oleju przechowywanego w postaci kapsułek chitozanowych i alginianowych wartość ta po zakończonym teście była aż o ok. 40% niższa.

Tab. 26. Zmiany oksydacyjne oleju rzepakowego przechowywanego w temperaturze 40°C w postaci kapsułek chitozanowych, alginianowych oraz w postaci niezakapsułkowanej. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

Wyróżnik	Rodzaj obróbki	Czas termostatowania w temp. 40°C [dni]		
		0	14	28
Liczba nadtlenkowa [mEq O ₂ /kg]	K	1,30 ± 0,04 ^a	11,21 ± 0,17 ^a	35,52 ± 1,98 ^a
	CHI	1,28 ± 0,05 ^a	8,74 ± 0,78 ^b	19,92 ± 1,69 ^b
	ALG	1,34 ± 0,07 ^a	10,55 ± 0,81 ^c	20,77 ± 1,02 ^c
Liczba anizydynowa [-]	K	0,34 ± 0,08 ^a	4,56 ± 0,42 ^a	11,30 ± 0,90 ^a
	CHI	0,30 ± 0,05 ^a	3,41 ± 0,22 ^b	7,52 ± 1,05 ^b
	ALG	0,40 ± 0,09 ^a	3,27 ± 0,25 ^b	6,98 ± 0,87 ^b
TOTOX	K	2,94 ^a	26,98 ^a	82,34 ^a
	CHI	2,86 ^a	20,89 ^b	47,36 ^b
	ALG	3,08 ^a	24,37 ^a	48,52 ^b
Liczba kwasowa [mg KOH/g]	K	0,08 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	0,30 ± 0,04 ^a
	CHI	0,09 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,03 ^a	0,29 ± 0,02 ^a
	ALG	0,10 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,04 ^a	0,32 ± 0,03 ^a

K- brak obróbki oleju; próba kontrolna

CHI - wytworzenie kapsułek z płaszczem chitozanowym

ALG - wytworzenie kapsułek z płaszczem alginianowym

Najwyższą wartością liczby nadtlenkowej po 28 dniach testu charakteryzował się olej lniany niepoddany kapsułkowaniu. Dla prób przechowywanych w tych samych warunkach w postaci kapsułek alginianowych osiągnięto wynik o 20% niższy. Największe działanie ochronne w przeprowadzonych testach uzyskano w wyniku kapsułkowania oleju lnianego w hydrożelu chitozanowym. W tym przypadku wartość LOO była o 88% niższa od wartości uzyskanej dla próby kontrolnej.

Dopuszczalna wartość liczby nadtlenkowej dla rafinowanego oleju rzepakowego, wynosząca 5 mEq/kg oleju, podczas pomiarów 14-stego dnia trwania testu została przekroczona dla wszystkich badanych prób. Jedyną próbą, w której po zakończonym teście wartość dopuszczalnej liczby nadtlenkowej nie została przekroczona był olej w kapsułkach chitozanowych (15 mEq/kg). W pozostałych

próbach oleju lnianego wartość ta została przekroczona między 14 a 28 dniem trwania testu.

Analizowane próby wykazały zróżnicowany poziom wtórnych produktów utlenienia w zależności od rodzaju i formy przechowywania oleju. W każdym z badanych przypadków, podobnie jak dla liczby nadtlencowej, następował wzrost wartości liczby anizydynowej w trakcie termostatowania prób (Tab. 27). Najwyższe wartości liczby anizydynowej po zakończonym teście uzyskano dla prób kontrolnych obu badanych olejów. Najniższe zaś, dla oleju lnianego zamkniętego w kapsułkach chitozanowych. Z kolei najniższą wartość LA w przypadku oleju rzepakowego osiągnięto zarówno dla prób w kapsułkach alginianowych i chitozanowych. Dopuszczalna wartość liczby anizydynowej w tym oleju przekroczona została jedynie w próbie kontrolnej między 14 a 28 dniem testu. W oleju lnianym wartość ta została przekroczona pomiędzy 14 a 28 dniem dla próby kontrolnej i oleju w płaszczu alginianowym.

Tab. 27. Zmiany oksydacyjne oleju lnianego przechowywanego w temperaturze 40°C w postaci kapsulek chitozanowych, alginianowych oraz w postaci niezakapsułkowanej. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

Wyróżnik	Rodzaj obróbki	Czas termostatowania w temp. 40°C [dni]		
		0	14	28
Liczba nadtlencowa [mEq O ₂ /kg]	K	0,89 ± 0,03 ^a	10,64 ± 0,24 ^a	65,07 ± 1,53 ^a
	CHI	1,10 ± 0,09 ^b	3,94 ± 0,15 ^b	7,48 ± 0,35 ^b
	ALG	1,15 ± 0,07 ^b	8,47 ± 0,20 ^c	48,25 ± 1,48 ^c
Liczba anizydynowa [-]	K	0,31 ± 0,02 ^a	2,72 ± 0,21 ^a	9,34 ± 0,19 ^a
	CHI	0,33 ± 0,02 ^a	1,15 ± 0,12 ^b	3,02 ± 0,31 ^b
	ALG	0,33 ± 0,03 ^a	1,20 ± 0,09 ^b	5,05 ± 0,34 ^c
TOTOX	K	2,09 ^a	24,00 ^a	139,48 ^a
	CHI	2,53 ^b	9,03 ^b	17,98 ^b
	ALG	2,63 ^b	18,14 ^c	101,55 ^c
Liczba kwasowa [mg KOH/g]	K	0,32 ± 0,03 ^a	0,87 ± 0,01 ^a	1,22 ± 0,10 ^a
	CHI	0,34 ± 0,05 ^a	0,92 ± 0,05 ^a	1,34 ± 0,09 ^a
	ALG	0,35 ± 0,03 ^a	1,10 ± 0,04 ^b	1,25 ± 0,11 ^a

K- brak obróbki oleju; próba kontrolna

CHI - wytworzenie kapsulek z płaszczem chitozanowym

ALG - wytworzenie kapsulek z płaszczem alginianowym

Na podstawie wartości LOO i LA obliczono wskaźniki TOTOX (Tab. 27). Podczas testów przyspieszonego starzenia wykazano wzrost wartości wskaźnika wraz z upływem czasu termostatowania prób. Wskaźnik ten wyznaczony dla oleju rzepakowego przekroczył dopuszczalną wartość jeszcze przed 14 dniem termostatowania we wszystkich badanych próbach. Najniższą wartość wskaźnika TOTOX uzyskano dla oleju lnianego w kapsułkach chitozanowych, dla którego graniczny poziom 10 jednostek przekroczony został krótko po 14 dniu termostatowania.

Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) w oleju rzepakowym była mała zarówno w próbie kontrolnej, jak i obu próbach oleju kapsułkowanego po rozpoczęciu etapu termostatowania. Po 28 dniach przechowywania prób w temperaturze 40°C wartość badanej liczby zwiększyła się w jednakowym stopniu w oleju niekapsułkowanym oraz w oleju w postaci kapsułek chitozanowych i alginianowych. Oznacza to, że etap kapsułkowania nie przyczynia się do powstawania wolnych kwasów tłuszczowych.

Warunkiem zajścia hydrolizy triacylogliceroli, podczas której tworzą się WKT, jest obecność wody, zasadowe środowisko reakcji i wysoka temperatura. Są to standardowe warunki wykorzystywane w reakcjach zmydlania tłuszczów (Drozdowski, 2007). Obecność dwóch pierwszych czynników podczas utwardzania chitozanowych kapsułek w temperaturze pokojowej nie miała wpływu na ostateczną wartość liczby kwasowej (Tab. 26 i Tab. 27). Co więcej, wartości LK po zakończonym teście spełniały wymagania normy PN-A-86908, zgodnie z którą dopuszczalna wartość LK dla rafinowanego oleju rzepakowego nie przekracza 0,3 mg KOH/g).

Wymagania jakościowe dotyczące LK w stosunku do oleju lnianego tłoczonego na zimno są tożsame z wymaganiami jakościowymi dla olejów roślinnych tłoczonych na zimno z różnych surowców. Zgodnie z powyższym dopuszczalna wartość LK dla tego oleju wynosi 4,0 mg KOH/g tłuszczu (Codex Standard 19-1981, 2013). Wartości liczby kwasowej dla oleju lnianego zwiększały się z taką samą szybkością podczas trwania testu dla wszystkich termostatowanych prób (Tab. 27). Po 28 dniu osiągnęły wartość ok. 1,25 mg KOH/g oleju, również spełniając wymagania określone w normie. Wartości liczby kwasowej oleju lnianego były większe niż oleju rzepakowego, ponieważ w procesie rafinacji wolne kwasy tłuszczowe są skutecznie usuwane (Wroniak i in., 2008).

W strukturze chemicznej wolnych kwasów tłuszczowych występują grupy hydrofilowe i hydrofobowe, dzięki czemu WKT zlokalizowane są na powierzchni oleju.

Powoduje to spadek jego napięcia powierzchniowego i wzrost prędkości dyfuzji tlenu do wnętrza oleju (Choe i Min, 2006). Opisany efekt proutleniający WKT uzależniony jest od stężenia i stopnia nienasycenia kwasów tłuszczowych. Im większy jest stopień nienasycenia kwasów tłuszczowych tym mniejszy jest efekt proutleniający. Inną drogą pogarszania jakości olejów związaną z obecnością WKT jest ich rozkład o charakterze oksydatywnym (Waraho i in., 2011).

W toku badawczym wykazano, że zawartość wolnych kwasów tłuszczowych we wszystkich próbach osiągnęła akceptowalny poziom, dlatego nie ma wpływu na ich jęlczenie.

Osiągnięcie wysokich wartości liczb nadtlennokowych, szczególnie w przypadku prób kontrolnych olejów, w końcowej fazie termostatowania jest w pełni uzasadnione, ponieważ próby do testów pobierane były zawsze z tego samego naczynia, zapewniając w ten sposób dostęp tlenu do olejów.

Większa liczba wiązań podwójnych występująca w profilu kwasów tłuszczowych oleju lnianego (Tab. 28) jest powodem jego większej podatności na utlenianie względem oleju rzepakowego, co tłumaczy ok. 2-krotnie mniejszą wartość liczby nadtlennokowej uzyskanej po teście przyspieszonego starzenia w kontrolnej próbie oleju rzepakowego.

Tab. 28. Skład kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego i wysokolinolenowego oleju lnianego (Tańska i in., 2011).

Kwas tłuszczowy	Zawartość [%]	
	Olej lniany	Olej rzepakowy
C16:0	5,87 ± 0,12	4,70 ± 0,06
C18:0	5,01 ± 0,05	1,87 ± 0,03
C18:1	21,16 ± 0,22	65,45 ± 0,23
C18:2	17,58 ± 0,08	18,64 ± 0,11
C18:3	49,93 ± 0,14	8,42 ± 0,06
C20:0	0,21 ± 0,02	0,57 ± 0,03
C20:1	0,18 ± 0,02	0,12 ± 0,02
C22:1	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,01
Inne	-	0,01 ± 0,00

Rozpuszczalność tlenu w oleju wynosi 3 mol/L, natomiast w wodzie jest ok. 10 razy mniejsza (Erich i in., 2006), co wyjaśnia ochronną rolę polimerów w formie hydrożelowych otoczek działających jako fizyczna bariera ograniczająca dostęp tlenu do wnętrza kapsulek. Działanie barierowe szczególnie zauważyć można w testach

wykonanych dla oleju rzepakowego, w których kapsułki chitozanowe i alginianowe wykazują bardzo zbliżone działanie ochronne. Dużo większe różnice w przypadku wyników opisujących szybkość utleniania się kontrolnego oleju lnianego oraz jego formy kapsułkowanej wynikają nie tylko z różnicy w składach kwasów tłuszczowych.

Olej lniany nie był poddawany procesowi rafinacji. W związku tym jest bogatszy w naturalne związki o działaniu przeciwutleniającym, np. tokoferole czy karotenoidy (Mińkowski i in., 2010). Obecność tych związków przy ograniczonym dostępie tlenu wynikającym z barierowej funkcji hydrożelowego płaszcza kapsulek wywołała dodatkowy efekt przedłużający trwałość oleju lnianego.

4.2.5. Ocena dodatku przeciwutleniacza na ochronę olejów poprzez kapsułkowanie metodą współosiową w testach przyspieszonego starzenia

W celu dodatkowego zminimalizowania procesów oksydacyjnych zachodzących w testowanych olejach, w kolejnej części badań oceniono możliwość ich spowolnienia wprowadzając do oleju związek o działaniu przeciwutleniającym.

Obecnie jednym z głównych zagadnień wpływających na rozwój nowych produktów spożywczych jest tzw. żywność funkcjonalna. Jej spożywanie umożliwia kontrolowanie wybranych fizjologicznych funkcji organizmu. We współczesnym świecie żywność ta stanowi obiekt szczególnego zainteresowania, ponieważ często szybki tryb życia człowieka jest powodem wytwarzania większej ilości wolnych rodników i ich gromadzenia się w organizmie. Gromadzenie reaktywnych form tlenu można przerwać, stosując w żywności dodatki związków o działaniu przeciwutleniającym. Przykładami najczęściej stosowanych przeciwutleniaczy są: witamina C, witamina E, cynk, magnez, selen. Działanie przeciwutleniające wykazują także związki naturalnie występujące w żywności, takie jak: flawonoidy i karotenoidy będące naturalnymi barwnikami warzyw i owoców lub inne związki fenolowe (Sadowska i in., 2012).

Głównymi źródłami naturalnych substancji o charakterze przeciwutleniającym są zioła i rośliny przyprawowe m.in. rozmaryn, szalwia, oregano, tymianek, mięta, melisa czy imbir. Jedną z najpopularniejszych roślin stosowanych jako przeciwutleniacz jest rozmaryn (Samotyja i Urbanowicz 2005). Rozmaryn jest przeciwutleniaczem stosowanym głównie w przemyśle mięsnym w postaci ekstraktów wodnych. Warto

jednak rozważyć wykorzystanie go w technologii tłuszczów jadalnych (Głowacz, 2014; Sielicka, 2014).

Oceny wpływu dodatku przeciwutleniacza do oleju lnianego i rzepakowego, kapsułkowanych metodą współosiową na przedłużenie ich stabilności dokonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdz. 4.2.4. Różnica w doświadczeniu polegała na wprowadzeniu do każdego z kapsułkowanych olejów 0,03% dodatku ekstraktu z rozmarynu, przygotowanego zgodnie z rozdz. 3.2.5.2 i porównaniu uzyskanych wyników bezpośrednio po 28 dniach termostatowania prób w 40°C. Zadeklarowana ilość dodatku ekstraktu rozmarynu stanowi maksymalne stężenie, jakie można zastosować w przypadku olejów roślinnych (Dyrektywa Komisji 2010/67/UE z dnia 20.10.2010 r.). Dodatkowo pozytywny efekt tego dodatku w oleju lnianym potwierdzono w literaturze (Sielicka, 2014).

Tab. 29. Zmiany oksydacyjne olejów rzepakowego i lnianego z dodatkiem przeciwutleniacza, przechowywanych w temperaturze 40°C w postaci kapsułek chitozanowych, alginianowych oraz w postaci niezakapsułkowanej. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).

Wyróżnik	Rodzaj obróbki	Po 28 dniach termostatowania w 40°C	
		Olej rzepakowy	Olej lniany
Liczba nadtlenkowa [mEq O ₂ /kg]	K	30,41 ± 1,11 ^a	99,07 ± 3,41 ^a
	CHI	17,32 ± 0,99 ^b	15,02 ± 0,40 ^b
	ALG	15,08 ± 0,92 ^c	55,47 ± 1,63 ^c
Liczba anizydynowa [-]	K	8,23 ± 0,56 ^a	19,34 ± 1,89
	CHI	6,31 ± 0,35 ^b	18,64 ± 0,58
	ALG	6,29 ± 0,61 ^b	17,25 ± 0,37
TOTOX	K	69,05 ^a	217,48 ^a
	CHI	40,95 ^b	48,68 ^b
	ALG	36,45 ^c	128,19 ^c
Liczba kwasowa [mg KOH/g]	K	0,26 ± 0,05 ^a	1,34 ± 0,15 ^a
	CHI	0,34 ± 0,09 ^a	1,51 ± 0,10 ^a
	ALG	0,29 ± 0,07 ^a	1,47 ± 0,11 ^a

K- brak obróbki oleju; próba kontrolna

CHI - wytworzenie kapsułek z płaszczem chitozanowym

ALG - wytworzenie kapsułek z płaszczem alginianowym

Działanie przeciwutleniające rozmarynu wynika z obecnych w nim związków fenolowych o działaniu synergicznym, m.in. kwasu karnozowego, karnazolu i kwasu rozmarynowego (Sielicka, 2014). Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie substancji dodatkowych dozwolonych do użytku w żywności, ekstrakt z rozmarynu może być stosowany w olejach roślinnych w ilości 30 mg/kg tłuszczu, wyrażonej jako suma karnozolu i kwasu karnozowego.

Efekt wprowadzenia ekstraktu do olejów poddawanych kapsułkowaniu w strukturze hydrożelu chitozanowego i alginianowego oceniono na podstawie porównania wartości liczb charakterystycznych uzyskanych po 28 dniach termostatowania prób w 40°C (Tab. 29).

Dodatek przeciwutleniacza spowodował pogorszenie jakości oleju lnianego we wszystkich badanych układach, w stosunku do prób niezawierających przeciwutleniacza. Największą zmianę zaobserwowano w stosunku do próby kontrolnej, dla której wartość LOO zwiększyła się dodatkowo o 53% w stosunku do próby kontrolnej bez udziału przeciwutleniacza po zakończonym teście. W przypadku kapsułek chitozanowych i alginianowych wzrost ten wyniósł odpowiednio 100% i 15% w odniesieniu do prób bez dodatku ekstraktu z rozmarynu. Zastosowanie dodatku rozmarynu w oleju rzepakowym przyniosło odwrotny efekt (Tab. 29). Oznacza to, że wartość liczby nadtlenkowej kolejno dla próby kontrolnej, oleju w hydrożelu chitozanowym i alginianowym po zakończonym teście była mniejsza odpowiednio o 14%, 25% i 27%. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku wyników oznaczania wtórnych produktów utlenienia. Wartości liczby anizydynowej dla prób oleju lnianego w kolejności: próba kontrolna, olej w kapsułkach chitozanowych i alginianowych zwiększyły się w teście z dodatkiem przeciwutleniacza odpowiednio ok. 2-krotnie, 6-krotnie i 3,5 krotnie. Wartości LA oleju rzepakowego z dodatkiem ekstraktu z rozmarynu dla tej samej kolejności prób obniżyła się odpowiednio o 27%, 16% i 10%. Graniczna wartość wskaźnika TOTOX, determinująca dobrą jakość olejów jadalnych, została przekroczona w przypadku wszystkich badanych prób po zakończonym teście przyspieszonego starzenia.

W wielu przypadkach zbyt wysoki dodatek przeciwutleniaczy wywołuje efekt proutleniający, co mogło być uwarunkowane nakładaniem się aktywności natywnych nieglicerydowych substancji i zastosowanych antyoksydantów poprzez synergistyczne lub antagonistyczne działanie (Choe i Min, 2009).

Rozbieżność w tych dwóch przypadkach może wynikać z faktu, że rozmaryn pod wpływem wysokich temperatur zmienia swoje właściwości przeciwutleniające w proutleniające. Za właściwości przeciwutleniające rozmarynu są odpowiedzialne głównie trzy terpeny tj. kwas karnozowy, karnozol i kwas rozmarynowy. Najsilniejsze właściwości wykazuje kwas karnozowy, który charakteryzuje się brakiem stabilności w roztworach i wysokich temperaturach (Szajek i Borowska, 2004). Kwas rozmarynowy, który jest pochodną kwasu kawowego, pod wpływem wysokich temperatur zmienia swoją strukturę oraz właściwości. W badaniach przeprowadzonych przez Kurzeji i Stec (2009) na rafinowanych olejach słonecznikowym i rzepakowym wykazano, że suszony rozmaryn wzmacnia hydrolizę kwasów tłuszczowych oraz wpływa na przyspieszenie procesu utleniania w wysokich temperaturach. Wykazuje jednak korzystne działanie – hamujące podczas przechowywania w temperaturze pokojowej oraz podczas ogrzewania krótkotrwałego (Kurzej i Stec, 2009).

Polimery pochodzenia naturalnego to grupa związków wielkocząsteczkowych, która w stosunku do większości popularnie wykorzystywanych niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy, wykazuje dużo niższą aktywność, zachowując jednak większą stabilność (Puoci i in. 2008). Badania Yen'a i współpracowników (2008) dotyczące aktywności przeciwutleniającej chitozanu dowodzą, że właściwość ta zależy od jego stopnia deacetylacji. Wzrost stopnia deacetylacji powoduje także wzrost aktywności przeciwutleniającej w teście z rodnikiem DPPH. W badaniach przeprowadzonych przez Bagnowską i współpracowników (2014), w których określono wpływ właściwości przeciwutleniających w stosunku do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) zawartych w kiełbasach, najwyższą aktywność wykazuje chitozan o średniej masie cząsteczkowej. Według badań Sellimi i współpracowników cecha ta opisuje także alginiany. W badaniach nad aktywnością przeciwutleniającą alginianu sodu izolowanego z tunezyjskich brązowych wodorostów (*Cystoseira barbata*) autorzy udowodnili, że parametr EC_{50} dla tego biopolimeru w teście z rodnikiem DPPH wynosi 0,1 mg/ml (Sellimi i in., 2015). Wartość ta w stosunku do wyników uzyskanych przeze mnie w testach materiałów chitozanowych jest znacznie niższa (Tab. 16). Inne badania naukowe dowodzą, że aktywność przeciwutleniająca alginianu sodu jest zależna od stosunku bloków G/M w zakresie mas 12-35 kDa i spada wraz ze spadkiem udziału bloków w tym zakresie.

Powyższe informacje są najlepszym dowodem na to, że ocena zdolności przeciwutleniającej jest wypadkową wielu zmiennych. Najłatwiej bada się ją w prostych

układach nieskomplikowanych matryc, w których aktywność tą wykazuje tylko jeden związek. Szczególna trudność polega na badaniu związków pozyskiwanych ze środowiska naturalnego, ponieważ właściwości fizykochemiczne takich surowców oraz otrzymywanych z nich produktów warunkowane są np. jakością surowca (odmiana lnu, metoda produkcji oleju), DD (chitozan), masy cząsteczkowej polimerów (chitozan i alginian sodu), a także od obecnych w nich związkach pomocniczych lub zanieczyszczeniach.

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Przeprowadzone przeze mnie badania w ramach pracy doktorskiej pozwoliły dokonać oceny możliwości wykorzystania chitozanu w nowatorskich zastosowaniach ukierunkowanych na przemysł medyczny i spożywczy.

Uzyskane wyniki badań potwierdzają, że chitozan jest odpowiednim surowcem, który z powodzeniem można wykorzystać w projektowaniu i tworzeniu kserożelowych matryc o strukturze i właściwościach wymaganych dla nowoczesnych materiałów opatrunkowych. Co więcej, właściwości użytkowe tworzonych na jego bazie kserożeli, takie jak np. rozpuszczalność, chłonność, parametry tekstury czy właściwości przeciwutleniające lub właściwości przeciwdrobnoustrojowe można modyfikować tworząc kompozyty chitozanu z białkami: kolagenem lub żelatyną, izolowanymi z produktów ubocznych przetwórstwa rybnego lub fosforylowaną pochodną polimeru, otrzymaną w wyniku modyfikacji chemicznej.

W pracy potwierdzono, że skóry suma afrykańskiego, łososia i dorsza stanowią dogodny surowiec do otrzymywania kolagenu i żelatyny, których wydajność izolacji wynosi ok. 70%, a właściwości fizykochemiczne izolowanych białek zależą od zawartości hydroksyproliny w ich profilu aminokwasowym. Im wyższą zawartością hydroksyproliny charakteryzuje się surowiec, tym wyższa jest temperatura denaturacji otrzymanych z niego roztworów kolagenu, temperatura skurczu i topnienia włókien kolagenowych, twardość i temperatura żelowania żelatyn i tym krótszy jest ich czas żelowania. Uzyskane wyniki potwierdziły również, że żelatyny otrzymane w wyniku wodnej ekstrakcji z surowca charakteryzują się wyższymi twardościami utworzonych z nich żeli, wyższą temperaturą i krótszym czasem żelowania w stosunku do żelatyn uzyskanych w wyniku termicznej denaturacji kolagenu.

Powyższe informacje dotyczące białek kolagenowych i żelatynowych umożliwiły opisanie wpływu ich dodatku na właściwości fizykochemiczne wytworzonych z nich kserożelowych kompozytów chitozanowo-białkowych.

W kolejnym etapie badań dowiedziono, że materiały białkowe i chitozanowo-białkowe charakteryzowały się jednakową porowatością, a jedynie porowatość kserożeli w 100% chitozanowych była najniższa.

Największą chłonnością roztworu imitującego płyn fizjologiczny charakteryzowały się kserożele chitozanowe, najmniejszą zaś materiały otrzymane wyłącznie z preparatów białkowych.



Najmniejszą rozpuszczalnością charakteryzowały się kserożele kolagenowe, natomiast największą materiały wykonane wyłącznie z żelatyn. Materiały chitozanowe były bardziej rozpuszczalne w stosunku do kolagenowych, lecz mniej w stosunku do kserożeli żelatynowych.

Materiały kolagenowe charakteryzowały się najmniejszą twardością i największą elastycznością. Materiały żelatynowe okazały się być najtwardsze spośród wszystkich wariantów otrzymanych kserożeli i jednocześnie mniej elastyczne od materiałów kolagenowych i bardziej elastyczne od materiałów chitozanowych. Twardość materiałów chitozanowych była pośrednia pomiędzy wartościami uzyskanymi dla kserożeli białkowych. Jednocześnie materiały te były najmniej elastyczne spośród wszystkich testowanych prób.

Wszystkie otrzymane materiały kserożelowe wykazywały zdolność do neutralizacji rodników DPPH, kationo-rodników ABTS oraz zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} , przy czym największa aktywność w wymienionych testach uzyskano dla materiałów otrzymanych w 100% z kolagenu. Ilość kserożelu żelatynowego potrzebna do uzyskania takiego samego efektu neutralizacji rodników i chelatowania jonów żelaza (II) była większa. Z kolei najmniejszą aktywnością przeciwutleniającą w teście z rodnikiem DPPH i zdolnością chelatowania jonów żelaza Fe^{2+} charakteryzowały się materiały chitozanowe.

Różnice badanych parametrów porównane w obrębie kolagenów i żelatyn uzyskanych ze skór sumy afrykańskiego i łososia wynikają prawdopodobnie ze składu aminokwasowego otrzymanych preparatów.

Podsumowując, tworzenie i charakterystyka kserożelowych kompozytów chitozanu z białkami skutkuje uzyskaniem cech pośrednich gotowych materiałów wynikających z właściwości każdego ze składników kompozytu.

Przeprowadzone badania potwierdziły również, że na właściwości fizykochemiczne i bioaktywne kserożeli chitozanowych można wpływać wykorzystując w projektowaniu kompozytów ten sam surowiec, poddany jednak chemicznej modyfikacji. W toku badawczym z powodzeniem dokonano modyfikacji chitozanu bezwodnikiem kwasu N-propylofosfonowego, która zapewniła polisacharydowi rozpuszczalność w roztworach wodnych o pH 7.

Wzrost udziału modyfikowanej pochodnej w kompozycie chitozanowym powodował spadek porowatości tworzonych z jej udziałem kserożeli, tworząc nitkowatą sieć wypełniającą pory polimeru niemodyfikowanego.

Gdy zawartość modyfikowanego chitozanu w kompozycie nie przekraczała 40% jego masy, chłonność materiałów w stosunku do roztworu soli imitującej płyn fizjologiczny nie ulegała zmianie. Rozpuszczalność tych samych kompozytów rosła wraz ze wzrostem udziału fosforylowanego chitozanu w kompozycie i osiągała prawie maksymalną wartość po umieszczeniu materiału w modelowym roztworze już pierwszego dnia testu. Zaobserwowano również, że im większą część masową kompozytu stanowi chitozan fosforylowany, tym trudniej wyplukuje się on z badanych gąbek. Powodem tego zjawiska jest lepkość roztworu rozpuszczalnej formy chitozanu tworzącego się wewnątrz kompozytu i powodującego rozpuszczenie się od ok. 30 ÷ 40% frakcji polimeru modyfikowanego.

Analiza tekstury wykazała, że kserożele otrzymane w 100% z chitozanu modyfikowanego charakteryzują się mniejszą twardością w stosunku do kserożeli uzyskanych z chitozanu niemodyfikowanego o takim samym stężeniu w roztworze przed suszeniem, natomiast wzrost zawartości udziału chitozanu modyfikowanego w kompozytach powoduje spadek elastyczności otrzymywanych materiałów.

Oba polisacharydy wykazywały zdolność do neutralizacji rodników DPPH, kationo-rodników ABTS oraz zdolność do chelatowania jonów żelaza (II). O ile różnice wykazane w teście rodnikiem ABTS i jonami żelaza (II) były niewielkie, o tyle największą różnicę zaobserwowano w przypadku zdolności do neutralizacji rodnika DDPH, która była 3-krotnie większa w przypadku chitozanu poddanego modyfikacji.

Wszystkie otrzymane materiały kompozytowe zawierające do 40% masowych modyfikowanej pochodnej chitozanu charakteryzowały się w stosunku do polimeru niemodyfikowanego prawie 100% redukcją wskaźnikowych bakterii reprezentujących grupę mikroorganizmów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także taką samą aktywnością w stosunku do drożdży, która wynika prawdopodobnie z rozpuszczalności materiału i zwiększonej powierzchni oddziaływań polimeru z drobnoustrojami.

Wyniki oceny cytotoksyczności względem linii komórkowej fibroblastów mysich L929 wykazały, że modyfikacja chitozanu ma wpływ na zdolność proliferacji komórek, a zahamowanie wzrostu fibroblastów w stosunku do materiałów wykonanych wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego miało miejsce, gdy stężenie fosforylowanego chitozanu osiągnęło w pożywce do hodowli stężenie przynajmniej 100 mg/mL. Dla takiego stężenia stopień zahamowania wzrostu komórek wyniósł ok. 50%.

Wyniki badań potwierdzają również hipotezę, według której hydrożelowa forma chitozanu w postaci płaszczu kapsułki może wykazywać funkcje ochronne w stosunku do składników żywności, w tym olejów jadalnych.

Podczas realizacji prac badawczych wykazano, że zaprojektowana w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności prototypowa aparatura do kapsułkowania metodą współosiową z powodzeniem umożliwia produkcję hydrożelowych struktur typu kropla w kropli z olejowym rdzeniem.

Określone w dalszym postępowaniu doświadczalnym optymalne prędkości przepływu mediów przez głowicę, równe dla oleju i roztworu polimeru, odpowiednio 2,0 g/godz. i 4,5 g/godz., umożliwiły uzyskanie kapsułek o zawartości oleju w ich wnętrzu równej 45%. Masa ta dotyczyła kapsułek w formie hydrożelowej o średnicy 4,4 mm.

Biorąc pod uwagę optymalne warunki kapsułkowania określono, że do zakapsułkowania 100 g oleju potrzeba jedynie 2,8 g chitozanu lub 5,6 g alginianu sodu.

Aby możliwe było zatrzymanie oleju w hydrożelowych kapsułkach w przynajmniej 90%, konieczne jest, aby były one przechowywane w warunkach wilgotności względnej otoczenia nie mniejszej niż 50%.

Wstępne testy stabilności potwierdziły, że etap kapsułkowania oleju rzepakowego i lnianego przy użyciu szklanej głowicy nie powoduje pogorszenia jakości olejów ocenianej bezpośrednio po zakapsułkowaniu niezależnie od zastosowanego w funkcji płaszczu kapsułki biopolimeru.

Testy z wykorzystaniem głowicy stalowej wykazały, że materiał konstrukcyjny prawdopodobnie zawiera zanieczyszczenia w postaci metali katalizujących procesy utleniania tłuszczów, ze względu na wyższą zawartość pierwotnych i wtórnych produktów utlenienia w stosunku do wszystkich prób testowanych w ten sam sposób lecz otrzymanych za pomocą szklanej głowicy.

Tygodniowe testy przechowywania olejów w postaci kapsułek wskazały, że największą tendencją ochronną w stosunku do oleju lnianego charakteryzował się płaszcz chitozanowy, natomiast w stosunku do oleju rzepakowego płaszcz wykonany z alginianu sodu.

Przyspieszone testy starzenia potwierdziły wyniki testów krótkotrwałego termostatowania kapsułek z olejem. Co więcej, wartości liczb nadtlenkowej oraz anizydynowej dla oleju kapsułkowanego w otocze z hydrożelu chitozanowego po

zakończonym teście w dalszym ciągu spełniały wymagania determinujące przydatność oleju do spożycia.

Zastosowanie dodatku przeciwutleniacza w postaci ekstraktu z rozmarynu w badanych olejach, poddanych następnie kapsułkowaniu i testom przyspieszonego starzenia, spowodowało pogorszenie jakości oleju lnianego, szczególnie podczas jego termostatowania w otoczce chitozanowej, co można wytłumaczyć wystąpieniem efektu proutleniającego. Dodatek ekstraktu z rozmarynu w oleju rzepakowym wywołał efekt przeciwutleniający.

6. LITERATURA

- Agnihotri N., Mishra R., Goda C., Arora M. (2012). Microencapsulation – A novel approach in drug delivery: A review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2: 1-20.
- Ahmad M., Benjakul S. (2011) Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 25: 381-388.
- Ahmed E. M. (2015) Hydrogels: Preparation, characterization and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6: 105-121.
- Alemán A., Giménez B., Montero P., Gómez-Guillén M.C. (2011) Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 407-413.
- Ali A. M. M., Benjakul S., Prodpran T., Kishimura H. (2017) Extraction and Characterisation of Collagen from the Skin of Golden Carp (*Proparbus Jullieni*), a processing by-product. *Waste and Biomass Valorization*, 1-9.
- Ali Hassan R. R. (2016) A preliminary study on using linseed oil emulsion in dressing archaeological leather. *Journal of Cultural Heritage*, 21: 786-795.
- Amidi M., Mastrobattista E., Jiskoot W., Hennink W. E. (2010) Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62: 59-82.
- Anwar S. H., Kunz B. (2011) The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105, 367-378.
- Anwar S. H., Weissbrodt J., Kunz B. (2010) Microencapsulation of fish oil by spray granulation and fluid bed film coating. *Journal of Food Science*, 75: E359–71.
- Arnesen J. A., Gildberg A. (2007) Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, 98: 53–57.
- Atmane M., Jacquot M., Scher J., Desobry S. (2006) Flavour encapsulation and controlled release – a review. *Food Science & Technology*, 41: 1-21.
- Augustine J. K., Atta R. N., Ramappa B. K., Boodappa C. (2009) Propylphosphonic anhydride (T3P): A remarkably efficient reagent for the one-pot transformation of aromatic, heteroaromatic, and aliphatic aldehydes to nitriles. *Tetrahedron*, 20: 3378-3382.

- Azizia N., Chevalierb Y., Majdouba M. (2014) Isosorbide-based microcapsules for cosmeto-textiles. *Industrial Crops and Products*, 52: 150–157.
- Badii F., Howell N. K. (2006) Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20: 630-640.
- Bagnowska A., Krala L., Nowak A., Oracz J. (2014) Właściwości przeciwutleniające chitozanu w kielbasach bez dodatku azotanu (III). *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 4: 173-187.
- Bakry A. M., Abbas S., Ali B., Majeed H., Abouelwafa M. Y., Mousa A. (2016) Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 143-182.
- Baranowski T. (2006) Hydrożele w zieleni miejskiej. *Zieleń Miejska*, 11: 16-18.
- Barbosa-Cànovas G. V. (2005). *Food powders. Physical properties, processing and functionality*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Bartkowiak A., Brylak W. (2006) Hydrożelowe mikrokapsułki z udziałem naturalnych i chemicznie modyfikowanych oligochitozanów - właściwości mechaniczne i porowatość. *Polimery*, 51: 547-554.
- Bartosik M., Kamrat W., Kaźmierkowski M., Lewandowski W., Pawlik M., Peryt T., Skoczkowski T., Strupczewski A., Szląg A. (2016) Bezpieczeństwo elektroenergetyczne dla pokoleń. *Przegląd Elektrotechniczny*, 92: 268-282.
- Benhabiles M. S., Salah R., Lounici H., Drouiche N., Goosen M. F. A., Mameri N. (2012) Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29: 48-56.
- Bi L., Cao Z., Hu Y., Song Y., Yu L., Yang B., Mu J., Huang Z., Han, Y. (2011). Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22: 51-62.
- Bialik-Wąs K., Pielichowski K. (2011) Polimerowe opatrunki hydrożelowe dla zastosowań biomedycznych. *Czasopismo Techniczne. Chemia*, 2: 39-52.
- Boguń M. (2010) Nanokompozytowe włókna alginianowe i kompozyty z ich udziałem do zastosowań w inżynierii biomateriałowej. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej*, 1062: 1-21.
- Chan L. W., Lim L. T., Heng P. W. S. (2000) Microencapsulation of oils using sodium alginate. *Journal of Microencapsulation*, 17: 757–66.

- Cheng H., Shao Z., Li C., Yu L., Raja M. A., Liu C. (2017) Isolation, characterisation and evaluation of collagen from Jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for use in hemostatic application. PLoS ONE 12: e0169731.
- Chien P. J., Sheu F., Huang W. T., Su M. S. (2007) Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice. Food Chemistry, 102: 1192-1198.
- Cho, S. M., Gu, Y. S., Kim S. B. (2005). Extraction optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatine compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids, 19: 221–229.
- Choe E., Min D. B. (2006) Mechanisms and factors for edible oil oxidation. Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety, 5: 169-186.
- Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Cstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O., Price A., Schectman L., Stacey G., Stokes W. (2005) Guidance on good cell culture practice. A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. Alternatives to Laboratory Animals, 33: 261-287.
- Coppola M., Djabourov M., Ferrand M. (2008) Phase diagram of gelatin plasticized by water and glycerol. Macromolecular Symposia 273: 56-65.
- Costache M., Qu H., Ducheyne P., Devore D. (2010) Polymere- xerogel composites for controlled release wound dressings. Biomaterials, 31: 6336-6343.
- Cuy J. L., Beckstead B. L., Brown C. D., Hoffman A. S., Giachelli C. M. (2003) Adhesive protein interactions with chitosan: Consequences for valve endothelial cell growth on tissue - engineering materials. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 67: 538–544.
- Czechowska-Liszka M. (2006) Jakość olejów jadalnych dostarczonych na rynek krajowy przez Zakłady Tłuszczowe "Bielski" w Bielsku Białej. Zeszyty Naukowe. Akademia Ekonomiczna w Krakowie, 705: 37-44.
- da Fonseca L. S., Silveira R. P., Deboni A. M., Benvenutti E. V. T., Costa M. H., Guterres S. S., Pohlmann A. R. (2008) Nanocapsule-xerogel microparticles containing sodium diclofenac: A new strategy to control the release of drugs. International Journal of Pharmaceutics, 358: 292-295.
- Dagani A., Auzzi A., Naas F., Megwez S. (2008) Effects of the oil and mucilage from flaxseed (*Linum usitatissimum*) on gastric lesions induced by ethanol in rats. Libyan Journal of Medicine, 3: 166-169.

- Dávalos A., Miguel, M., Bartolomé B., López-Fandiño R. (2004) Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67: 1939-1944.
- de Campos Vidal B., Mello M.L.S. (2011) Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42: 283-289.
- Dehghani F., Annabi N. (2011) Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 661-666.
- Dembczyński R., Jankowski T. (2004). Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania. Stan obecny i możliwości rozwoju tej metody. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 4: 5-17.
- Desai K. G. H., Jin Park H. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology. An International Journal*, 23: 1361-1394.
- Deyl Z., Mikšík I. (2000) Advanced separation methods for collagen parent α -chains, their polymers and fragments. *Journal of Chromatography B*, 739: 3-31.
- Dimida S., Demitri C., De Benedicti V. M., Scalera F., Gervaso F., Sannino A. (2015) Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 132.
- Dobarganes M. C., Velasco J. (2002) Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 420-428.
- Domian E., Wasak I. (2008) Microencapsulation of rapeseed oil based on spray drying method. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58: 477-483.
- Doyle B. B., Bendit E. G., Blout E.R. (1975) Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers*, 14: 937-957.
- Drozdowski B. (2007) Lipidy. Charakterystyka ogólna tłuszczów jadalnych. W: *Chemia Żywności. Tom II. Sacharady, lipidy i białka.* (ed. Sikorski Z. E.). Wydawnictwo Naukowo- Techniczne, Warszawa, 73-166.
- Dzięciał M., Przysławski J. (2013) Ocena wartości odżywczej i aktywności biologicznej wybranych olejów roślinnych dostępnych na rynku polskim w kontekście profilaktyki chorób dietozależnych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 1: 20-26.
- Eckert E. (2013) Próba pozyskiwania bioaktywnych peptydów z żółtka jaja metodą hydrolizy enzymatycznej. Rozprawa doktorska. Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław.

- Erich S. J. F., Laven J., Pel L., Huinink H. P., Kopinga K. (2006) Influence of catalyst type on the curing process and network structure of alkyd coatings. *Polymer*, 47: 1141–1149.
- Espicom Business Intelligence, 2015.
- Fallas J. A., Gauba V., Hartgerink J. D. (2009) Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 26851-9.
- Fang Z., Bhandari B. (2010) Encapsulation of polyphenols – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 510–23.
- Fitzmaurice S. D., Sivamani R. K., Isseroff R. R. (2011) Antioxidant therapies for wound healing: A clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24: 113-126.
- Foegeding E. A., Laneir T. C., Hultin H. O. (1996) Characteristics of edible muscle tissues. W: *Food chemistry*. (ed. Fennema O. R.). Marcel Dekker Inc., New York, USA, 902–906.
- Frankel E. N. (2005) *Lipid oxidation*. 2 edition. Oily Press, California, USA.
- Gades M.D., Stern J.S. (2002) Chitosan supplementation does not affect fat absorption In healthy males fed a high-fat diet, a pilot study. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorder*, 26: 119-122.
- Gades M.D., Stern J.S. (2004) Chitosan supplementation and fat absorption in men and woman. *Journal of the American Dietetic Association*, 105: 72-77.
- Gallardo G., Guida L., Martinez V., López M. C., Bernhardt D., Blasco R., Pedroza-Islals R., Hermida L. G. (2013) Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52: 473-482.
- Gaonkar A.G., Vasisht N., Khare A. R., Sobel R. (2014) *Microencapsulation in the food industry: A practical implementation guide*. Academic Press, USA.
- Gierszewska-Drużyńska M., Ostrowska-Czubenko J. (2007) Synteza i właściwości membran hydrożelowych na podstawie chitozanu i alginianu sodu. *Polimery*, 52: 517-523.
- Głowacz A. (2014) Wykorzystanie skór z mechanicznego odskórzania łososi jako źródła oleju i żelatyny oraz opracowanie metody wytwarzania finalnego produktu w postaci mikrokapsulek. Rozprawa doktorska. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk.

- Gómez-Guillén M.C., López-Caballero M.E., López de Lacey A., Alemán A., Giménez B., Montero P. (2010) Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. W: Sea by-products as a real material: New ways of application. (ed. Le Bihan E. i Koueta N.) Transworld Research Network Signpost, Kerala, India, 89-115.
- Gorczyca G. (2015) Otrzymywanie i charakterystyka nowych biomateriałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny. Rozprawa doktorska. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk.
- Gorczyca G., Tylingo R. (2011) Biopolimery w konstrukcji nowoczesnych materiałów medycznych o aktywności drobnoustrojowej. Cz. I. Biopolimerowe materiały medyczne – kolagen, chitozan. *Polimery*, 56: 709-715.
- Gorczyca G., Tylingo R., Szweda P., Augustin E., Sadowska M., Milewski S. (2014) Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO₂ solution. *Carbohydrate Polymers*, 102: 901-911.
- Górska A., Krupa A. (2013) Mikroemulsje jako nośniki kwasów tłuszczowych omega-3. *Medicina. Internacia. Revuo.* 4: 211-219.
- Gorzelanny C., Poppelmann B., Strozyk E., Moerschbacher B. M., Schneider S. W. (2007) Specific interaction between chitosan and matrix metalloprotease 2 decreases the invasive activity of human melanoma cells. *Biomacromolecules*, 8: 3035–3040.
- Goy R. C., de Britto D., Assis O. B. G (2009) A Review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19: 241-247.
- Grajek W. (2004) Rola przeciwutleniaczy w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 1: 3-11.
- Gray J. I. (1978) Measurement of lipid oxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55: 539-546.
- Gupta P., Vermani K., Garg S. (2002) Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 10: 569-578.
- Heino J. (2007) The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bio Essays*, 29: 1001-1010.
- Helrich K. (1990) AOAC. W: Official methods of analysis. Virginia, USA.

- Hennink W. E, van Nostrum C. F. (2002) Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Review*, 54: 13-36.
- Heras A., Rodriguez N. M., Ramos V. M., Agullo E. (2001) N-methylene phosphonic chitosan: a novel soluble derivative. *Carbohydrate Polymers*, 44: 1-8.
- Hęś M., Korczak J., Nogala- Kałucka M., Jędrusek-Golińska A., Gramza A. (2001) Przydatność przyspieszonych metod badania trwałości stabilizowanego oleju rzepakowego. *Roślinny Oleiste. Tom XXII*, 517-526.
- Holmes C., Wrobel J. S., MacEachern M. P., Boles B. R. (2013) Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: A systematic review. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 6: 17-29.
- Holzer D. (1996) Gelatin production. US patent 5,484,888.
- Hoyer B., Bernhardt A., Heinemann S., Stachel I., Meyer M., Gelinsky, M. (2012) Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 13: 1059-1066.
- Huang Y. R., Shiau C. Y., Chen H. H., Huang B. C. (2011) Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). *Food Hydrocolloids*, 25: 1507-1513.
- Hulmes D. J. S. (2008) Collagen diversity, synthesis and assembly. W: *Collagen: structure and mechanics*. (ed. Fratzl P.). Springer, Poczdam, Niemcy, 15-46.
- Hwang J. K., Shin H. H. (2000) Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*, 12: 175-179.
- Hwang J. S., Kim J. N., Wee Y. J., Yun J. S., Jang H. G., Kim S. H., Ryu H. W. (2006) Preparation and characterization of melamine-formaldehyde resin microcapsules containing fragrant oil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11: 332-6.
- Ikeda T., Ikeda K., Yamamoto K., Ishizaki H., Yoshizawa Y., Yanagiguchi K., Yamada S., Hayashi Y. (2014) Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. *BioMed Research International*, 2014: 1-8.
- Ilieva D., Jivov B., Bogachev G., Petkov C., Penkov I., Dimitriev Y. (2001) Infrared and Raman spectra of Ga₂O₃-P₂O₅ glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 283: 195-202.
- Inoue H., Yoshioka T., Hotta Y. (1988) Membrane-associated phospholipase C of *Drosophila* retina. *Journal of Biochemistry*, 103: 91-94.
- Jao D., Xue Y., Medina J., Hu X. (2017) Review protein-based drug delivery materials. *Materials*, 10: 517.

- Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P. T., Nair S.V., Tamura H. (2011) Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29: 322-337.
- Jeena K., Liju V.B., Umadevi N.P., Kuttan R. (2014) Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of black pepper essential oil (*Piper nigrum* Linn). *Journal of Essential Oil Bear Plants*, 17: 1–12.
- Karaca A. C., Nickerson M., Low N. H. (2013a) Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food Chemistry*, 139 :448–57.
- Karim A. A., Bhat R. (2009) Fish gelatin: properties, challenges and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23: 563-576.
- Kasaai M.R. (2010) Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate Polymers*, 79 :801-810.
- Kato D., Shirakawa D., Polz R., Maenaka M., Takeo M., Negoro S., Niwa K. (2012). Firefly inspired one-pot chemiluminescence system using n-propylphosphonic anhydride (T3P). *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13: 1640-1645.
- Kaushik P., Dowling K., Barrow C.J, Adhikari B. (2014) Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of Functional Foods*, 19: 868-881.
- Kazimierska-Drobny K. (2011) Symulacja procesów chemo-mechanicznych w porowatych żelach i identyfikacja parametrów modelu. Rozprawa doktorska. Instytut Mechaniki Środowiska i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz.
- Kennedy J. F., Philipps G. (2001) Natural polymers for healing wounds. *Recent Advances In Environmentally Compatible Polymers*, 12: 425-429.
- Kijeński J., Błędzki A. K., Jeziórska R. (2011) Odzysk i recykling materiałów polimerowych. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kim G.H., Ahn S.H., Yoon H., Kim Y.Y., Chun W. (2009) A cryogenic direct-plotting system for fabrication of 3D collagen scaffolds for tissue engineering. *Journal of Material Chemistry*, 19: 8817-8823.



- Kim S. K., Byun H.G., Park P.J., Shahidi F. (2001) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2992-2997.
- Kołodzyńska D., Franus D. (2016) Kompozyty chitozanowo-zeolitowe otrzymywane na bazie popiołów lotnych do usuwania metali ciężkich. *Zeszyty Naukowe. Instytut Gospodarki Surowcami Mineralnymi i Energią, Polska Akademia Nauk, Kraków*, 95: 145-156.
- Kołodziejska I., Kaczorowski K., Pietrowska B., Sadowska M. (2004) Modification of properties of gelatin from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chemistry*, 86: 203-209.
- Kołodziejska I., Skierka E., Sadowska M., Kołodziejski W., Niecikowska C. (2008) Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry*, 107: 700-706.
- Kong M., Chen X. G., Xing K., Park H. J. (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 51-63.
- Kontturi L. S., Yliperttula M., Toivanen P., Määttä A., Määttä A. M., Urtti A. (2011) A laboratory-scale device for the straightforward production of uniform, small sized cell microcapsules with long-term cell viability. *Journal of Controlled Release*, 152: 376-381.
- Kotowski W. (2008) Catalytic membrane reactors. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 15: 43-60.
- Kowalski Z., Banach M., Makara A. (2011) Otrzymywanie białka niskotemperaturowego mocno żelującego (żelatyny) metodami chemicznymi. *Chemik*, 65: 1085-1092.
- Kozłowska J., Sionkowska A., Skopińska-Wiśniewska J., Piechowicz K. (2015) Northern pike (*Esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81: 220-227.
- Krishnamoorthi J., Ramasamy P., Shanmugam V., Shanmugam A. (2017) Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochemistry and Biophysics Report*, 10: 39-45.
- Krochta J. M., De Mulder-Johnston C. (1997) Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51: 61-74.

- Kruszewski B., Fafara P., Ratusz K, Obiedziński M. (2013) Ocena pojemności przeciwutleniającej i stabilności oksydacyjnej wybranych olejów roślinnych. *Zeszyty Problemowe Postępów Rolniczych*, 572 : 43-52.
- Kumar K. S. S., Swaroop T. R., Harsha K. B., Narasimhamurthy K. H., Rangappa K. S. (2012) T3P-DMSO mediated one pot cascade protocol for the synthesis of 4-thiazolidinones from alcohols. *Tetrahedron Letters*, 53: 5619–5623.
- Kumar R., Isloor A. M., Ismail A. F., Matsuura T. (2013) Synthesis and characterization of novel water soluble derivative of chitosan as an additive for polysulphone ultrafiltration membrane. *Journal of Membrane Science*, 440: 140-147.
- Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bchowska A., Brzozowski K., Thoeming J., Stepnowski P. (2010) Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 29: 1567-636.
- Kumzerov Y., Vakhrushev S. (2003) Nanostructures within porous materials. W: *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. (ed. Nalwa H.). American Science Publishers, California, USA.
- Kurzej E., Stec M., Pawłowska-Góral K., Maciejewska-Paszek I., Pawlik M. Wpływ suszonego rozmarynu na peroksydację lipidów wybranych olejów jadalnych. *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy*, 5: 11-14.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage 4. *Nature*, 227: 680-685.
- Larsen M. (2009) *Salmon farming industry handbook*. Marine Harvest.
- Lasoń E., Ogonowski J. (2010) Kapsułkowanie - metoda immobilizacji materiałów bioaktywnych. *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania*, 1: 29-35.
- Leffler C. C., Müller B. W. (2000) Influence of the acid type on the physical and drug liberation properties of chitosan-gelatin sponges. *International Journal of Pharmaceutics*, 25: 229-237.
- Levi-Polyachenko N., Jacob R., Day C., Kuthirummal N. (2016) Chitosan wound dressing with hexagonal silver nanoparticles for hyperthermia and enhanced delivery of small molecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 142: 315-324.
- Li C., Yu D. G., Williams G. R., Wang Z. H. (2014) Fast-dissolving core-shell composite microparticles of quercetin fabricated using a coaxial electrospray process. *PLoS One* 9: e92106.



- Liu H. Y., Li D., Guo S. D. (2007) Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry*, 101: 621–625.
- Liu H., Li D., Guo S. (2008) Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatine from fish skins preserved by different methods. *LWT–Food Science and Technology*, 41: 414–419.
- Liu X. M., He J., Liu S. Y., Chen J. F., Le Y. (2014) A novel method for the preparation of electrophoretic display microcapsules. *Materials Science and Engineering B*, 185: 94-98.
- Makareviciene V., Janulis P. (1999). Analiza jakości olejów jadalnych oraz obowiązkowe wymagania. *Tłuszcze jadalne*, 34: 15-32.
- Małecka M., Rudzińska M., Pacholek B., Wąsowicz E. (2003) The effect of raspberry, black currant and tomato seeds extracts on oxyphytosterol formation in peanuts. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 12: 49-53.
- Malinowska-Pańczyk E., Staroszczyk H., Gottfried K., Kołodziejska I., Wojtasz-Pająk A. (2015) Antimicrobial properties of chitosan solutions, chitosan films and gelatin-chitosan films. *Polimery*, 60: 735-741.
- Mania S. (2013) Microcapsules and their applications in pharmaceutical and food industry. *PhD Interdisciplinary Journal*, 2: 71-75.
- Mania S., Tylingo R. (2016) Wpływ zmiennych procesu kapsułkowania współosiowego na stabilność oksydacyjną oleju rzepakowego. Przegląd wybranych zagadnień z zakresu przemysłu spożywczego. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., Lublin, 198-209.
- Manirakiza P., Covaci A., Schepens P. (2001) Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese–Gottlieb, Bligh and Dyer, and modified Bligh and Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14: 93–100.
- Manu B. T., Prasada Rao U. J. S. (2011) Role of peroxidase and H₂O₂ in cross-linking of gluten proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 35: 1695-1702.
- Masuda M. (2011) Microencapsulation of Pesticides for Controlling Release from Coatings, PhD Thesis, Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden.
- Masuelli M. A. (2014) Mark-Houwink parameters for aqueous-soluble polymers and biopolymers at various temperatures. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, 2: 37-43.

- McClung G., Frankenberger W. T. (1988) Comparison of reverse-phase high performance liquid chromatographic methods for precolumn-derivatized amino acids. *Journal of Liquid Chromatography*, 11: 613-646.
- Mińkowski K., Grzeńkiewicz S., Jerzewska M. (2011) Ocena wartości odżywczej olejów roślinnych o dużej zawartości kwasów linolenowych na podstawie składu kwasów tłuszczowych, tokoferoli i steroli. *ŻYWNOSĆ. Nauka, Technologia. Jakość*, 2: 124-135.
- Moreno-Vásquez M. J, Valenzuela-Buitimea E. L., Plascencia-Jatomea M., Encinas-Encinas J. C., Rodríguez-Félix F., Sánchez-Valdes S., Rosas-Burgos E. C., Ocaño-Higuera V. M., Graciano-Verdugo A. Z. (2017) Functionalization of chitosan by a free radical reaction: Characterization, antioxidant and antibacterial potential. *Carbohydrate Polymers*, 2: 117-127.
- Mroziński A. (2009) Recykulacja tworzyw sztucznych w Polsce i Europie. Wydział Mechaniczny, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz.
- Muyonga J. H., Cole C. G. B., Duodu K. G. (2004) Extraction and physicochemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18: 581–592.
- Muzzarelli R. A. A. (2009) Chitins and chitosans for the repair of wounded skin. *Carbohydrate Polymers*, 76: 167–182.
- Nagai T., Suzuki N., Nagashima T. (2008) Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. *Food Chemistry*, 111: 296-301.
- Nazzaro F., Orlando P., Fratianni F., Coppola R. (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 23: 182–186.
- Neau S. H., Goskonda S. R., Upadrashta S. M., Thies C. A., Tripp S. I. (1993) Encapsulation of a volatile oil by ionic gelation of alginate. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 57: 126-129.
- Ninan G., Joseph J., Aliyamveetil Z. A. (2014) A comparative study on the physical, chemical and functional properties of carp skin and mammalian gelatins. *Journal of Food Science and Technology*, 51: 2085-2091.
- Obara K., Ishihara M., Ishizuka T., Fujita M., Ozeki Y., Maehara T., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Kikuchi M., Kurita A. (2003) Photo-crosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired mice. *Biomaterials* 24: 3437–3444.

- Ołędzka E., Sobczak M., Kołodziejski W. L. (2007) Polimery w medycynie - przegląd dotychczasowych osiągnięć. *Polimery*, 52: 795 - 803.
- Ostrowska-Czubenko J., Pieróg M., Gierszewska M. (2016) Modyfikacje chitozanu - krótki przegląd. *Widomości chemiczne*, 70: 657-679.
- Oszust M., Barczak M., Dąbrowski A. (2012) Mezoporowate materiały krzemionkowe – charakterystyka i zastosowanie. W: *Adsorbenty i katalizatory. Wybrane technologie a środowisko.* (ed. Ryczkowski J.). Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów, 53-67.
- Pacholek B., Sielicka M., Doleba A., Kałużny M., Błaszowska M., Kołak M. (2014) Wpływ dodatku oleju z owoców rokitnika na stabilność oksydacyjną i pożądalność konsumencką oleju lnianego. *Zeszyty Naukowe. Akademia Morska, Gdynia*. 86: 231-236.
- Pamfil, D., Nistor, M. T. and Vasile, C. (2015) Collagen-based materials for pharmaceutical applications. W: *Handbook of polymers for pharmaceutical technologies: Biodegradable polymers.* (ed. Thakur V. K. i Thakur M. K.). Volume 3. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Pariente J. L., Kim B. S., Atala A. (2001) In vitro biocompatibility assessment of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human urothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55: 33–39.
- Piątkowski M., Bogdał D., Radomski P., Jarosiński A. (2010) Wykorzystanie chemicznie modyfikowanego chitozanu w sorpcji jonów metali. *Czasopismo Techniczne. Chemia*, 10: 257-266.
- Pielesz A. (2009) Elektroforeza w octanie celulozy CAE w badaniach komercyjnych alginianowych opatrunków aktywnych. Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku, Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materiałów Polimerowych, Akademia Techniczno-Humanistyczna, Bielsko-Biała.
- Pluta J., Karolewicz B. (2004) Hydrogels: properties and applications in the technology of drug form. The characteristic hydrogels. *Polimery w Medycynie*, 34: 3-19.
- Poshadri A., Kuna A. (2010) Microencapsulation technology: A review. *Journal of Research ANGRAU*, 38: 86-102.
- Privalov P. L. (1982) Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Advances in Protein Chemistry*, 35: 1-104.

- Przybysz M. A., Szterk A., Zawislak M., Dłużewska E. (2014) Wpływ procesu mikrokapsułkowania i dodatku przeciwutleniaczy na stabilność oleju rybnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2: 123-138.
- Puoci F., Iemma F., Curcio M., Parisi O. I., Cirillo G., Spizzirri U. G., Picci N. (2008) Synthesis of methacrylic-ferulic acid copolymer with antioxidant properties by single-step free radical polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10646–10650.
- Raafat D., von Bargen K., Haas A., Sahl H. G. (2008) Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3764-3773.
- Rabea E. I., Badawy M. E.-T., Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut W. (2003) Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4: 1457–1465.
- Ravi Kumar M. N. V. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46: 1-27.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26: 1231-1237.
- Renken A., Hunkeler D. (1998) Microencapsulation: A review of polymers and technologies with a focus on bioartificial organs. *Polimers*, 43: 530–539.
- Rinaudo M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31: 603-632.
- Rinaudo M. (2008) Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57: 397-430.
- Rodziewicz-Motowidło, S., Śladewska A., Mulkiewicz E., Kołodziejczyk A., Aleksandowicz A., Miskiewicz J., Stepnowski P. (2008). Isolation and characterization of a thermally stable collagen preparation from the outer skin of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Aquaculture*, 285: 130–134.
- Rouget M. C. (1859) Des substances amylicées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine). *Comptes Rendus Chimie*, 48: 792–795.
- Rouquero J., Avnir D., Fairbridge C.W., Everett D.H., Haynes J.M., Pernicone N., Ramsay J. D. F., Sing K. S. W. and Unger K. K. (1994) *Physical and biophysical chemistry division commission on colloid and surface chemistry including catalysis. Pure and Applied Chemistry*, 6: 1739-1758.

- Roy S., Khanna S., Nallu K., Hunt T. K., Sen C. K. (2006) Dermal wound healing is subject to redox control. *Molecular Therapy*, 13: 211–220.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych (Dz. U. z 2011 r. Nr 91, poz. 525)
- Rubilar M., Morales E., Saez R., Acevedo F., Palma B., Villarroel M., Shene C. (2012a). Polyphenolic fractions improve the oxidative stability of microencapsulated linseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114: 760–71.
- Rutkowski A. (1999) Żelatyna. Właściwości – Technologia – Użytkowanie. Wydawnictwo APEKS, Konin.
- Sadowska A., Żebrowska-Krasuska M., Świdorski F. (2012) Przeciwtleniacze w żywności. *Postępy techniki przetwórstwa spożywczego*, 2:100-104.
- Sadowska M. (1992) Kolagen mięsa: budowa, oznaczanie i właściwości funkcjonalne. Rozprawa habilitacyjna. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk.
- Sadowska M., Kołodziejska I. (2005) Optimisation of conditions for precipitation of collagen from solution using κ -carrageenan. *Studies on collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*)*. *Food Chemistry*, 91: 45-49.
- Sadowska M., Kołodziejska I., Niecikowska C. (2003) Isolation of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81: 257-262.
- Sagiri S.S., Anis A., Pal K. (2016) A review on encapsulation of vegetable oils: strategies, preparation methods and applications, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 55: 291-311.
- Saiga A., Tanabe S., Nishimura T. (2003) Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3661-3667.
- Saleeb F. Z., Arora V. K. US5972395, 26.10.1999.
- Samotyja U., Urbanowicz A. (2005) Przeciwtleniające właściwości handlowych ekstraktów z rozmarynu. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2: 184-192.
- Sandoval-Castilla O., Lobato-Calleros C., Garcia-Galindo H.S., Alvarez-Ramirez J., Vernon-Carter E.J. (2010) Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. Casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43: 111-117.

- Sanguansri L., Day L., Shen Z. P., Fagan P., Weerakkody R., Cheng L. J., Rusli J., Augustin M. A. (2013) Encapsulation of mixtures of tuna oil, tributyrin and resveratrol in a spray dried powder formulation. *Food & Function*, 4: 1794–802.
- Sano M., Hosoya O., Taoka S., Seki T., Kawaguchi T., Sugobayashi K., Juni K., Morimoto Y. (1999) Relationship between solubility of chitosan in alcoholic solution and its gelation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47: 1044-1046.
- Schrieber R., Gareis H. (2007) *Gelatine handbook. Theory and industrial practice.* Weinheim Wiley-VCH GmbH & C, Niemcy.
- Scrimgeour C. (2005) *Chemistry of fatty acids. Bailey's industrial oil and fat products.* 1:1. Scottish Crop Research Institute, Dundee, Scotland.
- Sebti I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S., Coma V. (2005) Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *Journal of Food Science*, 70: 100-104.
- See S. F., Ghassem M., Mamot S., Babji A. S. (2015) Effect of different pretreatments on functional properties of African catfish (*Clarias gariepinus*) skin gelatin. *Journal of Food Science and Technology*, 52: 753-762.
- Sellimi S., Younes I., Ayed H. B., Maalej H., Montero V., Rinaudo M., Dahia M., Mechichi T., Hajji M., Nasri M. (2015) Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 1358-1367.
- Senaratne L. S., Park P. J., Kim S. K. (2006) Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97: 191-197.
- Shahidi F., Synowiecki J. (1991) Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1527-1532.
- Shelke N. B., James R., Laurencin C. T., Kumbar S. G. (2014) Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. *Polymers for advanced technologies*, 25: 448-460.
- Shen X., Nagai N., Murata M., Nishimura D., Sugi M., Munekata M. (2008) Development of salmon milt DNA/salmon collagen composite for wound dressing. *Journal of Material Science: Material Medicine*, 19: 3473-3479.
- Shoulders M. D., Raines R. T. (2009) Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 929-958.

- Shoulders M. D., Raines R. T. (2009) Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 929-958.
- Sielicka M. M. (2014) Ocena skuteczności dodatku substancji o właściwościach przeciwutleniających w przedłużeniu trwałości oleju lnianego tłoczonego na zimno. Rozprawa doktorska. Wydział Towaroznawstwa. Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu. Poznań.
- Sikorski Z. E. (1994) Charakterystyka białek głównych surowców żywnościowych. W: *Chemia żywności*. (ed. Sikorski Z. E.). Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 47-95.
- Sikorski Z. E. (2013) *Chemia Żywności. Tom II. Sacharady, lipidy i białka*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- Silva Júnior Z. S., Botta S. B., Ana P.A., França C. M., Fernandes K. P. S., Mesquita-Ferrari R. A., Deana A., Bussadori S. K. (2015) Effect of papain-based gel on type I collagen-spectroscopy applied for microstructural analysis. *Scientific Reports*, 5: 11448.
- Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J. (2007) *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*. Polskie Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- Simsek-Ege F. A., Bond G. M., Stringer J. (2003) Polyelectrolyte complex. Formation between alginate and chitosan as a function of pH. *Journal of Applied Polymer Science*, 88: 346.
- Singh A.V. (2011) Biopolymers in drug delivery: A review. *Pharmacologyonline* 1, 666– 674.
- Skierka E. (2008) Opracowanie optymalnych parametrów odzyskiwania białek z kręgosłupów dorsza bałtyckiego (*Gadus morhua*) oraz fizykochemiczna charakterystyka produktów. Rozprawa doktorska. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk.
- Skierka E., Sadowska M. (2007) The influence of different acid and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 105: 1302-1306.
- Śledziński T., Kwaśniewska D., Zieliński R. (2013) Aktywność przeciwrodnikowa piwa. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 94: 648-652.
- Soliman E. A., El-Moghazy A. Y., El-Din M. S. M., Massoud M. A. (2013) Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro

- evaluation of antifungal activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3: 48–55.
- Staroszczyk H., Pielichowska J., Sztuka K., Stangret J., Kołodziejska I. (2012) Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase. *Food Chemistry*, 130: 335-345.
- Staroszczyk H., Sztuka K., Wolska J., Wojtasz-Pająk A., Kołodziejska I. (2014) Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimic Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117: 707-712.
- Struszczyk M. H. (2002) Chitin and chitosan. Part I. Properties and production. *Polimery*, 47: 316- 325.
- Suárez H., Gaitán O., Díaz C. (2015) Microstructural and physicochemical analysis of collagen in intramuscular pin bones of Bocachico fish (*Prochilodus* sp.). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 28: 188-196.
- Subramanian R., Nandini K. E., Sheila P. M, et al. (200) Membrane processing used frying oils. *Journal of the American Oil Chemist Society*, 77: 323-328.
- Sudarshan N. R., Hoover D. G., Knorr D. (1992) Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6: 257-272.
- Szabo N. J., Matulka R. A., Marone P. A., Bauter M. R., Chan T., Franklin S., Carney J. R., McQuaid S. L., Rakitsky W., Green R., Licari P. (2014) Safety evaluation of oleic-rich triglyceride oil produced by a heterotrophic microalgal fermentation process. *Food Chemistry and Toxicology*, 65: 301–11.
- Szajek A., Borowska J. (2004) Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 4: 5-28.
- Tańska M., Rotkiewicz D., Ambrosewicz M. (2011) Porównanie trwałości tłoczonych na zimno olejów lnianego i rzepakowego. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 3: 521-527.
- Thakur G., Mitra A., Basak A. (2011) Genipin crosslinked drug–gelatin composite for drug transport and cytocompatibility. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, 23: 1–6.
- Thakur V. K., Thakur M. K. (2016) *Handbook of sustainable polymers: Processing and applications*. CRC Press, USA.

- Thuy L. T. M., Okazaki E., Osako K. (2014) Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry*, 149: 264-270.
- Tian X., Yi L. J., Ma L., Zhang L., Song G. M., Wang Y. (2014) Effects of honey dressing for the treatment of DFUs: A systematic review. *International Journal of Nursing Sciences*, 1: 224-231.
- Tigh R. S., Karakecili A. (2007) *In vitro* characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *Journal of Material Science: Materials and Medicine*, 18: 1665-1674.
- Tylingo R., Gorczyca G., Mania S., Szweda P., Milewski S. (2016) Preparation and characterization of porous scaffolds from chitosan-collagen-gelatin composite. *Reactive and Functional Polymers*, 103: 131-140.
- Tylingo R., Mania S., Panek A., Piątek R., Pawłowicz R. (2016) Isolation and characterization of acid soluble collagen from the skin of African catfish (*Clarias gariepinus*), Salmon (*Salmo salar*) and Baltic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, 6: 234.
- Tylingo R., Mania S., Szwacki J. (2016) A novel method for drop in drop edible oils encapsulation with chitosan using a coaxial technique. *Reactive and Functional Polymers*, 100: 64-72.
- Tyliszczak B., Pielichowski K. (2007) Charakterystyka matryc hydrożelowych - zastosowania biomedyczne superabsorbentów polimerowych. *Czasopismo Techniczne. Chemia*, 31: 159-167.
- Tynek M., Kołodziejska I., Pawłowicz R., Głowacz A., Martysiak-Żurowska D., Malinowska-Pańczyk E., Kasprzak J., Malek J. Sposób otrzymywania oleju rybnego z odpadów ryb tłustych, zwłaszcza łososia. Zgłoszenie patentowe Nr 392002 z dnia 29.07.2010.
- Uragami T., Tokura S. (2010) *Material science of chitin and chitosan*. Springer, 51-79.
- Verlee A., Mincke S., Stevens C. V. (2017) Recent developments in antibacterial and antifungal chitoan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164: 268-283.
- Surewicz W. K., Mantsch H. H. (1988) New Insight into Protein Secondary Structure from Resolution Enhanced Infrared Spectra. *Biochimica et Biophysica Acta*, 952: 115-130.

- Wainewright F. W. (1977) Physical tests for gelatin and gel products. W: The science and technology of gelatins. (ed. Ward A. G., Courts A.). Academic Press, Londyn, UK, 507–531.
- Wang C. C., Su C. H., Chen J. P., Chen C. C. (2009) An enhancement on healing effect of wound dressing: Acrylic acid grafted and gamma-polyglutamic acid/chitosan immobilized polypropylene non-woven. *Materials Science and Engineering: C*, 29: 1715-1724.
- Waraho T., McClements S. J., Decker E. A. (2011) Impact of free acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 129: 854-859.
- Waszkiewicz-Robak B., Świdorski F. (2001) Hydrokoloidy pochodzenia roślinnego jako zamienniki żelatyny. *Bezpieczna Żywność*, 1: 31-37.
- Wen Y., Ramos Gallego M., Feldskov Nielsen L., Jorgensen L., Horn Mřller E., Mřrck Nielsen H. (2013) Design and characterization of core–shell mPEG–PLGA composite microparticles for development of cell–scaffold constructs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85: 87-98.
- Winter G. D. (1962) Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*, 193: 293-294.
- Wroniak M., Krygier K., Kaczmarczyk M (2008) Comparison of the quality of cold pressed and virgin rapeseed oils with industriallyobtained oils. *PolishJournal of Food and Nutrition Sciences*, 1: 85-89.
- Wroniak M., Kwiatkowska M., Krygier K. (2006) Charakterystyka wybranych olejów tłoczonych na zimno. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2: 46-58.
- Wu J., Li Z., Yuan X., Wang P., Liu Y., Wang H. (2011) Extraction and isolation of type I, III and V collagens and their SDS-PAGE analyses. *Transactions of Tianjin University*, 17: 111.
- Wybór W., Zaborski M. (2000) Budowa i właściwości kolagenu oraz żelatyny. *Polimery*, 45: 10-21.
- Yan M., Li B., Zhao X., Ren G., Zhuang Y., Hou H., Zhang X., Chen L., Fan Y. (2008) Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye polloc (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 107: 1581-1586.
- Yang B., Li X., Shi S., Kong X., Guo G., Huang M., Luo F., Wei Y., Zhao X., Qian Z. (2010) Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers*, 80: 860-865.

- Yang D., Guo S., Qiao J., Nie J. (2011) Investigation on the preparation and application of chitosan/alginate microcapsules. *Journal of Controlled Release*, 152: 71-72.
- Yen M. T., Tseng Y. H., Li R. C., Mau J. L. (2007) Antioxidant properties of fungal chitosan from shitake stripes. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 255-261.
- Yen M. T., Yang J. H., Mau J. L. (2008) Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 74: 840-844.
- Zargar V., Asghari M., Dashti A. (2015) A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, 2: 1-24.
- Zawirska-Wojtasik R. (2005) Aromaty, barwniki, konserwanty – perspektywy stosowania. *Przemysł Spożywczy*, 59: 3–8.
- Zhang Y., Liu W., Li G., Shi B., Miao Y., Wu X. (2007) Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Centropharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 103: 906-912.
- Żelaszczyk D., Waszkielewicz A, Manora H. (2012) Kolagen - struktura oraz zastosowanie w kosmetologii i medycynie estetycznej. *Estetologia Medyczna i Kosmetyczna*, 2: 14-20.
- Żelechowska E., Sadowska M., Turk M. (2010) Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Hydrocolloids*, 24: 325-329.

Akty prawne i normy

- BS-EN ISO 109330-12:2004. Biological evaluation of medical devices. Part 12. Sample preparation and reference materials.
- Codex Standard 19-1981 Codex Standard for edible fats and oils not covered by individual standards, 2013.
- Dyrektywa Komisji 2010/67/UE z dnia 20 października 2010 r. zmieniająca dyrektywę 2008/84/WE ustanawiającą szczególne kryteria czystości dla dodatków do środków spożywczych innych niż barwniki i substancje słodzące.
- Farmakopea polska VII. Tom I. (2006) Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Warszawa.
- Japan Food Chemical Research Foundation, 2011.

JIS L 1902 Wound dressings with antimicrobial properties —Requirements and test methods for determining bactericidal activity of antimicrobial wound care dressings

Korean Food and Drug Administration, 2011.

PN-75/A-04018. Produkty rolniczo-żywnościowe. Oznaczenie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.

PN-A-86908: *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce - Rafinowane oleje roślinne.*

PN-EN ISO 660: 2010. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby kwasowej i kwasowości.

PN-EN ISO 6885: 2016-04. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby anizydynowej.

PN-EN 13726-1: 2005. Metody badania bezpośrednich opatrunków ran. Część 1. Aspekty dotyczące chłonności.

PN-EN ISO 10993-5: 2009. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 5. Badania cytotoksyczności in vitro.

PN-ISO 3496: 2000. Mięso i przetwory mięsne. Oznaczenie zawartości hydroksyproliny.

PN-EN 13726-1: 2005. Metody badania bezpośrednich opatrunków ran -- Część 1: Aspekty dotyczące chłonności

Rozporządzenie Komisji (UE) NR 432/2012 z dnia 16 maja 2012 r. ustanawiające wykaz dopuszczonych oświadczeń zdrowotnych dotyczących żywności, innych niż oświadczenia odnoszące się do zmniejszenia ryzyka choroby oraz rozwoju i zdrowia dzieci.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych (Dz. U. z 2011r. Nr 91, poz. 525).

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 r. w sprawie nowej żywności, zmieniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie Komisji (WE) nr 1852/2001.

7. SPIS TABELI I RYSUNKÓW

7.1. Tabele

Tab. 1. Porównanie niektórych właściwości żelatyn typu A i B (Rutkowski, 1999)	22
Tab. 2. Porównanie cech różnych metod kapsułkowania oraz rozmiarów tworzonych za ich pomocą kapsułek	42-43
Tab. 3. Wykaz surowców i odczynników wykorzystywanych podczas badań laboratoryjnych	48
Tab. 4. Wykaz szczepów i podłoży bakteryjnych wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Pożywki po przygotowaniu sterylizowano w autoklawie w 120°C, przy ciśnieniu 1,5 atm przez 30 minut. Dodatki dodawano do sterylnych pożywek przed przygotowaniem podłoża.....	50
Tab. 5. Wykaz aparatury wykorzystywanej podczas badań laboratoryjnych	50
Tab. 6. Zestawienie testów wykonanych do oceny właściwości otrzymanych kompozytów chitozanowych oraz odpowiadające im warianty prób	61
Tab. 7. Skład podstawowy skór z suma afrykańskiego, łososia i dorsza bałtyckiego. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$).....	79
Tab. 8. Wydajność ekstrakcji kolagenu oraz wartości wyznaczonych współczynników przeliczeniowych azotu na białko. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$)	80
Tab. 9. Skład aminokwasowy kolagenów/ żelatyn wyizolowanych ze skór dorsza, łososia i suma afrykańskiego. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$)	82
Tab. 10. Porównanie temperatur denaturacji kolagenu suma afrykańskiego, łososia, dorsza bałtyckiego uzyskane na podstawie pomiaru wiskozymetrycznego i kalorymetrycznego oraz temperatura skurczu włókien kolagenowych uzyskana przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej. Wartości poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$)	87
Tab. 11. Porównanie temperatur topnienia włókien kolagenowych suma afrykańskiego, łososia i dorsza bałtyckiego uzyskanych przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$)	88
Tab. 12. Porównanie twardości żelatyny otrzymanej ze skór suma afrykańskiego, łososia i dorsza w wyniku ekstrakcji wodą oraz denaturacji kolagenu. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$)	90
Tab. 13. Porównanie temperatur topnienia żelatyn otrzymanych ze skór suma afrykańskiego, łososia i dorsza, w wyniku ekstrakcji wodą oraz denaturacji kolagenu. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$; $n=3$)	91

Tab. 14. Porowatość materiałów chitozanowych. (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHIX - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 25, 75, 50 lub 100). Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco, p<0,05, n=3)	102
Tab. 15. Średnia liczba komórek mikroorganizmów w skali logarytmicznej dla materiałów kontrolnego i kompozytów po 24 godzinach kontaktu innokulum z testowanym materiałem (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHI _x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 15, 25, 40). Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco, p<0,05, n=3).....	114
Tab. 16. Porównanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej kompozytów chitozanu w odniesieniu do próbki kontrolnej (p-CHI _x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 15, 25, 40). Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco, p<0,05, n=3).....	115
Tab. 27. Wpływ prędkości przepływu roztworu płaszczka na zawartość oleju w kapsułkach oraz ich średnicę. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco (p<0,05, n=3)	123
Tab. 18. Wpływ prędkości przepływu gazu inertnego zrywającego krople na zawartość oleju w kapsułkach oraz ich średnicę. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco (p<0,05, n=3)	125
Tab. 19. Wpływ wilgotności względnej otoczenia na stopień zatrzymania oleju w kapsułkach chitozanowych. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco (p<0,05, n=3)	127
Tab. 20. Zmiany liczby nadtlenkowej oleju rzepakowego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszczka kapsułki i temperatury termostatowania prób. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco (p < 0,05, n=3)	129
Tab. 21. Zmiany liczby anizydynowej oleju rzepakowego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszczka kapsułki i temperatury termostatowania prób. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco (p<0,05, n=3).....	130
Tab. 22. Zmiany wskaźnika TOTOX oleju rzepakowego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszczka kapsułki i temperatury termostatowania prób	131
Tab. 23. Zmiany liczby nadtlenkowej oleju lnianego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszczka kapsułki i temperatury termostatowania prób. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco (p<0,05, n=3)	132
Tab. 24. Zmiany liczby anizydynowej oleju lnianego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszczka kapsułki i temperatury termostatowania prób. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco (p<0,05, n=3)	133
Tab. 25. Zmiany wskaźnika TOTOX oleju lnianego w zależności od materiału głowicy kapsułkującej, płaszczka kapsułki i temperatury termostatowania prób	134

Tab. 26. Zmiany oksydacyjne oleju rzepakowego przechowywanego w temperaturze 40°C w postaci kapsułek chitozanowych, alginianowych oraz w postaci niezakapsułkowanej. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$)	136
Tab. 27. Zmiany oksydacyjne oleju lnianego przechowywanego w temperaturze 40°C w postaci kapsułek chitozanowych, alginianowych oraz w postaci niezakapsułkowanej. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$)	137
Tab. 28. Skład kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego i wysokolinolenowego oleju lnianego (Tańska i in., 2011)	139
Tab. 29. Zmiany oksydacyjne olejów rzepakowego i lnianego z dodatkiem przeciwutleniacza, przechowywanych w temperaturze 40°C w postaci kapsułek chitozanowych, alginianowych oraz w postaci niezakapsułkowanej. Wartości w poszczególnych kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się znacząco ($p < 0,05$, $n=3$).....	141

7.2. Rysunki

Rys. 1. Rodzaje struktur możliwych do uzyskania za pomocą dostępnych metod kapsułkowania. Mikrokapsułka: A - z wyodrębnionym rdzeniem i ścianą, B - z nieregularnym kształtem rdzenia, C - wielordzeniowa, D - z wielowarstwową ścianą (płaszczem), E - mikrosfera (Mania, 2013).....	12
Rys. 2. Porównanie budowy celulozy, chityny i chitozanu (Rinaudo, 2006)	14
Rys. 3. Fragment łańcucha cząsteczki alginianu (Dembczyński i Jankowski, 2004)	18
Rys. 4. Schemat tworzenia się struktury typu egg-box (Boguń, 2010)	19
Rys. 5. Wzór chemiczny cząsteczki bezwodnika kwasu N-propylofosfonowego (T3P)	32
Rys. 6. Schemat mechanizmu autooksydacji (Sikorski, 2013)	35
Rys. 7. Schemat ideowy procesu otrzymywania kolagenu ze skór rybich (Sadowska, 2003)	53
Rys. 8. Schemat ideowy procesu otrzymywania żelatyny ze skór rybich (Kołodziejaska i in., 2008)	54
Rys. 9. Elektroforetyczna charakterystyka uzyskanych białek kolagenowych wyizolowanych z rybich skór (1 - Sum afrykański, 2 - Łosoś, 3 - Dorsz, 4 - Wzorzec masy cząsteczkowej)	83
Rys. 10. Widma FTIR kolagenów otrzymanych z rybich skór (A - sum afrykański, B - łosoś, C - dorsz).	85
Rys. 11. Wykres zależności temperatury od czasu żelowania żelatynyze skór A - suma afrykańskiego, B - łososa, C - dorsza, otrzymanych w wyniku ekstrakcji wodą (W) oraz denaturacji kolagenu (K)	92
Rys. 12. Schemat przedstawiający mechanizm reakcji tworzenia N-propylofosfonowej pochodnej chitozanu (Kumar, 2013)	99
Rys. 13. Kserożele chitozanowe o rosnącym udziale modyfikowanej pochodnej chitozanu w przeliczeniu na suchą masę kompozytu (K - próba kontrolna bez dodatku modyfikowanej pochodnej)	100
Rys. 14. Obrazy powierzchni struktury materiałów chitozanowych uzyskane z wykorzystaniem elektronowej mikroskopii skaningowej (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu	

niemodyfikowanego, p-CHI _x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 25, 75 lub 100)	101
Rys. 15. Widmo FTIR materiałów chitozanowych. (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHI _x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 50 lub 100. Części A, B i C różnią się zakresem liczb falowych).....	104
Rys. 16. Chłonność i rozpuszczalność materiałów chitozanowych po 1 i 7 dniach inkubacji w roztworze soli imitującym płyn fizjologiczny. (CHI-materiał kontrolny otrzymany wyłącznie z chitozanu niemodyfikowanego, p-CHI _x - kompozyt zawierający x% masowych chitozanu modyfikowanego, gdzie x = 15, 25 lub 40. Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe; p<0,05, n=3)	106
Rys. 17. Twardość i elastyczność materiałów chitozanowych: A - wykonanych wyłącznie z polimeru kontrolnego lub wyłącznie z polimeru modyfikowanego, zamrożonych i wysuszonych sublimacyjnie, B - wykonanych poprzez zmieszanie roztworów polimeru kontrolnego i modyfikowanego w odpowiednich stosunkach masowych, zamrożonych i wysuszonych. Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe; p<0,05, n=5)	108
Rys. 18. Porównanie właściwości przeciwutleniających i zdolności do chelatowania jonów Fe ²⁺ przez chitozan modyfikowany p-CHI ₁₀₀ i materiał kontrolny CHI. Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe; p<0,05, n=3)	111
Rys. 19. (A) Wyniki testu MTT dla chitozanu modyfikowanego bezwodnikiem kwasu propylofosfonowego (rozcieńczenia p-CHI ₁₀₀ : 1:1, 1:5, 1:10), po 24 godz. inkubacji z linią komórkową L929, **p<0.01, ***p<0.001. Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe; n=3) (B) Zdjęcia mikroskopowe komórek bez obecności materiału (kontrola komórki L929) oraz w obecności badanego materiału p-CHI ₁₀₀ w rozcieńczeniach 1:1, 1:5, 1:10 (powiększenie x 150)	118
Rys. 20. schemat zestawu do kapsułkowania metodą współosiową wykonany w ramach realizacji pracy doktorskiej w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności (KChTiBŻ)	120
Rys. 21. Zdjęcie chitozanowych kapsułek z olejowym rdzeniem bezpośrednio po utwardzeniu w roztworze utwardzającym (Kapsułki wykonane zgodnie z metodyką zawartą w pracy - rozdz. 3.3.6. Prędkość przepływu gazu tłoczącego roztwór płaszcza VS = 4,45 g/godz., prędkość przepływu oleju VC= 2,00 g/godz.)	121
Rys. 22. Schemat miceli w środowisku hydrofilowym (www.bifi.es)	122
Rys. 23. Wpływ prędkości przepływu roztworu płaszcza na średnicę i kształt kapsułek (Prędkość przepływu gazu tłoczącego roztwór: A-0,6 L/godz., B-1,2 L/godz., C-1,8 L/godz., D-2,4 L/godz., E-3,0 L/godz., F-3,6 L/godz.)	124
Rys. 24. Wpływ prędkości strumienia gazu inertnego zrywającego krople na średnicę oraz kształt kapsułek. (Prędkość przepływu gazu inertnego: A-0 L/godz., B-200 L/godz., C-400 L/godz., D-600 L/godz., pomiary wykonane dla optymalnych przepływów roztworów płaszcza i rdzenia)	126

8. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie JCR:

1. Tylingo R., **Mania S.**, Szwacki J. A novel method for drop in drop edible oils encapsulation with chitosan using a coaxial technique, *Reactive and Functional Polymers*, 100 (2016) 64-72.
2. Tylingo R., Gorczyca G., **Mania S.**, Szweda P., Milewski S. Preparation and characterization of porous scaffolds from chitosan-collagen-gelatin composite, *Reactive and Functional Polymers*, 103 (2016) 131-140.

Pozostałe publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż w bazie JCR:

1. Tylingo R., **Mania S.**, Panek A., Piątek R., Pawłowicz R. Isolation and characterization of acid soluble collagen from the skin of African catfish (*Clarias gariepinus*), Salmon (*Salmo salar*) and Baltic cod (*Gadus morhua*), *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 6 (2016) 1-6.
2. **Mania S.**, Tylingo R. Wpływ zmiennych procesu kapsułkowania współosiowego na stabilność oksydacyjną oleju rzepakowego, *Przegląd wybranych zagadnień z zakresu przemysłu spożywczego*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o. (2016) 198-209.
3. **Mania S.**, Tylingo R. Metoda kapsułkowania z wykorzystaniem systemu współosiowego, W : *Technologia produkcji i bezpieczeństwo żywności*/ ed. Polskie Towarzystwo Technologów Żywności Kraków: Oddział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, (2014) 100-109.
4. **Mania S.** Microcapsules and their applications in pharmaceutical and food industry. *PhD Interdisciplinary Journal*, 2 (2013) 71-75.

Udział w konferencjach naukowych:

1. **Mania S.**, Tylingo R., Grube M. Ocena wpływu promieniowania UV i podwyższonej temperatury na stabilność oleju rzepakowego kapsułkowanego metodą współosiową, VIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2016. "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju", 12-13.03.2016, Lublin, Polska (plakat).
2. **Mania S.**, Tylingo R. Metoda kapsułkowania z wykorzystaniem systemu współosiowego, XI Konferencja Naukowa z cyklu *Żywność XXI wieku*

"ŻYWNOŚĆ A BEZPIECZEŃSTWO ZDROWOTNE", 18-19.09.2014, Kraków (wystąpienie ustne).

3. **Mania S.**, Tylingo R., Kasper A., Panek A., Synowiecki J. Properties of the gelatin-alginate microspheres and their capacity for the immobilization of enzymes, 5th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2013, 8-11.10.2013, Kraków, Polska (plakat).
4. **Mania S.** Microcapsules and their applications in pharmaceutical and food industry. BioTech Conference, 27-29.06.2013, Sopot, Polska (plakat).

Działalność redakcyjna i recenzencka:

1. Recenzent w czasopiśmie Carbohydrate Polymers, IF = 4,811; pierwszy kwartył.

Współautorstwo we wdrożeniach technologicznych:

1. Tylingo R., **Mania S.**, Śliwińska A. Opracowanie innowacyjnej technologii wytwarzania prozdrowotnego chleba o wysokiej wartości odżywczej. Zgłoszenie nr: 031924, 16.06.2016, Piekarnia Tyrolska Jarosław Goszczycki Sp. z o. o.
2. Gorczyca G., Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S., Zalewska M., **Mania S.** Sposób przygotowania roztworu chitozanu, kompozycja i sposób wytwarzania hydrożelowej membrany chitozanowej oraz Sposób wytwarzania chitozanowo-białkowego materiału biopolimerowego. Zgłoszenie nr: R/2015/10/01, 1.10.2015, KAEM Maria Krystyna Krupska.
3. Tylingo R., **Mania S.** Opracowanie nowego wyrobu w postaci hydrolizowanego kolagenu w roztworze do bezpośredniego spożycia wraz z opracowaniem nowego technologicznego procesu jego produkcji. Opracowanie planu wdrożenia opracowanej nowej technologii produkcji hydrolizowanego kolagenu w roztworze wraz z jego pakowaniem i warunkami przechowywania. Zgłoszenie nr: 031606, 4.05.2015, SUPERIOR-Strefa Józef Żórawski i Wspólnicy S.J.

Współautorstwo w projektach badawczo-rozwojowych

1. Tylingo R., **Mania S.**, Śliwińska A. Charakterystyka prototypowego pieczywa: wilgotność podczas przechowywania, kwasowość mękiszu, strata wypiekowa, tekstura prób, cechy sensoryczne, GDA. Nr zgłoszenia: 032428, 2.03.2017, P.P.U. Nort Sp. z o.o.
2. Tylingo R., **Mania S.**, Śliwińska A. Wykonanie prac badawczych w zakresie oznaczenia parametrów teksturowych-TPA prototypowych produktów, ocena skuteczności obróbki owoców czarnego bzu, określenie właściwości

przeciwutleniających produktów zawierających aktywne dodatki, przeprowadzenie analizy sensorycznej wytworzonych produktów prototypowych. Nr zgłoszenia: 032427, 13.01.2017, UNI-MASZ H. M. JUSZCZUK S. J.

3. Tylingo R., **Mania S.**, Śliwińska A. Optymalizacja procesu technologicznego wypieku produktów piekarniczych z dodatkiem uwodnionej krzemionki (dیتlenek krzemu, krzemian wapnia), skiełkowanego ziarna pszenicy i kurkumy. Zdefiniowanie udziału dodatków oraz ocena wpływu dodatku na parametry fizykochemiczne analizowanych wariantów prototypowych. Nr zgłoszenia: 032383, 12.01.2017, Mrozpak Sp. z o.o.
4. Tylingo R., **Mania S.**, Śliwińska A. Optymalizacja procesu technologicznego wypieku produktów piekarniczych z dodatkiem mielonego lnu - wykorzystanie preparatów mielonego lnu jako dodatków spulchniających. Zdefiniowanie dodatków oraz ocena wpływu dodatków na parametry fizykochemiczne analizowanych wariantów prototypowych. Oznaczenie referencyjne wartości wskazanego dziennego spożycia. Nr zgłoszenia: 032385, 9.01.2017, Piekarnia Cukiernia Piotr Kropidłowski.
5. Tylingo R., **Mania S.**, Wykonanie prac badawczych w zakresie opracowania założeń technologicznych i ocena opracowanego przez zleceniodawcę produktu. Nr zgłoszenia: 032429, 9.01.2017, CUSTI Dawid Goszczycki.
6. Tylingo R., **Mania S.**, Śliwińska A., Malinowska-Pańczyk E., Martysiak-Żurowska D. Opracowanie założeń technologicznych i ocena opracowanego produktu w postaci probiotycznych wyrobów cukierniczych. Nr zgłoszenia: 032385, 2.01.2017, Piekarnia Cukiernia Piotr Kropidłowski.
7. Tylingo R., **Mania S.**, Śliwińska A. Ocena właściwości mechanicznych, bakteriobójczych materiału, migracji i barierowości dla pary wodnej. Nr zgłoszenia: 032073, 31.07.2016, Witoplast Kisielinsey Sp. J.
8. Tylingo R., **Mania S.** Przeprowadzenie oznaczania składów podstawowych oraz oceny sensorycznej produktów twarogowych. Nr zgłoszenia: 031692, 2.11.2015, OTIS Sp. z o.o.
9. Tylingo R., **Mania S.**, Opracowanie technologii otrzymywania materiału sorpcyjnego, Nr zgłoszenia: 032078, 15.07.2016, Firma Handlowo-Usługowa "MARTA" Marta Wódkowska.
10. Tylingo R., **Mania S.** Oznaczenie właściwości technologicznych substytutów tłuszczu mlecznego, Nr zgłoszenia: 031700, 2.11.2015, Elstar Fats Sp. z o.o.

11. Tylingo R., **Mania S.** Przeprowadzenie analizy merytorycznej dotyczącej określenia zdolności patentowej innowacyjnych materiałów opakowaniowych. Nr zgłoszenia: 031691, 9.10.2015, Lester Productions Sp. z o.o.
12. Tylingo R., **Mania S.** Opracowania procedury otrzymywania innowacyjnego produktu, Nr zgłoszenia: 031586, 16.03.2015, P.P.H.U. WÓDKOWSKI Andrzej Wódkowski.
13. Tylingo R., **Mania S.** Testy TPA. Nr zgłoszenia: 031637, 1.05.2015, P.H.U. Logistyk Leszek Błański.
14. Tylingo R., **Mania S.** Prace badawczo-rozwojowe. Tuby polietylenowe, Nr zgłoszenia: 031581, 2.03.2015, WITOPLAST Kisielińscy Sp. J.