

ACTA AGROPHYSICA



Adam Paweł Kuczyński

**STUDIA NAD DYNAMIKĄ BRĄZOWIENIA
I JEJ WYKORZYSTANIEM
W OCENIE ŚWIEŻOŚCI MIĄŻSZU JABŁEK**

138

**Instytut Agrofizyki
im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
w Lublinie**

**Rozprawy i Monografie
2006 (5)**

Komitety Redakcyjny

Redaktor Naczelny

Ryszard T. Walczak, czł. koresp. PAN

Zastępca Redaktora Naczelnego

Józef Horabik

Sekretarz Redakcji

Wanda Woźniak

Rada Redakcyjna

Tomasz Brandyk, czł. koresp. PAN – przewodniczący

Ryszard Dębicki

Bohdan Dobrzański

Danuta Drozd

Franciszek Dubert

Tadeusz Filipek

Józef Fornal

Jan Gliński, czł. rzecz. PAN

Grzegorz Józefaciuk

Eugeniusz Kamiński

Andrzej Kędziora

Tadeusz Kęsik

Krystyna Konstankiewicz

Janusz Laskowski

Jerzy Lipiec

Piotr P. Lewicki

Stanisław Nawrocki, czł. rzecz. PAN

Edward Niedźwiecki

Viliam Novák, Słowacja

Josef Pecen, Czechy

Tadeusz Przybysz

Stanisław Radwan, czł. koresp. PAU

Jan Sielewiesiuk

Witold Stępniewski

Zbigniew Ślipek

Bogusław Szot

Opiniowali do druku

Prof. dr hab. Adolf Horubała, czł. rzecz. PAN

Prof. dr hab. Witold Płocharski

Praca dofinansowana przez KOMITET BADAŃ NAUKOWYCH
proj. nr PB 5 P06C 021 18 w latach 2000-2001

Adres redakcji

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, P.O. Box 201

20-290 Lublin, tel. (0-81) 744-50-61, e-mail: editor@ipan.lublin.pl

<http://www.ipan.lublin.pl>

Publikacja indeksowana przez

Polish Scientific Journals Contents – Life Sci. w sieci Internet

pod adresem <http://psjc.icm.edu.pl>

©Copyright by Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin 2006

ISSN 1234-4125

Wydanie I. Nakład 200 egz., Ark. 11,3

Skład komputerowy: Adam Kuczyński

Druk: Drukarnia ALF-GRAF, ul. Kościuszki 4, 20-006 Lublin

ERRATA

Strony	Jest	Powinno być
52, 57, 59, 60, 62, 63, 65, 69, 72, 75, 78, 79, 82, 84, 87, 88, 89, 90, 92, 94, 96, 117, 126	Np. (rys. 19 s. 3) lub (rozdz. 5.1.3 s. 3) lub (wg wzoru 5, s. 3)	Np. (rys. 19) lub (rozdz. 5.1.3) lub (wg wzoru 5)
40	term-1, term-2	term 1, term 2
43	nm/min	$\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$
71	, 1%, or 0.1%	or 0.1%
72	ksyloglukozyd	ksyloglukozydu
79	użytkowniaka	użytkownika

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	5
2. CEL I ZAKRES BADAŃ	6
3. GENEZA ZAGADNIENIA	6
3.1. Podstawy biologii enzymatycznego brązowienia mięszu jabłek	13
3.1.1. Dojrzewanie i dojrzałość owocu	13
3.1.2. Regulacja metaboliczna i śmierć komórek	15
3.1.3. Biochemiczne mechanizmy reakcji brązowienia	18
3.1.4. Brązowienie w ocenie konsumenta	21
3.2. Kinetyka biologiczna procesu brązowienia	25
3.2.1. Równanie kinetyczne	26
3.2.2. Sterowanie szybkością brązowienia	29
3.3. Pomiar brązowienia enzymatycznego	31
3.3.1. Kolorymetria tkanki	32
3.3.2. Spektrofotometria w świetle rozproszonym	34
4. MATERIAŁY I METODY	38
4.1. Materiały	38
4.1.1. Warunki przechowywania owoców	40
4.1.2. Przygotowanie próbek i cząstek z jabłek	40
4.2. Metody	43
4.2.1. Spektrofotometria dwuwiązkowa z rozpraszającą kulą	43
4.2.2. Prosta spektrofotometria odbiciowa	45
4.2.3. Spektrofluorymetria w świetle odbitym	46
4.2.4. Potencjometria redoks	47
4.2.5. Metodyka analiz dodatkowych	47
4.2.6. Model kinetyki	48
5. WYNIKI POMIARÓW I ICH ANALIZA	51
5.1. Charakterystyka spektroskopowa mięszu	51
5.1.1. Zasięg pomiarów absorpcji rozproszonej	52
5.1.2. Pasma absorpcji dla kwasu chlorogenowego	54
5.1.3. Fluorescencja mięszu	55
5.2. Zmienność świeżo wyciętego mięszu	57
5.3. Widma brązowienia mięszu	62
5.4. Potencjał elektrody redoks i brązowienie	67
5.5. Wpływ przestrzeni międzykomórkowej i jędrności na brązowienie	72
5.6. Model kinetyki brązowienia i świeżość mięszu	75
5.6.1. Wyrażenie kinetyczne dla brązowienia z uwzględnieniem dojrzałości	76
5.6.2. Funkcja kinetyczna procesu brązowienia z parametrem optycznym mięszu	78
5.7. Parametryzacja brązowienia	81
5.7.1. Wysycenie enzymatycznego brązowienia	82

5.7.2. Czas połówkowy brązowienia	84
5.7.3. Szybkość enzymatycznego brązowienia	85
5.7.4. Trwałość barwy mięszu	87
5.8. Testy hamowania brązowienia	88
5.9. Związek parametrów brązowienia z substratami brązowienia.....	93
6. DYSKUSJA	98
6.1. Uszkodzenie mechaniczne i ocena świeżości mięszu	98
6.2. Charakterystyka brązowienia i udział polifenoli	103
6.2.1. Zakres widzialny brązowienia	104
6.2.2. Brązowienie w zakresie UV	107
6.3. Pomiar świeżości poprzez brązowienie mięszu	112
6.3.1. Kryteria optyczne świeżości	114
6.3.2. Kryteria potencjometryczne świeżości	118
6.4. Ochrona świeżości mięszu.....	121
7. WNIOSKI	127
8. PIŚMIENNICTWO.....	128
9. STRESZCZENIE.....	141
10. SUMMARY	143

1. WSTĘP

Studia nad dynamiką brązowienia i jej związkiem ze zmianami wywołanymi przejrzywaniem, utratą świeżości i w efekcie brązowieniem enzymatycznym miąższu, mogą znaleźć zastosowanie przy ustalaniu metod aparaturowych do oceny zmian świeżości jabłek, autentyczności produktu w technologii ciętych owoców i do badania preferencji konsumenckich w ocenie świeżości.

Cecha organoleptyczna, jaką jest świeżość jabłek, nie jest dokładniej rozpoznana. Wydaje się, że postęp w dziedzinie poznania szczegółów percepcji świeżości owoców może nastąpić wraz z rozwojem metod aparaturowych i analitycznych. Pomiar aparaturowe obejmują jedynie niewielki fragment szerokiej gamy czynników, które kształtują oceny sensoryczne. Znalezienie i zastosowanie skutecznych technik instrumentalnych do pomiaru cech organoleptycznych jest trudne. Powstały ogólne procedury postępowania przy ustalaniu metod aparaturowych, tak aby odzwierciedlały w zadawalającym stopniu cechy sensoryczne produktu. Stosowano je przez dziesiątki lat, studiując obiektywne metody kontroli tekstury potrzebne w kontroli jakości jabłek. Wydaje się, że procedury te dobrze obejmują także istotę podejścia do świeżości i do tego, co potocznie określa się obiektywizacją ocen organoleptycznych. Podstawą ich jest dokładne zdefiniowanie parametrów zarówno fizycznych, jak i organoleptycznych.

W pracy wysunięto propozycję i utworzono obiektywne miary świeżości miąższu jabłek na podstawie pomiarów aktywności biologicznej tkanki po jej uszkodzeniu. W świeżym, żywym miąższu wczesna faza reakcji na stres uszkodzenia i stres wytworzonych rodników powinna być zbliżona do reakcji enzymatycznych zachodzących w żywej roślinie, przebiegać z nadmiarem enzymów, inicjując łańcuch przemian wolnorodnikowych wielu substratów. Parametrami kinetyki brązowienia powinno się określić w miąższu aktywność głównych substratów i enzymów uruchomionych po uszkodzeniu.

Jednak złożone mechanizmy enzymatycznego brązowienia miąższu jabłek i duża zmienność cechy nie pozwoliły dotąd na poznanie dynamiki i parametrów procesu. Najliczniejsze badania w chemii żywności ograniczane są do brązowienia soków i przecierów jabłkowych. Brakuje szerszych badań w zakresie technologii sadowniczych, przechowalniczych i łączenia wiedzy o przejrzywaniu jabłek z dobrze poznanymi *in vitro* procesami brązowienia. W pierwszym etapie badań powinny być poszukiwane parametry opisujące proces brązowienia i zależności pomiędzy parametrami fizycznymi a substratami lub produktami oznaczanymi w miąższu.

Celowy dobór materiału odmianowego i wybór technologii rolniczych, skorzystanie z agrofizycznych metod badawczych, utworzenie precyzyjnych pojęć i terminów powinno dać model najszerzej opisujący zmiany parametrów jabłek, szczegółowy opis dynamiki brązowienia miąższu i nowe parametry do oceny zmian świeżości jabłek.

2. CEL I ZAKRES BADAŃ

Celem pracy jest opracowanie i zaproponowanie nowego standardu jakości, który pozwoli obiektywnie określać świeżość miąższu jabłek lub produktu – świeżych sałatek z jabłek. Dlatego konieczne było opracowanie fizycznych metod pomiaru brązowienia i modelu tego procesu, zdefiniowanie mierzalnych bodźców, jak również wskazanie elementów oceny świeżości. Celowe było sprawdzenie hipotezy o możliwości wykorzystania szybkiej fazy reakcji żywej tkanki na uszkodzenie do tworzenia bodźców fizycznych i obiektywnego określania zmian świeżości, a więc – czy w reakcji brązowienia miąższu występuje czasowe i przestrzenne rozdzielanie substratów lub produktów reakcji i czy można je analizować metodami fizycznymi oraz wykorzystywać w ocenie zmian świeżości jabłek.

W realizacji celu można wyróżnić kilka etapów:

1. Poznanie metodami spektrofotometrii odbiciowej, spektrofluorymetrii i potencjometrii redoks zmian zachodzących w otoczeniu uszkodzonej mechanicznie tkanki miąższu jabłek, a następnie porównanie ich ze zmianami w jabłkach przechowywanych i przejrzywających lub po zastosowaniu technologii ciętych jabłek.

2. Porównanie znanych z literatury wyników badań modeli brązowienia enzymatycznego soków, przecierów z badaniami reakcji owoców na mechaniczne uszkodzenie i zmianami parametrów fizycznych uszkodzonego miąższu.

3. Opisanie możliwie pełnego zakresu zmienności brązowienia miąższu jabłek, biorąc pod uwagę owoce znanych odmian w stadium dojrzałości spożywczej i pochodzące z tradycyjnego sadownictwa i przechowalnictwa.

Badania odmianowe i ich opracowanie modelowe powinno być podstawą utworzenia szybkich metod oceny świeżości na podstawie pomiarów aktywności szlaków metabolicznych związanych z procesami redukcji i utleniania w owocach, które uruchamiane są po uszkodzeniu. Metody fizyczne powinny doprowadzić do dokładniejszego rozpoznania oceny świeżości jabłek i osiągnięcia praktycznego celu, którym jest pomiar zmian świeżości i kształtowanie wartości odżywczej, profilu sensorycznego jabłek, jak również produktów – ciętych świeżych jabłek.

3. GENEZA ZAGADNIENIA

Świeżość miąższu jest podstawową cechą jakości, którą zainteresowany jest konsument jabłek lub produktu – ciętych części z jabłek. Cecha organoleptyczna, jaką jest świeżość miąższu jabłek, nie jest dokładnie rozpoznana.

Świeżość miąższu jabłek jest częścią oceny jakości owoców [72]. W jabłkach przechowywanych chłodniczo przebiegają powolne procesy dojrzewania, a następnie przejrzywania. Gdy jabłka znajdują się poza chłodnią, szybko przejrzywiają i tracą świeżość. Znacznie szybszy proces przejrzywania i utraty świeżości zachodzi

w świeżych sałatkach z jabłek [245]. W fazie przejrzewanania, tzn. od stanu dojrzałości handlowej przez stan dojrzałości konsumpcyjnej, zachodzą w komórkach jabłek procesy metaboliczne i liczne przemiany biochemiczne. Świeżość mięszu zapewniają żywe komórki, których charakterystyczny w tym stanie metabolizm i aktywność biologiczna umożliwia reagowanie na zmiany w otoczeniu. W ocenie organoleptycznej o utracie świeżości świadczy np. utrata tekstury – spowodowana brakiem odporności na bodźce mechaniczne, więdnienie – związane z utratą zdolności utrzymywania wody, zmiana barwy – wywołana rozpadem i przemianami barwników [181].

Analiza stanu wiedzy z zakresu obiektywnych metod oceny świeżości jabłek wykazała dominację niszczących metod mechanicznych i metod barwometrycznych [1,2,32,40]. Właściwości mechaniczne mięszu jabłek badano w zależności od wielu kształtujących je czynników. Badacze starali się powiązać fenomenologiczny, fizyczny opis z podstawowymi elementami struktury: budową morfologiczną, budową tkanki i komórek lub z różnicami w składzie biochemicznym, a zatem z elementami, które do pewnego stopnia kształtują właściwości fizyczne materiału biologicznego [34,35]. Bardzo często elementem badań był czas, zmieniający dojrzałość i świeżość materiału. Zachowywano związek z procesami metabolicznymi przebiegającymi w żywej tkance podczas dojrzewania owoców w sadzie, po zbiorze w chłodni i przed konsumpcją. Metodyczne aspekty badań podstawowych właściwości fizycznych wskazywały na istotne korelacje ze zmianami stadium dojrzałości owoców lub zachodzącymi w owocach przemianami metabolicznymi [44,94,200].

W ocenie jakości i świeżości jabłek brano pod uwagę właściwości fizyczne, którym można przypisać interpretację organoleptyczną [1,12,67,69], tzn. znaną zmysłom konsumentów, lecz określającą tzw. jakość zewnętrzną [83,215]. W ocenie świeżości owoców nadal dominują oceny jędrności i barwy. Wymagania jakościowe, postawione w normie określającej świeżość [72] w formie opisu i terminów organoleptycznych, są zbyt skromne w stosunku do możliwości współczesnej hodowli i oczekiwań rynku konsumenta. Wzrosły wymagania w stosunku do świeżości jabłek, gdyż konsumenci świadomi są wartości żywieniowej składników dostępnych w owocach. Określa się ją pojęciem „jakości wewnętrznej” [232] i można by tu wprowadzić termin „świeżość jabłek”.

W badaniu jakości jabłek stosuje się niszczące, mechaniczne metody, lecz nie wykorzystuje informacji o szybkich procesach metabolicznych, biochemicznych związanych z reakcją na to uszkodzenie. Powszechnie znana reakcja enzymatycznego brązowienia mięszu, którą rozpoczyna mechaniczne uszkodzenie, jest jedynie rozpoznawana jako element oceny organoleptycznej i powód do pomiaru zmian barwy. Zmiany barwy przez nią wywołane są zwykle opisywane współrzędnymi barwy

z układu barwometrycznego CIE $L^*a^*b^*$. Parametrów tych używa się też do optymalizacji procesów hamowania brązowienia i technologii świeżo ciętych jabłek [202].

Świeżość powinna być precyzyjniej określana [72], obiektywnie mierzona, dlatego trwają poszukiwania metod obiektywnych, aby po licznych i złożonych procesach technologicznych, dokonywanych w nowoczesnym rolnictwie, nie wystąpił zanik aktywności biologicznej w produkcji i związana z nim utrata wartości żywieniowej – jak stwierdził Harborne [66].

Reakcja enzymatycznego brązowienia miększu występuje powszechnie przy zaburzeniach metabolizmu i przejrzeniu, a nie tylko po mechanicznym uszkodzeniu [86]. Efekty są widoczne po przekrojeniu jabłka – bliżej gniazda nasiennego lub przez skórę – przy powierzchni owocu. Badano warunki, które były przyczyną zepsucia wyglądu i utraty świeżości jabłek. Jabłka w tych samych warunkach przechowywania wykazywały różną skłonność do tworzenia ciemnych barwników melaninowych. Teraz wiadomo, że mogły się różnić zawartością lub proporcjami stężeń polifenoli – substratów uczestniczących w brązowieniu.

Na wszystkich etapach reakcji obronnej roślin, w reakcji na zmiany warunków i równowagi z ich otoczeniem, w adaptacji, obronie, regeneracji i degradacji uczestniczy liczna grupa związków polifenolowych. Zwraca się też uwagę na to, że stosowane obecnie w sadownictwie i przechowalnictwie technologie stymulują powstawanie substancji stresowych i polifenoli w produktach ogrodnictwa. W mechanicznie uszkodzonych płodach rolnych stwierdza się kumulację związków wtórnego metabolizmu już w ciągu krótkiego okresu przechowywania. Bada się ich stężenia uzależnione od warunków wegetacji i okresu przechowywania przed i po uszkodzeniu [126-130,240]. Doniesienia te zgodne są z badaniami metabolitów stresu i ciemnienia enzymatycznego [168]. Nie określano jednak skali tego zjawiska i zmienności wywołanej licznymi czynnikami stosowanymi w sadownictwie i w przechowalnictwie. Dlatego poznanie reakcji na stresy otoczenia i udział w tej reakcji polifenoli jabłek wydaje się być koniecznością.

W Polsce możliwe jest przeprowadzenie badań jakości i świeżości, z odniesieniem się do zawartości związków polifenolowych, na bogatym odmianowo materiale pochodzącym ze zrównoważonego rolnictwa [152]. Do Polski importowane są często tanie i atrakcyjne, z innych stref klimatycznych, świeże produkty roślinne. Również rozpoczęto produkcję świeżych, tylko minimalnie przetworzonych, owoców i warzyw. W krajach Unii Europejskiej trwają poszukiwania metod wyceny „świeżości, naturalności i ekologiczności” płodów rolnych. Powinny to być procedury dostosowane do wymagań giełdy handlowej owocowo-warzywnej. Dotąd nie opracowano założeń metodycznych do oceny nowych produktów wykorzystujących świeże, żywe tkanki owoców. Nie ma szybkich i obiektywnych metod fizycznych pomiaru tak ważnego elementu jakości, jakim jest świeżość jabłek. W związku

z tym celowe jest poznanie dostępnych w Polsce jabłek, których miąższ może być standardem aktywności biologicznej w owocu i świeżości.

Substancjami, które biorą udział w enzymatycznym brązowieniu jabłek zajmują się obecnie biolodzy i fizjologodzy roślin, których interesują mechanizmy dojrzewania owoców, odporność na różnorodne stresy, integracja przemian w komórce i tkance [128,188]. Praktycznych rozwiązań oczekują technolodzy przechowywalnictwa owoców, którym owoce brązowieją w komorach z atmosferą kontrolowaną, a także technolodzy i biochemicy żywności, badający skład chemiczny surowca lub żywności po utrwaleniu. Wyniki badań fizjologii stresu w roślinach prowadzą do ciekawych wniosków. Istnieją naturalne, a często specyficzne w odmianach, przystosowania tkanek do szybkiej reakcji na uszkodzenie. Przystosowania do ograniczania niszczenia komórek przez utleniane substancje organiczne. Wytwarzane są do tego specyficzne substancje chemiczne, a przede wszystkim działają mechanizmy służące ochronie żywotności tkanki. Prawdopodobnie liczne roślinne produkty metabolizmu wtórnego mogą być uniwersalnie wykorzystywane. Mogą spełniać podobną, ochronną rolę w stosunku do komórek w organizmach zwierząt. Są projekty, aby lepiej je wykorzystywać w żywieniu, produkując żywność funkcjonalną.

Jednocześnie badania naukowe zwracają uwagę na ogromną rolę w żywieniu człowieka flawonoidów i kwasów fenolowych, które są właśnie głównymi substratami reakcji brązowienia. Substrat i produkty reakcji brązowienia są przedmiotem zainteresowań żywieniowców, farmakologów i lekarzy. Potwierdzają oni ich funkcjonalną rolę w organizmie człowieka [208,209]. Zrozumiałe jest, że w ten sposób odnoszą się oni do elementów percepcji świeżości jabłek.

Nie powstało dotąd opracowanie złożonych zjawisk fizjologicznych i biochemicznych, zachodzących po uszkodzeniu miąższu jabłek i związanych z enzymatycznym brązowieniem. Znane opracowania monograficzne koncentrują się na problemach technologicznych, niemile widzianego przez człowieka procesu brązowienia [250] i nie wnikają głębiej w jego fizjologiczną i ochronną naturę.

Dynamiczny tryb życia ludności sprawił, że brak jest czasu na właściwe przygotowanie żywności, a nawet na efektywne jej spożycie. Jednak ogromne doświadczenie przechowywalników w zakresie fizjologii płodów rolnych, wiedza o warunkach zachowania świeżości, wykorzystanie cech odmianowych pozwala poszerzyć technologie chłodnicze o najbardziej wyrafinowane formy. Do takiej należy np. rozprowadzanie przez cały rok różnorodnych kompozycji ze świeżej, żywej tkanki owoców, warzyw, w tym naciowych, w porcjach gotowych do spożycia [244]. Jest to wygodne rozwiązanie w kierunku racjonalnego odżywiania [250].

Głównym problemem nowych technologii pozostaje niestabilność mikrobiologiczna i fizykochemiczna, i bezpieczeństwo nietrwałego wyrobu [125]. Obecnie dodatkowym i ważnym problem jest znaczne ograniczenie bioróżnorod-

ności, gdyż przetwórstwo korzysta z wybranych odmian. Ochrona różnorodności biologicznej jeszcze kilkanaście lat temu kojarzyła się z ratowaniem ginących, dzikich gatunków. Obecnie dotyczy ona także genotypów uzyskanych w czasie wielowiekowej uprawy roślin przez człowieka [152]. W sadownictwie wielu krajów zmniejszono już liczbę odmian w uprawach wielkotowarowych i pozostawiono tylko dostosowane do wymagań komór atmosfery kontrolowanej i handlu wielkotowarowego. Stare odmiany zostały wyparte z uprawy przez nowe, może nie ze względu na smak i wartość dietetyczną, lecz przede wszystkim z powodu przydatności do handlu [152].

Nowe technologie przetwórcze to nowe wymagania od surowca, a więc od sadownictwa. Dotychczas wymagano wprowadzania odmian bardzo wczesnie plonujących, intensywnych, o korzystnych cechach agrotechnicznych, a także o dużej odporności mechanicznej i ładnym wybarwieniu. Przechowywanie w komorach z atmosferą kontrolowaną i jego efekty na surowcu stały się technologią jak najbardziej już normowaną. Ten kierunek hodowli nie był jeszcze w pełni zadowalający i dodano mu wymagania ograniczenia ochrony chemicznej w sadach. Wydaje się, że spełniono także wymagania, które postawili producenci soków – potrzebne są owoce z dużą proporcją kwasów do cukrów. Zastanawiano się dalej, czy postęp w sadownictwie wymaga lepszego wykorzystania składników nawożenia, nawadniania, wprowadzania intensywnych odmian i tworzenia dla nich optymalnych warunków uprawy. Wymaga to ponownego dostosowania technologii uprawy, zbioru, jak również przechowywania. Stawiano także pytanie: „Jakie jest to jabłko, którego właściwości zapewniają wieczne zdrowie człowieka?” [66]. Z analizy wielu zjawisk w sadownictwie wydaje się i wynika, że przyczyną rzeczywistych strat powstających w złożonym cyklu produkcyjnym jabłek jest brak miarodajnych informacji o roślinnych metabolitach wtórnych. Dotyczy to informacji o substratach enzymatycznego ciemnienia, o ich charakterystycznym dla odmian rozkładzie i o nieuniknionej zmienności dostosowanej do wpływu stresowych warunków środowiska wzrostu i przechowywania. Obecnie brak wydajnych i prostych metod, aby dokładniej ocenić tę sytuację.

Wiadomo już, że osiągnięcia w biotechnologii pozwalają spełniać przeróżne wymagania nowoczesnego człowieka [198,230]. Daleko jeszcze do precyzyjnego określenia tych wymagań i jest wiele propozycji. Należy wskazać na opinię Harborne [66] – specjalisty z dziedziny metabolitów wtórnych, który proponuje, aby cofnąć się w badaniach metabolitów wtórnych do płodów rolnych uprawianych co najmniej 100 lat temu. Na bazie tak zdobytej wiedzy można by twierdzić o zasadnych lub niezasadnych zmianach, których dokonał człowiek metodami hodowlanymi i agrotechnicznymi. Dopiero wtedy można by planować nowe rośliny, a także zaprojektować produkty funkcjonalne.

W sadownictwie problematyka metabolitów wtórnych to znikomy fragment badań odporności roślin na różnorodne „stresy”. Natomiast badania polifenoli jabłek zdominowane zostały przez problemy przetwórstwa – początkowo z zakresu produkcji soków, a obecnie sałatek owocowych i chipsów. Rozwinięcie tej problematyki jest konieczne do oceny świeżości miąższu jabłek. Przede wszystkim brak jest metod badawczych dostosowanych do specyfiki doświadczeń sadowniczych. Droga aparatura do analiz chemicznych, koszty jednostkowe analizy i czasochłonność są to poważne ograniczenia, które umożliwiają wykonanie jedynie badań metodycznych i zaledwie na kilku odmianach. Poważną lukę w badaniach technologii przetwórczych stanowi brak opisu przygotowania do badań reprezentatywnego materiału wieloodmianowego i różnorodność technologii przechowalniczych, co nie sprzyja wskazaniu najistotniejszych składników biochemicznych określających świeżość jabłek.

Świeżość owoców można utrzymywać licznymi technologiami. Najstarsze z nich wykorzystują wiedzę o fizjologii rozwoju owoców w różnych warunkach otoczenia – temperatury i składu atmosfery [119]. Najnowsze metody biochemiczne blokują receptory etylenu [21]. Wydaje się, że inżynieria genetyczna [43,135,163,191] umożliwia już skonstruowanie owocu zadowolającego nasze zmysły oceniające świeżość.

Nadal poszukuje się skutecznych technologii hamowania brązowienia w produkcji ciętych jabłek i jednocześnie dąży do poprawy ich odporności mikrobiologicznej [73,74,87,138]. Idea technologii odtwarzania warstwy spełniającej funkcję skórki nie doczekała się jeszcze realizacji albo człowiek nie wie, w jaki sposób „dba o to przyroda”. Badania brązowienia miąższu w technologii świeżo ciętych owoców mają już ponad 30 lat. Ponting rozpoczął je od badań zjawiska enzymatycznego brązowienia, a już w roku 1972 zastosował różnorodne metody hamowania brązowienia świeżo ciętych jabłek [250].

Naukowcy znają złożoność problematyki reakcji enzymatycznych w roślinach i udział polifenoli w procesach enzymatycznych związanych z reaktywnymi formami tlenu. Zdają sobie sprawę z możliwości nowych technologii w przygotowaniu produkcji żywności wygodnej i funkcjonalnej. Doceniają możliwość wpływu tej żywności na poprawę zdrowia, ale liczą się też z wieloma niebezpieczeństwami. Wiąże się to z wykorzystaniem, już na masową skalę, w żywieniu ludzi chemizacji żywych tkanek roślinnych i blokowaniem reakcji enzymatycznych w żywym organizmie roślin przeznaczonych do spożycia, aby zachować „świeżość” ich tkanek. W tym celu norma ISO określa znaczenie terminu „świeżość owoców” [72].

Wszystkie dotąd przedstawione informacje nasunęły przypuszczenia, że dla różnych odmian warunki dojrzewania po zbiorze mogą mieć różny wpływ na zmienność brązowienia, podobnie jak na inne poznane właściwości fizyczne

owoców. Zatem pomiar brązowienia może być przydatny do optymalizacji procesów przechowalniczych i prowadzić do uzyskania wysokiej jakości owoców, a także zapewnić świeżość cząstek z jabłek.

Obiektywna charakterystyka brązowienia, tak jak i innych cech materiałów roślinnych, stwarza trudności natury teoretycznej i eksperymentalnej. Anizotropowość owoców nie pozwala bezpośrednio skorzystać z klasycznych pojęć i metod analitycznych w opisie tych procesów za pomocą parametrów. Dodatkowo różnorodny materiał badawczy, metodyka badań brązowienia, różne parametry i jednostki czynią dotychczasowe wyniki całkowicie nieporównywalnymi.

Celowe zatem jest poznanie zakresu zmienności ciemnienia enzymatycznego jabłek, a także ukierunkowanie badań na zagadnienia, jakie są celem tej pracy, a dotyczą bardziej precyzyjnego sposobu rozumienia świeżości jabłek. W ślad za tym powstała konieczność opracowania metod odpowiadających potrzebom badań w sadownictwie i przetwórstwie, i poszukiwanie aparatury, za pomocą której można by obiektywnie określać parametry kinetyki brązowienia.

Zastosowanie agrofizycznych metod badawczych ułatwia poznanie zmian jakości płodów rolnych. Metody te dobrze funkcjonują w zakresie nauk biologicznych, biofizycznych, a także odpowiadają zadaniom i skali badań materiałów ogrodnich. Konieczne jest opracowanie precyzyjniejszych metod badań właściwości fizycznych owoców. Uzyskanie informacji o zmienności parametrów brązowienia owoców w stadium dojrzałości konsumpcyjnej. Wprowadzenie metod nowej generacji, które związane będą ściśle z chemią nowo poznanych składników żywieniowych – nazywanych naturalnymi przeciwutleniaczami.

Szybkie zmiany fizjologiczne można przetwarzać na prościej rejestrowane zmiany parametrów fizycznych miększu. Doskonalsza, miniaturowa aparatura spektrofotometryczna i elektrometryczna, metody statystyczne i komputeryzacja umożliwiają już badanie i opracowanie wielu parametrów z dużej ilości pomiarów (chemometria). Pojawiają się przenośne aparaty o precyzji wystarczającej do rozległych badań na tkankach owoców w najtrudniejszych warunkach pomiaru: w sadzie, przechowalni jabłek i przed konsumpcją, które uzupełnią zbyt niską czułość ocen organoleptycznych świeżości.

Wprowadzane metody badawcze do sadownictwa i przetwórstwa powinny umożliwiać ocenę poszczególnych owoców lub nawet tkanek i przewidywanie zakresu, a także czasu działania przeciwutleniającego substratów obecnie identyfikowanych jedynie metodami chemicznymi. Mogą one wskazywać na produkty reakcji pośrednich, na naturalną kinetykę brązowienia lub też zmodyfikowaną aktywność biologiczną w miększu. Kinetykę reakcji enzymatycznego brązowienia dotychczas badano i rozpoznano w badaniach ekstraktów, win, soków i przecierów. Na granicy żywej tkanki z otoczeniem można kinetykę reakcji enzymatycz-

nego brązowienia badać, używając metod: różnicowej spektrofotometrii odbicia w zakresie UV-Vis i widm rozdzielonych czasowo, spektrofluorymetrii tkanki i elektrodowego potencjału redoks [99,102,107].

Dlatego celem tej pracy jest rozwinięcie nowej dziedziny badań i wprowadzenie metod analitycznych wykorzystujących pomiary kinetyki najszybszych procesów biochemicznych i metabolicznych do oceny jakości owoców. Równie ważne jest poznanie procesów występujących w naturze jako reakcja obronna mięszu i wykorzystania ich do obiektywnego określenia świeżości, powiązania jej z aktywnością biologiczną w mięszu.

W pracy ograniczono się do analizy reakcji na stres niszczenia żywej tkanki w warunkach, jakie występują w technologii produkcji świeżych sałatek z jabłek. Zastosowano fizyczne parametry do opisu kinetyki zmian uszkodzonej tkanki. W pracy dostarczono dowodów doświadczalnych i literaturowych na poparcie postawionych hipotez. Z najnowszych badań z zakresu biologii, medycyny i farmacji wynikają liczne informacje integrujące terminy i pojęcia, które składają się na definicję świeżości owocu związaną ze stresem uszkodzenia tkanki [77,168].

3.1. Podstawy biologii enzymatycznego brązowienia mięszu jabłek

3.1.1. Dojrzewanie i dojrzałość owocu

W okresie dojrzewania mięsz jabłka staje się miękki, zanika chlorofil i skrobia, częściowo maleje stężenie kwasów organicznych – natomiast wzrasta poziom cukrów prostych. Mięsz staje się jasny, a pod skórą mogą pojawić się barwniki żółte i czerwone należące do karotenoidów i flawonoidów (antocyjany). Zmiany te są podstawą optycznych metod oceny stadium dojrzałości jabłek. Dojrzewaniu jabłka towarzyszy największa intensywność przemian metabolicznych – szczyt klimakteryczny. Wzrost intensywności oddychania i synteza etylenu świadczy o osiągnięciu przez owoc dojrzałości fizjologicznej i jest początkiem starzenia się. Natomiast zmniejszająca się intensywność oddychania jest przejawem przejrzenia jabłek [86,119]. Kontrola wydzielania etylenu służy do badania dojrzewania jabłek i informuje o ich świeżości.

W czasie starzenia się owocu dochodzi do zmian biochemicznych i ultra-strukturalnych. Zmiany te są podstawą mechanicznych metod oceny stadium dojrzałości owocu i cechy organoleptycznej – oceny jędrności. Następuje silna wakuolizacja cytoplazmy i pojawiają się zaburzenia w budowie chloroplastów. Niektóre polifenole w wakuolach ulegają autooksydacji, a produkty odkładają się na powierzchni tonoplastu. Z czasem następuje zanik błony wakuolarnej. Zbiega się to z destrukcją mitochondriów i wyraźnym już brązowieniem. Zwykle widoczne jest ono najpierw przy gnieździe nasiennym lub przy powierzchni jabłka, w tkankach z szybszą

wymianą gazową. Brązowienie starzejących się owoców wiąże się ze zdolnością do samoutleniania substratów do nadtlenków i wodorotlenków, które rozpoczynają łańcuch dalszych przemian z wytworzeniem związków spolimeryzowanych. Polimery te nie przepuszczają tlenu i we wnętrzu jabłka jeszcze szybciej powstają warunki beztlenowe, prowadzące do nagromadzenia się aldehydu octowego, etanolu i jest to powodem zatrucia, śmierci wielu warstw komórek – uszkodzeń fizjologicznych jabłka. Wyraźne brązowienie wskazuje na śmierć otaczających je komórek. Równocześnie w starzejących się owocach zachodzą intensywne procesy peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych, karotenoidów i innych substancji. Proces jest rozwijany przez aktywne rodniki, które przekształcają się w toksyczne nadtlenki, wodorotlenki oraz w dalszych reakcjach w bardziej stabilne aldehydy, ketony i substancje o wyraźnym nieprzyjemnym zapachu. Ten już dość późny etap starzenia się jabłek, wykrywany jest przez „elektroniczny nos” [42,143]. Brązowy wygląd miąższu i wyraźnie nieświeży zapach, każdemu konsumentowi pozwala rozpoznać nieprzydatność jabłek do spożycia.

Termin dojrzałość owoców ma dla sadownika charakter bardzo utylitarny. Dojrzałość zbiorcza owoców (dojrzałość fizjologiczna), to taki stan rozwoju owoców w sadzie, w którym są one już wyrosnięte w stopniu zapewniającym im jak najlepsze długie przechowywanie, a potem osiągnięcie najlepszych wartości smakowych [45,46]. Pojęcie to zmienia się w zależności od wymagań rynkowych – surowiec na sok, owoce suszone, chipsy owocowe, owoce do konsumpcji, surowiec na sałatki owocowe, jak również od stosowanej technologii przechowywania owoców. Sprzedaż bezpośrednio po zerwaniu lub przechowywanie w prostych przechowalniach wymaga, aby owoce zbierano w okresie, kiedy mają już prawie optymalną wartość smakową. Taki stan dojrzałości jest zbyt zaawansowany, aby jabłka można było długo przechowywać nawet w obniżonej temperaturze i w kontrolowanej atmosferze. Wyznaczenie terminu zbioru w sadzie, a potem po kilku miesiącach, przewidywanego okresu przechowywania, jest niezmiernie ważne dla sadownictwa i przechowalnictwa. Określić to można na podstawie licznych zmian fizykochemicznych i biochemicznych zachodzących w czasie dojrzewania i przejrzenia. Sadownicy dysponują obiektywnym pomiarem jędrności, zawartością ekstraktu, próbą skrobiową, próbą etylenową itp. Nieunikniona jest bardzo duża zmienność tych parametrów w sezonach wegetacji. Wieloletnie doświadczenie sadowników w sadzie i w chłodni umożliwia osiągnięcie zadowalającej jakości i świeżości owoców. Sadownictwo przyzwyczaiało się do naturalnej zmienności wytworów przyrody. Przetwórstwo skłonne jest do normalizacji swoich surowców. Kłopot w przetwórstwie sprawiają zmieniające się, zaskakujące właściwości surowca i konieczność dostosowywania parametrów technologii, aby zapewnić maksymalną jednorodność produktu. Potrzebne są więc proste i szybkie metody pomiaru

świeżości miąższu efektywne dla wszystkich owoców – odmian i okresów przechowywania surowca. Bez wątplenia nabierze to znaczenia przy nieuniknionym rozwoju produkcji ciętych jabłek.

W dojrzewającym owocu funkcjonuje genetycznie zapisany scenariusz, lecz jego życie, rozwój zależy od wpływu czynników środowiskowych, np. od struktury gleby, składu chemicznego gleby, od oświetlenia drzewa, dostępności wody, temperatury, urazów mechanicznych i biologicznych itp. Impulsy środowiskowe szybko docierają do komórek i wpływają na relacje międzykomórkowe, międzytkankowe. Cykl dojrzewania jabłek i okres starzenia się podlega regulacji hormonalnej. O kierunku rozwoju decyduje wewnętrzna równowaga i współzależność pomiędzy grupami substancji hormonalnych. Stężenia poszczególnych fitohormonów uwarunkowane są w dużej mierze czynnikami środowiskowymi. W chłodniach wyposażonych w komory z kontrolowaną atmosferą unika się niepożądanego, przedwczesnego dojrzewania jabłek (przy temperaturze $-0,5^{\circ}\text{C}$) poprzez obniżenie stężenia tlenu do 3-5%, zwiększenie stężenia ditlenku węgla i usuwanie wydzielanego etylenu. Zmniejszenie ciśnienia w komorach do 0,02 MPa ułatwia ułatwianie się etylenu z tkanek owocu i opóźnia przejście jabłek ze stanu dojrzałości fizjologicznej do dojrzałości konsumpcyjnej (dojrzewanie). Natomiast jednodniowe gazowanie komory wraz z jabłkami 1-metylocyklopropienem (1-MCP blokuje receptor etylenowy) całkowicie zatrzymuje dojrzewanie [189]. Powyższe uwagi dają jedynie uproszczony opis technik ograniczania przejrzenia i zachowania świeżości jabłek.

3.1.2. Regulacja metaboliczna i śmierć komórek

Śmierć komórek miąższu może być procesem nagłym, wywołanym uszkodzeniem bądź zachodzącym w wyniku biochemicznej aktywności samych komórek. Ta druga sytuacja występuje przy starzeniu się jabłek.

Okres świeżości tkanki kończy zaawansowany proces starzenia się tkanki. Programowana śmierć komórki – apoptoza jest częścią programu rozwojowego owoców i zmian funkcjonalnych komórek. Uruchamiana jest również w tkance przy usuwaniu okolicy komórek uszkodzonych, zainfekowanych przez mikroorganizmy patogenne. Apoptoza jest genetycznie kontrolowana i uruchomiony „program starzenia się” zmienia poziom ekspresji wielu genów. Białka, kodowane przez te geny, mają zasadnicze znaczenie w przebiegu przejrzenia i starzenia się komórek [163].

Jednolitą odpowiedzią tkanek roślinnych na różnorodne czynniki stresowe jest „stres oksydacyjny”, czyli zachwianie równowagi między wytwarzaniem reaktywnych form tlenu a ich usuwaniem przez systemy przeciwutleniające. Stres oksydacyjny wywołują liczne nagłe czynniki: zranienie, ucisk mechaniczny, atak patogena, promieniowanie UV, nagła dostępność tlenu po okresie niedotlenienia [78]. Stres

oksydacyjny jednak stale towarzyszy procesom fizjologicznym, a nie tylko procesowi starzenia się komórek mięszu. Aktywne formy tlenu powstają w reakcjach redoks oraz w nadmiarze, w wyniku niezupełnej redukcji tlenu lub utleniania wody przez łańcuch transportu elektronów w mitochondriach i chloroplastach [76].

W roślinach stale muszą funkcjonować systemy przeciwutleniające, które „uprzątają” reaktywne formy tlenu. Zapobiegają utrzymywaniu i rozprzestrzenianiu się stresu oksydacyjnego w komórkach zawsze poddanych działaniu czynników stresowych. W mechanizmach ochronnych wykorzystywane są przeciwutleniacze enzymatyczne i nieenzymatyczne.

Enzymy przeciwutleniające są to zarówno enzymy bezpośrednio zaangażowane w usuwanie reaktywnych form tlenu (dysmutazy ponadtlenukowe, katalazy i peroksydazy), jak i enzymy biorące udział w reakcjach utleniania i redukcji kwasu askorbinowego lub redukcji glutationu. Rola tych enzymów zależy od ich umiejscowienia w komórce lub organelli. Nieenzymatyczne przeciwutleniacze to także „zmiatacze” wolnych rodników. Rolę taką spełniają małe lipofilowe lub hydrofilowe cząsteczki. Jest wiele substancji o tych właściwościach często takich samych u roślin i u człowieka, np. tokoferole, kwas askorbinowy. Jednak specyficznymi przeciwutleniaczami u roślin są np. flawonoidy. Zgromadzone w wakuoli, w formie glikozydów, stanowią substrat dla oksydazy polifenolowej PPO w reakcji inaktywacji nadtlenu wodoru, który przenika do wakuoli z innych przedziałów komórkowych. Wykazano, że takie flawonoidy, jak: kwercetyna, cyjanidyna, epikatechina mają w tych reakcjach kilkakrotnie większą aktywność przeciwutleniającą niż askorbinian i tokoferole [77].

Zdolność dostosowania szybkości procesów metabolicznych w komórkach roślinnych do zmian w środowisku zewnętrznym jest niezbędna dla zachowania stabilności środowiska wewnątrzkomórkowego i uniknięcia chaosu metabolicznego. Szybkość procesów zwykle kontrolowana jest poprzez aktywność enzymów. Podstawowy sposób regulacji szybkości reakcji enzymatycznych polega na regulacji ilości enzymu lub głównego substratu. Ten sposób jest dość powolny, zachodzi w ciągu godzin, a nawet dni i wymaga nakładów energii [226]. Stwierdzono, że promieniowanie UV uruchamia w komórkach owocu szybką syntezę flawonoidów [150]. Odbywa się to w wyspecjalizowanych, zewnętrznych komórkach, które chronią tkankę, absorbując promieniowanie w zakresie od 280 do 400 nm, a jednocześnie chronią także przed żerującymi owadami [168]. Inny rodzaj aktywności to synteza kwasu chlorogenowego jako reakcja na schłodzenie jabłek w chłodni [9,128,182,240].

Drugi sposób regulacji metabolicznej polega na szybkich (sekundy lub minuty) modyfikacjach aktywności białka enzymatycznego, które już istnieje w komórce. Jest to natychmiastowa reakcja na zmiany w środowisku wewnątrzkomórkowym

i „wykonanie zapotrzebowania” na produkty przemian metabolicznych. O szybkości ciągu przemian decyduje tempo najwolniejszej reakcji, która jest praktycznie nieodwracalna. Aktywność enzymu katalizującego zasadniczy etap (enzym regulatorowy) wpływa na przepływ metabolitów przez cały szlak.

Gdy stężenie substratu nie przekracza wartości wysycających enzymu, to szybkość reakcji enzymatycznej zależy od stężenia substratu. Zależność tę opisuje krzywa hiperboliczna – szybkość–stężenie (krzywa Michaelisa-Menten). Zwykle stężenie substratów w komórkach jest znacznie mniejsze od poziomu wysycającego enzymy [86]. O stężeniu substratu dla reakcji enzymatycznej decyduje szybkość jego powstawania, tzn. aktywność reakcji poprzedzającej w szlaku metabolicznym. Jeżeli reakcja znajduje się na rozgałęzieniu szlaku, to stężenie substratu w reakcji może być wynikiem konkurencji o ten substrat kilku reakcji enzymatycznych.

W komórce roślinnej rozgraniczenie przestrzenne metabolizmu oraz powiązanie go z błonami i z ułożonymi w nich enzymami jest ważnym sposobem regulacji. Poszczególne szlaki mogą przebiegać w różnych przedziałach komórkowych albo tylko w organellach lub specyficznych komórkach i tkankach. Do pełnej integracji metabolizmu komórki, a także całej rośliny, niezbędne jest współdziałanie między szlakami metabolicznymi operującymi w różnych przedziałach. Regulacja tego współdziałania polega na zmianie w przepływie metabolitów z jednego przedziału do drugiego. Są to metabolity będące substratami lub produktami przejściowymi różnych szlaków. Nagły stres, taki jak silniejsze odkształcenie lub uszkodzenie komórek, uruchamia mechanizmy regulacji poprzez zmiany stężenia substratu. W takich warunkach występuje transport poprzez błony komórkowe, a także długodystansowy w owocu. Jeżeli nastąpi zniszczenie komórki, to enzymy i liczne substraty pozostają nadal związane z błonami i prowadzą reakcję wg ustalonego scenariusza ograniczania stresu oksydacyjnego i osmotycznego.

Dostosowania rozwojowe niektórych tkanek szczególnie silnie zapobiegają penetracji czynnika stresowego w głąb miąższu, stwarzając warunki „uniknięcia stresu”. Modyfikacja funkcji lub struktury enzymu, tzn. „syndrom reakcji stresowej”, to elementy strategii roślin dla osiągnięcia odporności [168]. Widocznym efektem reakcji jest m.in. brązowienie miąższu jabłka. Jeśli jednak tego równowaga nie zostanie przywrócona, to nastąpi oksydacyjna degradacja lipidów w błonach komórkowych, zmiany patologiczne w przebiegu szlaków metabolicznych, co doprowadzi do stopniowej śmierci następnych grup komórek, z których produkty przejmą funkcje osłonowe. Opisane procesy regulacyjne są cechą żywych komórek. Rozpoznanie ich, uświadomienie tego zjawiska wynika z czułości zmysłów i doświadczenia konsumenta, a po jego ocenie może być uznane jako stopień wrażenia świeżości owocu.

3.1.3. Biochemiczne mechanizmy reakcji brązowienia

Podczas przerobu jabłek, w procesie rozdrabniania niszczone są błony i ściany komórkowe oddzielające enzymy i substraty brązowienia. Enzymy, przy udziale tlenu z przestrzeni międzykomórkowych bądź pochodzącego z atmosfery, utleniają związki fenolowe, a także kwas askorbinowy i inne związki obecne w treści komórkowej.

Pierwsze kontrolowane badania brązowienia enzymatycznego prowadzone były na roztworach modelowych zawierających znane stężenia różnych polifenoli, np. kwasu chlorogenowego, epikatechiny, ksyloglukozydu floretyny i enzym PPO lub wprost na ekstraktach z jabłek [68,243]. W procesie utleniania substancji polifenolowych uczestniczy oksydaza polifenolowa (EC 1.14.18.1), która katalizuje oksydację orto-dwufenoli do o-chinonów.

Oksydaza fenolowa jest miedzioproteina i jej aktywność związana jest z odwracalną reakcją przejścia Cu^{2+} w Cu^{+} . PPO ma dużą granicę specyficzności (występują izoenzymy) wobec związku polifenolowego. Wartości w sokach z jabłek stałej reakcji (Michaelisa) – K_M i szybkości reakcji – $v_{\max}$ wykazują ogromną zmienność, która zależy od substratu fenolowego, a także od miejsca jego występowania w owocu, np. miąższ powstały z rurki kwiatowej różni się od miąższu z owocolistków [75]. W zdrowych komórkach bardzo dużo aktywnego enzymu jest w tylakoidach dojrzałych chloroplastów. Aktywność PPO zmienia się zarówno dla odmian, jak i podczas dojrzewania oraz w trakcie przechowywania owoców [31,128,163]. W literaturze najwięcej miejsca poświęcano badaniom aktywności enzymu PPO w jabłkach i jego wpływowi na ciemnienie. Nie udało się w istotny sposób skorelować aktywności PPO i skłonności do ciemnienia całych owoców lub ciętych jabłek [5,6,120]. Wydaje się, że brak istotnej korelacji jest oczywisty i potwierdzony badaniami modelowymi. Znaczne stężenie enzymu PPO konieczne jest w fazie tworzenia chinonów fenolowych w miąższu, a jedynie zupełna i dość wczesna inhibicja ogranicza brązowienie po uszkodzeniu komórek, np. w procesie blanszowania. Nie można tego uczynić i równocześnie zachować świeżość miąższu.

W eksperymentach modelowych określono pierwszy krok reakcji brązowienia enzymatycznego. Tworzone są formy semichinonu i chinonu z fenoli, które nie są kolorowe, nie mają maksimum absorpcji w paśmie widzialnym, mają też różne współczynniki ekstynkcji w UV. Wysoki potencjał utleniająco-redukujący chinonów powoduje utlenienie wielu związków. Obecnie chinony mogą być monitorowane za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej HPLC. Osobne oznaczanie aktywności o-chinonów i fenoli pozwala rozdzielać utlenianie enzymatyczne od utleniania chemicznego, sprzężonego jedynie z chinonami. Utlenianie chemiczne fenoli jest znacznie wolniejsze, lecz powstałe chinony i nadtlenek wodoru szybko utleniają inne związki fenolowe, a dalej reagując z aminokwasami,

aminami, kwasami organicznymi (kwasem askorbinowym) ulegają reakcjom kondensacji. Obecność amin finalizuje proces polimeryzacji, gdyż w wyniku nukleofilowego podstawienia aminy łączą się z chinonami, a produkty tej reakcji ulegają przemianom do brązowych melanin, dając brązowe zabarwienie [77].

Identyfikacja oraz oznaczanie związków fenolowych w jabłkach, a głównie w przetworach z jabłek, jest przedmiotem wielu prac. W literaturze przedstawiono metody dokładnego ich oznaczania tylko w ekstraktach i były to metody HPLC, i spektrofotometryczne [49,58,210,211]. Biorąc pod uwagę znaczenie związków fenolowych, celowe byłoby dokładniejsze przebadanie polifenoli w owocach i zmian ich zawartości: po zbiorze, w chłodni – podczas dojrzewania i przejrzenia [31,128].

Wiedza o składzie polifenolowym jabłek rozwija się wraz z szybkim postępem analityki chemicznej – zwłaszcza ekstrakcji z tkanki, rozdzielu chromatograficznego i czułości detektorów optycznych. Zawartość polifenoli jabłkach może wahać od 0,1 do 5,0 g w 1 kg owoców, a w skórce jest ich około siedmiokrotnie więcej niż w miąższu. W jabłkach zidentyfikowano dotychczas 6 dużych grup związków fenolowych [63,153] należących do flawonoidów oraz do kwasów fenolowych [225]. Prawie 80% polifenoli jabłek stanowią procyanidyny, które są dwu-, trój- oraz polimerami takich monomerów, jak (+)-katechina i (–)-epikatechina, jak również monomeryczne flawanole (katechiny) i przeważa w tym (–)-epikatechina i jej dimer procyanidyna B2.

Do następnych, wg ilości występowania w jabłku, należą fenolkwasy, z których najpowszechniej występującymi w jabłkach są kwas chlorogenowy oraz kwas 4'-p-kumarylochinonowy. W mniejszej ilości, spośród dwuchydrochalkonów, występuje glikozyd florydyny (florydzyne) i ksyloglukozyd florydyny. Następne, co do ilości w jabłkach są flawanole w formie glikozydowej, w postaci pochodnych kwercetyny – jako glukozyd, galaktozyd, arabinozyd, ksylozyd i ramnozyd kwercetyny, a także antocyjaniny, np. cyjanidyny – 3-glukozyd, 3-galaktozyd, 3-ksylozyd lub w formie antocyjanidyn (aglikonowej).

Można także uszeregować polifenole jabłek według ich aktywności przeciwutleniającej [134] („zdolności zmiatania” rodników DPPH): glikozyd kwercetyny > procyanidyny > kwas chlorogenowy = florydzyne. Z wyjątkiem florydzyne wszystkie polifenole jabłek wykazują 2-3-krotnie większą aktywność niż witamina C i E. Związki o najwyższej aktywności przeciwutleniającej – procyanidyny, (–)-epikatechina oraz pochodne kwercetyny w największej ilości traczone są w procesie otrzymywania soku z jabłek.

Różne rejony owocu mają inną zawartość związków fenolowych [136]. W skórce owocu są głównie glikozydy kwercetyny, jak również znaczne ilości antocyjanów, katechin, a niewielkie ilości kwasu chlorogenowego. Większe ilości kwasów fenolowych znajdują się głównie w miąższu owoców [63]. Największe ilości dwuchydrochalkonów występują bliżej gniazda nasiennego i w nasionach.

Zawartość związków fenolowych w różnych częściach owocu zmienia się ze stadium dojrzałości owoców, zależy od bardzo wielu czynników i nie zawsze jest oznaczana bezwzględnymi wartościami dla ściśle opisanego obiektu badań. Jedną z przyczyn, poza zróżnicowanym dojrzewaniem w sadzie, jest długie przechowywanie w zróżnicowanym „łańcuchu technologii” przechowalniczych. W wielu pracach, także monografiach, zestawiono zawartość związków polifenolowych w jabłkach w postaci tabel, które wskazują na bardzo dużą zmienność stężeń w owocach i w przetworach [63,128,140,141,188]. Wiadomo, że przechowywanie wpływa na substraty i zaobserwowano efekty brązowienia mięszu [31,240]. Nie zajmowano się tym zagadnieniem dotychczas szerzej, ale np. badano przyczyny słabej tolerancji niektórych odmian na warunki w chłodni – obniżenie temperatury, niską zawartość tlenu i wysokie stężenie ditlenku węgla, a w efekcie na brązowienie jabłek. Informacje wynikające z tych prac wskazują, że przy analizach zawartości substratów brązowienia u odmian nie można pominąć techniki ich przechowywania. Wstępne badania wykazały istnienie zmienności substratów brązowienia uwarunkowanych procesem chłodniczym [31,169]. Nie określano ich udziału w zmienności ciemnienia mięszu, nie porównano kilku technik przechowywania i większej liczby odmian [95]. W przetworach, z których najczęściej badane są soki jabłkowe [48,79], na zawartość związków fenolowych wpływa nie tylko technologia przerobu, lecz także zróżnicowana łatwość związków fenolowych do enzymatycznego utleniania zmieniająca się ze stadium dojrzałości jabłek.

Najczęściej badanym polifenolem w jabłkach, dobrze rozpuszczalnym i występującym w dużych stężeniach w mięszu jabłek, jest kwas chlorogenowy. Znaczny jest jego wpływ na jakość produktów owocowych, gdyż nadaje im cierpki smak, a ulegając utlenieniu z udziałem PPO wspomaga utlenianie trudniej utlenianych polifenoli i przyspiesza brązowienie. W czasie dojrzewania w sadzie jego stężenie może rosnać i maleć, natomiast w czasie dłuższego przechowywania maleje ogólna zawartość kwasów fenolowych w mięszu [31,128], a rośnie zawartość antocyjanów w warstwie skórki. Spośród katechin dominuje w jabłkach (–)epikatechina, którą także cechuje dobra rozpuszczalność w wodzie.

Pierwszym etapem badań brązowienia były badania soków i nie wyjaśniły one mechanizmów czasowych reakcji i tego, czy układ charakteryzuje się hierarchią czasową poszczególnych stadiów. Chinony są niezwykle reaktywne, a więc szybkość i czasy reakcji w mięszu powinny być dostatecznie różne od zaobserwowanych w roztworach modelowych. Poszukiwania głównych parametrów sterowania procesem brązowienia prowadziły do kolejnych ustaleń. Badano zależności między stężeniem PPO lub stężeniem związków fenolowych i brązowieniem. Stwierdzano, że większy wpływ ma stężenie niektórych substratów niż stężenie enzymu PPO. Niektóre badane związki: flawonole, antocyjany i procyanidyny nie są utleniane przez oksydazę fenolową, a okazało się, że są utleniane przez chinony

powstałe z utlenienia kwasów fenolowych. Stwierdzono także, że chinony, utleniając kwas askorbinowy, regenerują się i odtwarzają pierwotne fenole. W ten sposób układ fenol i oksydaza fenolowa za pośrednictwem powstałych chinonów prowadzi utlenianie (sprzężone z określonym fenolem) związków, które nie mogą być utlenione wprost przez tlen cząsteczkowy. Gdy stwierdzono, że reaktywne chinony utleniają inne składniki i są redukowane do fenoli, poszukiwano kolejnych substratów dla takich reakcji łańcuchowych.

Analizy chemiczne, zwłaszcza techniki HPLC, jądrowego rezonansu magnetycznego – NMR, umożliwiają badanie właściwości fenoli w ekstraktach, sokach i w układach modelowych. Utlenianie enzymatyczne mieszanin kwasu chlorogenowego i epikatechiny prowadzi do formowania różnych kopolimerów, jako dodatkowych produktów nieotrzymywanych przez utlenianie każdego fenolu osobno. W tym układzie kwas chlorogenowy pośredniczy w bardzo szybkim utlenianiu epikatechiny, której ubywa wraz z formowaniem barwnych kopolimerów. W dalszym etapie, przy braku epikatechiny, sam kwas chlorogenowy utleni się, lecz w wolniejszym tempie [172]. W konsekwencji ostateczna barwa przecieru, chociaż uzależniona od pierwszych o-chinonów, zależy głównie od barwnej natury „trwałszych” fenoli, a przede wszystkim od możliwości ich udziału w następnych reakcjach.

Ze wzrastającym stopniem polimeryzacji produktu maleje jego rozpuszczalność w wodzie i alkoholach. Ponadto w tkankach roślinnych zarówno monomery, jak i formy spolimeryzowane związane są częściowo lub wiążą się z polisacharydami i podczas rozdrabniania i ekstrakcji rozpuszczalnikami dochodzi do zapoczątkowania reakcji enzymatycznej. Te związane i nierozpuszczalne polifenole trudno jest oznaczać [194].

Ostatnio opublikowane przez Kuczyńskiego [103] doświadczenia na szybko brązowiejącym, świeżym mięszu jabłka wykonane techniką różnicowej spektrofotometrii odbiciowej w UV zgodne są z zasadniczymi etapami reakcji brązowienia, przejętymi z modeli dla soków. Wyniki te wskazują jednak na jeszcze niedokładnie poznane, wczesne etapy reakcji zarejestrowane w świetle UV odbitym od mięszu i etapy związane z polifenolami określanymi w małych ilościach, jak np. ksyloglukozyd floretyny, procyjanidyna B2 [63,170]. Można przypuszczać, że słuszny jest wniosek – uruchomione na powierzchni mięszu procesy utleniania polifenoli są źródłem stresu i przebiegają zgodnie z zasadą prostoty sterowania procesem przez obiekt biologiczny [37,86] tak, aby wypełniały funkcje ochronne w żywej tkance.

3.1.4. Brązowienie w ocenie konsumenta

W większości przypadków brązowienie owoców jest niepożądaną reakcją w technologii i zapobieganie stanowi główny element zainteresowania naukowców, co widać w liczbie publikacji. Ocena świeżości owocu jest więc w tej dziedzinie niezauważana jako zbyt odległa od organoleptycznych ocen utrwalonego

produktu. Proponowane są różnorodne metody ograniczania brązowienia poprzez wpływanie na enzymy, substraty lub produkty reakcji. Zabiegi zmierzające do inhibicji PPO przez zmianę temperatury lub pH przecierów i soków zostały omówione w licznych pracach [80,143,204,250]. Reakcje enzymatyczne szybciej przebiegają w podwyższonej temperaturze. Optimum temperatury większości enzymów roślinnych mieści się w zakresie 20-30°C. Zależność przemiany od temperatury wyraża współczynnik termiczny tej przemiany Q_{10} . Dla większości reakcji enzymatycznych prowadzonych w roztworach Q_{10} wynosi ok. 2, tzn. dwa razy wzrośnie szybkość przemiany w wyniku podwyższenia temperatury o 10°C w zakresie pomiędzy minimalną a maksymalną temperaturą reakcji. Dotąd nie określano szybkości reakcji brązowienia ciętej powierzchni miększu, a jedynie w roztworach, więc nie wyznaczano Q_{10} lub optimum pH. Z badań przeprowadzonych na sałatkach z ciętych pod wodą jabłek, które były schłodzone lub nieschłodzone można oszacować Q_{10} . Nastąpiło wydłużenie czasu z 1 godziny do ok. 24 godzin dla osiągnięcia tego samego brązowienia. Chyba niewiele ma to wspólnego z modelem i współczynnikiem termicznym przemiany w roztworach [114,115].

Obecna wiedza daje realne możliwości ograniczania brązowienia enzymatycznego przetworów z owoców i warzyw poprzez [164]:

1. Usuwanie tlenu z tkanek owoców i warzyw oraz z otaczającej je atmosfery.
2. Selekcję odmian o niskiej aktywności enzymów i niskiej zawartości związków fenolowych [81].
3. Dobór odpowiedniego stadium dojrzałości surowca.
4. Dodatek substancji redukujących o-chinony.
5. Dodatek kwasów dla obniżenia pH i aktywności enzymów [64].
6. Inaktywację cieplną enzymów [80].
7. Dodatek inhibitorów enzymów.

Nie każdy z podanych sposobów może być użyty do żywej tkanki bez jej dalszego uszkodzania, wspomagania procesów brązowienia, a co ważne, do wytworzenia produktu o co najmniej niższej wartości żywieniowej. Uwzględniano zastosowanie siarczynów jako efektywnego inhibitora brązowienia, chociaż ich przydatność w tej technologii jest obecnie kontrowersyjna. Wiele z inhibitorów wielokrotnie sprawdzono: kwas askorbinowy i jego pochodne, jony chelatujące, cyklodekstryny i wielofosfaty, cysteinę, wielocukry sulfurowane, kwas kojowy, kwas szczawiowy [113,114], ekstrakty z miodu [174] i soki z owoców i warzyw [176]. Niektóre z nich mogłyby zastąpić siarczyny.

W polskim przemyśle przerabia się więcej niż połowę zbiorów jabłek na soki. Sok, po usunięciu większości związków fenolowych, wielocukrów i pektyn, ma dużo niższą wartość żywieniową niż świeży owoc [54,55,177]. Dlatego cięte jabłka są ważnym urozmaicheniem żywności [16,36,203,206]. Jabłka są jednym z głównych źródeł flawonoidów w diecie. Wykazano, że regularne spożywanie

jabłek obniża ryzyko chorób naczyń krwionośnych i nowotworów przewodu pokarmowego. Aktywność przeciwutleniająca polifenoli roślinnych była przedmiotem wielu prac i monografii. Informują one o reakcjach patologicznych w organizmie człowieka i przypadkach, którym różne grupy polifenoli pomogły zapobiec [231,241,246].

Flawonoidy, jako nieodłączne składniki żywności pochodzenia roślinnego, trafiają do przewodu pokarmowego człowieka. Tylko w niewielkich ilościach przechodzą do układu krwionośnego lub limfatycznego. Nie wiadomo, czy flawonoidy wchłaniane i metabolizowane wchodzą w kontakt z membranami komórkowymi, przedostają się do wnętrza komórek i w ten sposób spełniają rolę przeciwutleniacza. Wiadomo natomiast, że znaczna ich część jest dość szybko wydalana z moczem. Część flawonoidów powraca do dwunastnicy wraz z żółcią i emulguje tłuszcze. Wiadomo także, że flawonoidy pełnią rolę czynników współgenerujących molekuly sygnałne tlenu azotu 'NO dla komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego i efektywnie je chronią przed powstającymi jonami kwasu azotowego [77,183]. Ponadto, z uwagi na wysoką koncentrację polifenoli w owocach przypuszcza się, że ich główną rolą może być utrzymanie flory jelitowej w równowadze symbiotycznej. Flora ta współuczestniczy, wraz z komórkami nabłonka jelitowego, w walce z patogenami przewodu pokarmowego. Znaczenie mają tu stabilne lub odwracalne właściwości redoks polifenoli w środowisku kwaśnym i zasadowym [77]. W wyniku działania flory przewodu pokarmowego powstaje szereg metabolitów z flawonoidów. Następuje hydroliza koniugatów flawonoidów i powstawanie łatwo wchłanianych ich niskocząsteczkowych pochodnych. Bakterie tlenowe mogą produkować ze spożywanych produktów szkodliwe dla organizmu związki. Duża ilość wolnych rodników jest obecna lub powstaje w trawionej żywności i wskazywano na hamowanie utleniania lipidów, skuteczne usuwanie wolnych rodników i chelatowanie jonów metali. Opisana w ten sposób aktywność flawonoidów może zostać, jak to określa Treutter [232], przyjęta za czynnik składający się na "wewnętrzną jakość". Najłatwiej byłoby ją nazywać świeżością jabłek. Rola aktywności polifenoli wydaje się być przynajmniej tak istotna, jak równowaga populacji mikroflory jelitowej, a wiadome jest, że to istotnie wpływa na dobre odżywienie i zdrowie zwierząt.

Rośliny wytwarzają liczne substancje zaliczane do tzw. metabolizmu podstawowego, tzn. niezbędnych do funkcjonowania podstawowych szlaków metabolicznych i obecnych we wszystkich komórkach. Należą do nich, np. aminokwasy, nukleotydy, cukrowce, tłuszczowce i chlorofile. Ich rola jest dobrze znana konsumentom. Oprócz podstawowych, rośliny wytwarzają wiele różnorodnych, specyficznych substancji, niekiedy o niejasnym przeznaczeniu, które nie są niezbędne do przeprowadzenia podstawowych procesów życiowych. Związki te określa się mianem metabolitów wtórnych [86]. Są charakterystyczne dla gatunków lub

spokrewnionych ze sobą grup taksonomicznych. Synteza ich wymaga znaczących nakładów energetycznych, zwykle kosztem podstawowych funkcji życiowych. Nauka dostarcza dowodów, że mają one wielkie znaczenie w życiu roślin [65]. Wiele z tych związków rośliny wykorzystują do obrony przeciwko roślinożercom. Wykorzystywane są w interakcjach roślina-roślina lub jako atraktanty dla zapylaczy. Poznawanie mechanizmów ich działania to wielkie zadanie i ma ono praktyczne znaczenie dla człowieka, gdyż pozwala wykorzystywać naturalne zasoby rolnictwa i ograniczyć „sztuczną” ingerencję w środowisko [168].

Jeżeli problemem w jakości jest zewnętrzna barwa części z jabłka, to biorąc pod uwagę przedstawioną już rolę substratów enzymatycznego brązowienia, można wyjaśnić jej znaczenie konsumentowi owoców. Powstanie brązowej barwy na ciętej powierzchni owoców jest objawem aktywności biologicznej i świeżości mięszu. Jest to proces charakterystyczny dla świeżego mięszu znajdującego się głębiej i usuwania rodników organicznych powstających w wyniku agresywnego utleniania uwolnionej treści komórkowej. Początkowa faza enzymatycznego utleniania jest bezbarwna, lecz dalsze reakcje prowadzą do utworzenia na tkance warstwy ochronnej z trudno rozpuszczalnych polimerów, kolorowych melanin, które są naturalnym produktem roślinnym. Natomiast w czasie reakcji z metabolitami mikroorganizmów (grzyby, bakterie) porażających martwe komórki lub tkanki, rodniki organiczne z treści komórek jabłka utworzą bardziej kolorowe barwniki melaninowe – kompleksy z aldehydami, ketonami, aminokwasami, białkami i innymi związkami.

Konsument zna barwę wielu produktów żywnościowych, niewątpliwie zależną od obecności w przetworach produktów przemian, w które weszły barwniki naturalne zarówno te barwne, jak i wcześniej niewidoczne. Ładna barwa (np. soku jabłkowego, powideł) zależy od pozostałości produktów enzymatycznego i nieenzymatycznego brązowienia, natomiast naturalne barwniki nie odgrywają istotnej roli [70,71,177].

Coraz częściej rezygnuje się ze sztucznych, obcych surowcowi dodatków do żywności. Znacznie wydłuża się przez to czas trwałości, a stosuje tylko naturalne składniki roślinne zapobiegające utlenianiu w tradycyjnych produktach spożywczych. Dodatki także ulegają degradacji, lecz chronią tym samym inne substraty. Naturalne składniki roślinne po przemianach wywołanych technologią tworzą poznaną przez konsumenta formę wysoko przetworzonego produktu spożywczego. Wspólną cechą dużej grupy polifenoli jest łatwość włączania się do reakcji redoks. Polifenole przenosząc protony i elektrony nie tylko łatwo ulegają utlenieniu, ale również mogą pośredniczyć w utlenianiu substancji niereagujących wprost z tlenem. Reakcje utleniania polifenoli mają charakter złożony, a ich przebieg zależy od rodzajów i lokalizacji podstawników. Wydaje się, że te charakterystyczne reakcje mogłyby służyć ocenie świeżości jabłek lub autentyczności produktu.

3.2. Kinetyka biologiczna procesu brązowienia

Kinetyka procesów biologicznych wychodzi od modeli przemian biochemicznych i kontynuuje modelowanie procesów w żywych organizmach i całych populacjach [142]. Kinetyka chemiczna jest nauką o szybkości i mechanizmach przemian chemicznych. Do badań reakcji chemicznych stosowane są modele dynamiczne, tzn. układy równań różniczkowych.

Podczas przebiegu reakcji chemicznej zmieniają się ilości substratów i produktów znajdujących się w układzie. Najczęściej nie mierzy się bezpośrednio stężeń, lecz wielkości fizyczne zależne liniowo od stężeń. Zmieniają się one w czasie wraz ze zmianą składu mieszaniny reakcyjnej i tworzą krzywą kinetyczną. Przedstawia ona zależność wielkości fizycznej od czasu.

Szybkość zmian ilości produktów, a także substratów określa szybkość reakcji. Prosta miarą szybkości reakcji jest czas połowicznej przemiany (czas połówkowy) – $t_{1/2}$, tj. czas potrzebny do przekształcenia połowy początkowej ilości substratów. Skala czasu reakcji może być także wyrażana za pomocą czasu połówkowego – $t_{1/2}$, i w przypadku wolnych reakcji wynosi ona kilka minut lub dłużej.

W opisie ilościowym kinetyki ważne jest pojęcie chwilowej szybkości reakcji – v , zdefiniowane jako szybkości zmian stężenia w czasie. Eksperymentalnie stwierdzono, że krzywe kinetyczne reakcji spełniają równania kinetyczne postaci:

$$v = \text{„wyrażenie kinetyczne”}, \quad (1)$$

gdzie:

v – szybkość reakcji,

„wyrażenie kinetyczne” – ogólna zależność od stężeń reagentów i warunków reakcji takich, jak temperatura, ciśnienie itp.

W kinetyce procesów biologicznych nie musi być to funkcja, gdy dotyczy np. stadiów dojrzałości, okresów przechowywania.

Reakcja złożona jest przemianą składającą się z kilku etapów będących reakcjami prostymi (elementarnymi). Poznana sekwencja prostych reakcji, w której substraty przekształcane są w produkty, nazywana jest kinetycznym mechanizmem reakcji. Znalezienie kinetycznego mechanizmu reakcji jest podstawowym celem badań kinetycznych. Szybkość reakcji złożonej wyraża się jako szybkość zmiany stężenia jednej, wybranej substancji spośród produktów reakcji prostych. Oznacza to, że każdorazowo należy upewnić się, jaką definicję szybkości zastosowano dla reakcji. Substancje, z której zmian stężeń oznacza się doświadczalnie szybkości reakcji, nazywane są substancjami wskaźnikowymi.

W metodach kinetycznych wykorzystanie reakcji wskaźnikowej powinno zostać poprzedzone dokładnymi studiami i zbadaniem reakcji; wyjaśnieniem zależności szybkości od stężenia substancji reagujących, temperatury, obecności soli i innych możliwych do uwzględnienia czynników. Aby oznaczać zawartość

substancji metodą kinetyczną, należy mierzyć szybkość reakcji wskaźnikowej. Stężenie tej jednej substancji wskaźnikowej zmienia się podczas reakcji, natomiast stężenia substancji pozostałych albo się nie zmieniają wcale, albo tylko w niewielkim stopniu. Aby ten warunek był spełniony, stężenia wszystkich substancji biorących udział w reakcji powinny znacznie przewyższać stężenie substancji wskaźnikowej. Stężenie substancji oznaczanej również powinno pozostawać na czas pomiaru „prawie” niezmienione. Jest dość prawdopodobne, że na substancję wskaźnikową można wybrać barwne (zakres Vis) produkty melaninowe we wczesnej fazie reakcji enzymatycznego brązowienia mięszu. Zapewne mogą to być także produkty albo substraty jeszcze wcześniejszych etapów reakcji, które poznano jedynie w modelowych badaniach roztworów i pomiarów z zakresu UV. Wygodne byłoby wykorzystanie wielu reakcji wskaźnikowych w zakresie ultrafioletu i zastosowanie obliczeń chemometrycznych [25,26,103].

Reakcja wskaźnikowa powinna spełniać następujące wymagania:

1. Szybkość reakcji powinna znajdować się w określonych granicach, gdy reakcje przebiegające zbyt szybko lub zbyt wolno są do celów analitycznych niedogodne. Najdogodniejszy dla najprostszych metod pomiaru jest czas 5-10 min.
2. Stężenie substancji wskaźnikowej powinno dać się zmierzyć prostym sposobem i najlepiej w zakresie Vis lub potencjometrycznie.
3. Stężenie substancji oznaczanej (np. melaniny) nie powinno podczas wykonywania doświadczenia zmieni się w dużym stopniu.

Niezwykle ważnym w przyrodzie typem reakcji złożonych są reakcje łańcuchowe (proste i rozgałęzione). Tworzone są w nich nietrwałe produkty pośrednie – nośniki łańcucha. Biorą one udział w rozwijaniu łańcuchów i odtwarzają się. Przerwanie łańcucha następuje w reakcjach, w których nośniki łańcucha zużywane są bez wytworzenia nowych reaktywnych produktów przejściowych. Do przerywania łańcucha dochodzi także w reakcjach między nośnikami łańcucha, reakcjach nośników łańcucha z innymi substancjami lub w wyniku oddziaływań samych nośników łańcucha. Reakcje łańcuchowe można by zaproponować jako model reakcji brązowienia enzymatycznego.

3.2.1. Równanie kinetyczne

Równania kinetyczne reakcji łańcuchowych są złożone i można je wyprowadzać, stosując metodę stanów stacjonarnych. Gdy bieg reakcji jest ustalony, stężenie nietrwałych produktów pośrednich można uznać w przybliżeniu za stałe. Wtedy szybkość reakcji brązowienia wyznaczana jest przez szybkość etapu najwolniejszego. Szybkość tego etapu (np. formowanie melanin) powinna być niewspółmiernie mała w porównaniu z szybkością innych, poprzedzających ją etapów (tworzenia rodników), dlatego ogólne równanie kinetyczne jest wtedy stosunkowo proste.

Równanie kinetyczne reakcji pierwszego rzędu ma postać:

$$v = dx/dt = k \cdot (a - x), \quad (2)$$

gdzie:

k – współczynnik proporcjonalności nazywany stałą szybkości reakcji,

a – początkowe stężenie substratu,

x – stężenie substratu (albo stężenie produktu) po przereagowaniu w czasie t reakcji,

$(a - x)$ – stężenie substratu pozostałego po czasie t .

Po scałkowaniu otrzymujemy zależność prostoliniową pomiędzy logarytmem ze stężenia i czasem reakcji:

$$\ln [a/(a - x)] = k \cdot t, \quad (3)$$

co oznacza, że w jednakowych odstępach czasu wchodzą w reakcje jednakowe części substancji reagującej.

Czas połowicznej (połówkowy) przemiany – $t_{1/2}$ jest ważną charakterystyką reakcji i w reakcji pierwszego rzędu nie zależy od stężeń wyjściowych substancji reagujących, tak jak i stała szybkości $k = 0,693 \cdot (t_{1/2})^{-1}$ (min^{-1} albo s^{-1}). Sposób wyrażania stężeń, np. zastąpienie stężenia związanym z nim parametrem fizycznym, nie wywiera wpływu na wartości stałych k i $t_{1/2}$. W kinetyce procesów biologicznych często pozostaje się przy analizie i opisie właśnie takich parametrów fizycznych. Nie nadaje im się dokładnej nazwy – substratu lub produktu, gdyż zwykle nie są one określane metodami chemicznymi [37,77].

Stężenie x produktu reakcji pierwszego rzędu zależy w następujący sposób od czasu reakcji:

$$x = a \cdot (1 - e^{-k \cdot t}). \quad (4)$$

W okresie początkowym reakcji (gdy wielkość $k \cdot t$ jest mała) można przyjąć, że stężenie zależy liniowo od czasu:

$$x = k \cdot a \cdot t, \quad (5)$$

stąd niekiedy najłatwiej wyznaczać stałą szybkości reakcji. Jednak zależy to od czułości metody fizycznej, a więc od minimalnej wartości, jaką można dokładnie zmierzyć i od rozdzielczości czasowej pomiarów. Można także wyznaczać niewielkie szybkości reakcji, jeżeli obrany do obserwacji odstęp czasu będzie dostatecznie długi i nie zachodzą reakcje współbieżne. Początkową część krzywej kinetycznej zawsze można przybliżać linią prostą niezależnie od postaci wyrażenia kinetycznego. Często jest to wykorzystywane w badaniu jednocześnie kilku reakcji wskaźnikowych (np. w reakcji łańcuchowej). Takie pomiary używane są do obliczeń chemometrycznych.

Gdy zmiany stężenia substancji wskaźnikowej pomijać już nie można, to należy badać zależność stężenia od czasu. Metody całkowite opierają się bezpośrednio na rozwiązywaniu równań kinetycznych. Najprostszym przykładem zastosowania metody całkowitej jest dopasowanie teoretycznej krzywej kinetycznej do danych eksperymentalnych. Standardową metodą jest metoda najmniejszych kwadratów.

Przedstawioną kinetykę formalną można wybrać do modelowania kinetycznego reakcji prostych, które składają się na reakcję złożoną. Jednak należy zrobić przy tym założenie o addytywności poszczególnych reakcji, tzn. że stała szybkości reakcji prostej nie ulega zmianie w obecności innych reakcji prostych. Jeżeli w mechanizmie reakcji występuje etap znacznie wolniejszy od pozostałych, to szybkość całkowita będzie determinowana przez ten etap powolny. Jest to jakościowe wyjaśnienie tego, że kinetyka formalna umożliwia wyciągnięcie poprawnych wniosków nawet w przypadku reakcji tak bardzo złożonych, jak metabolizm komórkowy. Pojęcia i terminy z kinetyki chemicznej stosuje się również do opisu procesów kinetycznych, które nie są reakcjami chemicznymi, np. do wzrostu kolonii bakterii, rozwoju populacji.

Większość pomiarów kinetycznych to pomiary pośrednie, opierające się na fizycznych metodach (np. wyznaczania stężeń). Zmiana wielkości obserwowanej – np. przewodności elektrycznej, objętości, ciśnienia, absorbancji jest udziałem najczęściej wszystkich lub kilku ze składników „mieszaniny reakcyjnej”. Stężenia indywidualnych składników nie są tu znane. Znana jest jedynie wielkość obserwowana, będąca liniową kombinacją „stężeń”. Dla prostej reakcji informacja zawarta w krzywej kinetycznej wystarcza do wyznaczenia stałej szybkości reakcji. Można wyrazić to stwierdzeniem, że stała szybkości w modelu kinetycznym jest identyfikowalna i może być wyznaczona z krzywej kinetycznej. Dla kinetyki pierwszego rzędu stwierdzenie to wynika bezpośrednio z metody wyznaczania stałej szybkości.

Dla reakcji następczych można twierdzić, że istnieje więcej schematów reakcyjnych zgodnych z krzywą kinetyczną. Jest to problem rozróżnialności modeli. Jeśli dwa schematy reakcji opisuje ta sama krzywa kinetyczna, to są one nierozróżnialne. Oznacza to, że jest potrzebna dodatkowa informacja, aby wskazać, który z nich jest poprawny. Schematy reakcji złożonych często mogą być nierozróżnialne. Jeżeli dysponujemy informacją z jednej krzywej dla jednej substancji wskaźnikowej, to nie można stwierdzić na podstawie dostępnej informacji kinetycznej, czy produkt tworzy się przez produkt pośredni, czy też bezpośrednio. Problemy identyfikowalności i braku rozróżnialności wskazują na pewne ograniczenia poznawcze kinetyki. Nie można więc „udowodnić” mechanizmu reakcji. Dlatego poprzez obliczenia chemometryczne ustala się jedynie, czy zaproponowany model brązowienia enzymatycznego miąższu jabłka, przyjęte substraty lub produkty nie są sprzeczne z uzyskanymi danymi kinetycznymi [103]. Można jednak udowodnić, że wybrany model nie jest poprawny, bo nie jest zgodny z eksperymentem.

3.2.2. Sterowanie szybkością brązowienia

Szereg problemów związanych z ograniczaniem brązowienia lub zachowaniem trwałości polifenoli w sokach i przecierach rozwiązywanych jest w badaniach modelowych na roślinnych ekstraktach i naturalnych polifenolach. W zadowalającym stopniu poznano rolę spełnianą przez polifenole i enzymy w ciemnieniu wina lub soków i znaczne postępy poczyniono w zakresie przecierów [70]. Jednak wyniki tych prac są zbyt odległe od zagadnień biologii komórki i tkanki roślinnej, od obumierania jedynie części komórek, a dalszej integralności i dostosowania się biosyntezy tkanki. Tylko niewielka część tych wyników może być związana z poznawaniem brązowienia żywej, otaczającej uszkodzenie, tkanki. Złożone mechanizmy kontrolne szlaków metabolicznych, ich organizacja przestrzenna w organellach i na błonach biologicznych, regulacja allosteryczna i integracja ogółu przemian komórkowych nie mogą ujawniać się w przecierach lub sokach. Lecz nawet i w nich zanika przebieg reakcji oparty na prawie działania mas. Liczne badania nie pozwalają znaleźć tu prostych korelacji substratów tkankowych i produktów, wyraźnego udziału aktywności enzymu w ciemnieniu wyrobu, co stale potwierdzane jest w publikacjach [164].

Do opisu kinetyki reakcji enzymatycznych wg schematu Michaelisa-Mentena wykorzystuje się metody stanu stacjonarnego [252]. Uwzględnia się dwa przypadki graniczne – duże lub małe stężenia substratu, dla których kinetykę reakcji można opisać w prosty sposób. W zakresie małych stężeń substratu szybkość tworzenia się produktu w reakcji enzymatycznej jest proporcjonalna do stężenia, tzn. szybkość jest procesem pierwszego rzędu względem stężenia substratu. W zakresie dużych stężeń substratu występuje całkowite wysycenie enzymu, reakcja osiągnęła już szybkość maksymalną i zwiększenie stężenia substratu nie może wpłynąć na wzrost szybkości katalizowanej reakcji. Stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji równa jest połowie maksymalnej szybkości reakcji enzymatycznej, ocenia aktywność enzymu, jego powinowactwo do substratu. To stężenie nazwano stałą Michaelisa – K_M .

Całkowita szybkość reakcji, na którą składa się kilka etapów pośrednich, jest uwarunkowana szybkością reakcji najwolniejszej. Sprzężenie kilku reakcji enzymatycznych, przebiegających z różnymi szybkościami jest spotykane często w procesach przemiany materii w żywych organizmach. Szybkość przemian metabolicznych zależna jest od wielu czynników: stężenia reagujących związków, temperatury, ciśnienia, obecności katalizatorów lub pH otaczającego środowiska.

Zjawisko inhibicji polega na hamowaniu aktywności katalizacyjnej (np. enzymu) wskutek obecności inhibitora. Jeżeli dodawać do enzymu nawet bardzo niewielkie ilości pewnych substancji, to można stwierdzić duży spadek szybkości reakcji. Substancje takie nazywa się inhibitorami, a ich działanie sprowadza się w więk-

szości przypadków do tego, że tworzą połączenia, które blokują enzym. Możliwa jest również sytuacja, że inhibicja dotyczy tego etapu reakcji, który nie był etapem limitującym (np. opóźnione unieczynnienie PPO), lecz szybkość ogólną reakcji wyznaczał jakiś inny etap.

Szybkość reakcji musi być mierzona w początkowym etapie reakcji, w przeciwnym razie popełniony może być duży błąd. Szybkość reakcji maleje w czasie wskutek wyczerpywania się substratów i również enzymy mogą być inhibowane przez produkt reakcji (przez tworzące się melaniny). W wyniku procesów fizjologicznych i przejrzenia jabłek w chłodni powstają w miąższu produkty reakcji enzymatycznego brązowienia. Niewątpliwie istnienie takiej autokatalitycznej reakcji związane jest z powstawaniem aktywnych rodników w stosunkowo małych stężeniach. Szybkość ogólna reakcji brązowienia jest sumą szybkości dwóch reakcji: autokatalitycznej, „niewymuszonej” – której produktów może być dość niewiele w świeżej tkance i stanowiącej tylko „tło” dla szybkiej reakcji wywołanej stresem (np. mechanicznym uszkodzeniem).

Wpływ inhibitora ocenia się względną szybkością (aktywnością) – a , w obecności inhibitora i bez niego lub stopniem inhibicji $i = 1 - a$. Formułowane definicje fenomenologiczne inhibicji nie określają mechanizmów reakcji. Klasyfikowane są tylko przypadki: stopień inhibicji nie zależy od stężenia substratu, stopień inhibicji zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia substratu, stopień inhibicji zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia substratu, stopień inhibicji rośnie lub maleje.

Reakcje mogą zachodzić całkowicie w obrębie jednej fazy (dotyczy – gazowej, ciekłej lub stałej) – i być jednorodnymi albo, gdy co najmniej jeden etap występuje na granicy faz, być reakcjami niejednorodnymi. W reakcjach niejednorodnych z udziałem gazów, np. tlenu, transport może być bardzo szybki i nie on determinuje całkowitą szybkość reakcji. Jednak przy szybkich reakcjach zachodzących tylko w roztworze to dyfuzja reagentów może ograniczać całkowitą szybkość reakcji. Gdy dyfuzja tlenu poprzez tkankę jest powolna, to stężenie tlenu w głębi owocu jest niższe niż przy powierzchni owocu. Takie proste przybliżenie może być również stosowane w modelach brązowienia wówczas, gdy szybkość powstawania barwnika na powierzchni determinowana jest stężeniem tlenu, polifenoli lub, gdy głębiej w owocu są ich różne stężenia.

Enzymy wielu szlaków związane są z błonami biologicznymi i tworzą kompleksy enzymatyczne ściśle uporządkowane przestrzennie, w których produkt jednej reakcji natychmiast staje się substratem następnej w szlaku. Dla reakcji przebiegających w strukturze biologicznej znaczenie regulacyjne ma [86]:

1. Tworzenie się kanałów metabolicznych, które zapewniają przepływ metabolitów przez cały szlak.
2. Modulacja poszczególnych etapów reakcji.
3. Równowaga formy rozpuszczalnej i związanej enzymu.

Niekiedy te same enzymy, gdy związane zostaną ze sztucznymi błonami, mogą utworzyć podobne funkcjonalnie struktury [62,217]. Studiowanie i poznanie tego typu zagadnień niezbędne jest do tworzonego modelu kinetyki procesów biologicznych, procesu brązowienia i weryfikacji zakresu ich funkcjonowania w technologiach sadowniczych, przechowalnictwie i przetwórstwie.

3.3. Pomiar brązowienia enzymatycznego

Potrzebne są dokładne metody pomiaru szybkości reakcji do porównania brązowienia owoców lub efektywności hamowania brązowienia w technologiach przetwórczych. Jeszcze większe wymagania należy postawić metodom, które służą badaniom naukowym brązowienia i mogłyby doprowadzić do standaryzacji ocen świeżości jabłek.

Powszechnie stosowane są dwie metody optyczne. W pierwszej wykorzystuje się metody spektrofotometryczne w pobliżu linii 400 nm i mierzy się absorbancję roztworu – ekstraktu z owocu [188]. W drugiej korzysta się z trójbodźcowej kolorymetrii odbiciowej CIE $L^*a^*b^*$, a pomiary wykonuje się na ciętej powierzchni lub w przecierze z owoców [202]. Metody te są stosowane zamiennie, pomimo znaczących różnic metod, a także możliwości w interpretacji wyników.

Mierząc absorbancję roztworu alkoholowego, określamy tylko barwniki rozpuszczone, nawet gdy ekstrakcję zrobiono z jabłek zamrożonych w ciekłym azocie i do ich wyflukiwania używano ultradźwięków [5]. Ponadto podczas szybkiej reakcji brązowienia zachodził proces polimeryzacji i część barwników stała się mniej rozpuszczalna i to wyeliminowało je z analizy [178]. Także przy dłuższej trwającym brązowieniu zmienia się długość fali dla maksimum absorpcji pomiędzy 360 a 500 nm. Zależy to od powstawania barwników z różnych fenoli. Między innymi, dlatego z wizualną oceną zaawansowanego brązowienia miąższu słabo korelują pomiary absorbancji przy jednej długości fali [6].

W ramach spektrofotometrycznej metody, zwykle używanej do badań w świetle przechodzącym przez klarowne roztwory, istnieje spektrofotometria odbiciowa UV-Vis [113,238]. Umożliwia ona pomiar odbicia światła od powierzchni miąższu i można dobrać taki zakres widma, w którym najefektywniej występują początkowe zmiany wywołane reakcją enzymatyczną. W pomiarach tych można uwzględnić i oddzielić wpływ na absorpcję miąższu zmian struktury tkanki przejrzałej, wysychającej, jak również zmiany wywołane zawartością barwników: chlorofili, antocyjanów, karotenoidów. Możliwe jest także wyliczenie parametrów barwy CIE $L^*a^*b^*$, które odpowiadają organoleptycznemu opisowi i ocenie barwy produktu [151].

3.3.1. Kolorymetria tkanki

W ocenie efektywności technologii świeżych sałatek z jabłek wykorzystywane są współrzędne barwy L^* , a^* , b^* . Przegląd literatury dotyczącej ograniczania ciemnienia wykazał, że porównywanie opublikowanych wyników i efektywności inhibicji brązowienia nie jest możliwe. Stwierdzano, może za przyczyną ułomności użytej metodyki, np. brak różnic w opisie barwy cząstek (parametrem L^*) świeżo ciętych jabłek z 12 odmian [81]. Trudno jest znaleźć tak bardzo podobne odmiany, używając pomiaru spektrofotometrycznego. Współrzędne barwy L^* , a^* , b^* są parametrami złożonymi, do których dane pochodzą z trzech szerokich przedziałów widma światła niebieskiego, zielonego i czerwonego. Sposób przekalowania widma i całkowania, w tych trzech przedziałach, dobrany został do czułości oka ludzkiego. Przestrzeń barw CIE $L^*a^*b^*$ daje dobrą zgodność z opisem wizualnym barwy produktu. Do opisu barwy stosuje się parametry barwy: jasność – L^* , odcień – h i nasycenie (czystość) – C^* [151]. Parametr dE^* określa całkowitą różnicę barwy w przestrzeni. Jednak w badaniach brązowienia ten zestaw parametrów barwy nie jest wykorzystywany.

Na barwę mięszu, według pojęć kolorymetrii wpływają trzy czynniki:

- charakterystyka źródła światła oświetlającego (określa się w metodyce pomiaru), a więc rodzaj promieniowania, jakie skierowano na produkt,
- chemiczne właściwości, które głównie decydują o selektywnym pochłanianiu promieniowania elektromagnetycznego i fizyczne właściwości produktu najczęściej wpływające na rozpraszanie promieniowania,
- wrażliwość spektralna oka obserwatora (tzw. obserwator normalny) i kąt widzenia, tzn. zdolności do rejestrowania promieniowania o określonej długości i natężeniu pod określonym kątem przez receptory wzrokowe człowieka, który określa się w metodyce pomiaru.

Wynik pomiaru barwy tkanki jest specyficzny, lecz w niewielkim stopniu barwa zależy od składu chemicznego mięszu. Mała powtarzalność pomiarów kolorymetrycznych wynika z różnych sposobów oświetlania i oglądania próbki w aparaturze. Podstawowa metodyka pomiaru dostosowana jest do materiałów poligraficznych o barwie powierzchniowej, którą adaptuje się do tkanki o barwie pochodzącej z wnętrza materiału [159]. Większość informacji optycznych o enzymatycznym brązowieniu mięszu jabłek wyrażono metodami kolorymetrii trójbodźcowej. Podawane są wartości parametru jasności L^* lub współrzędne barwy a^* i b^* . Rzadko stosowano składowe barwy X , Y , Z z układu CIE XYZ. Praktycznie nie spotyka się prac, w których podano parametry opisujące barwę mięszu: jasność – Y lub – L^* , długość fali dominującej – λ lub ton – h^* i czystość – p , lub nasycenie barwy – C^* zgodnie z wymaganiami norm CIE XYZ, albo CIE $L^*a^*b^*$. Zwykle brakuje informacji o wybranym źródle światła oświetlającego (tzw. luminatu), o kącie i rodzaju oświetlenia lub obserwacji próbki. Można

się tego domyśleć, znając producenta, model aparatu lub jego przeznaczenie. Zmierzone współrzędne barwy zależą od aparatury pomiarowej i od struktury powierzchni mierzonej tkanki. Ocenia się w ten sposób zmienność wynikającą jednocześnie ze zmian chemicznych i fizycznych tkanki, które trudno rozdzielić.

Wielokrotnie próbowano istotnie skorelować zaawansowanie brązowienia wyrażone współrzędnymi L^* , a^* , b^* z zawartością polifenoli lub z aktywnością PPO w owocu. Jednak nie są znane badania, w których wyniki pomiarów brązowienia wskazywałyby badanie, które przeprowadzono w zakresie zmian barwy ledwo zauważalnej dla oka ludzkiego. Pomimo stosowania inhibitorów eksperymenty prowadzone były aż do uzyskania znaczących różnic wizualnych i całkowitej różnicy barwy – $\Delta E^* > 5$. Mattheis i Fellman [143] dokonali przeglądu ponad 100 prac, w których badano te korelacje. Stwierdzano, że dla wielu rodzajów owoców brak jest zależności pomiędzy pomiarami brązowienia (L^* , a^* , b^*) i składem chemicznym owocu, natomiast istotne korelacje otrzymano dla pomiarów spektrofotometrycznych na roztworach modelowych. Można zaproponować co najmniej dwa wyjaśnienia. Pierwsze, że to metoda oceny brązowienia (L^* , a^* , b^*) ma swoje ograniczenia i konieczne jest poprawienie jej specyficzności. Drugie, że chemiczne parametry, a zwłaszcza zawartość fenoli i aktywność PPO, nie są wystarczające do wyjaśnienia przebiegu brązowienia.

Większość autorów używa spadku jasności – ΔL^* (różnicę przed i po brązowieniu) jako oceny brązowienia i można zauważyć, że zakres akceptowanych zmian ΔL^* wywołanych brązowieniem u niektórych autorów wynosi od 5 do 15. Stosowana jest całkowita różnica barwy – ΔE^* albo tworzone są ze współrzędnych L^* , a^* , b^* względne parametry do oceny brązowienia. Odległość ΔE^* pomiędzy barwami w przestrzeni barw nie może przewyższać 10. Większe zmiany ΔE^* to już inny rodzaj barwy, której nie można porównać za pomocą odległości barw ΔE^* w przestrzeni $L^*a^*b^*$, gdyż całkowita różnica barwy nie określa kierunku wektora zmian barwy. W opublikowanych wynikach, wartości ΔE^* zwykle przekraczają 10 dla świeżych sałatek z jabłek, tzn. że barwa znacznie wykracza poza barwę początkową. Niemożliwe jest bezpośrednie porównanie współrzędnych L^* , a^* , b^* z eksperymentów, a zwłaszcza wykonanych aparaturą bez specjalnego układu optycznego, np. spełniającego rolę kuli Ulbrichta lub przystosowanego do badań materiałów półprzezroczystych. W publikacjach cytowana jest zwykle jedynie opinia autora pracy o uzyskanej „jakości” w analizach barwy, a nie wartości współrzędnych barwy. Bardzo często zamiast używać współrzędnych L^* , a^* , b^* do opisu barwy traktuje się je jak oceny właściwości fizykochemicznych miąższu, pomimo że dla tkanek nie są odtwarzalne na aparatach użytkowanych przez poligrafię. W roku 1969 Clydesdale [34] po raz pierwszy przedstawił dokładne studia problemów barwometrii obiektywnej, związanych z pomiarem barwy produktów pochodzenia roślinnego [94].

3.3.2. Spektrofotometria w świetle rozproszonym

Rozważania ograniczmy do analizy zjawisk spektroskopii obszaru UV-Vis, które związane są z absorpcją elektronową, tzn. przejściem elektronów walencyjnych pomiędzy ich poziomami energetycznymi w molekułach. Gdy kwant światła trafia na molekułę, może on ulec rozproszeniu (zmianie ulega kierunek) bądź absorpcji (energię przejmuje molekuła), a prawdopodobieństwo tych zjawisk zależy głównie od molekuły. Wzbudzona w wyniku absorpcji molekuła może się znajdować w jednym z wielu dyskretnych stanów energetycznych, nazywanych elektronowymi poziomami energetycznymi. Na te poziomy nałożone są poziomy oscylacyjne, które są wynikiem drgań molekuły, rozciągania lub skręcania wiązań kowalencyjnych i poziomy rotacyjne odpowiadające energiom obrotu molekuły. W fazie skondensowanej (roztwory, ciała stałe) silne oddziaływania z ośrodkiem powodują, że poziomy rotacyjno-oscylacyjne molekuł ulegają znacznemu poszerzeniu. Nakładają się one na siebie, co powoduje, że widmo absorpcji jest widmem prawie ciągłym.

W badaniach spektrofotometrycznych, w normalnych warunkach główną przyczyną osłabienia promieniowania przechodzącego przez próbkę roztworu jest absorpcja światła. U większości molekuł energia pierwszego przejścia elektronowego ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego i do dowolnego stanu oscylacyjnego leży w zakresie absorpcji energii promieniowania nadfioletowego – UV, także widzialnego – Vis albo w bliskiej podczerwieni – NIR [235]. Eksperymenty wykazują dość często, że względne osłabienie wiązki światła – I_0 padającej na warstwę – dx (patrz rys. 1) jest proporcjonalne do grubości tej warstwy oraz do stężenia molekuły – c , gdzie współczynnikiem proporcjonalności jest – k (współczynnik absorpcji). Prawo Bouguera-Lamberta-Beera przewiduje taką liniową zależność pomiędzy stężeniem danej substancji a zmierzoną wartością absorbancji. Większe lub mniejsze odchylenia od zależności liniowej obserwuje się z bardzo wielu przyczyn. Odchylenia występują, gdy substancje oddziałują ze sobą lub z rozpuszczalnikiem, albo próbka rozprasza światło, fluoryzuje, zachodzi rozkład lub polimeryzacja substancji, tworzą się pary jonowe lub wiązania wodorowe – przemieszczają się maksima absorpcji lub zmieniają molowe współczynniki absorpcji biomolekuł. Często występują także ograniczenia ze strony możliwości pracy aparatury w wymaganym zakresie.

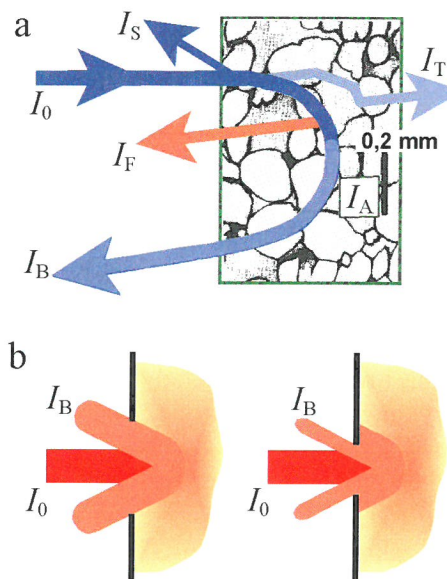
Wykres absorbancji lub fluorescencji w funkcji długości fali – λ (liczby falowej – λ^{-1} lub częstości – ω) nazywa się widmem próbki. Ponieważ długość fali lub pasmo (przedział długości fal), przy której obserwuje się osłabienie światła (absorpcję) albo wzmoczoną fluorescencję, zależy od badanych molekuł, to substancje mogą być identyfikowane na podstawie kształtu ich widm [235]. Tę część biomolekuły, która absorbuje światło w zakresie UV-Vis, nazywa się grupą chromoforową, a tę która przyczynia się do fluorescencji nazywa się fluoroforem. W identyfikacji substancji pomocne są katalogi widm molekuł rozpuszczonych

w różnych rozpuszczalnikach. Są to podstawowe wiadomości do zastosowania spektroskopii zakresu UV-Vis w analizie jakościowej, które można również wykorzystać w spektrofotometrii UV-Vis światła odbitego od tkanki.

W analizie ilościowej wykorzystuje się stwierdzenie faktu, że absorpcja promieniowania przy określonej długości fali jest skorelowana ze stężeniem absorbujących molekuł. Wtedy stosuje się znane prawo Bouguera-Lamberta-Beera. Czułość tej analizy jest ograniczona do minimalnej absorbancji, jaką przyrząd może zarejestrować. Jeśli próbka zawiera kilka substancji, które absorbują światło, a często jest to przy tej samej długości fali, to zmierzona całkowita absorbancja jest sumą absorbancji poszczególnych składników. Dlatego roztwory dwu- trój- i wieloskładnikowe można analizować specjalnymi technikami obliczeniowymi, mierząc absorbancję w wielu pasmach widma i rozwiązując układy równań. Do znalezienia optymalnych pasm absorpcji wykorzystuje się również statystyczną analizę wielowymiarową dla stężeń wzorców i ich widm (metody chemometryczne). Ilość zmierzonych absorbancji dla różnych pasm musi być większa od ilości analizowanych składników mieszaniny [25,26,103,197].

Metody transmisyjne spektrofotometrii w zakresie ultrafioletu UV mają zastosowanie w analizach polifenoli, w cieczach klarownych tuż po ich rozdzieleniu chromatograficznym. Klasyczna spektrofotometria transmisyjna nadal jest doskonała do badań polifenoli, zwłaszcza z wykorzystaniem statystycznych metod analiz wielowymiarowych (chemometrii) [49]. Zastosowania spektrofotometrii światła odbitego w UV-Vis są bardzo ograniczone. Przyczyna jest oczywista – bardzo silna absorpcja pochodząca od wielu molekuł, poszerzenie i nakładanie się pasm powoduje, że widmo jest widmem ciągłym. Problem pomiarów brązowienia miąższu w świetle odbitym odbiega jednak nieznacznie od problemów klasycznej spektrofotometrii transmisyjnej.

Spektrofotometria różnicowa umożliwia detekcję małych zmian w otoczeniu grup chromoforowych lub fluoroforowych. Zwykle porównuje się dwa roztwory. Jeden jest traktowany jako badana próbka, a drugi stanowi próbkę odniesienia. Wspólne, lecz bardzo złożone cechy spektralne obu roztworów kompensują się i jedynie pasma, które uległy przesunięciu w stosunku do siebie, z powodu np. badanych różnic środowiskowych, są zarejestrowane. Biochemicy stosują zapis widm różnicowych próbek o różnym pH w stosunku do jednej próbki o określonym pH. Można wtedy korelować zmiany spektralne ze zmianami konformacji (białek) lub stanem zjonizowania grupy chromoforowej [77]. Taką metodą badane są zmiany i zaburzenia strukturalne wywołane różnymi rozpuszczalnikami. Z tych względów spektroskopia różnicowa mogłaby znaleźć szersze zastosowanie również jako technika pomiarowa w spektrofotometrii światła rozproszonego (spektrofotometria dyfuzyjna) przez miąższ jabłka [113,150] lub w spektrofluorymetrii miąższu [254,255].



Rys. 1. Odbicie rozproszone, wewnętrzne światła od miąższu jabłka:

a – podział wiązki światła oświetlającego miąższ jabłka, b – wpływ wymiarów otworu pomiarowego i wiązki światła oświetlającego. Oznaczenia: I_0 – wiązka oświetlająca, I_B – wiązka odbita wewnętrznie, I_S – wiązka odbita zwierciadlanie, I_F – wiązka fluorescencji wzbudzonej, I_T – wiązka przechodząca, I_A – wiązka zaabsorbowana

Fig. 1. Internal diffuse reflection of light from apple flesh:

a – split of light beam illuminating apple flesh, b – effect of aperture size and illuminating beam. Symbols used: I_0 – illuminating light beam, I_B – body reflected beam, I_S – mirror-reflected beam, I_F – beam of excited fluorescence, I_T – transmitted beam, I_A – absorbed beam

Na rysunku 1 przedstawiono schemat odbicia od tkanki światła o natężeniu – I_0 . Natężenie światła odbitego z wnętrza – I_B i natężenie fluorescencji – I_F niosą informację użyteczną w świetle rozproszonym, tzn. związaną ze stężeniem barwnika w tkance. Pozostałe składniki sumy to natężenie światła przechodzącego – I_T , wykorzystywane w metodzie transmisyjnej do określania stężenia barwnika i natężenie światła odbitego zwierciadlanie – I_S , przydatne do pomiaru połysku. W metodach ilościowych, przy pomiarze widma odbicia przydatne jest natężenie światła wewnętrznje odbitego – I_B [91,94], jeżeli pozostałe składniki są stałe lub kontrolowane. W małym zakresie zmian stężeń obowiązuje prawo Beera, lecz zastosowane nie do transmisji przez próbkę, lecz do funkcji $KM = (1 - R^2)/(2 \cdot R)$ (Kubelki-Munka), gdzie R jest współczynnikiem odbicia rozproszonego [162]. Liniową zależność od stężenia daje również funkcja Pineo, czyli absorbancja rozproszona (dyfuzyjna), którą wyraża wzor $A = \log(R^{-1})$ [228].

W analityce związków organicznych bardzo nieliczne są zastosowania spektrofotometrii odbiciowej w zakresie UV-VIS. Natomiast ogromną popularność zyskała spektrofotometria odbiciowa w podczerwieni – IR, wykorzystująca widma oscylacyjno-rotacyjne do identyfikacji i określania zawartości składników w produktach spożywczych, a także do badania struktury związków organicznych. Na widmach w zakresie NIR i IR najczęściej absorbancja rozproszona przedstawiana jest w zależności od liczby falowej – λ^{-1} .

Niekiedy spektrofotometria odbiciowa mylnie kojarzona jest z kolorymetrią fizyczną. Zasadnicza różnica polega na tym, że prosta kolorymetria stosuje światło z trzech lub czterech szerokopasmowych filtrów dopasowanych charakterystyką do maksymalnej czułości spektralnej oka ludzkiego, natomiast spektrofotometria używa do analizy barwników linii monochromatycznych [162].

W wielu publikacjach opisano badania stężeń chlorofili, antocyjanów i karotenoidów, np. w skórce jabłka, metodami spektrofotometrii odbiciowej w zakresie Vis i metodą fluorymetryczną [150]. Natężenie fluorescencji z miększu jest podstawą metod jakościowych, a także ilościowych, jeżeli można je odnieść do fluorescencji wzorców o znanych stężeniach [180].

Uzyskanie wiarygodnych danych z widm różnicowych zależy w dużej mierze od jakości spektrofotometru, gdyż mierzone są bardzo małe różnice pomiędzy próbkami, które silnie pochłaniają światło. W przypadku widm elektronowych UV-Vis i odbicia rozproszonego od miększu jabłka należy sprawdzić warunki do wykonywania takich pomiarów. Spektrofotometr lub spektrofluorymetr do tego typu pomiarów powinien charakteryzować się dużą czułością fotometryczną, liniowością sygnału oraz znikomym udziałem "światła błądzącego" w zarejestrowanym widmie.

Natężenie wiązki odniesienia we wszystkich spektrofotometrach zmienia się w funkcji długości fali. Na to wpływa charakterystyka spektralna: źródła światła, próbki odniesienia, czułości detektora, transmisji monochromatora oraz szerokość szczeliny. W spektrofotometrze dwuwiązkowym wykorzystuje się sygnał wiązki odniesienia. Stwarza to najkorzystniejsze warunki pracy urządzenia. Pomiar nie jest czuły na niestabilność źródła światła lub nieliniowości pracy wzmacniaczy. Natomiast w spektrofotometrze jednowiązkowym konieczna jest regulacja przy każdej długości fali (np. przez wzmacnianie sygnału z detektora) [77].

W biologii i biofizyce do przekazywania energii biomolekułom stosowane są źródła światła laserowego z modulacją pikosekundową [235]. Miniaturyzację i uproszczenie aparatury osiągnięto, stosując lasery diodowe nawet w zakresie fioletu. Studia nad dynamiką molekularną stały się możliwe w przedziale czasowym od 10^{-12} do 10^{-9} s. W spektroskopii czasowo rozdzielonej wykonuje się bardzo szybkie analizy i prawie równoczesne porównania zjawisk absorpcji, fluorescencji oraz rozpraszania światła. Technologia generowania bardzo szybkich impulsów laserowych i technika rejestracji impulsów z dużą rozdzielczością czasową umożliwia szybki postęp w pomiarach kinetyk chemicznych w zakresie spektrofotometrii i fluorymetrii. Dostarcza ona informacji o naturze biomolekuł, aby można ściślej określać związek pomiędzy ich strukturą i funkcją biologiczną w żywej tkance [35,255].

4. MATERIAŁY I METODY

Do realizacji celu pracy stworzono takie warunki w doświadczeniach, aby najistotniejszym czynnikiem zmian były cechy odmian, a następnie zróżnicowana dojrzałość owoców podczas zbioru do długo trwającego przechowywania w komorach chłodniczych, okresy przechowalnicze lub hamowanie brązowienia wyciętych cząstek z jabłek. Mając to na uwadze, należało wyeliminować wpływ innych czynników, np. ilości opadów, nasłonecznienia, temperatury powietrza, uprawy, pielęgnacji mogących zniekształcać wyniki porównań w grupie odmian.

W metodyce badań można wyróżnić dwa kierunki. Pierwszy zajmuje się tworzeniem parametrów fizycznych, które zaplanowano wykorzystać jako elementy ocen świeżości miąższu i drugi – to problematyka związana z równoległymi badaniami zmian świeżości, jakie mogą wywołać technologie świeżych sałatek. W obu kierunkach badań ważne było poznanie i scharakteryzowanie cech owoców przydatnych do konsumpcji w stanie świeżym. W pracy trzeba było zastosować dość niestandardowe warunki przygotowania materiału i metody przechowalnicze już niespotykane w wielkoprzemysłowych technologiach przechowywania jabłek [45,46]. W wyborze optymalnej jakości jabłek, ich stanu dojrzałości, gotowości do spożycia po długim przechowywaniu chłodniczym wykorzystano wieloletnie doświadczenie naukowców-sadowników. W ocenie owoców, jak się teraz wydaje, nie obowiązywały ich precyzyjne ograniczenia, takie jak: minimalna jędrność, zawartość ekstraktu, kwasowość ogólna lub wybarwienie skórki, tzn. podlegające normom wyróżniki jakości gwarantujące trwałość handlową owoców (jakość handlową). Decydowały różnorodne elementy organoleptyczne, głównie smakowe przygotowanej do badań próby o dojrzałości konsumpcyjnej, których poznanie było wynikiem wieloletniego kontaktu z dojrzewającymi owocami i dużą liczbą odmian. Decyzje oparte były na znanym przez sadowników zakresie zmienności, czyli potencjalnych możliwościach grupy lub typu jabłoni, a także dostosowane do konkretnego sezonu wegetacji. Z tego względu dokładniej opisano te nowe elementy, które wprowadzono do metodyki i przygotowania materiału – mogące mieć wartość w badaniach naukowych nad świeżością owoców.

4.1. Materiały

Wybrano materiał badawczy bardzo zróżnicowany odmianowo. Ujednolicono warunki przechowywania chłodniczego owoców, aby były bezpieczne jednocześnie dla dużej ilości odmian i zastosowano jednakowe technologie minimalnego przetwarzania. Wybrano stan dojrzałości konsumpcyjnej i dłuższe okresy przechowywania, po których owoce mają niższą zawartość kwasów, lecz typową i preferowaną w jabłkach, a także niższą skłonność do brązowienia. Modelowy układ

materiału użyto do badań świeżości i reakcji brązowienia miąższu ciętych lub nakłuwanych owoców. Wynikło to z potrzeby dostosowania miąższu do warunków technologii świeżo ciętych jabłek i wywołania w owocach zmian statusu przeciwutleniającego w wyniku ubytku naturalnych przeciwutleniaczy w surowcu i produkcji lub powstawania form przeciwutleniaczy o nowej aktywności biologicznej.

Do zasadniczych badań pobierano owoce w latach 1993-1995 z doświadczenia odmianowego prowadzonego przez Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Sadowniczym Zakładzie Doświadczalnym w Albigowej (woj. podkarpackie). Jabłonie były wyrównane wiekowo, weszły w 4-7 rok owocowania produkcyjnego. Rosły między murawą trawiastą, z ugiem pod koronami drzew, przy nasadzeniach w układzie bloków losowych, w dużych kwaterach rozdzielonych drogami.

Wzrost i dojrzewanie odbywały się w jednakowych warunkach klimatycznych i agrotechnicznych, a czynnikiem różnicującym w sadzie były odmiany. Doświadczenie obejmowało najbardziej rozpowszechnione w świecie i w Polsce odmiany o doskonale znanych cechach użytkowych. Zapewniało duży zakres zmienności terminów dojrzewania owoców w sadzie i zmienności okresów przechowywania chłodniczego. W Polsce były to odmiany od jesiennych aż do najpóźniejszych odmian zimowych.

Do badań zasadniczych w roku 1993, z zaplanowaną oceną zmienności międzyodmianowej, użyto owoców jabłoni 33 odmian [97]: 'Honeygold' (HGD), 'Szampion' (SAM), 'James Grieve' (JGV), 'Mac Spur' (MPR), 'Wealthy' (WHY), 'Fantazja' (FZJ), 'Cortland' (CTR), 'Prima' (PRI), 'Ozark Gold' (OZG), 'Lobo' (LBO), 'Jonagold' (JOG), 'Mc Intosh' (MCI), 'Książę Albrecht Pruski' (KAP), 'Beforest' (BFR), 'Melrose' (MEL), 'Elstar' (ELS), 'Starkrimson' (STN), 'Golden Delicious' (GDL), 'Freedom' (FDM), 'Idared' (IDR), 'Gloster' (GST), 'Jonathan' (JON), 'Starking' (STK), 'Macoun' (MUN), 'Spartan' (SPT), 'Billing Boskoop' (BIB), 'Bankroft' (BKF), 'Gala' (GAL), 'Boiken' (BOI), 'Liberty' (LBR), 'Florina' (FLO), 'Fireside Red' (RFS), 'Ligol' (LIG).

Do metodycznych badań użyto także owoców z rejonu Voucluse (Francja), zrywanych w stanie dojrzałości handlowej: 'Granny Smith' (GSM), 'Red Delicious' (RDL), 'Early Redone', 'Delbard Festiwal', 'Royal Gala', 'Florina', 'Ozark Gold', 'Jonnee', 'Golden Delicious'. Badano również owoce z obrotu giełdowego (dojrzałość handlowa) z rejonu Leuven w Belgii, odmian: 'Boskoop', 'Jonagold', 'Golden Delicious', 'Cox', 'Elstar', 'Granny Smith'.

Optymalny termin zbioru w sadzie wieloodmianowym określali (głównie metodami organoleptycznymi) pracownicy naukowci doświadczeni w zakresie chłodniczego przechowywania. W terminach najodpowiedniejszych dla każdej odmiany wykonali reprezentatywny, ręczny zbiór owoców do przechowywania w komorach chłodniczych. Z 10 do 15 drzew każdej odmiany zrywano owoce, których część losowo odłożono na płachtę rozścieloną w sadzie. Ta część plonu

utworzyła „próbę chłodniczą” reprezentatywną dla sezonu produkcyjnego i dla plonu z odmiany.

Wprowadzono nowy układ eksperymentu przechowalniczego, ponieważ przechowywano owoce w klasach wybarwienia, które ustalono w chwili zbioru. Próbę chłodniczą rozdzielano na 5 klas, różniących się stopniem wybarwienia jabłek. Początkowo z każdej odmiany uformowano dwie równoliczne grupy najsilniej różniące się wybarwieniem, a dla odmian z rumieńcem, zaawansowaniem rumieńca. Pierwszy podział umożliwił zapoznanie się ze zmiennością barwy owoców w próbie (bardzo różnej dla odmian) i zdobycia doświadczenia potrzebnego do podziału na klasy. Na tej samej zasadzie rozdzielono dwie grupy, wyłoniono przeciętną i w efekcie uzyskano 5 klas. Osiągnięto cel klasyfikacji: wykorzystano wszystkie owoce z „próby chłodniczej” (podobną techniką, jak to robiono z owocami truskawki [92]), wprowadzono tzw. klasy dojrzałości.

Jabłka podpisano numerami: od $Z = 1$ – klasa najlepiej wybarwiona do $Z = 5$ – klasa słabiej wybarwiona. Z próby chłodniczej usunięto jedynie owoce zebrane przez nieuwagę, tzn. owoce uszkodzone, zbyt małe lub nadwymiarowe w plonie.

4.1.1. Warunki przechowywania owoców

Próby chłodnicze umieszczano wraz z innymi jabłkami w dużej chłodni. Podczas okresu przechowywania zapewniono temperaturę w zakresie od 3°C do 6°C . Przyjęto jednolite warunki, najbardziej „bezpieczne” dla tak licznej grupy odmian [45,119]. Zapewniono wysoką (89-95%) wilgotność względną powietrza. Jabłka wyjmowano z chłodni po dwóch okresach chłodniczych: wczesnym – „term-1” i późnym – „term-2”.

Okresy przechowywania jabłek oczywiście znacznie się różniły u każdej z odmian. Zostały optymalnie wybrane przez pracowników naukowych w taki sposób, aby owoce na początku osiągnęły stan dojrzałości handlowej, a po kondycjonowaniu stan dojrzałości konsumpcyjnej.

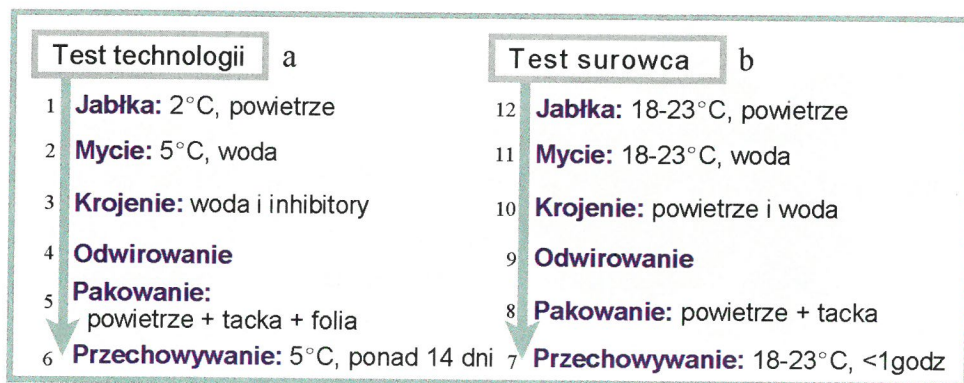
Część próby chłodniczej wyjmowano, tzn. ponumerowane owoce z każdej odmiany i kondycjonowano je przez 24 do 36 godzin, nadal utrzymując dużą (89-95%) wilgotność względną powietrza w temperaturze ok. 18°C i zaciemnienie. W ten sposób owoce osiągały dojrzałość konsumpcyjną i aktywność fizjologiczną w dniu wykonywania pomiarów.

4.1.2. Przygotowanie próbek i części z jabłek

Krojenie jabłek wykonano w dwóch układach badawczych: oceny wpływu surowca na brązowienie i testowania efektów hamowania brązowienia w technologiach. W obu układach obserwowano wpływ czynników związanych ze świe-

nością. Schemat na rysunku 2 przedstawia różnice pomiędzy sposobami przygotowania i traktowania surowca.

Jabłka przecinano na połowy do badań spektrofotometrem dwuwiaźkowym lub spektrofluorymetrem (rys. 3a). Wykrojnikiem rurkowym wycinano cylindryczną próbkę o średnicy 20 mm i wraz z wykrojnikiem umieszczano w uchwycie. Uchwyt dostosowano do przystawki spektrofotometru i do spektrofluorymetru, w taki sposób, aby utrudnił zanieczyszczenie przystawek i zapewnił właściwe oświetlenie wiązką światła.



Rys. 2. Warunki i operacje odróżniające technologię ciętych, świeżych jabłek od oceny świeżości surowca

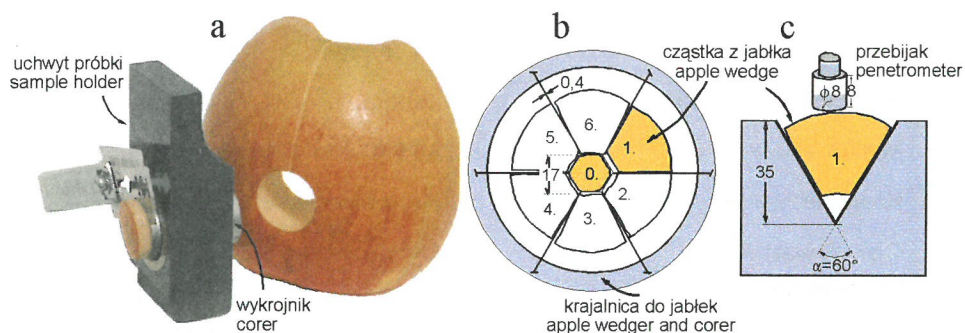
Fig. 2. Conditions and operations differentiating fresh apple slices technology from raw material estimation: a – Test of technology; b – Test of material; 1 – Apples: 2°C, air; 2 – Rinsing: 5°C, water; 3 – Slicing: water and inhibitors; 4 – Centrifuging; 5 – Packaging: air + tray + membrane; 6 – Storage: 5°C, over 14 days; 7 – Storage: 18-23°C, under 1 hour; 8 – Packaging: air + tray; 9 – Centrifuging; 10 – Slicing: air and water; 11 – Rinsing: 18-23°C water, 12 – Apples 18-23°C, air

Badano spektrofotometrem jednowiaźkowym cząstki z jabłek przygotowane wg ściśle przestrzeganej procedury naśladującej warunki technologii produkcji sałatek (rys. 2). Stosowano wodę albo następujące roztwory inhibitorów: kwas askorbinowy (0,05%, 0,1% i 0,2% wagowo), kwas szczawiowy (0,05%, 0,1%, 0,2%) i pirosiarczyny sodowej (0,02%, 0,02% i 0,04%) – znane z pierwszych prac Sapersa i Hicksa [204] i Dudena [47]. Hamowanie brązowienia przeprowadzano na jabłkach i w roztworach oziębionych do temperatury 5°C.

Owoce cięto (temperatura 5°C) ręczną kralnicą do jabłek, wykonaną ze stali nierdzewnej (rys. 3b). Powstawało 6 cząstek z jabłka i usuwane było gniazdo nasienne. W badaniach hamowania brązowienia jabłko cięto w powietrzu albo wraz z kralnicą umieszczano w naczyniu z wodą dejonizowaną lub w roz-

tworach inhibitora i cięto zanurzone. Wodę lub roztwory wymieniano co 5 jablek (2,5 litra), odwirowywano za pomocą wirówek do sałatek przez 5 s z przyspieszeniem 35 G.

Rozkładano po 6 sztuk cząstek na tackach, a system losowego układania zapewniał jednorodność całego zestawu tacek. Tacki z owocami, które miały być długo przechowywane, zamykano w torebkach plastikowych o bardzo dużej przepuszczalności dla gazu, lecz nieprzepuszczających pary wodnej (firmy Rhone-Poulenc) i umieszczono na półkach w chłodni.



Rys. 3. Zestaw do przygotowania próbek: a – pobranie miąższu z jabłka wykrojnikiem i odcięcie plastra przed pomiarem w spektrofotometrze dwuwiązkowym lub spektrofluorymetrze, b – przygotowanie cząstek z jabłka do spektrofotometru jednowiązkowego, c – cząstki na podstawie do pomiaru jędrności lub wyciskania soku

Fig. 3. Experimental setup for sample preparation: a – taking an apple flesh wedge with a wedger and cutting a slice before measurement in dual-beam spectrophotometer or spectrofluorimeter, b – apple flesh wedge preparation for single-beam spectrophotometer measurements, c – apple flesh wedge in a holder for firmness determination or juice pressing

Opakowanie zapewniło oddychanie tlenowe tkanki, które sprawdzono, kontrolując po 10 dniach chromatografem gazowym stężenie alkoholi w opakowaniu. Przez 10 dni wyjmowano losowo zestaw 3 opakowań z każdej odmiany. Wprowadzony system przygotowania podobnych próbek umożliwił zbadanie surowca o maksymalnej zmienności z każdej odmiany i w każdym terminie wyjęcia z chłodni, a jednocześnie uwzględnił 3 powtórzenia, wyrównując efekt niejednorodności w technologii chłodniczej. Po dłuższym przechowywaniu cząstek z jabłek, w niektórych układach badań, odświeżano powierzchnię cięcia, odcinając plaster o grubości 1,5 mm gładkim nożem obrotowym na maszynie do wędlin.

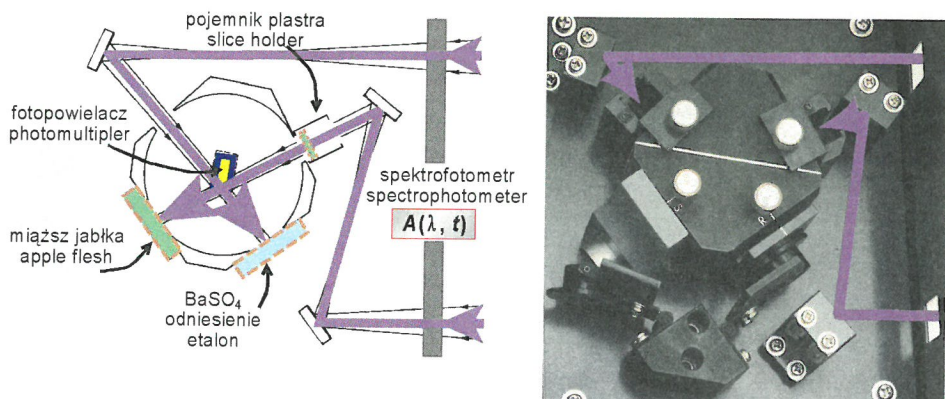
Najmniej liczna próbka odmianowa, z której pomiary nadawały się do modelu kinetyki brązowienia, składała się z 30 owoców w 5 klasach wybarwienia (utworzonych w sadzie), po 6 owoców w klasie.

4.2. Metody

4.2.1. Spektrofotometria dwuwiazkowa z rozpraszającą kulą

Producent spektrofotometrycznej aparatury naukowej nie przewidywał badań na mokrym materiale roślinnym i nie zapewnił odporności na zanieczyszczenia sokiem kuli pomiarowej spektrofotometru. W trakcie badań opracowano uchwyty próbek do trzech modeli spektrofotometrów. Podjęto również decyzję, że badania kinetyki brązowienia mięszu z wielu odmian, trwające przez kilka miesięcy, trzeba jednak wykonać prostszym spektrofotometrem jednowiazkowym.

Pomiary widmowego współczynnika odbicia mięszu przeliczano na absorbancję rozproszoną wg wzoru $A = \log(1 / R)$, gdzie R jest współczynnikiem odbicia rozproszonego (reflektancja) dla określonej długości fali światła.



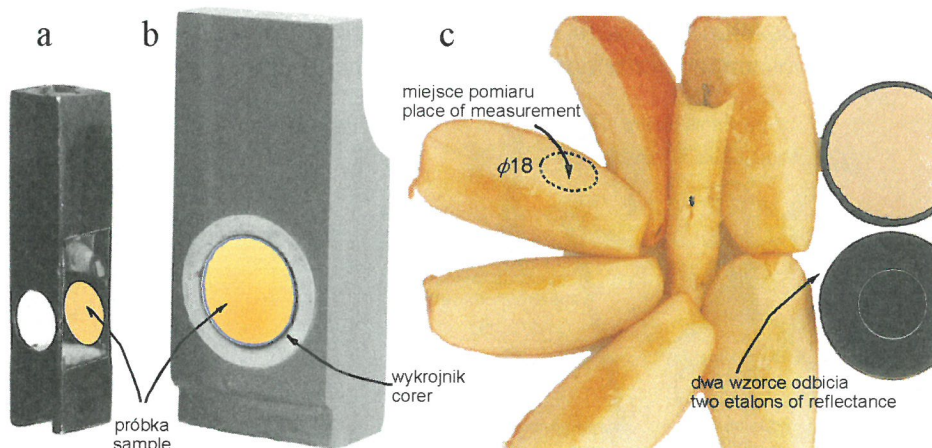
Rys. 4. Schemat układu optycznego przystawki z kulą rozpraszającą w spektrofotometrze dwuwiazkowym przeznaczonym do pomiaru światła przechodzącego lub odbitego od plastra mięszu i zdjęcie przystawki rozpraszającej z próbką mięszu i wzorcem bieli (dorysowano wiązki światła)

Fig. 4. Schematic of optical set with diffusion sphere of dual-beam spectrophotometer for measurement of apple flesh slice transmitted or reflected light and the photo of the diffusion sphere attachment with sample of flesh and white reference (light beam path drawn-in)

Widma w świetle UV-Vis odbitym lub przechodzącym przez mięsz otrzymywano ze spektrofotometru Carry 5 firmy Varian wyposażonego w kulę Ulbrichta lub z UV-2101PC z przystawką odbiciową ISR-260 firmy Shimadzu. Są to aparaty do badań naukowych o bardzo dużej dokładności – powtarzalności $Abs = 0,0001$ i czułości do 6 Abs. Cechowanie i pomiar sterowany był przez komputer z systemem Windows. Wzorcem 100% widmowego współczynnika odbicia (z konieczności również w zakresie UV) był standard ze sprasowanego pudru BaSO₄ cz.d.a. (Shimadzu). Skanowano od dłuższych fal z dużą szybkością 800 nm/min i ze skokiem 0,5 nm, przesłoną wiązki 5 nm, ze źródłem światła halogenowego i deuterio-

wego przełączanym automatycznie. W spektrofotometrze UV-2101PC okienko próbki miało średnicę 18 mm, a wymiary wiązki oświetlającej 5 mm na 3 mm.

Pomiary w zakresie UV i widzialnym fiolecie rozdzielono od pomiarów w świetle widzialnym, aby maksymalnie skrócić czas skanowania widma. Wybrane zostały optymalne ustawienia dla spektrofotometru, żeby przyspieszyć pomiar i uzyskać wyraźne widma do zaplanowanych analiz chemometrycznych. Miąższ skanowano co 2 min przez czas do 28 min w normalnych warunkach otoczenia. Widma różnicowe obliczano dla próbki brązowiejącego miąższu w stosunku do pierwszego pomiaru i wygładzano je dwukrotnie metodą średniej ruchomej dla pięciu punktów.



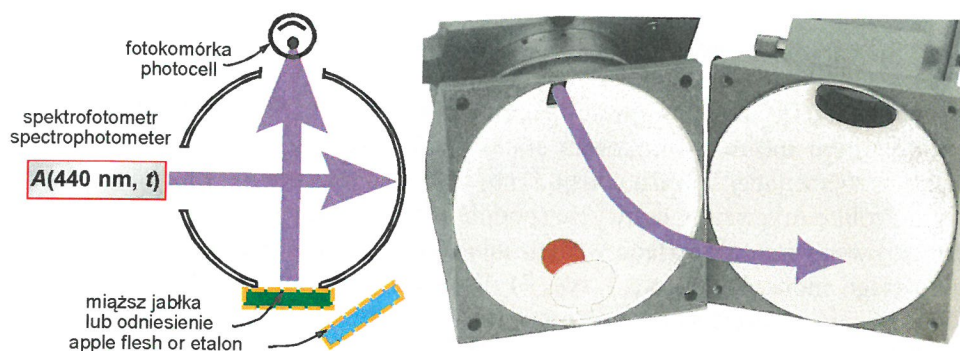
Rys. 5. Próbkę stosowane w spektrofotometrach: a – kuweta z plastrem miąższu do prześwietlania, b – próbka w kształcie walca w uchwycie do spektrofotometru dwuwieżkowego lub spektrofotometru, c – części z jabłka i wzorec czarny, wzorec odbicia 57% przy 440 nm do spektrofotometru jednowieżkowego

Fig. 5. Samples used in the spectrophotometers: a – black cuvette for light transmission of thin slice, b – cylindrical flesh sample in a holder for dual-beam spectrophotometer or spectrofluorimeter, c – apple wedges and the black etalon, etalon of 57% reflectance at 440 nm for single-beam spectrophotometer

Na rysunku 4 przedstawiono schemat przystawki i jej zdjęcie. Zaznaczono dwie wiązki światła z monochromatora spektrofotometru, które naprzemiennie wpadają do kuli i padają na próbkę lub na wzorec bieli, ulegając rozproszeniu. Natężenie światła rozproszonego mierzy fotopowielacz znajdujący się pod kulą. Wiązka światła padała na próbkę – na środek podstawy walca lub na plaster w kuvecie (rys. 5a, b) i oświetlała powierzchnię 5×3 mm. Przed pomiarem odcinano z walca plaster (4-8 mm od skórki) i próbkę natychmiast umieszczano w spektrofotometrze do automatycznego skanowania, co 2 min. Pomiary powtarzano 2-3- krotnie, odcinając plaster o grubości około 1,5 mm.

4.2.2. Prosta spektrofotometria odbiciowa

Na spektrofotometrze jednowiązkowym (HunterLab ColorQuestSphere) obserwowano zmiany absorbancji powierzchni plastrów w zakresie widzialnym od 400 do 710 nm. Pomiar wykonywano przez otwór 17,7 mm. Kulę pomiarową zabezpieczono przed zanieczyszczeniem sokiem i w tym celu ustawiono spektrokolorymetr tak, aby otwór pomiarowy był od dołu. Pomieszczenie było zaciemnione i nie potrzeba było osłaniać plastra.



Rys. 6. Schemat układu optycznego z kulą rozpraszającą w spektrofotometrze jednowiązkowym i zdjęcie wnętrza kuli rozpraszającej z otworami pomiarowym i oświetlenia (dorysowano wiązkę)

Fig. 6. Schematic of optical set with diffusion sphere in single-beam spectrophotometer and the photo of diffusion sphere with apertures for illumination and measurement (beam path drawn-in)

Przez kilka miesięcy wykonywano pomiary kinetyki zmian absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm spektrofotometrem jednowiązkowym wyposażonym w kulę Ulbrichta (rys. 6) o średnicy 60 mm, z otworem pomiarowym o średnicy 18 mm (Specol 10). W przystawce Rd/0 wokół otworu pomiarowego umieszczono cienki, biały silikonowy pierścień, oddzielający miąższ cząstki wyciętej z jabłka (rys. 5c) od powierzchni pokrytej siarczanem baru. Łatwość naprawy optyki tego spektrofotometru zdecydowała o jego wyborze do wielomiesięcznych badań. W przypadku zanieczyszczenia kuli naprawiano białą powierzchnię [94].

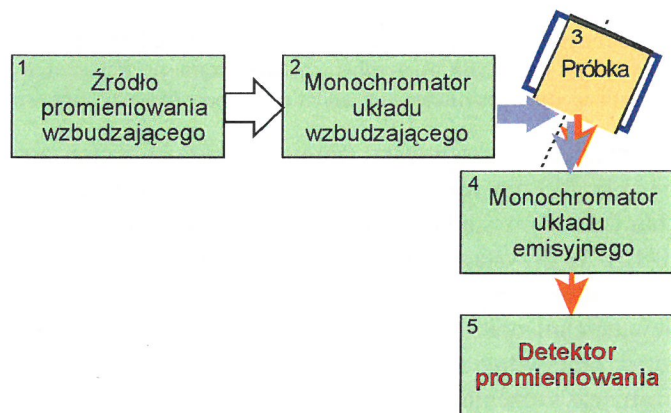
Znacznie zmodyfikowano układ rejestracji wyników, podłączając spektrofotometr do komputera. Napisano program do kalibracji spektrofotometru i gromadzenia pomiarów. Ułatwił on skalowanie na dwóch wzorcach: wzorcu „białej tkanki” wykonanym z fajansu (57% reflektancji dla 440 nm i 800 mV na wyjściu wzmacniacza) i wzorcu czerni. W czasie pomiaru program przeliczał napięcia elektryczne na reflektancję R% i organizował pomiary, tzn. wyznaczał kolejne próbki do pomiaru, notował czas trwania pomiarów kinetyki, stale kontrolował wyskalowanie i czystość układu optycznego, sprawdzał operatora, porównując na bieżąco odczyty i ostrzegał przed pomyłką. Przy długo trwającym brązowieniu

cząstek i wielu odmianach pracowano równocześnie z kilkoma jabłkami i odmianami. Pobierano do spektrofotometru cząstki z odmiany wskazanej przez komputer, lecz powtórnie nie mierzono tych samych powierzchni miąższu z cząstek jabłka.

Obliczano widma absorbancji różnicowej (brązowienie) jako różnicę widm absorbancji rozproszonej dla cząstki zmierzonej po przechowywaniu i widma absorbancji cząstki jabłka świeżo wyciętej. W niektórych wielodniowych badaniach cząstek przechowywanych w niskiej temperaturze, dodatkowo mierzono cząstki odświeżone przez odcięcie warstwy 1,5 mm.

4.2.3. Spektrofluorymetria w świetle odbitym

Do badań miąższu używano spektrofluorymetru Shimadzu RF-5001PC z podwójnym monochromatorem siatkowym. Ustalono szerokość przesłony: wiązki wzbudzającej 5 nm, a emisji 3 nm, prędkość rejestracji – Medium i czułość High. Próbkę miąższu w uchwycie (podobnie jak w spektrofotometrze dwuwiazkowym) wstawiano do układu wzbudzania czołowego (kąt ponad 45° z wiązką od pierwszego monochromatora – rys. 7). Detektor, którym jest fotopowielacz, ma filtr odcinający światło (rozproszone) wzbudzające fluorescencję i rejestruje po drugim monochromatorze natężenie emisji wzbudzonej.



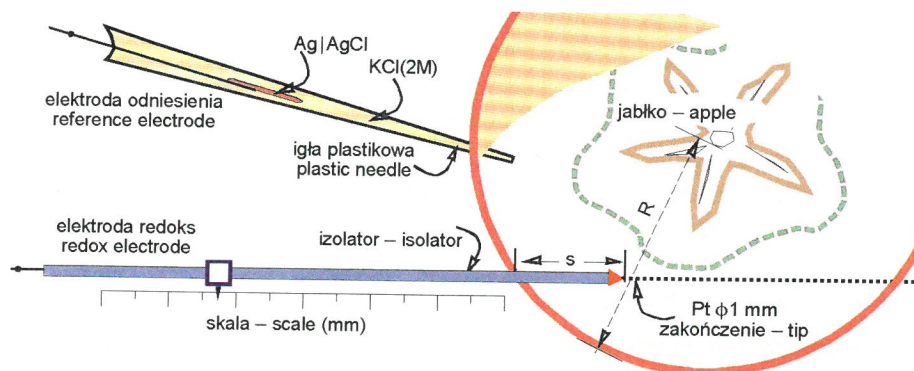
Rys. 7. Schemat blokowy układu oświetlenia próbki i detekcji fluorescencji w spektrofluorymetrze z próbką miąższu

Fig. 7. Schematic diagram of sample illumination and fluorescence detection system in spectrofluorimeter with apple flesh sample. Symbols used: 1 – source of excitation, 2 – monochromator of excitation set, 3 – sample, 4 – monochromator of emission system, 5 – detector of radiation

Badano widma efektywności wzbudzania fluorescencji w paśmie 685 nm, w którym emitują chlorofile. Ponadto badano bardzo charakterystyczną emisję w zakresie UV i widmową efektywność jej wzbudzania. Badania powtarzano po 6 min od chwili odcięcia miąższu, uzyskując widma różnicowe z fluorymetru.

4.2.4. Potencjometria redoks

Rejestrowano potencjał redoks w układzie elektrochemicznym (rys. 8) z elektrodą platynową (ostrze platynowe o średnicy 1 mm) i chlorosrebrną elektrodą odniesienia poprzez mostek elektrolityczny. Mierzono siłę elektromotoryczną elektrometrem ORION-EA940 o oporze ponad $10^{-9} \Omega$. Do elektrometru podłączono komputer, który zapisywał napięcie z wyjścia na rejestrator, czas od momentu wbicia elektrody redoks i notowano warunki pomiarów.



Rys. 8. Schemat układu pomiarowego z elektrodą redoks w miąższu jabłka

Fig. 8. Schematic of redox electrode measuring setup in apple flesh

Po wbiciu w miąższ jabłka pozostawiano elektrodę platynową nieruchomo przez 10 min, rejestrując zmiany w miejscu uszkodzenia komórek. Za pomocą manipulatora przeciskano elektrodę przez miąższ, skokami co kilka milimetrów. Zestawiono pomiary potencjału redoks w jabłku w zależności od odległości elektrody od skórki jabłka i od czasu [99]. Zanotowano wymiary jabłka, żeby wyliczyć zagłębienie elektrody w miąższ.

Zależność potencjału redoks od czasu przybliżono równaniem regresyjnym, z którego otrzymano wartości początkowe potencjału elektrody – E_0 , a po 10 minutach wartości wysycenia – E_f .

4.2.5. Metodyka analiz dodatkowych

Do oceny wpływu okresu przechowalniczego na owoce użyto pomiarów jędrności miąższu i zawartości ekstraktu.

Jędrność miąższu zmierzono po cięciu jabłek na cząstki i po wykonaniu analizy spektroskopowej. Stosowano ręczny sprężynowy dynamometr ze wskazaniem krańcowym siły maksymalnej [92]. Cząstkę z jabłka po odcięciu skórki utrzymywała podstawka kątowna (rys. 3c). Dynamometr wyposażono w płasko zakończony

przebijak cylindryczny o średnicy 7,9 mm i mierzono nim maksymalną siłę wbicia przebijaka w tkankę do głębokości 7 mm [92,104].

Zawartość ekstraktu SS (%) zmierzono refraktometrem laboratoryjnym w soku wyciśniętym ręczną praską z cząstki jabłka i wyrażono w procentach zawartości sacharozy [94].

Objętość przestrzeni międzykomórkowych w miąższu oszacowano, wypełniając miąższ wodą. Zanurzono wszystkie próbki w wodzie i trzykrotnie obniżono ciśnienie do 0,1 atm. Z pomiarów objętości próbek miąższu przed wypełnieniem wodą i z przyrostu ich masy oszacowano objętość przestrzeni dostępnej dla wody. Nie stosowano poprawek (np. na pęcznienie tkanki wysycanej wodą). Wykonane wg opisaney procedury pomiary objętości przestrzeni międzykomórkowych dają zawyżoną wartość, gdyż nie uwzględniono wielu czynników, które dokładnie opisali Samotus i in., Shyu i Hwang [201,216]. Jednocześnie wykonana dla próbek i dokładnie powtarzana procedura okazała się wystarczającym oszacowaniem i silnie zróżnicowała miąższ różnych odmian wg zawartości tlenu, gdyż jabłka przechowywano i kondycjonowano w normalnej atmosferze.

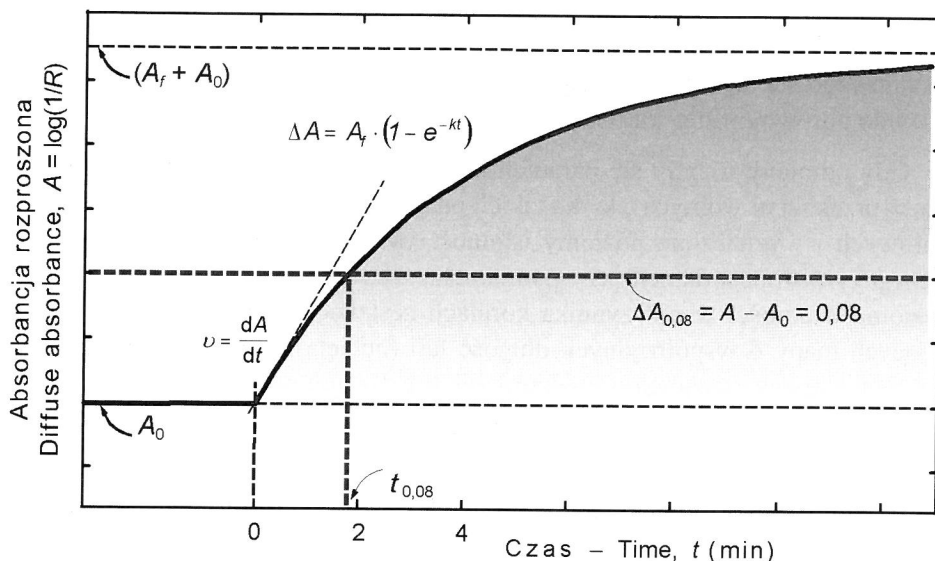
Analizy chromatograficzne HPLC wykonano na miąższu owoców z tej samej próby, z której pobrano owoce do badań spektrofotometrycznych. Miąższ z części centralnej pokrojono na kostkę (1,5-2 cm), równowagowo uzupełniono alkoholem etylowym z dodatkiem pirosiarczyny sodu i zamrożono w temperaturze -20°C . Jednocześnie zamrożono wszystkie próbki i po 3 miesiącach rozdrobniono homogenizatorem nożowym i ultradźwiękowym. Po odwirowaniu, pobierano po 3 próbki ekstraktu, które przetrzymywano w temperaturze -20°C podczas wykonywania analiz. Analizy chemiczne kwasu chlorogenowego, epikatechiny, ksyloglukozydu floretyny w ekstraktach wykonano w Katedrze Technologii Żywności AR we Wrocławiu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej [109]. Użyte zostały metody analizy chemicznej dostępne tam w roku 1994, a ich receptury obecnie opisane są w licznych publikacjach [103,169,175].

4.2.6. Model kinetyki

Do opisu zmian absorbancji brązowiejącego miąższu jabłek wybrano model kinetyki pierwszego rzędu (rys. 9). Parametry: szybkość początkowa brązowienia – v , czas połówkowy brązowienia – $t_{1/2}$, stała szybkości brązowienia – k , przyrost absorbancji rozproszonej do wysycenia brązowienia (absorbancja wysycenia brązowienia) – A_f , absorbancja początkowa (natychmiast po uszkodzeniu) – A_0 są parametrami opisowymi krzywej kinetyki. Wprowadzono nazwę dla parametru –

– A_f „absorbancja wysycenia brązowienia”, która najbardziej odpowiada ocenie organoleptycznej miąższu i jest oceną różnicową dla brązowienia.

Do modelu wprowadzono zmienne uwzględniające wpływ czynników: dojrzałość i okresy chłodnicze (term 1 i term 2) jako liniowe zależności. Testowano je w różnorodnych układach, aby odszukać najlepszą zgodność z danymi doświadczalnymi. Do wstępnych obliczeń z każdego jabłka wybierano wartości median. Uzasadnienie przedstawiono w pracach Kuczyńskiego [94,104].



Rys. 9. Model pierwszego rzędu dla krzywej kinetyki opisujący zmiany absorbancji rozproszonej – A (pasmo 440 nm) w czasie – t brązowienia miąższu jabłka: A_0 – absorbancja początkowa miąższu, $t_{0,08}$ – trwałość barwy, $\Delta A_{0,08}$ – absorbancja krytyczna dla jakości, $(A_f + A_0)$ – końcowa absorbancja dla wysycenia brązowienia, v – szybkość brązowienia

Fig. 9. First-order model of kinetic curve for changes in diffuse absorbance – A (the 440 nm band) during time – t of apple flesh browning: A_0 – initial absorbance of flesh, $t_{0,08}$ – stability of colour, $\Delta A_{0,08}$ – absorbance critical for quality, $(A_f + A_0)$ – absorbance of final equilibrium browning, v – browning rate

Wykorzystano metodę „regresji użytkownika” z programu Statistica PL v. 5.5, która oblicza parametry zaprojektowanej funkcji, minimalizując sumy kwadratów odchyłeń. W metodzie regresyjnej miarą precyzji otrzymanych parametrów było odchylenie standardowe, poziom istotności parametru (uznano go za istotny, gdy był lepszy od 0,05) i współczynnik determinancji dla modelu – R^2 jako ocena ogólna dopasowania pomiarów do modelu (uznano za istotny, gdy $R^2 > 50\%$).

Opracowanie i **prezentacja pomiarów na rysunkach** służy ocenie zakresu zmienności nowych parametrów. Są to średnia i $\pm$ odchylenie standardowe. Z jednej strony ma to zwrócić uwagę na zakres zmian wartości nowych miar, a z drugiej, w odniesieniu do odmian, pokazać zakres zmienności materiału w warunkach wybranych do badań, tj. przy zmianie okresu przechowywania, stadium dojrzałości lub przy hamowaniu brązowienia. Dla odmian wyniki przedstawiano wg kolejności wartości median, a bardzo rzadko wartości średnich parametrów dla odmian. Ułatwia to odszukanie podobnych „sąsiadów”. Jeżeli celem zestawienia wyników było wskazanie na istotne różnice pomiędzy wartościami parametru, posługiwano się błędem standardowym (najmniejszą istotną różnicą – NIR), który służy do porównywania wartości średnich testem t–Studenta.

Gdy odmiany różniły się parametrami (jędrnością, potencjałem redoks, objętością przestrzeni wolnych), to dla takich parametrów wykonano **analizy korelacji liniowych** i wyznaczono poziomy istotności współczynnika korelacji np. z widmem przyrostu absorbancji przy pomiarach czasowo rozdzielonych. Wyniki ocen poziomu istotności współczynnika korelacji zestawiono na rysunkach przypominających mapy o współrzędnych długość fali (odcięta) i czas brązowienia (rzędna). Na mapach oznaczono znakami: $\ominus$ lub $\oplus$ ujemne lub dodatnie wartości współczynnika korelacji, a poziomiami obszary poziomu istotności wyższego odpowiednio od 5%, 1% lub 0,1%.

Odmiany różniły się stężeniami polifenoli. Metodą statystyczną – **analizą skupień** z programu Statistica PL v. 5.5, utworzono grupy odmian istotnie różniące się średnimi stężeniami polifenoli i jednocześnie najbardziej podobne w grupie pod względem stężeń polifenoli.

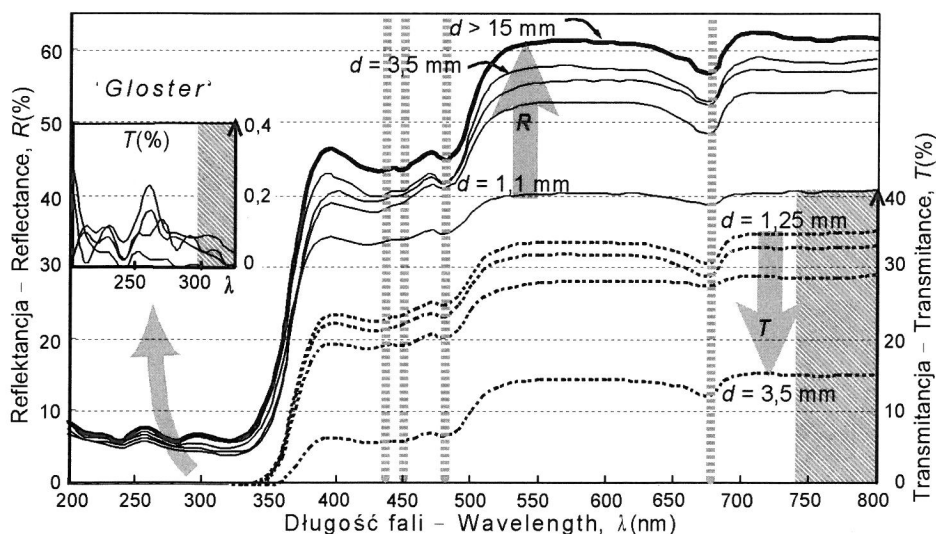
Wystandaryzowano w ramach każdej odmiany pomiary absorbancji świeżo uciętego miąższu – A_0 (wykorzystując średnią i odchylenia standardowe ze wszystkich pomiarów dla odmiany). W ten sposób powstał dla każdej odmiany parametr, absorbancja standaryzowana – A_{0S} , którym scharakteryzowano stan dojrzałości każdej cząstki miąższu z jabłka. Średnia A_{0S} pomiarów wykonanych dla odmiany wynosi zero, a odchylenie standardowe A_{0S} równe jest jeden.

5. WYNIKI POMIARÓW I ICH ANALIZA

W wynikach można wskazać dwa kierunki badań świeżości: poznanie zmienności parametrów mięszu świeżo wyciętego z jabłek i jego zmienności wywołanej brązowieniem enzymatycznym mięszu.

5.1. Charakterystyka spektroskopowa mięszu

Mięsz jabłek scharakteryzowano spektrofotometrycznie w zakresie od 200 do 800 nm w świetle przechodzącym przez próbkę i w świetle odbitym rozproszonym od próbki. Użyto spektrofotometru dwuwiązkowego z kulą, który umożliwia pomiar widma współczynnika przepuszczania – transmitancji próbek półprzezroczystych i współczynnika odbicia rozproszonego – reflektancji.



Rys. 10. Wpływ grubości plastrów – d z mięszu jabłka na widma; współczynnika odbicia (reflektancji) – $R(\%)$ i współczynnika przepuszczania (transmitancji – linie punktowane) – $T(\%)$

Fig. 10. Effect of apple flesh slice thickness – d on reflectance spectra – $R(\%)$ and transmittance spectra (dotted line) – $T(\%)$

Zbadano plastry o grubościach od ok. 1 mm do 20 mm świeżo wycięte z mięszu jabłek. Jako przykład przedstawiono wyniki badań odmiany ‘Gloster’ (rys. 10). Grubsze plastry silniej odbijały w świetle rozproszonym (dyfuzyjnie) i największy współczynnik odbicia rozproszonego (reflektancję) – $R\%$ miały plastry o grubości ponad 15 mm. Również grubsze plastry silniej pochłaniały – miały niższy współczynnik przepuszczania (transmitancję) – $T\%$.

Pasma absorpcji w próbkach miększu są szerokie i charakterystyczne dla materiałów stałych. Wzrost grubości skrawka miększu nie zmienia położenia pasm, ani kształtu widma odbicia i przepuszczania (rys. 10). W obu typach widm (transmitancji i reflektancji) występują te same pasma pochłaniania (absorpcji): pasma chlorofilii (ok. 685 nm i 440 nm), karotenoidów (ok. 450 nm, 480 nm) i w ultrafiolecie zakres silnej absorpcji wielu składników – zwłaszcza aminokwasów i polifenoli.

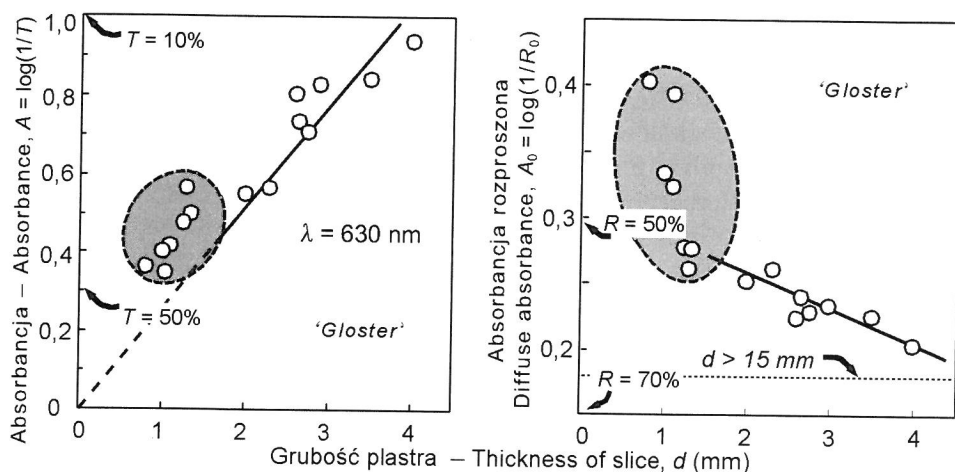
Wysoka czułość spektrofotometrów dwuwiązkowych umożliwia wykonywanie pomiarów także przy bardzo silnej absorpcji w zakresie UV, gdy transmitancja jest rzędu ułamka procenta, a reflektancja mniejsza od 10%. Na rysunku 10 pokazano w dokładniejszej skali transmitancję w zakresie UV.

Zmiany w świetle odbitym od miększu łatwiej jest analizować w jednostkach absorbancji rozproszonej $A = \log(1/R)$, a nie jako reflektancję – R . Absorbancję rozproszoną cechuje lepsza proporcjonalność do stężeń barwników w miększu i jest w tym analogia do pomiarów wykonywanych w świetle przechodzącym przez roztwory. W dalszej części pracy wyniki są przeliczane i przedstawiane w jednostkach absorbancji rozproszonej. Nie będzie także używana funkcja i jednostki Kubelki-Muncka stosowane w technice badania stężeń barwników w cienkich warstwach.

Absorbancja rozproszona – A_0 w zakresie fal od 400 do 800 nm zmienia się od 0,5 do 0,2 Abs dla miększu świeżo wyciętego i występuje nachylenie spadku absorbancji w kierunku fal dłuższych – do 800 nm. W odmianach ‘Jonagold’, ‘Golden Delicious’, ‘Idared’, ‘Szampion’, ‘Gala’ jest bardzo wyraźna, wyższa absorbancja w paśmie 460-500 nm i pochodzi od absorpcji karotenoidów. Bardzo wyraźne wzniesienie w widmie absorbancji w okolicy 680 nm występuje dla odmian ‘Gloster’, ‘Granny Smith’, ‘Bankroft’ i pochodzi od absorpcji chlorofili. Od zakresu fioletu do ultrafioletu wartości absorbancji wzrastają 2-3- krotnie i osiągają wartość od 1 do 1,3 Abs (rys. 19, s. 3).

5.1.1. Zasięg pomiarów absorbancji rozproszonej

Ponieważ podstawowe zastosowanie spektrofotometrii odbiciowej w świetle rozproszonym to pomiary współczynnika odbicia światła od nieprzezroczystych farb i lakierów, dlatego wykonano szczegółowe badania metodyczne na miększu jabłek. Do badań właściwości optycznych miększu, na które może wpływać jego struktura, najodpowiedniejsze są pasma pochłaniania achromatycznego. Stwierdzono, że w miększu zbadanych odmian nie absorbują barwniki konstytutywne w paśmie od ok. 550 do 650 nm (rys. 10). Również produkty enzymatycznego brązowienia pojawiają się tam najpóźniej.



Rys. 11. Wpływ grubości plastra miąższu jabłka – d na wzrost absorbancji w metodzie transmisyjnej – A i spadek absorbancji rozproszonej plastra – $A_0 = \log(1/R)$ w paśmie 630 nm

Fig. 11. Effect of apple flesh thickness – d on increase of absorbance in the transmission – A and on decrease of diffuse absorbance of slice – $A_0 = \log(1/R)$ in 630 nm beam

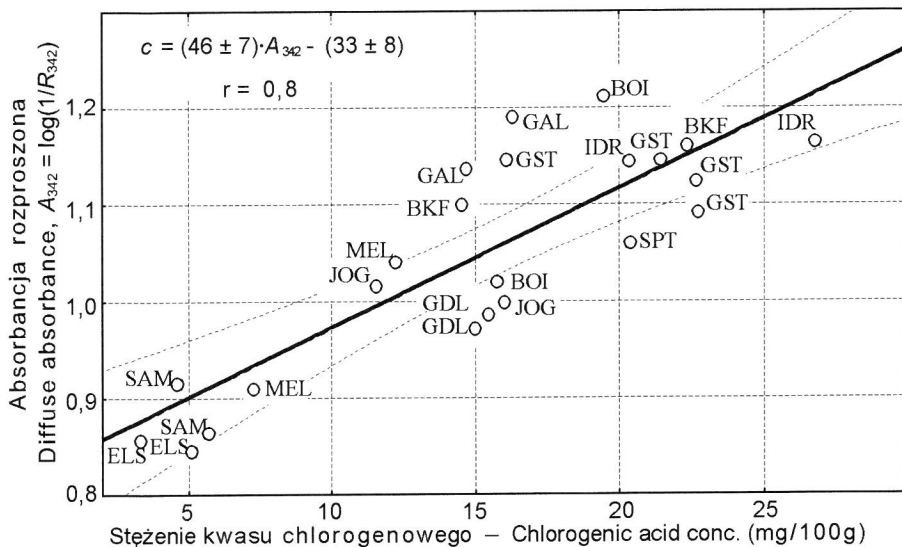
Dla różnej grubości plasterków wyciętych z miąższu jabłek zestawiono wyniki pomiarów absorbancji – A_0 w paśmie 630 nm (rys. 11). Można przyjąć, że zależność absorbancji, określanej w świetle przechodzącym przez miąższ od grubości plastra jest prawie liniowa i zgodna z prawem Lamberta. W szerokim zakresie zmian grubości próbki nie ma liniowej zależności dla transmitancji – natomiast plaster o grubości 1 mm ma transmitancję 50%, a o grubości 4 mm przepuszcza 10% światła padającego

Absorbancja rozproszona – A_0 (pomiaru światła odbitego z wnętrza miąższu) również liniowo maleje wraz ze wzrostem grubości plastra (rys. 11). Wartość najmniejszą osiąga dla próbki grubszej od 15 mm – „całkowicie odbijającej” z wnętrza. Po aproksymacji wyników linią prostą otrzymujemy informację, że już plaster o grubości ponad 4 mm można traktować jako bardzo gruby. Ponadto wiadomo, że przez miąższ na tę głębokość dociera nie więcej niż 10% z natężenia wiązki oświetlającej i jeszcze mniej światła powraca ku powierzchni oświetlonej.

Podczas wycinania, cienkie plastry poniżej 1 mm uszkodzają się, wzrastają w nich przestrzenie międzykomórkowe i wzrasta rozpraszanie światła. W ten sposób można wytłumaczyć (punkty zaznaczone na rys. 11) odstępstwo od liniowego spadku absorbancji cienkich plasterków z miąższu. W pasmach, w których pochłaniają barwniki, natężenie wiązki penetrującej miąższ maleje znacznie szybciej, a więc z analizy spektrofotometrycznej widm w zakresie Vis uzyskuje się informacje nie z powierzchni, lecz z warstwy miąższu, ale nie głębiej niż 4 mm, a gdy absorbancja wzrasta – w zakresie UV, ze znacznie cieńszej warstwy.

5.1.2. Pasmo absorpcji dla kwasu chlorogenowego

Badano widma odbiciowe świeżo wyciętego miąższu jabłek z kilku odmian. Przeanalizowano jednocześnie widma absorbancji dyfuzyjnej w zakresie ultrafioletu i stężenia polifenoli w miąższu, które oznaczono metodą HPLC. Jedynie dla zawartości kwasu chlorogenowego w miąższu uzyskano wysoko istotną korelację liniową z absorbancją rozproszoną – A_0 w szerokim paśmie ok. 342 nm (rys. 12).



Rys. 12. Zmienność absorbancji rozproszonej w paśmie 342 nm – A_{342} świeżo ciętego miąższu jabłek różnych odmian, którą wyjaśniono liniową zależnością od stężenia kwasu chlorogenowego

Fig. 12. Variability of diffuse absorbance in 342 nm – A_{342} of fresh slices of several apple cultivars as explained by linear relation to chlorogenic acid concentration

Zatem zmiany absorbancji rozproszonej miąższu w przedziale 0,4 Abs i w paśmie 342 nm, dobrze wyjaśnia różna zawartość kwasu chlorogenowego (3-25 mg) w 100 g miąższu jabłek różnych odmian.

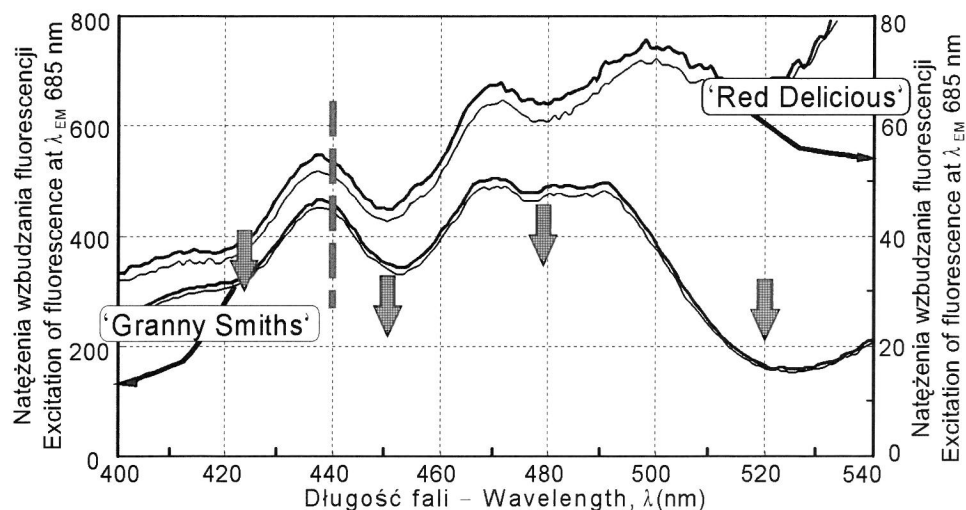
Struktura miąższu w różnym stopniu zmienna, rozprasza światło i zwykle wywołuje przesunięcie całego widma wzdłuż osi absorbancji. Wartości absorbancji, np. w paśmie 630 nm, dobrze różnicują miąższ odmian na ten o dużej i niskiej przepuszczalności optycznej i istotnie korelują z objętością przestrzeni międzykomórkowych w miąższu. Spadek wartości parametru absorbancji rozproszonej zaobserwowano w warstwie bliższej skórki jabłka i od strony jabłka z barwą zasadniczą skórki. Pomimo tak znacznego wpływu zróżnicowania budowy komórkowej w badanych odmianach, otrzymano istotną liniową zależność od zawartości kwasu chlorogenowego. Wyjaśnić to można bardzo dużymi zmianami

w zawartości kwasu chlorogenowego w badanym mięszu, przy jednocześnie niewielkiej stosunkowo głębokości penetracji mięszu przez światło fioletowe, a więc i zmienności rozpraszania.

5.1.3. Fluorescencja mięszu

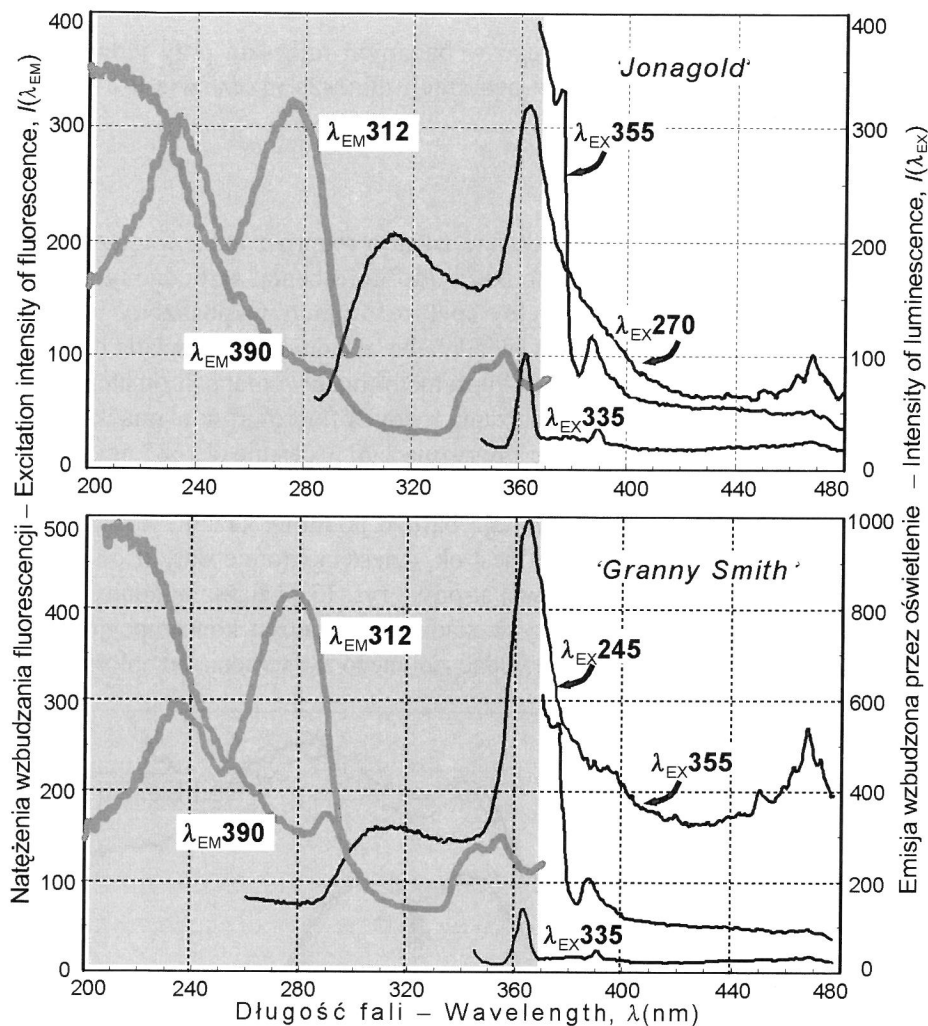
Spektrofotometr odbiciowy rejestruje światło rozproszone z wnętrza próbki, które zawiera także składową pochodzącą od fluorescencji wzbudzonych fluoroforów (np. od chlorofili). Tradycyjny spektrofotometr wyposażony jest tylko w jeden monochromator – dla źródła światła albo układu detekcji światła dochodzącego z próbki. Układ optyczny spektroforymetru ma dwa monochromatory. Układ ten umożliwia poznanie widma wzbudzania różnych fluoroforów w mięszu, a najprościej jest to wzbudzanie chlorofilu fluoryzującego w paśmie ok. 685 nm.

Widma wzbudzania emisji w paśmie 685 nm otrzymane dla świeżo uciętego mięszu z dwóch odmian (rys. 13) mają bardzo podobny kształt, jednak widmo wzbudzania odmiany ‘Red Delicious’ jest ok. dziesięciokrotnie słabsze od odmiany ‘Granny Smith’ (skala z lewej i prawej strony – rys. 13). Mięsz odmiany ‘Granny Smith’ pozostaje dość długo zielony w stadium dojrzałości konsumpcyjnej, natomiast w mięszu ‘Red Delicious’ nie widać zielonego zabarwienia od chlorofilu.



Rys. 13. Widma wzbudzania fluorescencji chlorofilu w paśmie 685 nm otrzymane dla odmiany ‘Red Delicious’ i ‘Granny Smith’ (linie grube) i ich przesunięcie po 6 min od ucięcia mięszu jabłka (linie cienkie)

Fig. 13. Excitation spectra of chlorophyll at band 685 nm and registered for apple flesh of ‘Red Delicious’ and ‘Granny Smith’ cultivars (bold lines) after 6 minutes from slicing (thin lines)



Rys. 14. Widma wzbudzenia fluoroforów w pasmach 312 i 390 nm (linie grube), jak również widma emisji (fluorescencja wzbudzane w pasmach 245, 270, 335 i 355 nm – linie cienkie), na których zaobserwowano cztery piki wyświecania 310, 365, 385, 470 nm dla miąższu jabłek odmiany 'Jonagold' i 'Granny Smith'

Fig. 14. Excitation spectra of fluorophores in 312 and 390 nm (bold line) and fluorescence spectra (excitation in 245, 270, 335 and 355 nm) with four detected peaks of luminescence in 310, 365, 385, 470 nm registered for apple flesh of 'Jonagold' and 'Granny Smith' cultivars

W widmach wzbudzenia chlorofilu, silne pasma ukształtowane są od 430 do 510 nm, a przedzielone są dolinami pochłaniania osłonowego: antocyjanów (pasmo 520 nm) i karotenoidów (pasma 450 nm i 480 nm). Wyraźnie widać, że w paśmie ok. 440 nm bardzo efektywne jest wzbudzenie chlorofilu. Wzbudzenie tego

miąższu po 6 min od odcięcia plastra (linia cieńsza) jest nieznacznie mniej efektywne. Może to świadczyć o częściowym rozpadzie chlorofilu w warstwie powierzchniowej miąższu.

Miąższ scharakteryzowano fluorymetrycznie również w zakresie ultrafioletu (szary obszar na rys. 14). Zarejestrowano widma wzbudzania (rys. 14 grubsze linie) dla dwóch fluoroforów, które świecą w pasmach 312 i 390 nm. Charakterystyczne jest widmo wzbudzania fluoroforu $\lambda_{EM} = 312$ nm, które ma piki przedzielone doliną absorpcji 250 nm. Natomiast w widmie wzbudzania fluoroforu $\lambda_{EM} = 390$ nm widać dwie doliny 320 nm i 360 nm dobrze znanej absorpcji pFCC – produktów rozpadu chlorofilu, a także nieokreśloną absorpcję w paśmie 280 nm.

Widma emisji fluoroforów (rys. 14 linie cieńsze) otrzymano, wzbudzając miąższ światłem z wybranych pasm $\lambda_{EX} = 245, 270, 335$ nm. Uzyskano charakterystyczną, silniejszą emisję przy 310, 365, 385 nm. Także wystąpiła ostra emisję przy ok. 470 nm poprzez wzbudzenie pasmem $\lambda_{EX} = 355$ nm i 385 nm znana jako produkty rozpadu chlorofili. Porównano natężenia emisji wzbudzonej oświetleniem $\lambda_{EX} = 355$ nm. Odmiana ‘Granny Smith’ świeciła ok. 4-krotnie silniej niż ‘Jonagold’ (skala z prawej rys. 14).

Widma wzbudzania fluoroforów w miąższu naśladują kształtem – omawiane widma absorbancji rozproszonej. W spektrofotometrze inne są jednak warunki oświetlenia próbek i detekcji światła (światło rozproszone). Fluorymetrycznie trudniej jest wykonać pomiary ilościowe stężeń fluoroforów m. in. w sposób powtarzalny ustawiać wiązkę światła padającego na próbkę miąższu.

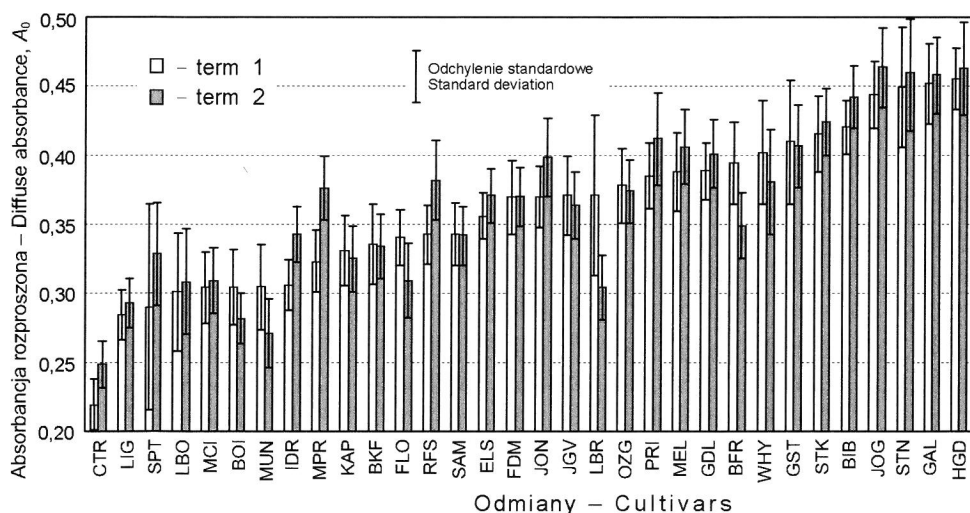
5.2. Zmienność świeżo wyciętego miąższu

Biała barwa miąższu ukształtowana jest przez rozpraszanie światła na strukturze komórkowej, pochłanianie przez barwniki konstytutywne i barwniki procesu brązowienia [71,159]. Białą barwę wielu materiałów technicznych charakteryzuje się ich absorbancją w rejonie fioletu. Do oceny białości świeżo wyciętego miąższu, a także do porównywania zmian wywołanych brązowieniem w zakresie widzialnym wygodne jest wybranie pasma 440 nm. Jego wybór uzasadnia kilka ważnych, zaobserwowanych elementów. Pasma 440 nm to maksimum na krzywej trójkromatycznej składowej Z, która odpowiada bodźcowi fioletowo-niebieskiemu w kolorymetrii trójkromatycznej. Dlatego nawet proste spektrokolorymetry mają w tym paśmie wystarczającą dokładność i czułość. Pasma to jest bliskie maksimum absorpcji roztworów z barwnikami enzymatycznego brązowienia, a także jak stwierdzono, efektywnie wzbudza fluorescencję chlorofilu w miąższu (rozdz. 5.1.3. s. 3). Ponadto Kuczyński, Varoquaux i in. [114,115] wykorzystali to pasmo i wykonali pomiary brązowienia miąższu, odnieśli te wyniki do ocen organoleptycznych. Pomimo że wyniki te mogły być specyficzne dla badanej

technologii i zbadanych odmian, utworzyły pierwszą skalę świeżości bardzo przydatną w aparaturowej ocenie miąższu.

Absorpcja rozproszona – A_0 świeżo wyciętego miąższu przy 440 nm zmienia się w szerokich granicach od 0,2 do 0,5 Abs (rys. 15). Rozstęp jest bardzo duży i wynosi 0,3 Abs. Odmiany można rozdzielić na białe, gdy $A_0 < 0,3$ Abs, których miąższ absorbuje słabo i ciemne, gdy $A_0 > 0,4$ Abs absorbujące silnie [96]. Najniższe wartości średnie absorbancji rozproszonej otrzymano dla odmian CTR, SPT, LBO, BOI, LIG, MUN i MCI. Odpowiada to wrażeniu białego miąższu i jego opis pomologiczny zawiera określenia różnego stopnia białości barwy: czysto biały, lekko żółty, biały wpadający w kremowy. Najsilniej absorbuje miąższ z odmian GAL, HGD, JOG, STN i BIB. W opisie pomologicznym ich miąższu występują zdecydowane określenia barwy, jak: żółta, kremowa, zielona.

Naturalna zmienność absorbancji rozproszonej miąższu – A_0 w ramach odmiany wynosi od 0,03 do 0,15 Abs, a więc często przekracza 0,04 Abs – limit rozróżnialności dla barwy cząstek. Można więc często znaleźć świeżo wycięte cząstki z jabłka, które wzrokowo różnią się w tej samej próbie. Nie należy zapominać, że silne zróżnicowanie parametru absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm, to nie tylko efekt pochłaniania światła przez tkankę wypełnioną różnymi barwnikami, np. karotenoidami, chlorofilami i barwnikami brązowymi, ale także efekt zróżnicowanego rozpraszania światła na strukturze komórkowej z przestrzeniami powietrznymi.

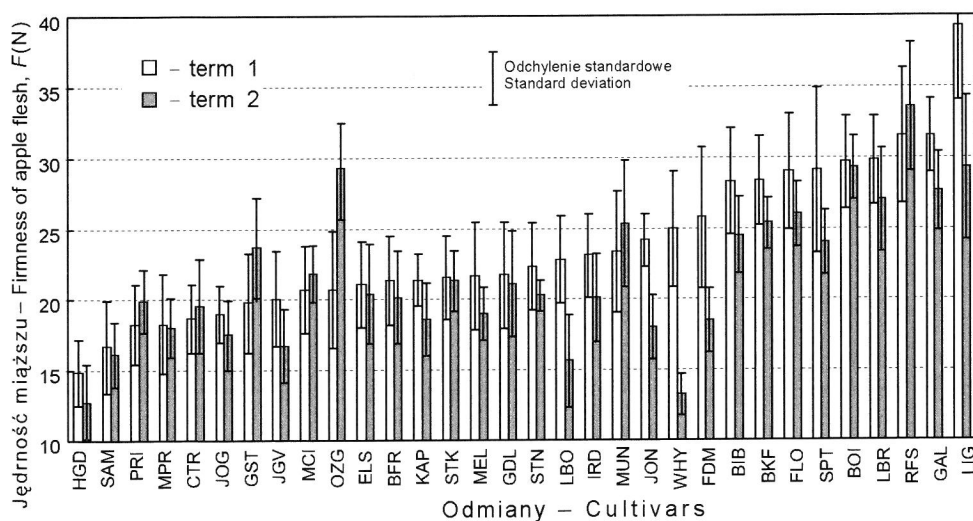


Rys. 15. Absorbancja rozproszona – A_0 miąższu cząstek z jabłek ciętych w powietrzu po dwóch okresach przechowywania jabłek (term 1, term 2)

Fig. 15. Diffuse absorbance – A_0 of flesh wedges of several apple cultivars sliced in air, after two periods of storage (term 1, term 2)

Zbadano miąższ cząstek wyciętych z jabłek, które były przechowywane przez dwa różne okresy. Wiadomo, że długotrwałe przechowywanie i przejrzenie jabłek indukuje powstawanie w komórkach brązowych barwników. Dla większości odmian stwierdzono wzrost absorbancji rozproszonej – A_0 miąższu z jabłek, które dłużej przechowywano (rys. 15). Można wskazać także drugą przyczynę, z powodu której absorbancja świeżo wyciętego miąższu wzrosła w paśmie 440 nm. Kuczyński i Varoquaux [114] zwrócili już uwagę na spadek absorbancji w paśmie 685 nm w szybko przejrzejacym miąższu cząstek jabłek. Spowodowane jest to spadkiem zawartości chlorofilu. Miąższ zawierający mniej chlorofilu powinien także słabiej fluoryzować, jak to już wykazano (rozdz. 5.1.3. s. 3) poprzez wzbudzenie fluorescencji pasmem 440 nm. Wyniki wskazują więc na to, że parametr – A_0 może być dobrą miarą przejrzenia owoców w stanie dojrzałości konsumpcyjnej.

Wydawałoby się, że jędrność miąższu (rys. 16) lub zawartość ekstraktu niewiele mają wspólnego z brązowieniem ciętego miąższu, gdyż dotyczą odrębnych właściwości tkanki (np. w badanych odmianach). Jednak cięcie jest procesem mechanicznym i Kuczyński [95] wskazywał na wpływ parametrów mechanicznych miąższu na oceny skłonności odmian do brązowienia. Ponadto oba parametry są niezwykle ważne w charakterystyce przechowalniczej jabłek – ocenie ich stanu dojrzałości, ocenie organoleptycznej świeżości, a także związane z kondycją biochemiczną przechowywanych jabłek.



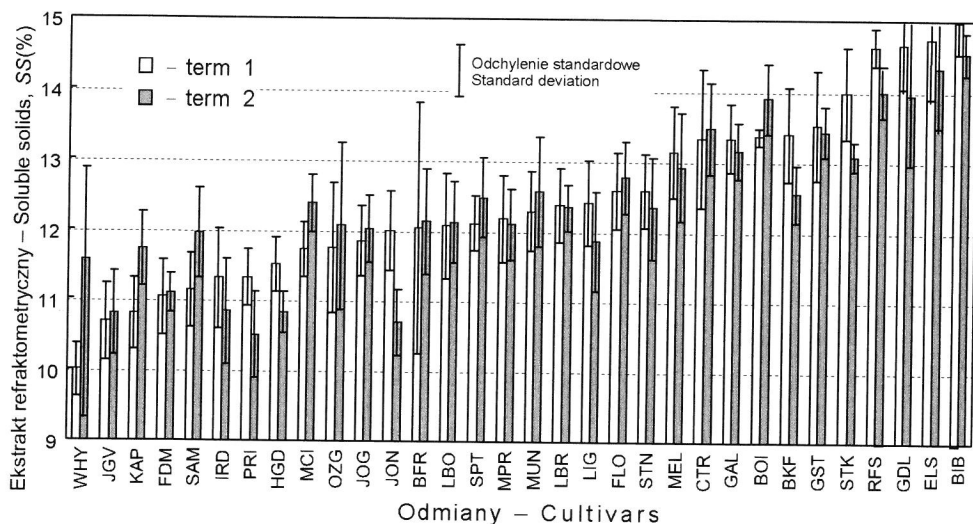
Rys. 16. Jędrność (przebijak płaski średnicy 7,9 mm) – F miąższu cząstek z jabłek po dwóch okresach przechowywania jabłek (term 1 i term 2)

Fig. 16. Firmness of apple flesh wedge – F (flat penetrometer 7,9 mm dia) in relation to storage time (term 1, term 2) and cultivars

Jędrność cząstek z jabłek – F w stadium dojrzałości konsumpcyjnej (rys. 16) zmieniała się w szerokim zakresie od 10 N do ponad 40 N (wg metody rozdz. 4.2.5. s. 3). Na tej podstawie cząstki z jabłek można umownie dzielić na bardziej jędrne ($F > 30$ N), takie jak wykrojone z odmian: ‘Ligol’, ‘Florina’, ‘Red Fireside’, ‘Boiken’, ‘Liberty’ i o mniejszej jędrności ($F < 20$ N), jak cząstki z odmian ‘Prima’, ‘Lobo’, ‘Wealthy’, ‘James Grieve’.

Zawartość ekstraktu – SS w cząstkach wyciętych z jabłek znajdujących się w stanie dojrzałości konsumpcyjnej (rys. 17) była silnie zróżnicowana dla odmian. Niższe wartości średnie od 11% miały odmiany: ‘Wealthy’, ‘James Grieve’, ‘Prima’, ‘Friedom’, ‘Król Albrecht Pruski’, a średnie wyższe od 14% ‘Billing Boskoop’, ‘Elstar’, ‘Golden Delicious’, ‘Red Fireside’, ‘Boiken’.

Stwierdzono generalnie niższą jędrność cząstek (rys. 16) i niższą zawartość ekstraktu (rys. 17), gdy wycięto je z jabłek po dłuższym okresie przechowywania (term 2). Jednak w kilkunastu przypadkach wystąpiły efekty odwrotne. Wydaje się, że wpływ kondycjonowania i doprowadzenia jabłek do stanu dojrzałości konsumpcyjnej po wyjęciu z chłodni mógł być decydujący, gdy tak często przeważał nad zmianami wywołanymi dłuższym przechowywaniem jabłek i obniżył jędrność. Podobnie jest z zawartością ekstraktu w jabłkach, która dla niektórych odmian spadała lub znacząco wzrastała, co świadczyłoby o przejrzywaniu owoców z wykorzystaniem cukrów lub o upłynnieniu pewnych substancji (np. pektyn).



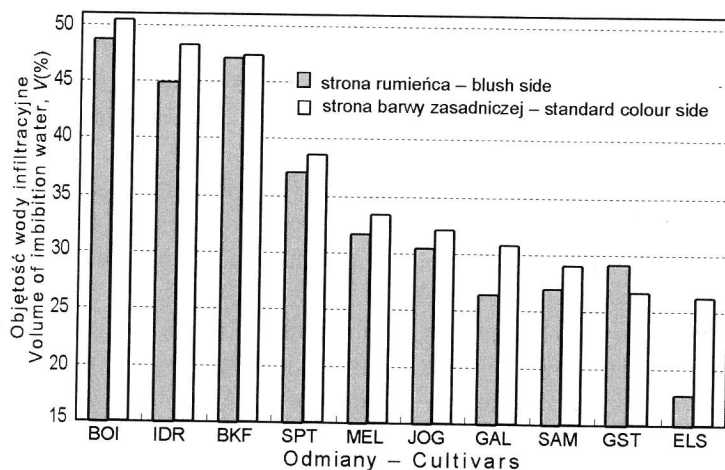
Rys. 17. Zawartość ekstraktu w jabłkach – SS po dwóch okresach przechowywania jabłek (term 1 i term 2)

Fig. 17. Soluble solids (TSSs – °Brix) of apple juice – SS in relation to storage time (term 1, term 2) and cultivars

Zestawienie wartości średnich parametru jędrności miąższu i zawartość ekstraktu potwierdza jedynie to, że owoce z dwóch okresów przechowywania jabłek różniły się jakością. Oceniając jakość owoców użytych do wykonania cząstek z jabłek na podstawie ich jędrności, należy stwierdzić, że miąższ ich był dość miękki w porównaniu z jędrnością oczekiwaną od owoców handlowych [187]. Nie jest to zaskakujące, gdyż cięto na cząstki owoce w stanie dojrzałości konsumpcyjnej, a nie owoce handlowe. Podsumowując analizy trzech parametrów miąższu Kuczyński [95] stwierdził, że nowy parametr, absorbancja rozproszona – A_0 , ma większą zmienność niż tradycyjna jędrność – F i zawartość ekstraktu – SS .

Tlen jest jednym z głównych substratów w reakcji ciemnienia enzymatycznego uszkodzonej tkanki jabłek. Poprzez przestrzenie międzykomórkowe w jabłku zachodzi proces wymiany gazowej i to umożliwia oddychanie żywych komórek miąższu. Odpowietrzanie jabłek lub wypełnianie go gazami obojętnymi to metody proponowane przy ograniczaniu strat cennych substancji w produkcji mętnych soków. Materiał do badań stanowiły owoce jabłoni, po długim okresie dojrzewania w komorze chłodniczej i kondycjonowane do dojrzałości konsumpcyjnej.

Objętość przestrzeni międzykomórkowych wyznaczono metodą infiltracji próżniowej w jabłkach pociętych na kostkę i podano ją jako względny przyrost masy miąższu po wypełnieniu go wodą (rys. 18). Wybrane odmiany istotnie różniły się objętością przestrzeni międzykomórkowych. Wyznaczona „bardzo drastyczną” metodą, zmieniała się od 50% (odmiany ‘Boiken’, ‘Idared’, ‘Bankroft’) do 20% (odmiana ‘Elstar’). Wyższe wartości (o 3-8%) uzyskano dla miąższu owoców w dojrzałości konsumpcyjnej, lecz o słabszym wybarwieniu.



Rys. 18. Oszacowana objętość przestrzeni międzykomórkowych – V w miąższu jabłka od strony z barwą podstawową i od strony jabłek z rumieńcem dla kilku odmian

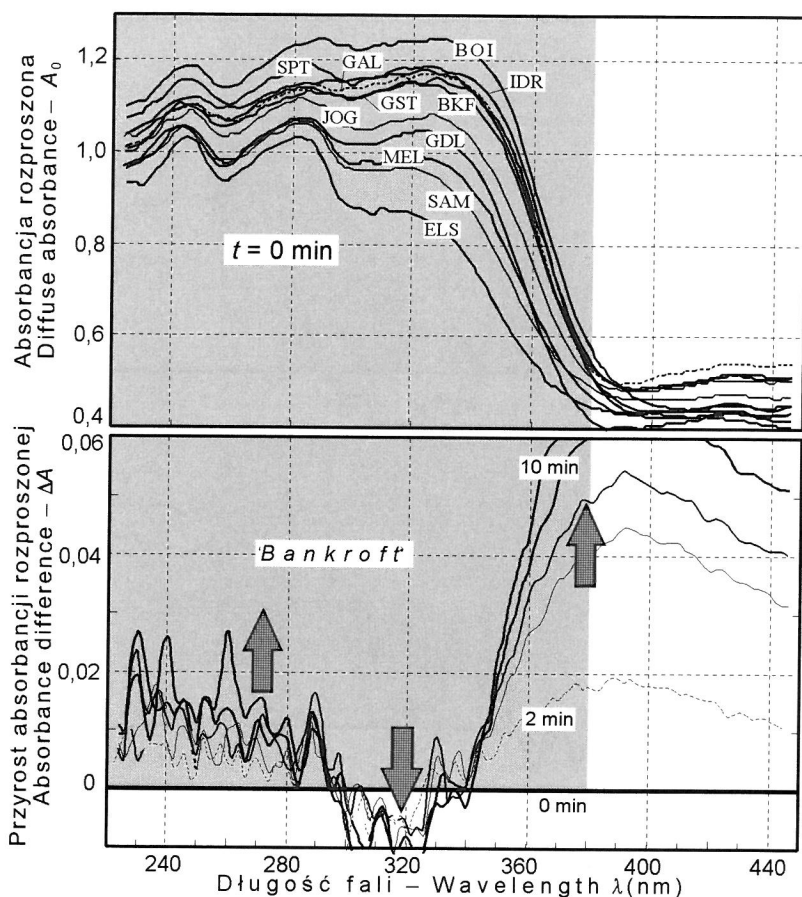
Fig. 18. Estimated volume of intercellular spaces – V in apple flesh on the standard colour side and the blush side of apples of several cultivars

Obliczono korelacje objętości przestrzeni międzykomórkowych z innymi parametrami mięszu i wykonano to na średnich odmianowych niezależnie dla grupy owoców z silnym lub słabym rumieńcem. Otrzymano istotne i dodatnie korelacje objętości przestrzeni międzykomórkowych z absorbancją rozproszoną cząstek – A_0 (pasmo 440 nm), z przyrostem absorbancji po 32 min cząstek ciętych w powietrzu – ΔA , a także z przyrostem po 64 min cząstek ciętych pod wodą. Ponadto w grupie owoców słabiej wybarwionych uzyskano istotną i dodatnią korelację objętości przestrzeni międzykomórkowych z jędrnością owoców. Obliczono również korelacje objętości przestrzeni międzykomórkowych z zawartością polifenoli (rys. 42, s. 3). Otrzymano istotne korelacje objętości przestrzeni międzykomórkowych z zawartością ksyloglukozyd floretyny, lecz jedynie w grupie owoców z rumieńcem otrzymano istotną i dodatnią korelację ze stężeniem kwasu chlorogenowego. Następne badania istotności korelacji wielu parametrów rozszerzono na całe widma UV-Vis przyrostu absorbancji rozproszonej – ΔA , a wyniki analizy przedstawiają rysunki 26 i 27 (s. 3).

5.3. Widma brązowienia mięszu

Mechanicznym uszkodzeniem uruchamiano bardzo szybko (w normalnych warunkach otoczenia) reakcję enzymatycznego brązowienia mięszu. Widma przyrostu absorbancji rozproszonej (widma różnicowe) – ΔA , które były czasowo rozdzielone, otrzymano w świetle odbitym i rozproszonym przez miąższ. Są one źródłem informacji o zmianach zachodzących w mięszu. Widmem odniesienia jest widmo mięszu świeżo odciętego. Pomiary pozwalają na wnioskowanie o następstwach czasowych badanej reakcji. Oczywiście konieczne jest, aby czas pomiędzy uszkodzeniem a pierwszym pomiarem widma był znacznie krótszy od czasu skanowania widma. Również pasmo i całkowity czas pomiaru powinien być dostosowany do celu tych badań.

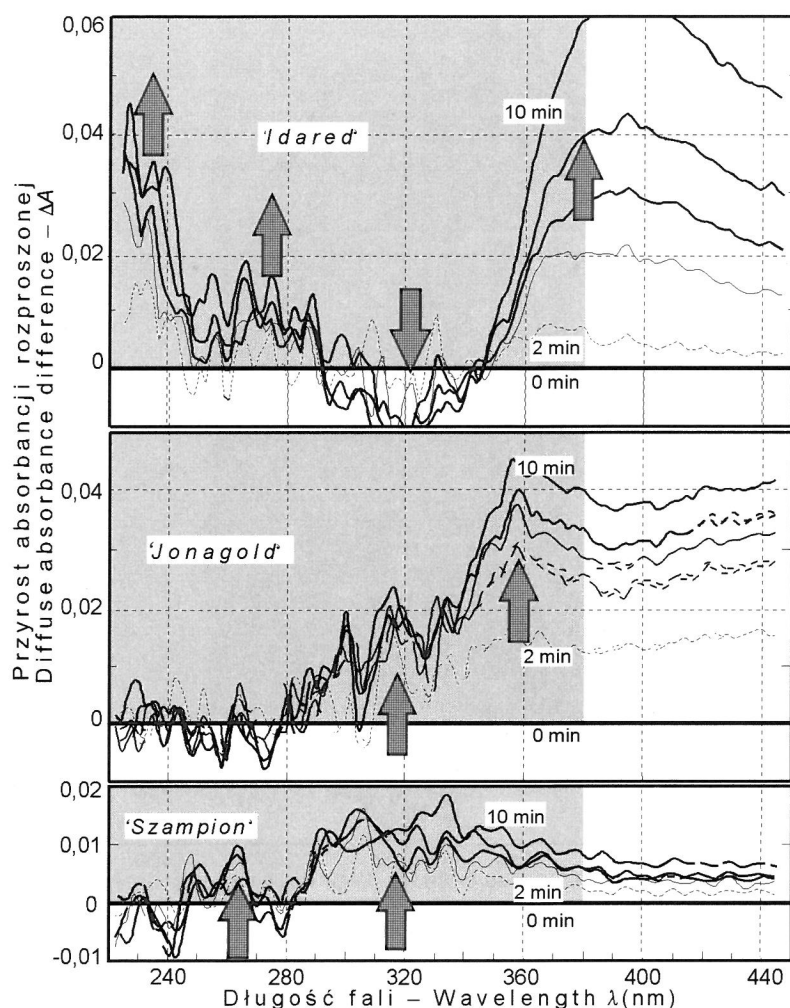
Kuczyński [103] ustalił, że po czasie 6-10 min w normalnych warunkach otoczenia można zaobserwować zmiany w widmach zakresu widzialnego, które są wywołane brązowieniem i tworzonymi polimerami melaninowymi. Natomiast w znacznie krótszym czasie, lecz tylko w zakresie ultrafioletu mogą być analizowane zmiany zawartości produktów i substratów polifenolowych tej reakcji. Na podstawie tych badań powstały dwa warianty, kinetycznego opisu procesu brązowienia opisywane dalej. Zbadano je w zależności od odmiany, stadium dojrzałości, warunków i techniki cięcia. Określono również związek kinetyki brązowienia z innymi charakterystykami mięszu, np. oznaczonymi chemicznie stężeniami polifenoli, potencjałem elektrodowym redoks, objętością przestrzeni międzykomórkowych i jędrnością. Dotychczas jedynie w zakresie widzialnym poszukiwano zależności i głównie wykorzystywano współrzędne barwometryczne L^* , a^* , b^* .



Rys. 19. Widma absorbancji rozproszonej – A_0 miąższu jabłek kilku odmian po wycięciu plastra i zmiany widm UV-Vis przyrostu absorbancji rozproszonej – ΔA zarejestrowane w odstępach dwuminiutowych dla miąższu szybko brązowiejącego 'Bankroft' w 18-20°C

Fig. 19. Diffuse absorbance spectra of apple flesh for cultivars immediately after flesh cutting – A_0 and evolution of UV-visible absorbance spectra of differences – ΔA for rapidly browning flesh of cultivar 'Bankroft' recorded at 2-minute intervals during incubation at 18-20°C

Dążąc do poznania zróżnicowania kinetyki brązowienia, przeanalizowano widma miąższu bardzo licznej grupy odmian. W górnej części rysunku 19 zestawiono widma absorbancji rozproszonej miąższu – A_0 (uzyskane techniką odbicia światła rozproszonego ze spektrofotometru dwuwiązkowego) natychmiast po odcięciu miąższu. Widma świeżo odciętego miąższu są do siebie bardzo podobne kształtem w zakresie UV (szary obszar na rys. 19) ze względu na bardzo silne pochłanianie światła dla fal krótszych od 350 nm. Jednak, jak wcześniej stwierdzono (rozdz. 5.1.2. s. 3), zmiany widma w paśmie 342 nm są m.in. skorelowane ze stężeniami kwasu chlorogenowego.



Rys. 20. Trzy charakterystyczne typy zmian w widmach przyrostu absorbancji rozproszonej – ΔA zarejestrowane w odstępach dwuminutowych podczas brązowienia miąższu w 18-20°C

Fig. 20. Three characteristic types of evolution of UV-visible diffuse absorbance spectra of differences – ΔA recorded at 2-minute intervals in the course of apple flesh browning at 18-20°C

Widma przyrostu absorbancji rozproszonej (widma różnicowe) – ΔA miąższu są bardziej złożone niż widma absorbancji – A_0 w zakresie ultrafioletu. Zmieniają się bardzo szybko (w normalnych warunkach otoczenia) w wyniku reakcji enzymatycznego brązowienia. Z badań modelowych na ekstraktach i sokach z jabłek wiadomo, że z polifenoli powstają produkty, które absorbują w zakresie ultrafioletu i fioletu. Na tej podstawie można by uznać już, że spadek lub wzrost absorbancji rozproszonej miąższu w szczególnych pasmach widma wywołany jest przez

udział w reakcji utleniania enzymatycznego substratów polifenolowych zawartych mięszu. Ponieważ zbadane odmiany jabłek zdecydowanie różnią się stężeniami polifenoli (dane na rys. 42. s. 3) można przypuszczać, że po różnym czasie brązowienia zmiany dotyczą innych pasm widma (rys. 20).

Cztery typy widm różnicowych – ΔA wyłoniła, spośród wielu zbadanych widm dla odmian, analiza statystyczna podobieństw. Uwzględnione zostały w tej analizie podobieństwa czasowe lub charakterystyczny kształt w kilku pasmach widma. W dolnej części rysunku 19 i na rysunku 20 przedstawiono (jako odniesienie do górnej części rysunku 19) charakterystyczne widma różnicowe absorpcji rozproszonej dla brązowiejącego mięszu. Obliczone widma różnicowe przedstawiają zmiany po kolejnych 2 min aż do 10 min od chwili odcięcia mięszu dla odmian: 'Bankroft' (BKF), 'Idared' (IDR), 'Jonagold' (JOG) i 'Szampion' (SAM). Jest to zestaw widm różnicowych czasowo rozdzielonych.

W pracy tej stwierdzono, że brązowienie enzymatyczne startuje natychmiast po przecięciu mięszu u każdej odmiany. Jednak zmiany te nie mogą być obserwowane wzrokowo, gdyż najwcześniejsza aktywność występuje tylko w niewidzialnym fiolecie. Dopiero po 4 min brązowienia (pasmo 440 nm) przyrost absorpcji w zakresie widzialnym przekracza 0,04 Abs dla odmiany 'Bankroft', a dla odmiany 'Idared' potrzeba na to 8 min [107].

W widmach przyrostu absorpcji rozproszonej ΔA otrzymanych dla mięszu typu odmiany 'Bankroft' widoczny jest znaczny i bardzo szybki wzrost przy ok. 390 nm, natomiast spadek absorpcji w ultrafiolecie od 310 do 350 nm i wzrost w paśmie 260-280 nm. Najszybciej można wzrokowo zauważyć brązowienie odmiany 'Bankroft' i tak szybkie zmiany poznane zostały w studiach nad modelowymi roztworami kwasu chlorogenowego z dodatkiem katechiny lub wprost nad ekstraktami z jabłek. Również charakterystyczny jest dla nich bardzo szybki wzrost absorpcji w widzialnym fiolecie. W przypadku mięszu wywołany może on być przyspieszonym utlenianiem epikatechiny, poprzez mechanizm nieenzymatycznego utleniania, który sprzężony jest z utlenianiem kwasu chlorogenowego. W reakcji tej powstałe na drodze enzymatycznej chinony kwasu chlorogenowego utleniają inne fenole, a stałemu odtwarzaniu ulega kwas chlorogenowy. Również podobne jest utlenianie procyjanidyn, ksyloglukozyd floretyny, także sprzężone z utlenianiem kwasu chlorogenowego, prowadzi do związków silnie absorbujących w fiolecie.

W drugiej grupie widm różnicowych, takich jak dla mięszu odmiany 'Idared', zmiany są podobne jak w 'Bankroft', lecz obserwuje się ponadto silny wzrost absorpcji w UV poniżej 240 nm.

Grupę trzecią i czwartą reprezentują odmiany 'Szampion' i 'Jonagold'. Cechuje je jedynie wzrost absorpcji, lecz prawie niewidoczny ludzkim okiem, bo głównie w zakresie UV. Nie ma u nich charakterystycznego, tak jak dla typu 'Bankroft' i 'Idared', spadku absorpcji w paśmie 310-350 nm lub jej wzrostu

w dalekim UV. W grupie, jak dla odmiany 'Jonagold', najszybszy przyrost absorbancji występuje w paśmie 360 nm, a nie typowo w paśmie 390 nm. Ponadto dla odmian grupy, takiej jak odmiana 'Szampion', jest większy przyrost absorbancji w paśmie 340 nm i 260 nm niż w zakresie widzialnym w ciągu 10 min.

Zmiany w widmach grupy trzeciej i czwartej można próbować wyjaśniać wolniejszym utlenianiem epikatechiny z niedomiarem lub dłużej związanym kwasem chlorogenowym, który jest pośrednikiem w utlenianiu sprzężonym. W tych złożonych układach biologicznych można by jednocześnie wskazywać na wiele pasm. Mogą to być pasma epikatechiny sygnalizujące utlenianie ostrym wzrostem absorbancji ok. 275 nm i w szerokim paśmie 320-350 nm, a także na pasma utleniania kwasu chlorogenowego z charakterystycznym spadkiem absorbancji ok. 325 nm i z punktami izobestycznymi ok. 275 nm i 375 nm. Informacje o takich charakterystycznych pasmach utleniania znane są jedynie z badań roztworów modelowych, a zupełnie nieznane z badań miąższu jabłek.

Zaobserwowano wyraźny wpływ stadium dojrzałości owocu na widma różnicowe miąższu. U mniej dojrzałych owoców odmiany 'Jonagold' w widmach różnicowych występują podobne cechy, jak w pierwszej grupie odmian typu 'Bankroft'. Następuje spadek absorbancji w zakresie ultrafioletu, zwykle jednak wzrost w zakresie widzialnym jest słabszy. Może to wynikać ze znacznie wyższej zawartości kwasu chlorogenowego w stosunku do pozostałych polifenoli w owocach mniej dojrzałych.

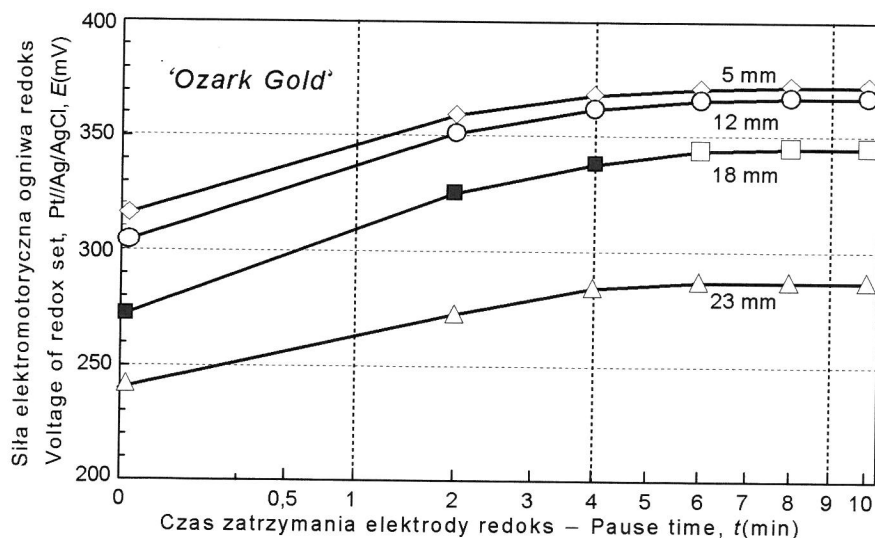
Wspólną cechą widm różnicowych otrzymywanych z miąższu (rys. 20) jest wzrost absorbancji rozproszonej w zakresie widzialnym – powyżej 360 nm, lecz z bardzo różną szybkością. Ten wzrost absorbancji przenosi się do fal coraz dłuższych – niebieskiej części widma i charakterystyczne jest to dla wszystkich odmian brązowiejących. W zakresie UV spada albo rośnie absorbancja dyfuzyjna podczas brązowienia. Zapewne dwie klasy składników chemicznych biorą udział w ciemnieniu miąższu tych jabłek. Szybkie wystąpienie widzialnych efektów brązowienia jest uwarunkowane, jak można sądzić, nadmiarem powstających chinonów kwasu chlorogenowego (lub orto-dwufenoli) utlenianych z udziałem PPO i dostępnością drugiej klasy fenoli (np. flawonoidów) do etapu chemicznego brązowienia. W ten sposób można proces brązowienia miąższu uznać za zgodny z propozycją i wynikami badań modelowych na roztworach, w których zapewniono dużą aktywność enzymu PPO i dokładnie znany skład polifenolowy.

Widma absorbancji rozproszonej (czasowo rozdzielone) Kuczyński [103] wykorzystał do bardziej szczegółowych analiz chemometrycznych substratów fenolowych. Pasma w widmach przyrostu absorbancji są szerokie i nakładają się, pomimo że związane są ze zmianami substratów i produktów. Metoda chemometryczna bierze pod uwagę nie tylko widma, lecz także czas brązowienia. Umożliwia to dokładniejsze porównanie widm ze stężeniami substratów polifenolowych

w miąższu, skuteczniej niż opisana, prosta analiza czterech typów widm brązowienia. Dopiero po długim czasie reakcji, barwniki brązowe przereagują z innymi dostępnymi substratami (m.in. z aminokwasami) i utworzą silnie spolimeryzowane barwniki melaninowe, najsilniej absorbujące w widzialnym fiolecie (rys. 19).

5.4. Potencjał elektrody redoks i brązowienie

Po wbiciu elektrody z platynowym zakończeniem w miąższ jabłka, pozostawiano ją nieruchomo przez 10 min. Rejestrowano zmiany siły elektromotorycznej ogniwa – SEM w miejscu uszkodzenia komórek (rys. 21). Potencjał elektrody redoks nie był stały, lecz wzrastał początkowo gwałtownie i w zróżnicowany sposób dla odmian. Rysunek 21 przedstawia zmiany SEM (na osi odciętych) w zależności od pierwiastka z czasu – t , żeby pokazać najprostszą linearyzację początkowego wzrostu SEM do $t = 0$ min. Średnio dla odmian, zróżnicowanie początkowej szybkości wynosiło od $7,5 \text{ mV} \cdot \text{min}^{-1}$ ('Starkrimson') do $37 \text{ mV} \cdot \text{min}^{-1}$ ('Beforest'). Obliczony potencjał elektrody redoks w chwili wbicia w miąższ nazwano „redoks wbicia” – E_0 . Po ok. 10 min potencjał elektrody redoks przyjmował stałe wartości, które nazwano potencjałem „redoks wysycenia” – E_f na elektrodzie.

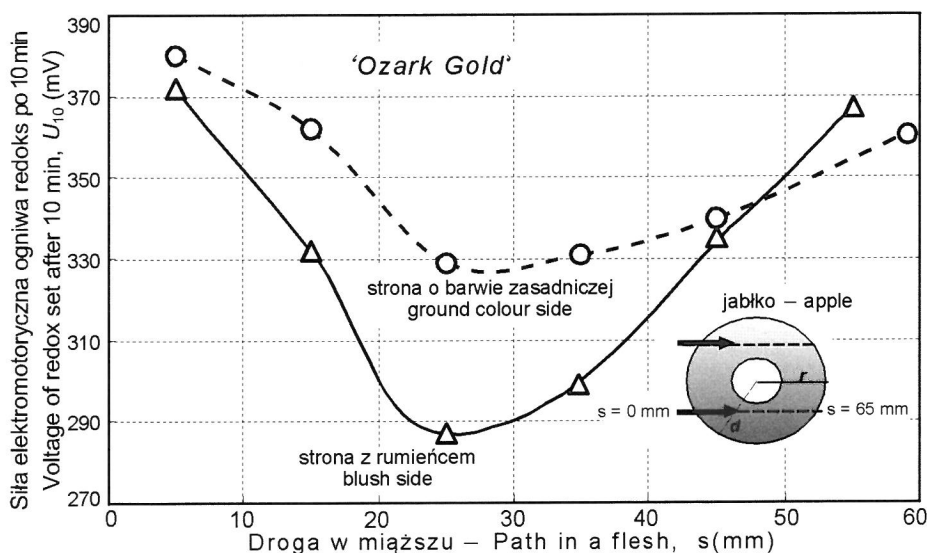


Rys. 21. Zmiana potencjału elektrody redoks (SEM ogniwa) w czasie od chwili uszkodzenia miąższu jabłka przez elektrodę redoks aż do wysycenia na elektrodzie. Wartości zarejestrowane na różnych głębokościach w jabłku 5-23 mm

Fig. 21. Time-course of redox electrode potential (the cell electromotance) after disruption of flesh by redox electrode insertion until sill potential on electrode, recorded at various depths in apple flesh 5-23 mm

Elektrodą redoks, która jest czuła jedynie na zakończeniu z platyną, można również zbadać anizotropowość budowy jabłka. Przepychano ją i zatrzymywano w jabłku po stronie barwy zasadniczej, a także po przeciwnej z „rumieńcem”. Rysunek 22 przedstawia typowe wyniki pomiarów SEM ogniwa po wysyceniu na elektrodzie w jabłkach odmiany ‘Ozark Gold’ i w różnej odległości – s od punktu wbicia w skórę na obu stronach wybarwienia jabłka.

Pod skórą otrzymywano najwyższe wartości potencjału redoks. Im dalej od skórki i głębiej znajdowało się platynowe zakończenie, tym niższe zarejestrowano wartości. Przeciętny spadek redoks z głębokością wynosił od $0,3 \text{ mV} \cdot \text{mm}^{-1}$ dla odmiany ‘Starkrimson’ i ‘Boiken’, a osiągał $4,9 \text{ mV} \cdot \text{mm}^{-1}$ dla odmiany ‘Jonagold’. Odmiany, które miały niską zawartość ekstraktu wykazały silniejszy spadek potencjału redoks wraz z zagłębianiem elektrody w jabłko. Zaobserwowano, że dla niektórych odmian (‘Gloster’, ‘Gala’, ‘Elstar’) potencjał redoks wzrasta w pobliżu komory nasiennej.



Rys. 22. Rozkład radialny w jabłku potencjału elektrody redoks w fazie wysycenia (SEM ogniwa) dla strony jabłka z barwą zasadniczą i od strony rumieńca

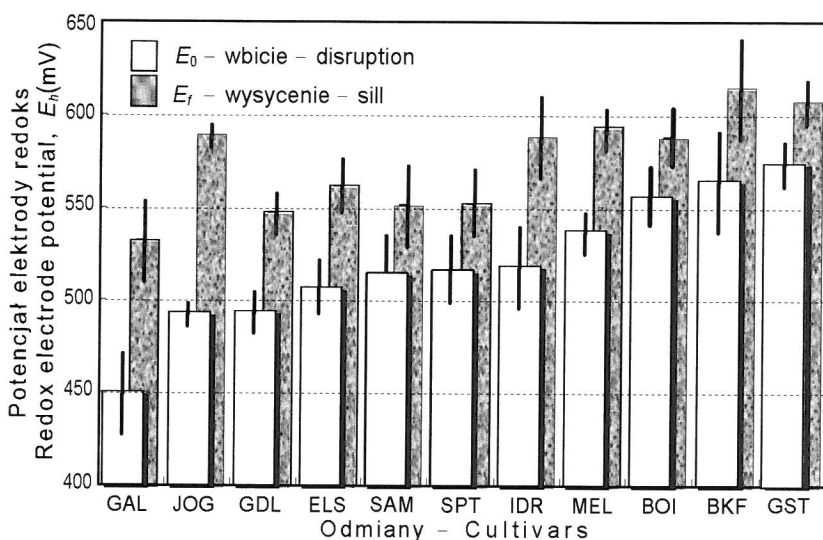
Fig. 22. Radial distribution of redox electrode potential (the cell electromotance) in apple at sill potential phase point on blush side and standard colour side of apple

Wyraźnie widać powiązanie zmian potencjału redoks z warstwową budową jabłka (rys. 22). W wynikach można by także wskazać na wpływ miąższu zewnętrznego powstałego z rurki kwiatowej i miąższu wewnętrznego utworzonego z owocolistka. Najwyższy potencjał elektrody redoks po wysyceniu obserwowano od strony z rumieńcem, a różnica pomiędzy stronami jabłka wynosiła

zależnie od odmiany od 3 mV ('Jonagold') do 62 mV ('Cortland'). Natomiast spadek potencjału redoks wysycenia – E_f był mniejszy przy oddalaniu się od skórki o barwie zasadniczej.

Do lepszej interpretacji powyższych zależności brakuje dokładniejszych analiz chemicznych rozkładu polifenoli w miąższu jabłka wraz z koniecznymi tu informacjami, np. oceną stadium dojrzałości owoców, czasu i temperatury przechowywania owoców. Może z powodu ogólnie coraz niższego stężenia polifenoli im dalej od skórki i mniejszego stężenia tlenu w przestrzeniach międzykomórkowych, należało oczekiwać, że po uszkodzeniu miąższu powstanie niższe stężenie chinonów fenolowych i ustali się niższy potencjał elektrody redoks po wysyceniu – E_f (rys. 22). Tlen zapewne bardziej dostępny jest w miąższu bliżej skórki, a u tych odmian z otwartą komorą nasienną, także wokoło gniazda nasennego.

Występują dość złożone efekty wpływające na potencjał elektrody redoks. Potencjał redoks elektrody może zostać łatwo i szybko zmieniony przez warunki otoczenia i tempo tych zmian nie odbiega od zmian świeżości miąższu.



Rys. 23. Potencjał elektrody redoks w chwili wbicia w jabłko – E_0 i potencjał wysycenia na elektrodzie redoks – E_f na głębokości 10 mm w jabłkach kilku odmian

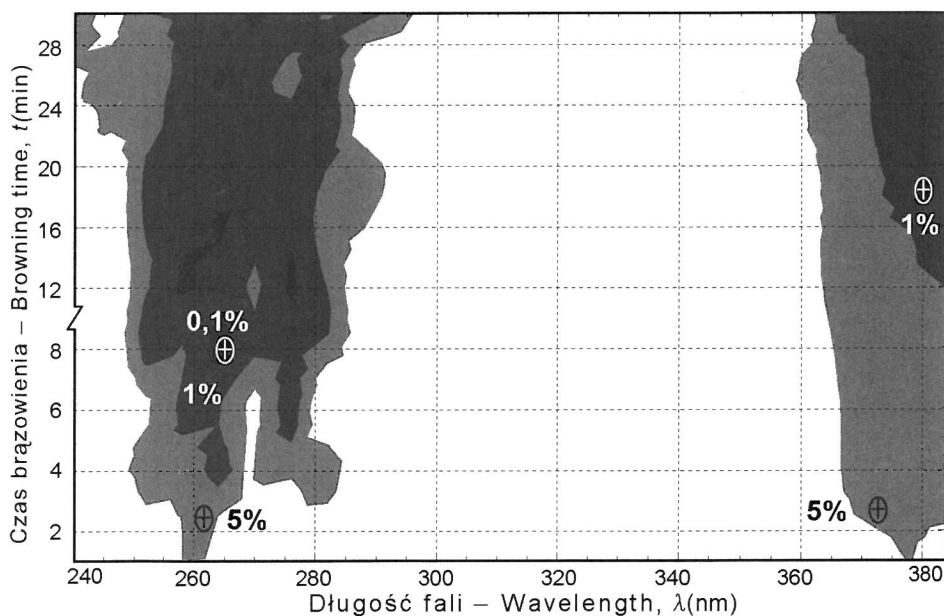
Fig. 23. Potential of redox electrode at the moment of apple puncture – E_0 and potential of redox electrode in apple at final equilibrium browning – E_f at the depth of 10 mm in apples of several cultivars

Odmiany różniły się zarówno potencjałem redoks wysycenia – E_f na elektrodzie, jak i potencjałem elektrody redoks po wbiciu – E_0 . Kilka charakterystycznych odmian uszeregowano (rys. 23) według wzrastającej wartości średniej potencjału elektrody redoks po wbiciu i dla nich określono zawartość polifenoli w miąższu (polifenole na rys. 42, s. 3). Wartości potencjału redoks zmieniały się

od najmniejszych dla redoks wbicia – E_0 (420-580 mV) do największych dla redoks wysycenia – E_f (510-650 mV).

Wyniki pomiarów redoks wbicia – E_0 i potencjału redoks wysycenia – E_f na elektrodzie porównano z widmami absorpcji dyfuzyjnej miąższu. Wybrano dwa stadia dojrzałości owoców, a miąższ cięto w normalnych warunkach otoczenia i w powietrzu. Na tym samym materiale odmianowym (13 odmian) zmierzono wartości potencjału redoks wbicia, redoks wysycenia na elektrodzie i obliczono korelacje proste pomiędzy tymi dwoma, bardzo licznymi zestawami danych – potencjałem redoks i przyrostem absorpcji w funkcji długości fali światła i czasu brązowienia. Analizowano istotność współczynników korelacji na poziomie 5%, 1% i 0,1%.

Poziom istotności i znak współczynnika korelacji przedstawiają rysunki w formie map o współrzędnych: długość fali (odcięta) i czas brązowienia (rzędna). Poziomicami zaznaczono obszary na których poziom istotności współczynnika korelacji prostoliniowej przekraczał 5%, 1% lub 0,1%.



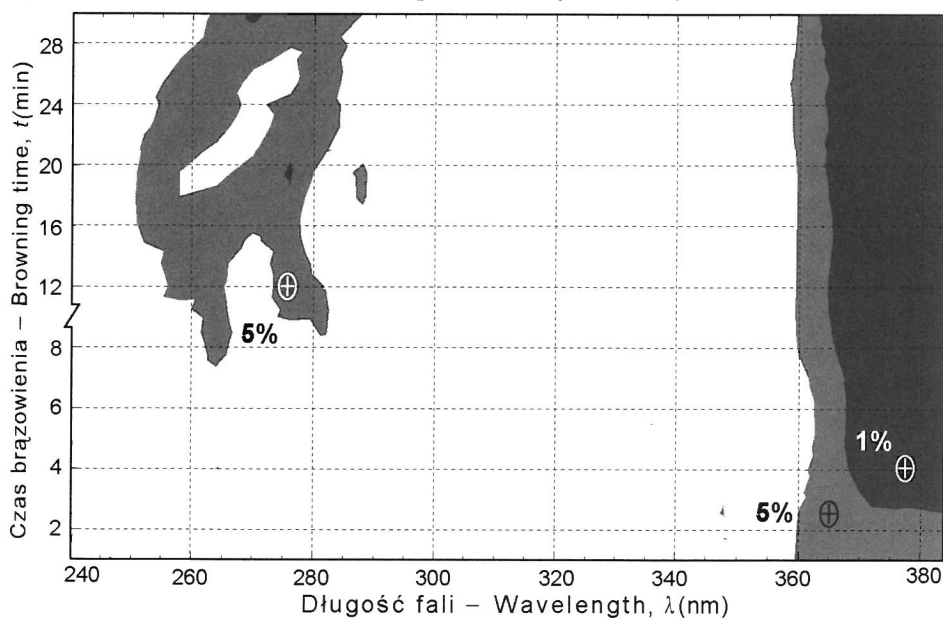
Rys. 24. Potencjał elektrody redoks w chwili wbicia w jabłko – E_0 na głębokość 10 mm skorelowany z widmami przyrostu absorpcji rozproszonej w czasie brązowienia – t ciętego miąższu jabłek z kilku odmian. Obszary: ⊕ – dodatniej korelacji, poziom istotności współczynników korelacji mniejszy od 5%, 1% lub 0,1%.

Fig. 24. Potential of redox electrode at the moment of apple puncture – E_0 at the depth of 10 mm correlated with time-dependent – t spectra of absorbance differences of flesh browning for several apple cultivars. Areas: ⊕ – positive of correlation coefficients, level of significance of correlation coefficients less than 5%, 1%, or 0.1%

Potencjał elektrody redoks w chwili wbicia – E_0 w miąższ koreluje z przyrostem absorbancji miąższu w paśmie 260 i 275 nm na poziomie istotności 1% już od 3-4 min, a istotności rośnie w czasie aż do 0,1% (rys. 24). Znacznie później (o ok. 8 min) w stosunku do zakresu UV, redoks wbicia – E_0 koreluje z przyrostem absorbancji miąższu w zakresie widzialnym i osiąga poziom istotności 1%.

Potencjał elektrody w fazie wysycenia na elektrodzie – E_f koreluje z przyrostem absorbancji miąższu w widzialnym fiolecie na poziomie istotności 1% już od pierwszych minut brązowienia, natomiast jego korelacje w UV mają bardzo niski poziom istotności (rys. 25).

Pasma, w których wystąpiła istotna korelacja potencjału na elektrodzie redoks z przyrostem absorbancji, są dość charakterystyczne, gdyż można je porównywać z pasmami, w których przyrosty absorbancji rozproszonej miąższu – A_0 korelowały ze stężeniami polifenoli w miąższu. Na podobnych mapach Kuczyński [103] wskazał pasma absorbancji charakterystyczne dla brązowiejącego miąższu, które odpowiadały zawartości substratów polifenolowych w miąższu.



Rys. 25. Potencjał elektrody redoks po wysyceniu – E_f na głębokości 10 mm skorelowany z widmami przyrostu absorbancji rozproszonej w czasie brązowienia – t ciętego miąższu jabłek z kilku odmian. Zaznaczono obszary: ⊕ – dodatniej korelacji, poziom istotności współczynników korelacji mniejszy od 5% lub 1%

Fig. 25. Potential of redox electrode in apple at sill browning – E_f at the depth of 10 mm correlated with time-dependent – t spectra of absorbance differences of flesh browning for several apple cultivars. Areas: ⊕ – positive of correlation coefficients, level of significance of correlation coefficients less than 5%, 1%, or 0.1%

Występuje duże podobieństwo układu pasm w UV do udziału ksyloglukozydu floretyny w brązowaniu. Natomiast pasmo w zakresie widzialnym odpowiada pasmom z udziałem stężeń epikatechiny lub kwasu chlorogenowego. W tej sytuacji można się zgodzić z tym, że najwcześniej w reakcji brązowania uczestniczą pewne formy powiązane z zawartością ksyloglukozydu floretyny w mięszu. Wydaje się jednak, że raczej to nie zawartość ksyloglukozydu floretyny w mięszu ukształtowała potencjał redoks elektrody w chwili wbicia – E_0 . Można tak sądzić, gdyż nie jest on bezpośrednio utleniany przez PPO.

W literaturze nie znaleziono dokładnego porównania szybkości utleniania enzymatycznego kwasu chlorogenowego i ksyloglukozyd floretyny w mięszu. Jednak Oleszek i in. (1980) [170] twierdzą na podstawie badań czystych składników, że utlenianie kwasu chlorogenowego w mieszaninie z ksyloglukozydem floretyny jest wolniejsze. Z tego powodu można przyjąć, że już w najszybszej fazie brązowania mięszu, zaobserwowanej w widmach UV (po 2-4 min), powstają chinony w ilości zgodnej z zawartością w mięszu ksyloglukozydu floretyny lub z formami ilościowo z nim powiązanymi.

Jedynie odmiana BOI ma dużą zawartość ksyloglukozydu floretyny, a nieznaczne jego ilości zawierają GST i BKF. Natomiast wszystkie one charakteryzują się dużą zawartością kwasu chlorogenowego (rys. 42, s. 3). Nie rozszerzono analizy wpływu stężenia ksyloglukozydu floretyny na potencjał redoks z powodu zbyt małej liczby danych z zakresu jego wyższych stężeń. Kuczyński [99] otrzymał istotną i dodatnią korelację stężenia kwasu chlorogenowego w mięszu z potencjałem elektrody redoks po wysyceniu – E_f . Można się zgodzić z tym, że stężenie kwasu chlorogenowego w mięszu określa potencjał elektrody redoks powstały w fazie wysycenia na elektrodzie.

Należy podsumować istotne cechy potencjału elektrody redoks. Uszkodzając komórki elektrodą redoks, można zmierzyć dwie wartości: redoks wbicia – E_0 i redoks wysycenia – E_f , które, jak to wykazano za pomocą widm UV czasowo rozdzielonych i analiz polifenoli w mięszu, związane są z aktywnością biologiczną polifenoli w mięszu.

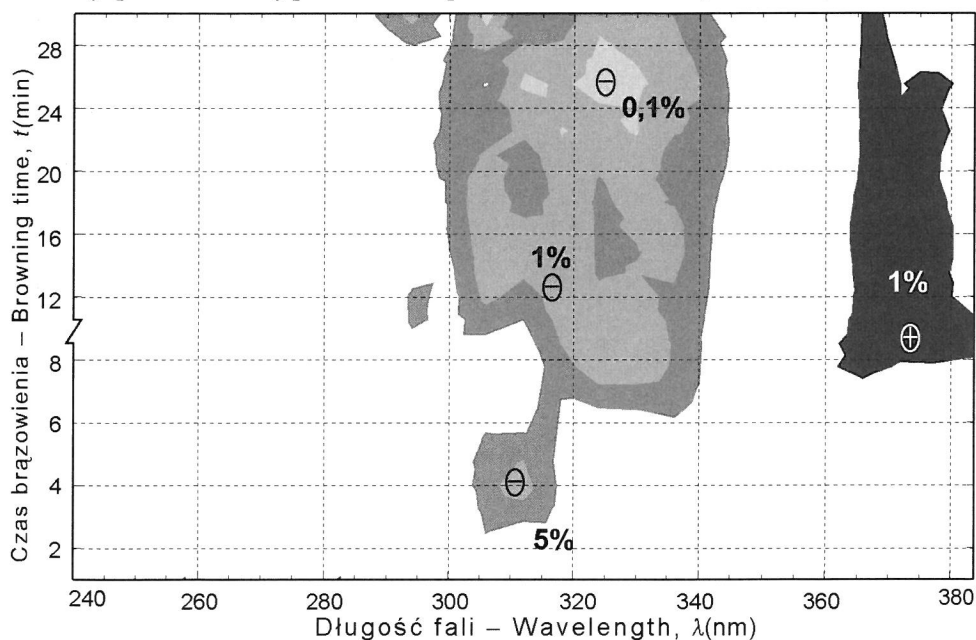
5.5. Wpływ przestrzeni międzykomórkowej i jędrności na brązowanie

Właściwości mechaniczne mięszu i użyta technika krojenia mogą wpływać na zasięg i rozprzestrzenianie się uszkodzeń w mięszu, na wielkość wycieku treści z komórek i prawdopodobnie zmieniać proces brązowania. Dotychczasowe badania enzymatycznego brązowania mięszu nie wskazywały na bezpośredni udział w enzymatycznym brązowaniu mięszu tlenu pochodzącego z przestrzeni międzykomórkowych. Jednak wiadomo, że jest on podstawowym substratem,

a proces brązowienia, podczas produkcji przecierów z jabłek można ograniczyć, gdy tlen zostanie zastąpiony innym gazem.

Zestawiono pomiary widma absorbancji rozproszonej brązowiejącego przez 28 min miąższu z 13 odmian i z dwóch stadiów dojrzałości owoców. Dla tego samego materiału badawczego zestawiono wyniki pomiarów jędrności miąższu i objętości przestrzeni międzykomórkowych. Wykorzystano oba zestawy danych i wykonano analizy korelacji widm różnicowych podczas brązowienia – z jędrnością miąższu albo z objętością przestrzeni międzykomórkowych.

Jako wynik analiz korelacji zebrano takie układy współrzędnych, czas i długość fali, dla których współczynniki korelacji były istotne na poziomie 5%, 1% i 0,1%. Wyniki określające istotność współczynników korelacji zestawiono na rysunkach w formie map o odciętej – długość fali i rzędnej – czas brązowienia (rys. 26 i 27). Na mapach zaznaczono obszary, w których istotność współczynnika korelacji prostoliniowej przekraczała poziom istotności 5%, 1% lub 0,1%.

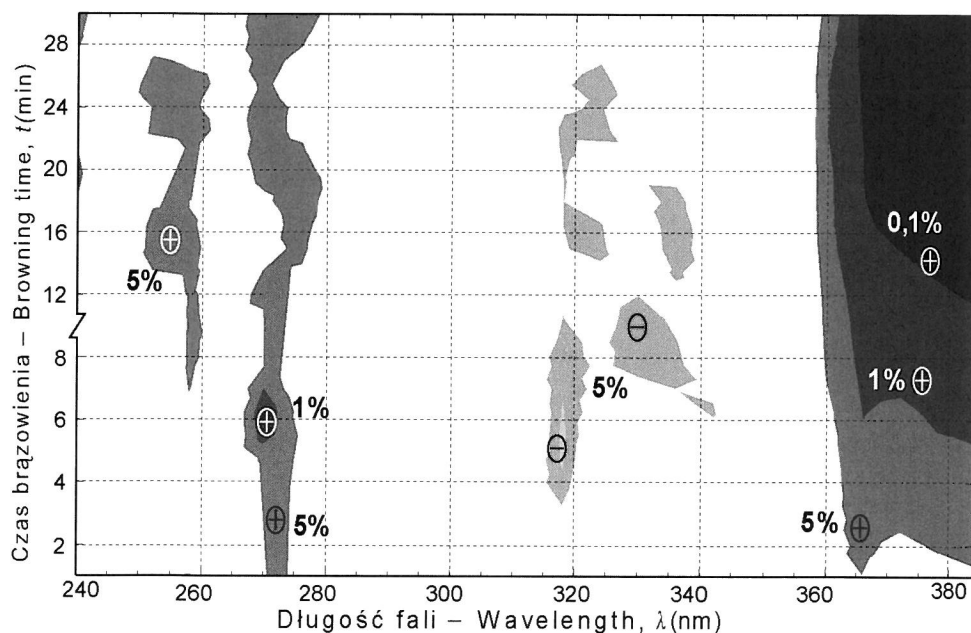


Rys. 26. Jędrność miąższu jabłek – F kilku odmian skorelowana z widmami przyrostu absorbancji rozproszonej w czasie brązowienia – t ciętego miąższu jabłek z kilku odmian. Obszary: $\oplus$, $\ominus$ – dodatniej i ujemnej korelacji, poziom istotności współczynników korelacji mniejszy od 5%, 1% lub 0,1%

Fig. 26. Flesh firmness – F correlated with time-dependent – t spectra of absorbance differences of flesh browning for several apple cultivars. Areas: $\oplus$, $\ominus$ – positive and negative of correlation coefficients, level of significance of correlation coefficients less than 5%, 1%, or 0.1%

Widma przyrostu absorbancji rozproszonej korelowały z jędrnością istotnie i ujemnie w szerokim paśmie 310-335 nm, od ok. 3-4 min, a istotność współczynnika korelacji wzrastała do 0,1% po 25 min w wąskim paśmie 320-330 nm (rys. 26). Po ok. 8 min także w paśmie 365-375 nm wystąpiła istotna i dodatnia korelacja o niskiej istotności 1%. Oznacza to, że w jabłkach odmian z jędrnym miąższem występuje większy ubytek substratu absorbującego w paśmie ok. 320 nm, a także nieznacznie silniej brązowieją (w widzialnym fiolecie). Wyniki można wyjaśnić ubytkiem substratu absorbującego w ultrafiolecie, którym zapewne jest kwas chlorogenowy. Utleniając się, daje on spadek absorbancji w paśmie 325 nm w badaniach roztworów modelowych.

Podobne wyniki analiz korelacji (jak dla jędrności) zestawiono dla objętości przestrzeni międzykomórkowych (rys. 27). W kilku pasmach widma różnicowe czasowo rozdzielone miąższu – $\Delta\lambda$ korelują istotnie z objętością przestrzeni międzykomórkowej brązowiejącego miąższu.



Rys. 27. Objętość przestrzeni międzykomórkowych w miąższu – V jabłek skorelowana z widniami przyrostu absorbancji rozproszonej w czasie brązowienia – t ciętego miąższu jabłek z kilku odmian. Obszary: $\oplus$, $\ominus$ – dodatniej i ujemnej korelacji, poziom istotności współczynników korelacji mniejszy od 5%, 1% lub 0,1%

Fig. 27. Volume of intercellular spaces in apple flesh – V correlated with time-dependent – t spectra of absorbance differences of browning flesh for several apple cultivars. Areas: $\oplus$, $\ominus$ – positive and negative of correlation coefficients, level of significance of correlation coefficients less than 5%, 1%, or 0.1%

Od pierwszych minut brązowienia bardzo istotna jest dodatnia korelacja w paśmie ok. 275 nm, która osiąga 1% istotności, a także w widzialnym fiolecie 365-380 nm po 12 min na poziomie 0,1%. Towarzyszą temu mniej istotne (5%) ujemne korelacje w pasmach ok. 315 do 335 nm. Wiadomo, że pasmo w obszarze widzialnym to istotne korelacje z produktami brązowienia i objętością przestrzeni międzykomórkowej, a więc z oszacowaną zawartością tlenu. Charakterystyczne jest pasmo w dalekim UV, ponownie ok. 275 nm poznane w badaniach widm, w którym występuje istotna i dodatnia korelacja brązowienia z objętością przestrzeni międzykomórkowej. Natomiast pasma 318 lub 330 nm o niskiej 5% istotności dla ujemnej korelacji z przyrostem absorbancji mogą świadczyć o udziale epikatechiny lub kwasu chlorogenowego.

Wyniki analizy nie przeczą więc hipotezie, że w najwcześniejszej fazie reakcji brązowienia występuje zużywanie tlenu śródkomórkowego i że bardzo ściśle wiąże się to z udziałem substratów i produktów zmieniających absorbancję mięszu podczas brązowienia w dalekim ultrafiolecie.

5.6. Model kinetyki brązowienia i świeżość mięszu

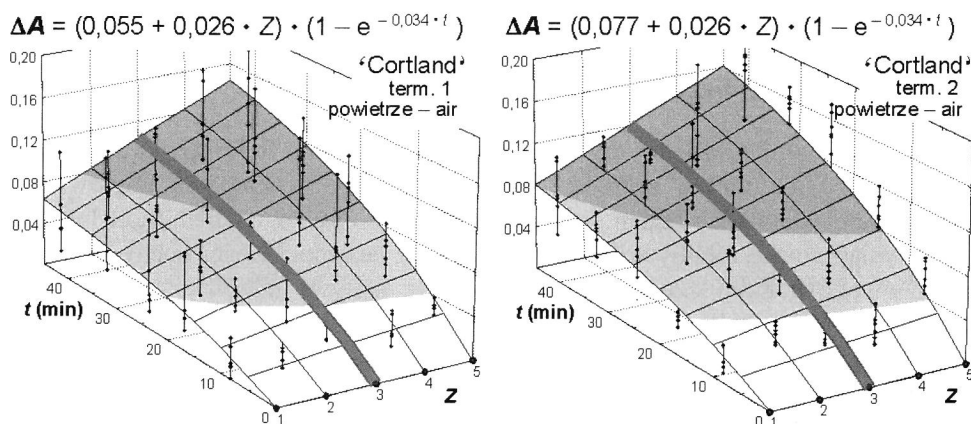
W technologii żywności do jednorodnych prób soku lub przecieru z jabłek stosuje się kilka metod pomiaru brązowienia i opisu kinetyki brązowienia [19,142,221]. Dla badań zmian świeżości jabłek lub cząstek z jabłek model brązowienia mięszu nie miałby większego znaczenia bez możliwości oceny pojedynczych owoców. Konieczne jest uwzględnienie wpływu takich czynników, jak stadium dojrzałości dla poszczególnych owoców lub okres przechowania, który jest charakterystyczny dla odmiany. Użyto złożonego modelu, aby otrzymać parametry obiektywnie charakteryzujące tak bardzo zmienny materiał.

Pomiarami objęto 33 odmiany, a dla nich przyjęto dwa okresy przechowywania owoców, które były w pięciu klasach wybarwienia i dwie techniki cięcia (w powietrzu i pod wodą). Po jednym sezonie badań metodycznych ustalono warunki pomiarowe na następne lata dla wielu odmian [95]. Mięsz zbadanych odmian, nawet jako świeżo wycięty z jabłek, cechuje znaczne zróżnicowanie absorbancji rozproszonej – A_0 w paśmie 440 nm (rozd. 5.2. s. 3), a ponadto zróżnicowany przyrost absorbancji rozproszonej – ΔA podczas brązowienia. Cięcie jabłek pod wodą osłabia brązowienie cząstek, lecz nie zaciera różnic między odmianami [95]. Z tej przyczyny można było dla określonych grup odmian przewidzieć i ustalić czasy pomiaru brązowienia. Czas wybrano w zakresie 25-50 min dla cząstek ciętych w powietrzu, a dla ciętych pod wodą 45-80 min. Pomiary przyrostu absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm – ΔA aproksymowano wyrażeniem kinetycznym lub w następnej fazie analizy funkcją kinetyczną pierwszego rzędu względem przyrostu absorbancji w paśmie 440 nm.

W wyrażeniu kinetycznym uwzględniono klasyfikację owoców pod względem wybarwienia, a w dalszych analizach dotyczących funkcji kinetycznej, wprowadzono ocenę opartą o parametr optyczny – A_0 i oceniono stadium dojrzałości każdej cząstki z jabłek.

5.6.1. Wyrażenie kinetyczne dla brązowienia z uwzględnieniem dojrzałości

Badano przyrosty absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm – ΔA dla miąższu z 2 okresów przechowywania jabłek, w pięciu klasach wybarwienia (tn. z parametrem – Z , pseudozmienną 1-5) po wycięciu cząstek w powietrzu lub pod wodą. Wyniki opracowano metodą regresji użytkownika. Sprawdzone wiele możliwych układów parametrów i zależności w wyrażeniu kinetycznym, aby uwzględnić wpływ na brązowienie współdziałania stadium dojrzałości owoców i okresu przechowywania.



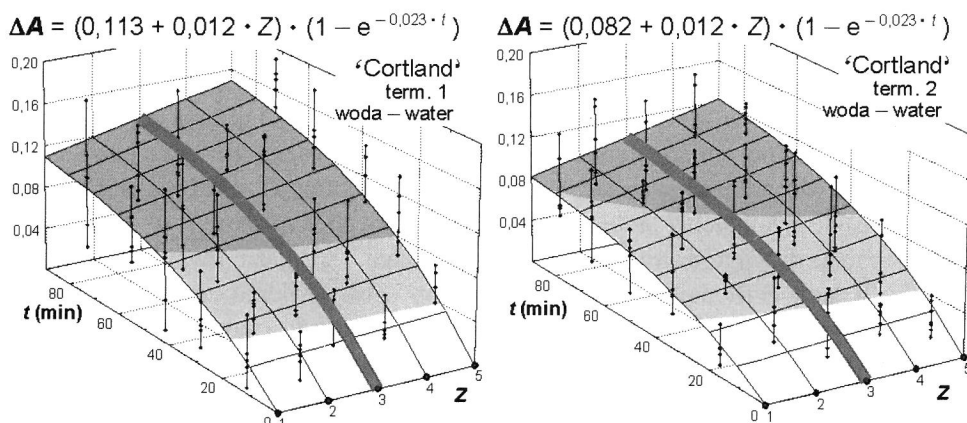
Rys. 28. Model brązowienia na podstawie przyrostów absorbancji rozproszonej – ΔA (pasmo 440 nm) miąższu cząstek z jabłek zależny od czasu brązowienia – t i od oceny stadium dojrzałości (pseudozmiennej) – Z . Odmiana ‘Cortland’ z dwóch okresów przechowywania, cięte w powietrzu o temperaturze 18-20°C, $Z = 1$ klasa owoców najlepiej wybarwionych, $Z = 5$ – owoce słabiej wybarwione

Fig. 28. Model of browning based on increase of differences of diffuse absorbance – ΔA (at 440 nm) of flesh of apple wedges related to the time of browning – t and ripeness estimate (pseudo-variable) – Z . Apples ‘Cortland’ after two periods of storage (term. 1, term. 2), sliced in air at 18-20°C, $Z = 1$ – class of fruits with best colouring, $Z = 5$ – fruits with less colouring

Szybkości początkowe brązowienia enzymatycznego cząstek i przyrost absorbancji do wysycenia brązowienia różniły się znacznie. Głównym czynnikiem zmienności były odmiany. Próby znalezienia opisu dla każdej odmiany, zakończyły się sukcesem, gdy do wyrażenia kinetycznego – ΔA wprowadzono czynnik, który wg liniowej zależności przeskalowuje absorbancję wysycenia – A_f (osiąganą po długim czasie) od stadium dojrzałości owocu ($Z = 1-5$). Ostatecznie w wyniku

analiz ustalono, że absorbancja wysycenia – A_f przeskalowywana jest przy zmianie dojrzałości miąższu ($Z = 1-5$) przez stały mnożnik, lecz czynnik ten ulega zmianie wraz ze zmianą techniki cięcia. Wpływ okresu przechowywania jabłek został uwzględniony w czynniku jako stała przesunięcia dla – A_f .

Funkcje dopasowane do danych pochodzących z pomiarów – ΔA brązowiejącego miąższu cząstek wyciętych w powietrzu i pod wodą z jabłek odmiany ‘Cortland’ dla dwóch okresach przechowywania jabłek przed wycięciem (term 1, term 2) umieszczono na rysunkach 28 i 29. Sporządzone z nich wykresy przedstawiają zmiany ΔA , opisane modelem brązowienia na tle bezpośrednich wyników pomiaru ΔA brązowiejących cząstek z jabłka.



Rys. 29. Model brązowienia miąższu określony przez przyrost absorbancji rozproszonej – ΔA (pasmo 440 nm) miąższu cząstek z jabłek zależny od czasu brązowienia – t i od oceny stadium dojrzałości (pseudozmiennej) – Z , zestawiona dla jabłek z dwóch okresów przechowywania.. Jabłka ‘Cortland’ o temperaturze 18-20°C cięte pod wodą, $Z = 1$ – klasa owoców najlepiej wybarwionych, $Z = 5$ – owoce słabiej wybarwione

Fig. 29. Model of flesh browning specified by time-dependent – t differences of diffuse absorbance – ΔA (440 nm band) of apple wedges and related to ripeness estimate (pseudo-variable) – Z , after two periods of apple storage (term. 1, term. 2). Apples ‘Cortland’ after two periods of storage (term. 1, term. 2), sliced under water at 18-20°C, $Z = 1$ – class of fruits with best colouring, $Z = 5$ – fruits with less colouring

Dla odmian bardzo wolno brązowiejących, jak ‘Szampion’, nie zebrano wystarczającej liczby danych z brązowienia, aby opisać je modelem, który mógłby uwzględnić stadium dojrzałości i okres przechowywania jabłek.

Uzyskano dopasowanie modelu – ΔA na poziomie ufności często lepszym od 0,01. Współczynniki determinacji R^2 modelu zawsze przewyższały 50%, przeciętnie wynosiły 68% i dla niektórych odmian osiągnęły 80%.

Dla odmiany niezależnie od długości okresu przechowywania jabłek, z analizy pomiarów i modelu brązowienia otrzymano takie same stałe szybkości brązowie-

nia – k . Z tego powodu wykładniki potęgowe w funkcji kinetycznej (odmiany ‘Cortland’) stale są równe – 0,034 (rys. 28) i zmienił je dopiero proces cięcia pod wodą na – 0,023 (rys. 29).

Parametr dla wysycenia brązowienia miąższu po długim czasie – t , (które opisano w funkcji kinetycznej czynnikiem liniowym zależnym od Z) nazwany został absorbancją wysycenia brązowienia – A_f . Absorbancja wysycenia – A_f , malała liniowo z numerem klasy wybarwienia (pseudozmienna Z) – była mniejsza dla owoców silniej wybarwionych w sadzie $Z = 1$. Skala tych zmian niezależna była od długości okresu przechowywania jabłek i wynosiła (odmiana ‘Cortland’) 0,026, a dopiero zmalała do 0,012, gdy jabłka cięto pod wodą.

Na rysunkach 28 i 29 zaznaczono poziomiami (szare obszary) przyrost absorbancji ΔA powyżej 0,04 Abs, który jest zmianą ledwo dostrzegalną dla oka i przyrost $\Delta A > 0,08$ Abs, tzn. zmianę barwy cząstek na brązową, ale jeszcze akceptowaną. W ten sposób analizując czas, po jakim brązowienie miąższu przekracza granicę zmian niedostrzegalnych dla oka (oznaczone na szaro) albo brązowienie akceptowane, widać, że czas wydłużył się znacznie w klasach $Z = 1$, tzn. u cząstek wyciętych z jabłek silniej wybarwionych w sadzie.

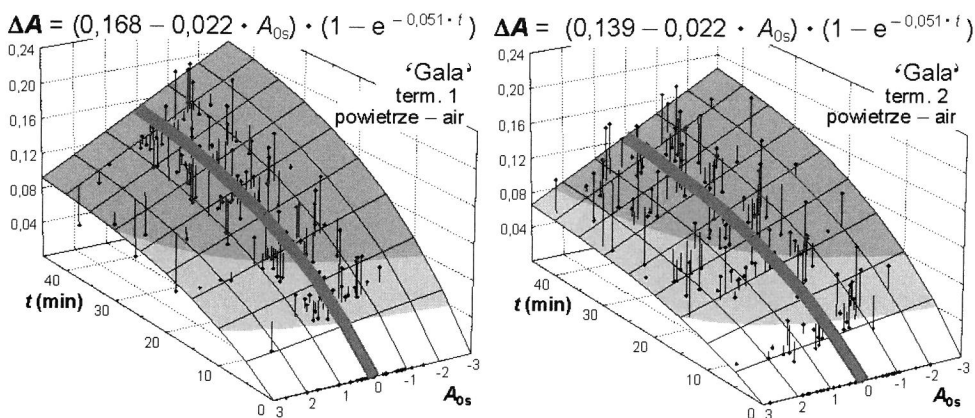
Do badań przyjęto normalne warunki otoczenia i w czasie uwzględnionym na rysunkach zachodziły najbardziej istotne zmiany w brązowieniu cząstek dla wszystkich odmian, których jabłka brązowiły. Także te bardzo szybko brązowiejące odmiany zachowywały – A_f przez ten dłuższy czas pomiaru. Nie na wszystkich wykresach kinetycznych dla enzymatycznego brązowienia można było zaobserwować wyraźny wpływ klas wybarwienia jabłek (klasy ustalano w sadzie) na brązowienie miąższu, jednak ich istotny wpływ potwierdzały wyniki liczbowe otrzymane z analizy statystycznej modelu, który obejmował większą liczbę danych.

5.6.2. Funkcja kinetyczna procesu brązowienia z parametrem optycznym miąższu

Do modelowania funkcji kinetycznej brązowienia – ΔA miąższu cząstek wyciętych z jabłek wykorzystano parametr optyczny miąższu każdej świeżo wyciętej cząstki z jabłka, tzn. absorbancję rozproszoną – A_0 miąższu w paśmie 440 nm. Jak wykazano już (rozdział 5.2. s. 3) absorbancja rozproszona – A_0 to parametr świeżo wyciętej cząstki z jabłka. Ocenia zabarwienie brązowe miąższu (prawie niewidoczne dla oka) jabłek po przechowywaniu, a także ubytek fluoryzującego chlorofilu. Parametr ten powinien zróżnicować cząstki z jabłek wg dojrzałości ich miąższu. Te ważne właściwości parametru A_0 potwierdzić powinna jego przydatność w tworzeniu funkcji kinetycznej brązowienia miąższu.

W ramach każdej odmiany wystandaryzowano pomiary absorbancji rozproszonej miąższu – A_0 , które zostały wykonane dla każdej cząstki z jabłka (rozdz.

4.2.6. s. 3). W ten sposób powstał dla każdej odmiany parametr, nazywany standaryzowaną absorbcją – A_{0S} . Może on scharakteryzować stadium dojrzałości każdej cząstki z jabłka w ”próbie chłodniczej” wybranej (patrz rozdz. 4.1. s. 3) dla odmiany. Cechuje go to, że średnia z wartości A_{0S} dla każdej odmiany wynosi zero, a odchylenie standardowe równe jest jeden. W podobny sposób (rozdz. 5.6.1) opracowano pomiary metodą regresji użytkownika. W efekcie do modelu wprowadzono standaryzowaną absorbcję miąższu – A_{0S} i uzyskano przetworzenie wyrażeń kinetycznych na funkcje kinetyczne brązowienia – ΔA . Przykłady funkcji kinetycznych dla odmiany ‘Gala’ umieszczono na rysunkach 30 i 31.



Rys. 30. Funkcja kinetyczna brązowienia miąższu jako model przyrostu absorbcji rozproszonej – ΔA (pasmo 440 nm) miąższu zależny od czasu brązowienia i od standaryzowanej absorbcji – A_{0S} cząstek świeżo wyciętych. Jabłka ‘Gala’ po dwóch okresach przechowywania jabłek (term 1, term 2) cięte w powietrzu o temperaturze 18-20°C, $A_{0S} = 3$ – bardziej dojrzały miąższ

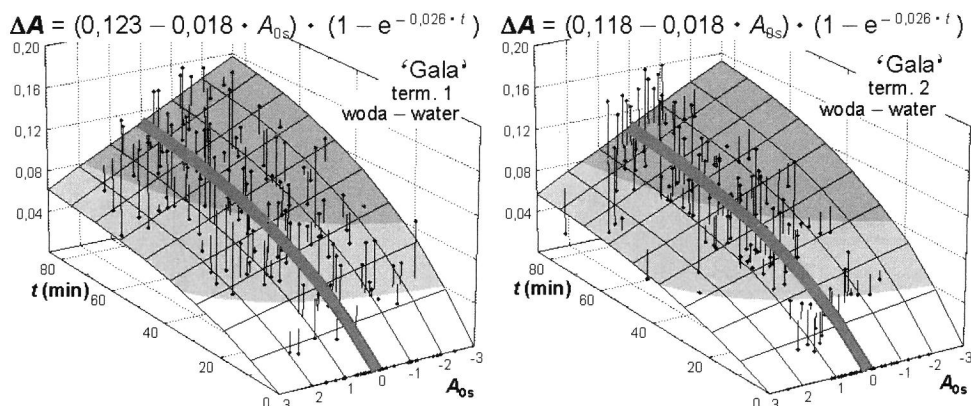
Fig. 30. Kinetics function of browning as a model of time-course of differences of diffuse absorbance – ΔA (in 440 nm) related to standardized absorbance – A_{0S} of fresh sliced wedges. Apples ‘Gala’ after two periods of storage (term 1, term 2), sliced in air at 18-20°C, $A_{0S} = 3$ – more ripe flesh

Ponieważ analizy statystyczne polegające na wyznaczeniu parametrów funkcji z modelu regresyjnego zakończyły się powodzeniem, można twierdzić, że nie są już potrzebne klasy wybarwienia tworzone podczas zbioru owoców. Model umożliwia teraz pełne zautomatyzowanie pomiarów brązowienia miąższu w całej próbie chłodniczej.

Przedstawiono (rys. 30 i 31) przykładowe opracowanie pomiarów brązowienia cząstek z jabłek ‘Gala’, wyciętych w powietrzu i pod wodą po dwóch okresach przechowywania jabłek. Wykreślono pomiary na tle funkcji kinetycznych – ΔA (tylko z pojedynczej próby), żeby można było zaobserwować jak analiza wskazuje na silne zróżnicowanie, np. mniejszą szybkość brązowienia cząstek wyciętych z jabłek dłużej przechowywanych (rys. 30 term 1 i term 2). Wyraźniejsze jest to

dla cząstek wyciętych w powietrzu, nawet ze względu na zakres tych zmian. Gdy porównujemy skalę przyrostu absorbancji ΔA na rysunku 30 i rysunku 31, to uwagę zwraca mniejsza szybkość brązowienia cząstek wyciętych pod wodą.

Uzyskano te same wyniki parametryczne (jak w rozdziale 5.6.1), które obliczono dla wszystkich zbadanych odmian. Dla odmiany niezależnie od długości okresu przechowywania jabłek (długość okresu bardzo różna u odmian) otrzymano takie same stałe szybkości brązowienia – k . Wykładniki potęgowe w funkcji kinetycznej – ΔA były przykładowo (rys. 30 dla odmiany ‘Gala’) równe $-0,051$ i uległy zmianie na $-0,026$ dopiero w procesie cięcia pod wodą (rys. 31).



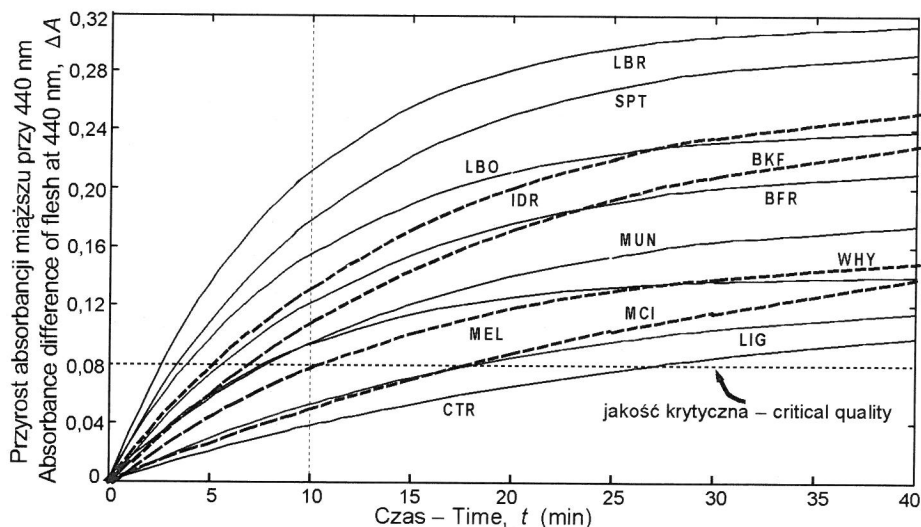
Rys. 31. Funkcja kinetyczna brązowienia miąższu jako model przyrost absorbancji rozproszonej – ΔA (pasmo 440 nm) miąższu zależny od czasu brązowienia i od standaryzowanej absorbancji – A_{0s} cząstek świeżo wyciętych. Jabłka ‘Gala’ po dwóch okresach przechowywania jabłek (term. 1, term. 2) cięte w wodzie o temperaturze 18-20°C, $A_{0s} = 3$ – bardziej dojrzały miąższ

Fig. 31. Kinetics function as a model of browning of time-course of differences of diffuse absorbance – ΔA (in 440 nm) related to standardized absorbance – A_{0s} of fresh sliced wedges. Apples ‘Gala’ after two periods of storage (term. 1, term. 2), sliced under water, $A_{0s} = 3$ – more ripe flesh

W funkcji kinetycznej – ΔA przyrost absorbancji rozproszonej do osiągnięcia wysycenia brązowienia (absorbancja wysycenia – A_f) malał liniowo ze spadkiem absorbancji standaryzowanej – A_{0s} cząstek. Skala tych zmian nie była zależna od długości okresu przechowywania jabłek i wynosiła (dla odmiany ‘Gala’) 0,022. Natomiast gdy jabłka wycięto pod wodą, zmalała do 0,018. Przyrost absorbancji do osiągnięcia wysycenia – A_f był oczywiście mniejszy dla owoców z lepszym wybarwieniem w sadzie, czyli dla wyższych wartości (dodatnich) standaryzowanej absorbancji – A_{0s} cząstek. Natomiast charakterystyczne jest, że po dłuższym okresie przechowywania jabłek dla wszystkich odmian, zmalało przesunięcia w czynniku liniowym dla A_f w funkcji kinetycznej, tak jak to widać na rysunku 31 dla odmiany ‘Gala’ od 0,123 do 0,118.

5.7. Parametryzacja brązowienia

Opis przyrostu absorbancji rozproszonej – ΔA (pomiaru brązowienia) za pomocą modelu i funkcji kinetycznej umożliwił wyznaczenie praktycznych parametrów brązowienia i ich błędów standardowych. Wykorzystano je do obliczenia różnych charakterystyk cząstek wyciętych z jabłek i najbardziej reprezentatywnych dla każdej ze zbadanych odmian (rys. 32).



Rys. 32. Zróżnicowanie brązowienia cząstek z jabłek kilku odmian opisane za pomocą przyrostu absorbancji rozproszonej – ΔA w paśmie 440 nm, wyznaczone z modelu kinetyk I-rzędu na podstawie parametrów doświadczalnych, przyjmując przeciętną dojrzałość jabłek, cięcie w powietrzu po pierwszym okresie przechowywania jabłek i temperaturę 18-20°C

Fig. 32. Differentiation in browning of wedges of several apple cultivars as described by differences in diffuse absorbance – ΔA at 440 nm, determined from first-order reaction kinetics on the basis of experimental parameters, assuming average ripeness of apples sliced in air after first period of apples storage and temperature of 18-20°C

Ustalono wartości: $A_{0S} = 0$ (przeciętna dojrzałość), term = 1 (okres przechowywania jabłek), cięcie w powietrzu i temperaturę 18-20°C. Krzywe kinetyczne brązowienia – ΔA cząstek z jabłek, które wykreślono na rysunku 32, powstały z funkcji kinetycznej i wyznaczonych dla odmian parametrów. Przedstawiają one zaobserwowany zakres zróżnicowania kinetyki. Można zauważyć, że przecinają się już po 10 min. Aproxymowanie tych zależności linią prostą i obliczenie w ten sposób szybkości początkowej byłoby możliwe tylko dla pomiarów wykonywanych w czasie 10 min i przy przeciętnej dojrzałości owoców. Model można więc zredukować do liniowego, lecz trzeba wtedy spełnić określone, dodatkowe wyma-

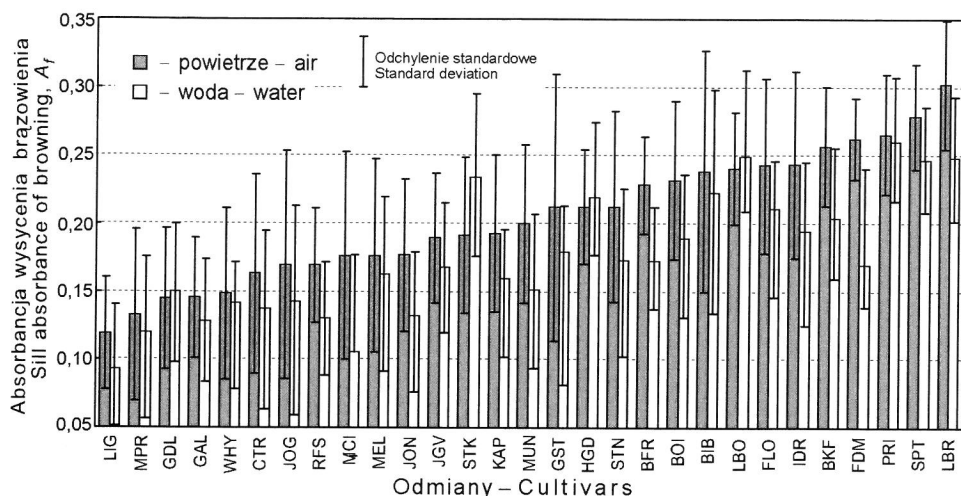
gania związane z czułością pomiarów brązowienia (rozdz. 3.2. s. 3). Stadium dojrzałości owoców, okres przechowywania jabłek, a także techniki cięcia wywołują dużą zmienność absorbancji rozproszonej (rys. 30 i 31). Zakończenie pomiarów po 10 min wymaga zarejestrowania spektrokolorymetrem bardzo małych zmian i występują one, zwłaszcza gdy owoce są bardziej dojrzałe, a także w szerokim zakresie zmienności parametru dla każdej odmiany, gdy dysponujemy w „próbie chłodniczej” naturalną populacją. Uproszczony, bo liniowy model regresyjny do wyznaczania szybkości początkowej brązowienia, można stosować wtedy, gdy możliwe jest wykonanie pomiaru ΔA , co najmniej z dokładnością $\pm 0,01$ Abs w czasie 10 min. Jak wykazano dalej, może być również przydatna absorbancja wysycenia brązowienia – A_f , zwłaszcza w badaniach technologicznych lub badaniach preferencji dla brązowienia wśród konsumentów (rozdz. 5.8. s. 3). Wtedy na podstawie poznanego dla odmiany czasu połówkowego brązowienia – $t_{1/2}$ (rys. 35 s. 3) konieczne jest odpowiednie wydłużenie czasu pomiarów.

Mięszak jabłek z odmian, które uznaje się za brązowiejące, po 10 min od przecięcia ma przyrost absorbancji rozproszonej większy od 0,04 Abs. Takie brązowienie może już być zauważone przez człowieka. Jeżeli jest możliwy precyzyjny pomiar czasu, po jakim nastąpił przyrost absorbancji, np. o 0,08 Abs, to dobrą ocenę szybkości można by otrzymać także z pomiarów czasu. Dla większości owoców w normalnych warunkach otoczenia czas ten nie będzie dłuższy od 30-40 min przy cięciu w powietrzu. Jednak, jak stwierdzono, a można to wywnioskować z wykresów funkcji kinetycznych (rys. 30 i 31), rozkład statystyczny parametru – $t_{0,08}$ będzie rozkładem niesymetrycznym. Widać to także z odchyłeń standardowych dla $t_{0,08}$ u odmian na rysunku 37 (s. 3).

Z tych powodów wszystkie parametry brązowienia obliczano z modelu brązowienia i dla przeciętnej dojrzałości jabłek, tzn. dla cząstek, których standaryzowana absorbancja – A_{0S} równa się zero. Dalsze analizy dotyczą obliczonych w ten sposób parametrów opisowych brązowienia i są to: szybkość brązowienia – v , czas połówkowy brązowienia – $t_{1/2}$ (lub stała szybkości – k), wysycenie enzymatycznego brązowienia – A_f , trwałość barwy miąższu – $t_{0,08}$. Analizowano je pod różnym kątem, traktując głównie jako cechy odmianowe jabłek, a także określono wpływ długości okresu przechowywania jabłek lub wpływ cięcia jabłek w powietrzu i pod wodą. Odmiany ‘Szampion’, ‘Elstar’, ‘Fantazja’, ‘Ozark Gold’ ciemniały „niezauważalnie” w warunkach przyjętych do badań.

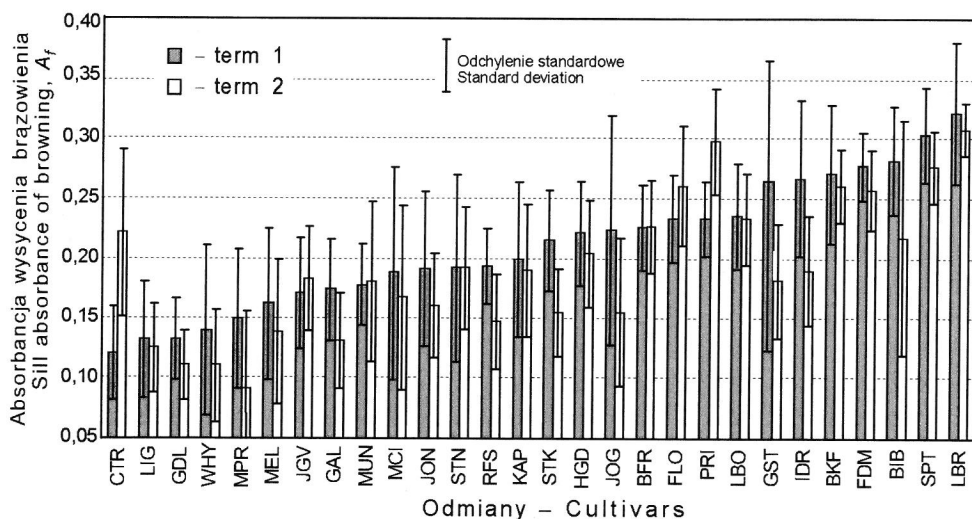
5.7.1. Wysycenie enzymatycznego brązowienia

Zakres zmienności absorbancji wysycenia – A_f (przyrostu absorbancji rozproszonej do osiągnięcia wysycenia brązowienia) cząstek ciętych z jabłek w powietrzu i pod wodą (rys. 33) wynosi u zbadanych odmian od 0,05 Abs do 0,35 Abs.



Rys. 33. Przyrosty absorbancji rozproszonej do wysycenia brązowienia (absorbancja wysycenia z modelu brązowienia) – A_f miąższu cząstek z jabłek ciętych w powietrzu lub pod wodą o temperaturze 18-20°C dla kilku odmian

Fig. 33. Differences of diffuse absorbance for final equilibrium of browning (equilibrium absorbance is estimated from model of browning) – A_f of flesh of apple wedges sliced in air or under water with temperature of 18-20°C for several cultivars



Rys. 34. Przyrosty absorbancji rozproszonej do wysycenia brązowienia (absorbancja wysycenia) – A_f miąższu cząstek z jabłek po dwóch okresach przechowywania jabłek (term 1, term 2) ciętych w powietrzu o temperaturze 18-20°C dla kilku odmian, wyznaczone z modelu brązowienia

Fig. 34. Differences of diffuse absorbance for final equilibrium of browning (sill absorbance) – A_f of flesh wedges after two periods of apple storage (term 1, term 2) and sliced in air with temperature of 18-20°C for several cultivars, calculated from model of browning

Każdą odmianę charakteryzuje duże odchylenie standardowe, które przekracza najczęściej 0,04 Abs i nawet osiąga 0,1 Abs. Zróżnicowanie to powoduje wyraźnie zauważalne różnice w barwie pomiędzy brązowymi cząstkami i w większości prób. Cięcie pod wodą obniża przyrosty absorbancji do wysycenia brązowienia – A_f , lecz nie są to znaczne różnice, a więc stężenia wytwarzanych w tych warunkach barwników brązowych w miąższu są tylko nieznacznie niższe.

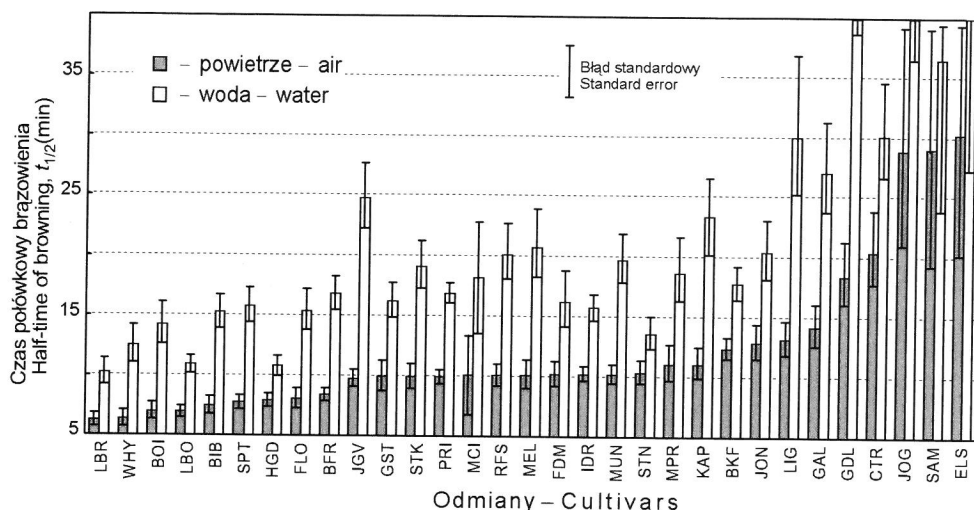
Po dłuższym przechowywaniu jabłek (rys. 34, term. 2) generalnie niższe są przyrosty absorbancji aż do wysycenia brązowienia miąższu – A_f (cząstek ciętych w powietrzu) i zaobserwowano to u większości zbadanych odmian. Zmienność parametru – A_f w ramach odmiany, także po dłuższym przechowywaniu jabłek, nadal jest duża. Należy przypomnieć opisany już wynik (rozdz. 5.2. s. 3), że absorbancja rozproszona cząstek świeżo wyciętych z jabłka – A_0 wzrosła po dłuższym przechowywaniu jabłek. Jest to efekt przeciwny do tego, jaki występuje z wysycaniem brązowienia – A_f .

Podsumowując analizy można stwierdzić, że gromadząc dane przez dłuższy czas brązowienia cząstek, uzyskiwano stabilizację brązowienia miąższu i ustalał się stan równowagi w zewnętrznej warstwie miąższu. Ten maksymalny przyrost absorbancji rozproszonej, nazwany został absorbancją wysycenia – A_f brązowienia. Przyrost mierzony był od początkowej absorbancji rozproszonej – A_0 dla cząstek jabłka zmierzonej tuż po ich wycięciu. Oznacza to, że wysycenie brązowienia – A_f daje wyniki odpowiadające aktywności biologicznej w miąższu, która w mniejszym stopniu została zachowana przez dłuższy okres przechowywania jabłek. W ten sposób oceniono parametr – A_f , który jest elementem świeżości jabłek po ich przechowywaniu i opisuje niższą aktywność układu enzymatycznego utleniania polifenoli.

5.7.2. Czas połówkowy brązowienia

Technicznym oszacowaniem skali czasu (rozdz. 3.2. s. 3) dla przebiegu reakcji brązowienia miąższu licznej grupy odmian jest czas połówkowy brązowienia (połowiczne brązowienie) miąższu – $t_{1/2}$. Dla zbadanych odmian wynosił on 5–45 min (rys. 35). Wartości średnie na rysunku 35 i zaznaczony błąd standardowy (a nie odchylenie standardowe) wskazują na bardzo istotne i duże różnice pomiędzy odmianami, a także bardzo istotne różnice spowodowane techniką cięcia w powietrzu lub pod wodą.

Z analizy pomiarów cząstek i modelu brązowienia otrzymano stały (w każdej odmianie) dla dwóch okresów przechowywania jabłek czas połówkowy – $t_{1/2}$. Jednak technika cięcia pod wodą ponad dwukrotnie wydłużyła czas połówkowy brązowienia cząstek wyciętych z jabłek pod wodą, w stosunku do wyciętych wprost w powietrzu. Trzeba przypomnieć to, że w reakcji I-go rzędu czas połówkowy jest parametrem niezależnym od stężeń reagujących substancji. Zależna od stężeń jest szybkość początkowa reakcji.



Rys. 35. Czas połówkowy brązowienia – $t_{1/2}$ miąższu cząstek jabłek z różnych odmian ciętych w powietrzu lub pod wodą o temperaturze 18-20°C, wyznaczony z modelu brązowienia

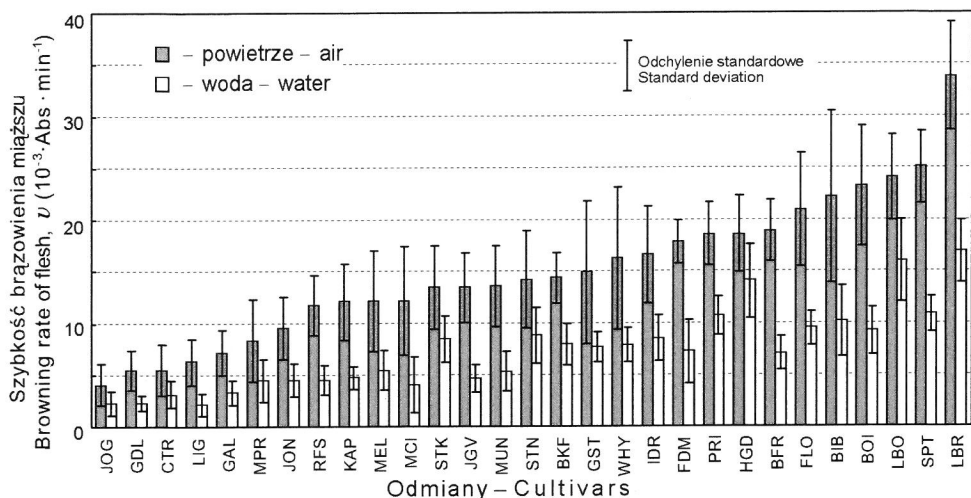
Fig. 35. Half-life of browning – $t_{1/2}$ of flesh of apple wedges for several cultivars sliced in air or under water with temperature of 18-20°C, calculated from model of browning

Ponieważ stwierdzono, że czas połówkowy brązowienia – $t_{1/2}$ nie zależy od stadium dojrzałości jabłek i od długości okresu przechowywania jabłek, a pozostaje jedynie zależny od techniki cięcia jabłek na cząstki (rys. 35), wygodnie jest go użyć do charakterystyki brązowienia i porównywania odmian.

5.7.3. Szybkość enzymatycznego brązowienia

Z wyznaczonych funkcji kinetycznych obliczono szybkości początkowe brązowienia – v cząstek wyciętych z jabłek w powietrzu, a także cząstek wyciętych pod wodą. Obliczono także odpowiadające im odchylenia standardowe. Wyniki dla odmian uszeregowano wg rosnących średnich na rysunku 36. Dla cząstek wyciętych w powietrzu szybkość brązowienia (dla różnych odmian) może się zmieniać od $0,003 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$ do $0,035 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$, czyli prawie dziesięciokrotnie, a dla wyciętych pod wodą od $0,001 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$ do $0,02 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$ i jest to dwudziestokrotna zmiana szybkości. Na dużą zmienność wskazują przedziały odchylen standardowych szybkości początkowej dla różnych odmian, które wynoszą od $0,002 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$ do $0,017 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$.

Ponieważ cięcie pod wodą zdecydowanie obniża szybkość brązowienia, oznacza to wolniejsze wytwarzanie brązowych barwników w miąższu i sugeruje mniejsze stężenie substratów w początkowym etapie reakcji enzymatycznej. Nie należy zapominać o krótszym czasie połówkowym – $t_{1/2}$ po zastosowaniu cięcia pod wodą.



Rys. 36. Szybkość brązowienia – v miąższu cząstek z jabłek różnych odmian wyciętych w powietrzu lub pod wodą o temperaturze 18-20°C, wyznaczona z modelu brązowienia

Fig. 36. Browning rate – v of flesh of apple wedges for several cultivars sliced in air or under water with temperature of 18-20°C, calculated from model of browning

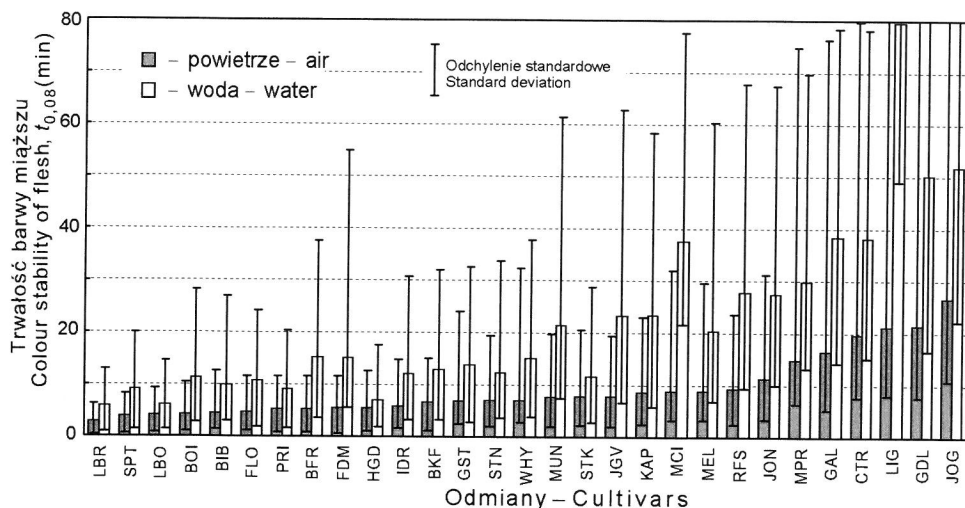
Można ustalać graniczne szybkości brązowienia – v albo graniczne wysycenie brązowienia – A_f przy cięciu w powietrzu, albo pod wodą i podzielić odmiany jabłek na 3 grupy. Może to być podział na odmiany o bardzo małej skłonności do brązowienia, gdy szybkość początkowa nie przekracza $0,01 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$. Należą do nich 4 odmiany niebrązowiejące SAM, ELS, FZJ, OZG i odmiany JOG, GDL, CTR, LIG, GAL, których szybkość brązowienia można było zmierzyć. Odmiany SPT, LBR, LBO, BOI, BIB, FLO bardzo szybko brązowiejące, których miąższ brązowieje szybciej niż $0,025 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$.

Z przeciętną szybkością brązowienia od $0,017 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$ do $0,025 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$ brązowieją odmiany MPR, JON i pozostałe uszeregowane wg rosnącej szybkości (rys. 36) aż do odmian HGD, BFR. Cechuje je praktycznie niezauważalne wzrokowo brązowienie przez ok. 1,5 min ($\Delta A < 0,04 \text{ Abs}$), lecz nie dłużej niż przez 4 min.

Dłuższy okres przechowywania jabłek generalnie obniżył szybkość początkową brązowienia miąższu cząstek dla większości odmian. Nie zilustrowano tego rysunkiem, lecz to prosty wniosek, który wpływa wprost ze zmian absorbancji wysycenia brązowienia – A_f (rys. 33). Obowiązuje w tym miejscu prosta zależność $v = A_f / t_{1/2}$, która pozwala przeskalowywać wyniki. Czas połówkowy brązowienia – $t_{1/2}$ jest stałą niezależną od długości okresu przechowywania, lecz charakterystyczną dla każdej odmiany. Pozostaje jedynie różnicujący wpływ absorbancji wysycenia – A_f na szybkość brązowienia – v , która maleje po dłuższym okresie przechowywania jabłek (rys. 33).

5.7.4. Trwałość barwy miąższu

Praktycznym parametrem dla technologa zajmującego się brązowiejącym produktem może być parametr określający trwałość barwy miąższu. Jest to czas, przez jaki cząstki z jabłka mogą być jeszcze akceptowane przez konsumenta. Można zaproponować taki obiektywny parametr i wyznaczyć go dla każdej odmiany z funkcji kinetycznej – modelu brązowienia.

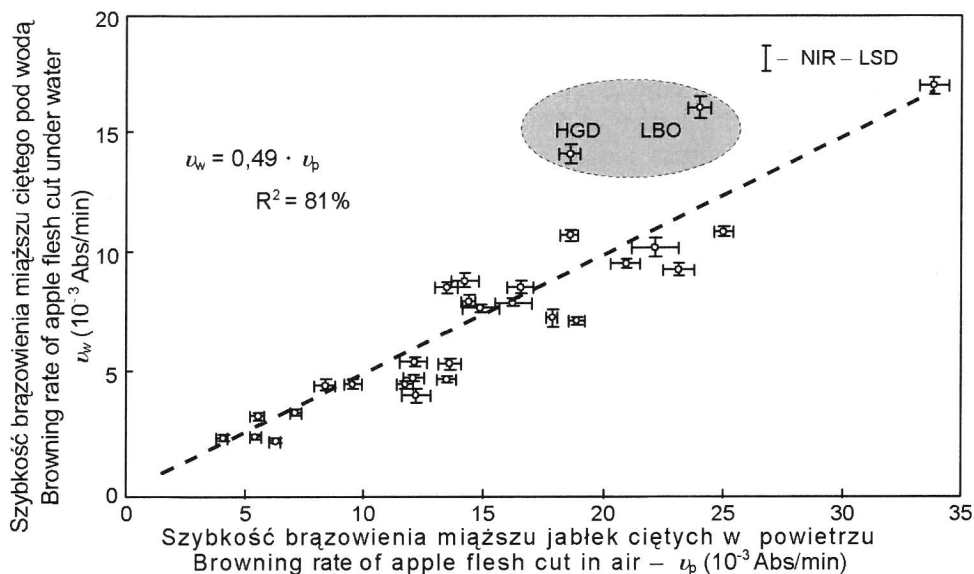


Rys. 37. Trwałość barwy – $t_{0,08}$ miąższu cząstek z jabłek różnych odmian wyciętych w powietrzu lub pod wodą o temperaturze 18-20°C, wyznaczona z modelu brązowienia

Fig. 37. Colour stability – $t_{0,08}$ of flesh of apple wedges for several cultivars sliced in air or under water with temperature of 18-20°C, calculated from model of browning

Przyrost absorbancji rozproszonej cząstki z jabłka równy 0,04 Abs odpowiada zaledwie zauważalnym zmianom barwy. Oszacował tę wartość Kuczyński i Varoquaux [114] na podstawie pomiarów kolorymetrycznych całkowitej różnicy barwy i ocen organoleptycznych brązowiejących plastrów. Graniczny, jeszcze akceptowany przyrost absorbancji wybrano arbitralnie (= 0,08 Abs), aby zasignalizować problem i możliwość wyznaczania w ten sposób czasu trwałości. Dotychczas Kuczyński i Varoquaux [114] posługiwali się trwałością barwy świeżych sałatek z jabłek, lecz wyznaczano ją zasadniczo w inny sposób. Metoda ta zostanie uwzględniona w opisie hamowania brązowienia (rozdz. 5.8. str. 3).

Na rysunku 37 zestawiono średnie czasy trwałości barwy miąższu, tzn. czas po jakim barwa miąższu osiąga przyrost absorbancji $\Delta A = 0,08$ ABS. Stwierdzono bardzo duże różnice pomiędzy odmianami i zakres zmian trwałości barwy miąższu 2-80 min w tych samych warunkach. Cięcie pod wodą wydłużyło dwu, a niekiedy ponad trzykrotnie czas trwałości barwy.



Rys. 38. Zmiany szybkości brązowienia miąższu cząstek wyciętych pod wodą – v_w w stosunku do zmian szybkości brązowienia miąższu cząstek wyciętych w powietrzu – v_p zestawione dla jabłek z różnych odmian

Fig. 38. Changes in the browning rate of apple flesh sliced under water – v_w versus browning rate of flesh sliced in air – v_p for flesh wedges of several cultivars

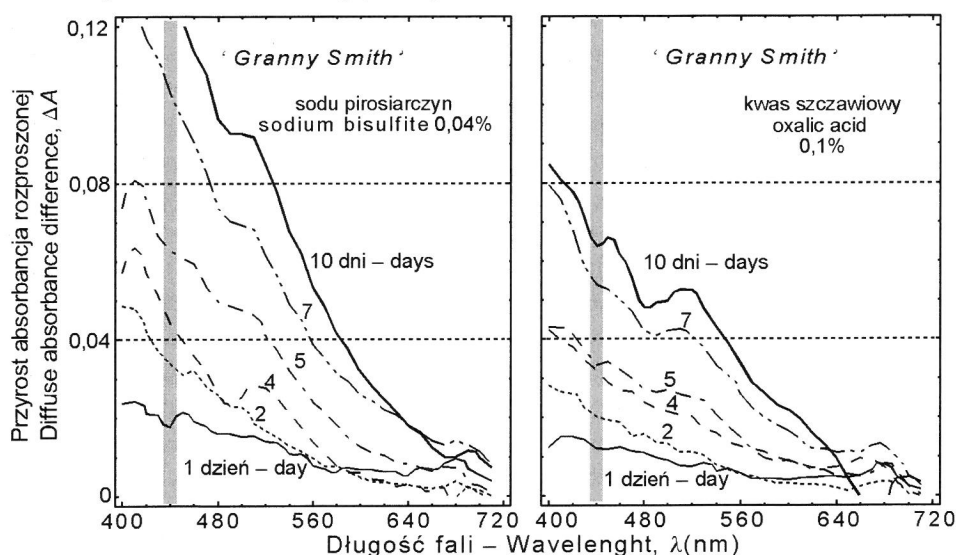
Zaznaczony na tym rysunku przedział jednego odchylenia standardowego dla każdej odmiany informuje również o tym, że odmiany o większej trwałości barwy miąższu JGD, GDL, LIG, CTR mają także duże odchylenia standardowe. Duża zmienność w ramach każdej odmiany wynika m.in. z tego, że zachowano naturalną strukturę plonu jabłek w próbie chłodniczej. W dalszej części pracy nie badano, w jakim stopniu może ograniczyć tę zmienność zastosowanie silnych inhibitorów i wysycanie nimi miąższu. Można przewidywać, że wartości absorpcji rozproszonej – A_0 będą zupełnie inne i znacznie niższe, gdyż tkanka wysycona roztworem inhibitora niewiele światła rozprasza i odbija [16,203,205,206]. Ponadto dla utrwalonych cząstek z jabłka nie uzyska się po przecięciu cząstki (odświeżeniu), charakterystycznych parametrów brązowienia, a zwłaszcza czasu połowkowego, który uległ nawet zmianie, gdy jabłka pocięto pod wodą.

5.8. Testy hamowania brązowienia

Badano efektywność hamowania brązowienia miąższu jabłek, stosując cięcie w różnych roztworach. Stosowano warunki schematu „test technologii” i „test surowca” do wykonywania świeżych sałatek z jabłek (rys. 2. s. 3).

Ilościowa ocena efektywności hamowania brązowienia mięszu jest zwykle trudna, jednak spektrofotometria w świetle odbitym umożliwia zmierzenie szybkości powstawania brązowych barwników, a więc obliczanie stopnia inhibicji (rozdz. 3.2. s. 3). Sapers i Hicks [204] testowali przydatność przemycania cząstek wodą, jak również cięcia tkanek nożem wodnym. Zwrócili oni uwagę na konieczność usuwania soku komórkowego z powierzchni cięcia, a także nadmiaru wody z tkanki po jej przemycaniu, co ma ograniczyć brązowienie mięszu.

Najdokładniej zmierzono w poprzednim rozdziale opisane hamowanie brązowienia poprzez cięcie jabłek pod wodą. Określano więc dwie szybkości brązowienia mięszu – dla jabłek ciętych w powietrzu i jabłek ciętych pod wodą i na rysunku 38 zestawiono wyniki dla zbadanych odmian. Stwierdzono, że dwie szybkości początkowe brązowienia związane są zależnością liniową i jedynie próbki z odmiany HGD i LBO odstają od tej zależności.



Rys. 39. Zmiany widm przyrostu absorbancji rozproszonej – ΔA mięszu podczas przechowywanych przez 10 dni w temperaturze 5°C cząstek z jabłek schłodzonych do temperatury 5°C i ciętych w roztworach inhibitorów

Fig. 39. Storage-related pattern of spectra differences of diffuse absorbance – ΔA during 10 days of storage at temperature of 5°C of apple flesh wedges chilled to 5°C and sliced in either sodium bisulfite or oxalic acid solution

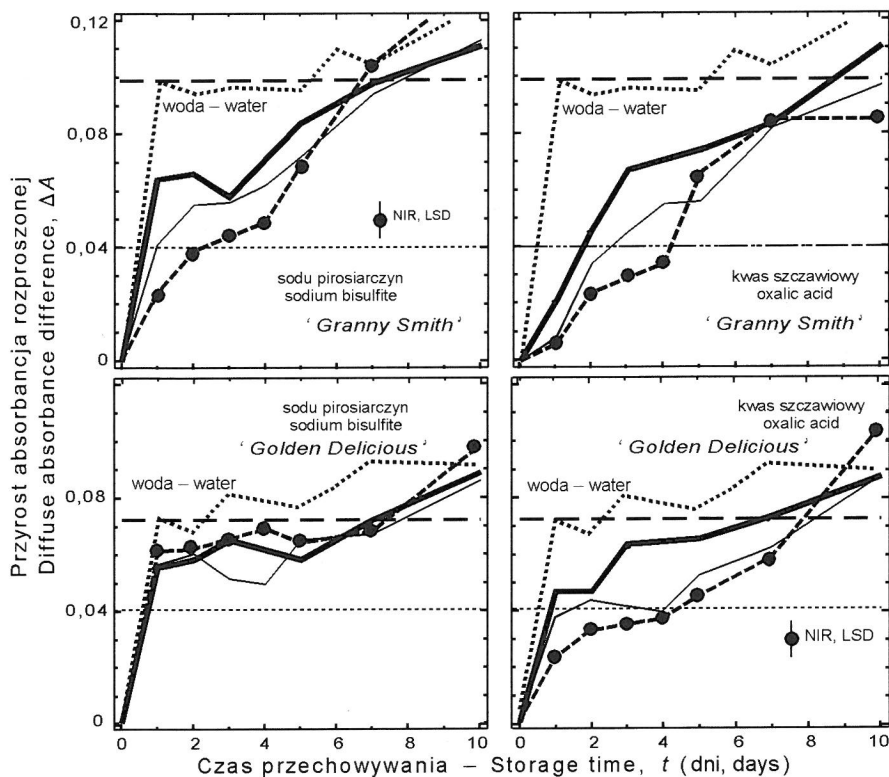
Obliczony stosunek szybkości brązowienia (aktywność) wynosi 0,49, czyli stopień inhibicji techniki cięcia pod wodą wynosi ok. 50% w normalnych warunkach otoczenia. Skuteczność cięcia pod wodą jest taka sama dla zbadanych odmian. W warunkach jakie występują przy cięciu pod wodą uszkodzane komórki

nie mają kontaktu z fazą gazową i łatwiej zwilżanie są przez wodę. Mniejsze opory cięcia nożem w roztworze mogą wpłynąć na zmniejszenie grubości warstwy uszkodzonych komórek. Wiele elementów wskazuje na to, że istnieje wpływ właściwości mięszu – jego świeżości na uszkodzenia powstałe podczas cięcia i na efektywność wymywania wodą treści komórkowej. Pomiar stopnia inhibicji dla cięcia pod wodą i odniesienie wyniku do wartości 50% może także być jednym z elementów oceny świeżości mięszu.

Widmo absorbancji rozproszonej mięszu zmierzone natychmiast po odcięciu mięszu różni się od widm mierzonych kolejno po określonym czasie. Obliczone z takich pomiarów widma przyrostu absorbancji – ΔA (widma różnicowe) cząstek ciętych pod wodą albo cząstek ciętych w roztworze inhibitorów nie różniły się kształtem, pomimo że proces brązowienia trwał aż 10 dni (rys. 39). Widma różnicowe – ΔA są również takie same dla mięszu ciętego w powietrzu, tzn. w warunkach, w których mięsz brązowieje krócej niż 30 min, a więc znacznie szybciej (rys. 19, s. 3). Wspólną cechą widm różnicowych – ΔA jest wzrost absorbancji rozproszonej w zakresie światła niebieskiego. Również na podstawie obliczanych widm różnicowych stwierdzono, że samo tylko wycięcie cząstek z jabłka w roztworze inhibitora (czas zanurzenia ok. 4 s) nie zmienia w zakresie Vis widma absorbancji rozproszonej – A_0 , a więc naturalnej barwy przeciętego jabłka.

Po 10 dniach chłodniczego przechowywania cząstek z jabłek, odcinano z cząstek plaster o grubości ok. 1,5 mm. W ten sposób odświeżone cząstki jabłka badano spektrofotometrycznie. Także obliczono widma różnicowe – ΔA cząstek odświeżonych i stwierdzono, że ich widmo po 10 dniach nie uległo znacznej zmianie w porównaniu z widmem cząstek ciętych 10 dni wcześniej. Mięsz wewnątrz cząstek zachował prawie naturalną barwę z sprzed 10 dni – barwę wyciętych cząstek. Zaobserwowano jednak po 10 dniach istotny spadek absorbancji w paśmie absorpcji chlorofilu. Można to wytłumaczyć przyspieszonym (w wyniku cięcia) przejrzywaniem cząstek. Wykonano podobne, lecz teraz już w temperaturze 18-23°C badania widm cząstek odświeżanych. W paśmie 600-710 nm stwierdzono, że absorbancja zmienia się, lecz zmiana ta nie przekracza 0,02 Abs i nie wykazuje przez 32 min związku z czasem brązowienia. Oznacza to, że szybkie brązowienie powierzchni mięszu jeszcze nie prowadzi do wyraźnej degradacji barwników absorbujących w tym rejonie (chlorofilu). Również zmiany struktury jabłka zapoczątkowane cięciem tkanki nie są aż tak szybkie. Możliwość oceny zmian struktury mięszu z pomiarów absorbancji rozproszonej wyjaśniono wcześniej (rozd. 5.1.1. s. 3). Z badań wynika też (rys. 39), że absorbancję w rejonie 700-720 nm można wykorzystać do standaryzowania aparatury przeznaczonej do kontroli świeżości sałatek, gdyż w tym rejonie nie ma barwników i w ten sposób można uwzględniać zmiany wywołane różną budową i zmianami struktury mięszu.

W technologii świeżych sałatek z jabłek potrzebna jest aparaturowa ocena świeżości, która daje wyniki zgodne z oceną konsumentów. Mogłaby ona uzupełnić testy organoleptyczne świeżości, gdy zostaną opracowane standardy. Należy tu brać także pod uwagę efekt przyzwyczajania się konsumentów do tego, że jabłka po przecięciu już za chwilę wyglądają na trochę brązowe, gdyż zwykle natychmiast ciemnieją w normalnych warunkach. Propozycja uwzględnienia zmieniającego się poziomu percepcji świeżości u konsumentów zgodna jest ze studiami McLellan i in. nad „składnikami akceptowalności” cząstek z jabłek [146,147].



Rys. 40. Przyrosty absorbancji rozproszonej – ΔA_{440} (pasmo 440 nm) miąższu cząstek z jabłek podczas dziesięciodniowego przechowywania w 5°C w pojemniku z membraną. Schłodzone jabłka cięto w 5°C pod wodą lub roztworami pirosiarczynu sodu i kwasu szczawiowego o stężeniach; — woda, — 0,1%, — 0,01%, - - - 0,04% — pirosiarczyny sodu, — 0,05%, — 0,1%, - · - · 0,2% — kwas szczawiowy

Fig. 40. Differences of diffuse absorbance – ΔA_{440} (band 440 nm) of flesh of apple wedges during 10 days of storage at 5°C in plastic membrane bags. Apples were cut at 5°C in water, either sodium bisulfite or oxalic acid solutions with the following concentrations; — water, — 0.1%, — 0.01%, - - - 0.04% — sodium bisulfite, — 0.05%, — 0.1%, - · - · 0.2% — oxalic acid

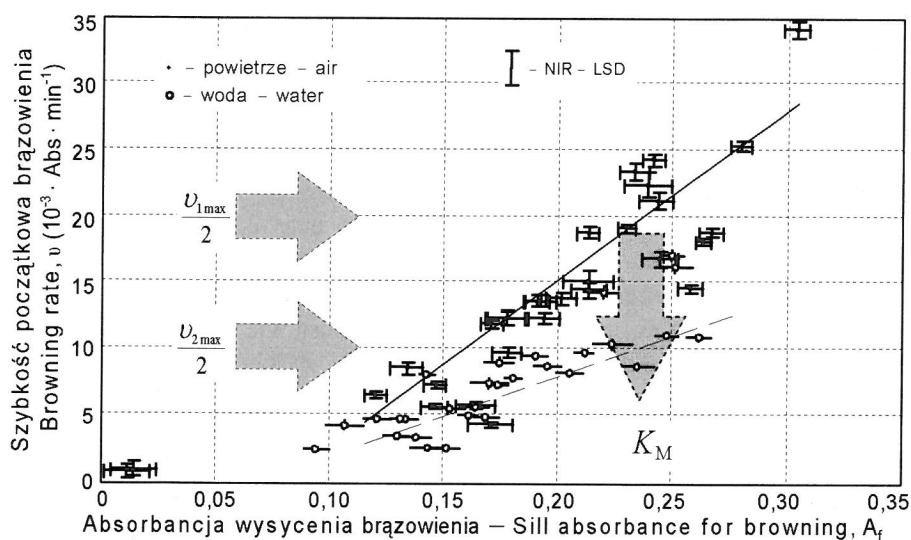
Efektywność inhibitorów można wyrażać stopniem inhibicji obliczanym z szybkości brązowienia albo też bardziej praktycznym w technologii, czasem trwałości, tzn. maksymalnym czasem, po którym cząstki z jabłek są jeszcze akceptowane przez konsumenta. W takiej ocenie jako odniesienie można wykorzystać przyrost absorbancji miąższu cząstek wyciętych pod wodą po jednym dniu chłodniczego przechowywania (wg technologii na rys. 2, s. 3) i ustalić te wyniki jako ograniczenie dla odmiany. Możliwość ta wynika z tego, że cząstki z jabłek o temperaturze 5°C wycięte w wodzie osiągną absorbancję wysycenia brązowienia – A_f po jednym dniu przechowywania chłodniczego [114]. Można przedstawić konkretne wyniki. Gdy jabłka oziębione do 5°C pocięto na cząstki w zimnej wodzie i przechowywano chłodniczo w temperaturze 5°C (rys. 40), to dla odmiany ‘Granny Smith’ zanotowano po 24. godzinach wzrost absorbancji rozproszonej o $0,10 \pm 0,05$ Abs, a dla ‘Golden Delicious’ o $0,07 \pm 0,01$ Abs. Wynik ten nieznacznie różni się od przyrostu absorbancji cząstek ciętych w powietrzu lub pod wodą w temperaturze 23°C i po 32 min. Dla odmiany ‘Granny Smith’ przyrosty wyniosły (odpowiednio: w powietrzu i w wodzie) 0,075 i 0,068 Abs, a dla ‘Golden Delicious’ 0,095 i 0,035 Abs.

Uzyskano również podobną absorbancję wysycenia, gdy zastosowano zamiast wody, roztwory inhibitorów enzymu PPO, takie jak pirosiarczyn sodu lub kwas szczawiowy. Lecz w takiej sytuacji efekt był widoczny dopiero po kilku dniach (rys. 40). Pomimo zmniejszenia szybkości początkowej brązowienia przy wzrastającym stężeniu inhibitora uzyskano absorbancję wysycenia na podobnym poziomie charakterystycznym dla badanej odmiany. Odmiana ‘Granny Smith’ osiągnęła wyższą, a ‘Golden Delicious’ niższą absorbancję wysycenia. Wartości te tylko nieznacznie różnią się od absorbancji wysycenia brązowienia, jakie uzyskiwano dla cząstek ciętych pod wodą o temperaturze 5°C po 24. godzinach ich chłodniczego przechowywania (rys. 40).

Podsumowując wyniki tego etapu badań stwierdzono, że proste spektrokolorymetry nadają się do monitorowania zmian absorbancji w paśmie 440 nm, a zmienności rozpraszania światła przez tkankę można uwzględnić, wykorzystując pomiar absorbancji miąższu w rejonie 700-720 nm dla każdej cząstki jabłka. Surowiec obiektywnie charakteryzuje przyrost absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm – ΔA , zmierzony na miąższu cząstek wyciętych pod wodą z oziębionych jabłek, po jednym dniu przetrzymywania opakowanych cząstek w chłodni. Równoważny jest proponowany „test surowca”, wykonywany w normalnych warunkach otoczenia (rys. 2, s. 3). W doświadczeniach z inhibicją do parametrów opisujących cechy odmianowe należy zaliczyć absorbancję rozproszoną miąższu świeżo wyciętej cząstki jabłka – A_0 , przyrost absorbancji do wysycenia brązowienia miąższu (wysycenie brązowienia) – A_f , a także czas połówkowy brązowienia – $t_{1/2}$.

5.9. Związek parametrów brązowienia z substratami brązowienia

Absorbancję dla wysycenia brązowienia – A_f wprowadzono po stwierdzeniu, że podczas brązowienia ustala się stan równowagi w mięszu i że pomiary można opisywać modelem kinetyki I-go rzędu. W przybliżeniu można przyjąć, że absorbancja wysycenia to miara wysycenia mięszu produktami reakcji brązowienia i w pośredni sposób powinna zależeć od stężeń substratów (polifenoli, tlenu) w ustalonych warunkach. Użyte tu, nowe parametry brązowienia mięszu – A_f i – v mogłyby, podobnie jak dotychczas próbowano współrzędne L^* , a^* , b^* , zostać powiązane z zawartością w mięszu substratów lub produktów określonych chemicznie.



Rys. 41. Stała reakcji (Michaelisa) enzymatycznego brązowienia – K_M oszacowana graficznie z zestawienia szybkości brązowienia – v i przyrostu absorbancji do wysycenia brązowienia – A_f mięszu cząstek z jabłek ciętych w powietrzu lub pod wodą (linia przerywana) o temperaturze 18-20°C (różne odmiany)

Fig. 41. Michaelis constant value for enzymatic browning – K_M estimated from the fitting of browning rate – v of flesh plotted versus final equilibrium of browning (equilibrium diffuse absorbances) – A_f of flesh of apple wedges sliced in air or under water (dotted line) with temperature of 18-20°C (for several cultivars).

Związek szybkości początkowej brązowienia – v z absorbancją dla wysycenia brązowienia – A_f i ich maksymalne, zaobserwowane zmiany dla odmian przedstawia rysunek 41. Zrozumiałe jest, że zależności uzyskane w doświadczeniu biologicznym i na tak różnych obiektach nie mogą być dokładne, jak w przypadku badań reakcji *in vitro*. Jednak i tu można spróbować opracowania modelowego wyników pomiarów.

W zbadanym układzie biologicznym – żywym mięszu, reakcja enzymatycznego brązowienia przebiegała przy nadmiarze enzymu PPO. Należy jednak zauważyć (rys. 41), że związek szybkości początkowej brązowienia – v z wysyceniem brązowienia – A_f ma postać krzywej sigmoidalnej. Krzywe kinetyczne wykreśla się (zasadniczo) dla szybkości początkowej i różnych zawartości głównego substratu w reakcji enzymatycznej. Można sądzić, że wyniki na wykresie przedstawiają efekty dodatniej kooperacji (procesu współdziałania) i na wykresie dotyczy to zakresu przejścia od najniższych do wyższych szybkości. Tylko takie pomiary były dostępne z tego eksperymentu.

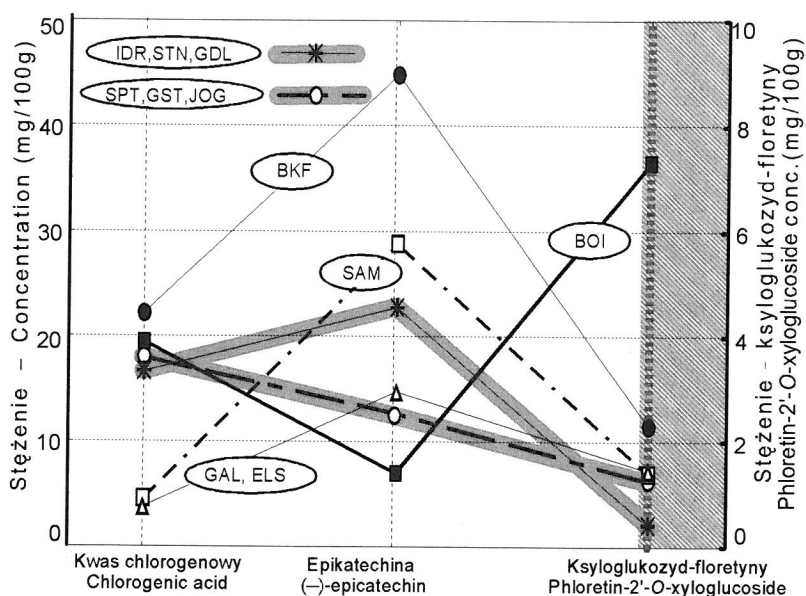
Zaobserwowana zasadnicza zmiana w zależności związana jest z techniką cięcia jabłek pod wodą i ten efekt zaznaczono linią przerywaną na rysunku 41. Zakres zmienności dla absorbancji wysycenia brązowienia – A_f zmniejszył się nieznacznie (rys. 33, s. 3) natomiast szybkość początkowa brązowienia – v , obniżyła się dwukrotnie (rys. 36, s. 3). Charakterystyczna jest także absorbancja dla wysycenia brązowienia – A_f , która odpowiada połowie maksymalnej zaobserwowanej szybkości $v = 20 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$, przy cięciu jabłek w powietrzu lub $v = 10 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$ dla cięcia pod wodą. Dane uzyskano z doświadczenia odmianowego i dla mięszu parametr można traktować jak stałą kinetyczną (Michaelisa) enzymatycznego brązowienia mięszu – $K_M = 0,23 \text{ Abs}$.

Gdyby cięcie pod wodą albo udział wody potraktować jak wpływ inhibitora [219] na przebieg reakcji enzymatycznej, to na podstawie porównania krzywych w zakresie wyższych szybkości powinno się go uznać za inhibitor niekompetycyjny. Tak więc udział wody należałoby raczej rozważyć jako rozpuszczalnika substratów reakcji lub ogólnie przeciwutleniacza. Dla takiej interpretacji można przyjąć, że substraty słabiej związane z matrycą komórkową ulegają rozcieńczeniu, wymyciu i odwirowaniu z treścią komórkową. Zapewne obniżeniu ulega stężenie tylko niektórych substratów w miejscu reakcji. W tym układzie możliwe jest łatwe wypłukania kwasu chlorogenowego, tlenu i zachowanie wielu substratów (np. procyanidyn) mocniej wiążących się z polisacharydami (celulozą). Ostatecznym efektem jest tylko nieznacznie niższa absorbancja wysycenia brązowienia – A_f , pomimo dwukrotnego spadku szybkości początkowej brązowienia cząstek wyciętych z jabłek. Wymyty substrat jest zapewne niezwykle istotnym, lecz tylko przejściowym w całym łańcuchu reakcji brązowienia, na co wskazuje niewielka zmiana ostatecznej zawartości produktu reakcji w mięszu – A_f .

Na podstawie powyższych wniosków można traktować eksperyment modelowo, jako przeprowadzany przy zmienianym stężeniu kwasu chlorogenowego i ustalonych innych substratach. Model brązowienia można także badać, np. w prezentacji danych Lineweavera-Burka, tak jak w doświadczeniach *in vitro*, gdy oś odcięta i rzędna są odwrotnością szybkości i odwrotnością stężenia [252]. Wyniki skłaniają do przyjęcia najprostszego modelu brązowienia jako reakcji dwusubstratowej dwa-dwa i mecha-

nizmu sekwencyjnego, uporządkowanego. Mógłby to być najprostszy model brązowienia, który wyjaśnia różnice w kinetyce brązowienia mięszu ciętego w powietrzu i ciętego pod wodą przedstawione na wykresie (rys. 41).

Przedstawione tu rozumowanie nie wyjaśnia ani pełnej roli kwasu chlorogenowego, ani wpływu wody, a jedynie wskazuje na możliwość rozważenia takiego modelu na podstawie pomiarów brązowienia wprost w ciętym mięszu. Konieczne byłoby odniesienie wyników do substratów lub produktów oznaczonych coraz doskonalszymi metodami chemicznymi.

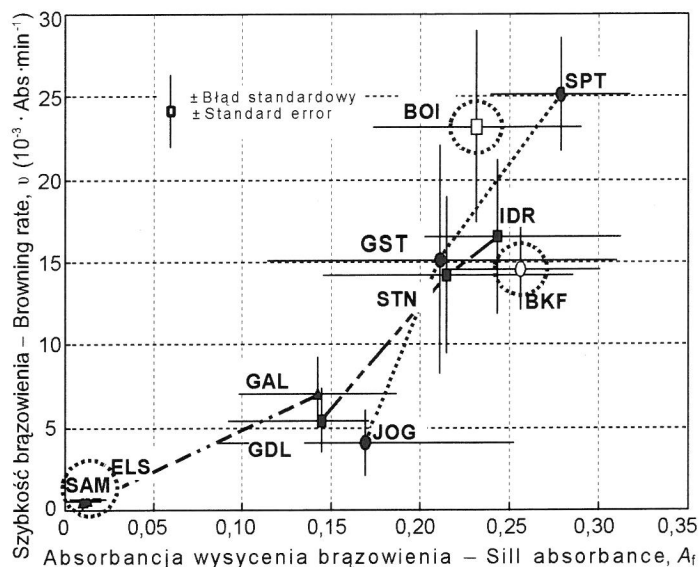


Rys. 42. Średnie stężenia polifenoli w mięszu jabłek obliczone dla sześciu skupień odmianowych o różnym składzie trzech polifenoli w jabłkach, które znaleziono metodą grupowania: 1 – BKF, 2 – SAM, 3 – BOI, 4 – GAL, ELS, 5 – IDR, STN, GDL, 6 – SPT, GST, JOG

Fig. 42. Mean concentrations of phenolics in the flesh of six clusters of cultivars with different phenolics content in apples, specified by means of cluster method: 1 – BKF, 2 – SAM, 3 – BOI, 4 – GAL, ELS, 5 – IDR, STN, GDL, 6 – SPT, GST, JOG

Do oceny wpływu zawartości polifenoli w mięszu na enzymatyczne brązowienie cząstek z jabłek wybrano 11 odmian (rys. 42). Wyboru odmian dokonano na podstawie znajomości parametrów ich brązowienia. Wykorzystano wyniki w taki sposób, aby pokryć odmianami pełen zakres zmienności parametrów szybkości brązowienia i absorbancji wysycenia brązowienia cząstek z jabłek, zakres który poznano w badaniach odmianowych.

Wyniki analiz chemicznych wykonanych na ekstraktach alkoholowych z mięszu owoców wykazały, że odmiany znacznie różnią się zawartością trzech polife-



Rys. 43. Zestawienie szybkości brązowienia – v miąższu cząstek z jabłek i przyrostu absorbancji do wysycenia brązowienia – A_f dla sześciu skupień odmianowych o różnej zawartości polifenoli: kwasu chlorogenowego, (–)-epikatechiny i ksyloglukozydu-floretyny. Cięte w powietrzu o temperaturze 18-20°C, średnie i błędy standardowe dla odmian

Fig. 43. Scatter plots of the browning rate – v versus differences of absorbance for final equilibrium of browning (equilibrium absorbance) – A_f of flesh of apple wedges for six clusters of cultivars with different content of chlorogenic acid, (–)-epicatechin and phloretin-2'-*O*-xyloglucoside. Sliced in air with temperature of 18-20°C, mean values and standard deviations for cultivars

noli: stężeniem kwasu chlorogenowego, epikatechiny i ksyloglukozydu floretyny (rozdz. 4.2.5. s. 3). Żeby uprościć ocenę udziału polifenoli w brązowieniu miąższu i określić ich typowe profile, utworzono z 11 odmian metodami statystycznymi 6 istotnie różniących się skupień odmianowych. W skupieniu są odmiany najbardziej podobne pod względem zawartości trzech polifenoli w miąższu, a najbardziej różnią się wartości średnie każdego skupienia [227]. Zestawienie wyników na rysunku 42 w sposób poglądowy przedstawia zakres zawartości trzech polifenoli w 100 g miąższu z jabłek o dojrzałości konsumpcyjnej. Jest to stężenie kwasu chlorogenowego (3-25 mg), epikatechiny (7-45 mg) i ksyloglukozydu floretyny (0,5-7,5 mg). Na rysunku scharakteryzowano również profile odmianowe zawartości polifenoli reprezentowane przez wyłonięte skupienia.

Skupienie z odmianą BKF ma najwyższą w 100 g miąższu zawartość kwasu chlorogenowego (25 mg) i epikatechiny (45 mg), a także stosunkowo dużo ksyloglukozydu floretyny. Skupienie złożone z odmiany BOI ma maksymalną zawartość ksyloglukozydu floretyny (7,5 mg) jaką zaobserwowano i dość dużą kwasu

chlorogenowego, lecz najmniejszą z zaobserwowanych zawartość epikatechiny (7 mg). Skupienie z odmianą SAM charakteryzuje najmniejsza w 100 g mięszu zawartość kwasu chlorogenowego (3 mg) i stosunkowo duża zawartość epikatechiny. Podobnie najmniejsza zaobserwowana zawartość kwasu chlorogenowego występuje w skupieniu z odmianami GAL i ELS, lecz mało mają one epikatechiny.

Do dwóch pozostałych skupień odmianowych (oznaczone grubą linią na rys. 42) można użyć określenia – odmiany o „przeciętnym profilu” polifenoli w mięszu jabłek. Skupienie z odmianami IDR, STN i GDL ma minimalną z zaobserwowanych zawartość w 100 g mięszu ksyloglukozydu floretyny (0,5 mg), a stosunkowo dużą jeszcze zawartość kwasu chlorogenowego przy wyższej zawartości epikatechiny. Skupienie z odmianami SPT, GST i JOG cechuje także stosunkowo duża zawartość kwasu chlorogenowego w 100 g mięszu, dość niska zawartości epikatechiny i przeciętna, lecz niska ksyloglukozydu floretyny.

Ponownie na jednym rysunku przedstawiono parametry: szybkość początkową brązowienia – v i wysycenie brązowienia – A_f , a ponadto oznaczono skupienia do jakich należą odmiany (rys. 43). Dla dwóch skupień odmianowych BOI i BKF, które cechuje najwyższa zawartość kwasu chlorogenowego w mięszu i najwyższa zawartość albo epikatechiny (odmiana BKF), albo ksyloglukozyd floretyny (odmiana BOI) przy zawsze niskiej zawartości trzeciego polifenolu, stwierdzono duże szybkości początkowe brązowienia – v i duże przyrosty absorbancji do wysycenia brązowienia – A_f . Natomiast dla odmiany SAM i dla skupienia z odmianami ELS i GAL, które miały najmniejszą zawartość kwasu chlorogenowego w mięszu, zaobserwowano najmniejszą szybkość brązowienia i małe przyrosty absorbancji do wysycenia brązowienia.

Wyniki tej analizy można podsumować następująco. Szybkość brązowienia wyższa od $0,01 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$ występuje przy wysokiej zawartości kwasu chlorogenowego i jednego z polifenoli – epikatechiny lub ksyloglukozydu floretyny. Niskie szybkości brązowienia związane są z bardzo małą zawartością kwasu chlorogenowego i niezależnie od tego, czy mięsz zawiera dużo, czy mało epikatechiny. Wynika z tego, że przy szybkiej reakcji brązowienia (badanej w zakresie Vis) można przyjąć, że powstające w dużej ilości chinony kwasu chlorogenowego nadają szybkości procesowi brązowienia. Na tej podstawie słusznym jest wyjaśnianie znacznego obniżenia szybkości brązowienia (rys. 41) wypłukaniem kwasu chlorogenowego z mięszu podczas cięcia pod wodą, lecz nie wyklucza to innych czynników.

Wykazano, że wyniki pomiarów brązowienia w zakresie widzialnego fioletu związane są z zawartością polifenoli w mięszu i z tego względu nie tworzą one jedynie skali oceny wrażeń świeżości cząstek z jabłek u konsumenta. Oczywiście jest, że parametry z modelu brązowienia wnoszą znacznie bogatsze informacje niż współrzędne barwometryczne L^* , a^* , b^* .

6. DYSKUSJA

6.1. Uszkodzenie mechaniczne i ocena świeżości mięszu

Termin świeżość owoców opisuje produkt pełen turgoru bez objawów usychania albo starzenia, którego komórki są nieuszkodzone [72]. Definicja podana przez ISO i próba standaryzacji nie określiła obiektywnych metod i parametrów do pomiaru świeżości. Opiera się ona na opisie i ocenie organoleptycznej produktu. Powszechnie używane pojęcie świeżości owoców i obecnie także produktu ciętych świeżych jabłek, ma wg tej definicji sens tylko organoleptyczny. Na podstawie podanej definicji i dostępnych metod badań w sadownictwie można świeżość owoców najłatwiej powiązać z testami mechanicznymi [40,181]. Są one często wykorzystywane do określania turgoru i odporności tkanek na uszkodzenie, a najczęściej do oceny stadium dojrzałości owoców i ogólnie rozumianej jakości owoców przechowywanych. Niewiele badań miało za swój cel rozpoznanie cechy organoleptycznej świeżości, wyjaśnienie tego pojęcia, jego zrozumienia i znaczenia dla konsumenta jabłek, a w efekcie powiązania świeżości z poznanymi już obiektywnymi wyróżnikami jakości [32,181,213]. We wprowadzeniu do tej pracy powiązano wiedzę naukową z licznymi informacjami praktycznymi, które zebrano od naukowców sadowników. Łatwiej jest na tej podstawie przedstawiać nową koncepcję świeżości mięszu jabłek, która jest wynikiem badań zróżnicowania procesu enzymatycznego brązowienia mięszu.

Testy mechaniczne niszczące tkankę stosowane są w badaniach sadowniczych od początku XX wieku [1,160]. W USA proste aparaty do oceny właściwości mechanicznych jabłek wprowadzono wraz z rozwojem metropolii przemysłowych i potrzebą zaopatrzenia stanów północnych w najwyższej jakości, świeże owoce przywożone z Kalifornii. Szybki rozwój konkurencji w rolniczej produkcji wielkotowarowej wymusił utworzenie Amerykańskiego Stowarzyszenia Inżynierii Rolniczej, ASAE (od 2005 r. o nazwie Amerykańskie Stowarzyszenie Inżynierii Rolniczej i Biologicznej, ASABE). Rozpowszechniło ono testy jędrności wśród plantatorów, a także wprowadzało wydajne technologie przechowalnicze [90,93]. Głównym zastosowaniem niszczących testów mechanicznych (testu jędrności) była ocena stadium dojrzałości jabłek i terminu zbioru w sadzie. Jednak najpopularniejszy test Magnessa-Taylor (opisany w 1925 r.) udało się znormalizować i dostosować do znacznie szerszych potrzeb, nie tylko do oceny owoców w sadzie, lecz także do określania szeroko rozumianej jakości jabłek, które dojrzały w komorach przechowalniczych. Wyniki badań w tej pracy również potwierdzają użyteczność pomiaru jędrności mięszu jabłek i zawartości ekstraktu, gdyż dłuższy okres przechowywania jabłek, zróżnicowane wybarwienie skórki zmieniało

wartości tych parametrów. Zestawiono je dla ponad 30. odmian w stadium dojrzałości konsumpcyjnej jabłek i są one, jak wiadomo z najnowszej literatury [181], elementem obiektywnej oceny świeżości owoców.

Dalsze badania właściwości mechanicznych jabłek, przeprowadzane w latach 70. XX w. przez Szcześniak [14], Bourne'a [22-24] i Mohsenina [160], ustaliły parametry tekstury dla owoców jabłoni. Do ich określania opracowano wiele, niekiedy bardzo złożonych układów mechanicznych. Z procesu uszkodzania miąższu jabłek i zależności (reologicznych) siła-odkształcenie-czas obliczanych jest wiele parametrów [14,187], które jak wykazały badania, odpowiadają ocenom organoleptycznym miąższu owocu, np. kruchości, soczystości, zwięzłości, jędrności [220]. Jednak w tych ocenach jakości organoleptycznej jabłek nie pojawiło się określenie „świeżość”, pomimo że często używane jest ono w badaniach najściślej związanych z sadownictwem i z przechowywalnictwem jabłek.

W wielu pracach z zakresu nauk rolniczych wykorzystywane są pomiary mechaniczne i niszczące owoce [92,105,106,112]. Postęp w technologiach przechowywania wymaga doskonalenia metod kontroli jakości świeżego produktu [84,85]. Liczne badania naukowe wskazują, że zmienność parametrów mechanicznych jabłek związana jest ze zróżnicowanymi przemianami metabolitów podstawowych w owocach, ze składnikami struktury tkanki, celulozą, pektynami i składnikami ustalającymi ciśnienie osmotyczne miąższu (turgor): cukrami, kwasami, jonami, białkami. Pod tym względem opis za pomocą jędrności ma najmocniej ugruntowaną pozycję [1,67,215]. Ponad pięćdziesiąt lat pracy naukowej dokumentuje jego znaczenie jako obiektywnego wyróżnika bardzo ogólnie rozumianej jakości: organoleptycznej i technologicznej jabłek [20,190,200]. Stosunkowo małe jest jednak zaangażowanie w badania właściwości mechanicznych owoców miękkich, np. truskawek lub malin niezwykle łatwo tracących świeżość [91,92,110].

Niewiele prac poświęcono związkom brązowienia enzymatycznego jabłek z ich właściwościami mechanicznymi. Obicie i wewnętrzne brązowienie, a także brązowienie przechowalnicze to znane przyczyny utraty świeżości i jakości owoców [27,193,236]. W badaniach określano siłę, energię, częstość drgań mechanicznych, a po pewnym czasie objętość uszkodzonego, brązowego miąższu jabłek [59,251]. Oceniona tymi metodami odporność albo skłonność do brązowienia owoców, opisana za pomocą obiektywnych parametrów mechanicznych, wykorzystywana jest do projektowania bezpieczniejszych technologii sortowania, pakowania jabłek i środków transportu, a także w selekcji hodowlanej odmian.

Pomimo wielu lat doświadczeń i badań owoców niszczącymi metodami mechanicznymi, wiadomo że brakuje instrumentalnych metod przygotowanych do tego, aby uzupełniły organoleptyczne oceny świeżości jabłek [2,16]. Wykonane w USA i opublikowane przez Saperssa, Douglasa i Hicksa w latach 80. XX w. [202,204] prace z zakresu technologii świeżo ciętych owoców, wskazały po raz

pierwszy na zmiany parametrów z układu CIE $L^*a^*b^*$ określających barwę miąższu jabłek. Współrzędne L^* , a^* , b^* mierzono po pewnym czasie od przecięcia jabłek. Były one przydatne w ocenie świeżości miąższu i nowego produktu. Znacznie wcześniej (ok. roku 1940) Sapers rozpoczął studia nad procesami enzymatycznego brązowienia. Następne, a także obecne prace w technologii ciętych świeżych owoców, nadal wykorzystują współrzędne barwy L^* , a^* , b^* i interpretację wyników podaną w tych pierwszych pracach. Zmiany jasności L^* , przecieru, soku lub ciętego miąższu interpretuje się jako proporcjonalne do stężenia brązowych barwników powstających w reakcji enzymatycznego brązowienia. Jak wykazano w pracy Kuczyńskiego i in. [113], interpretacja związana ze stężeniem barwników jest niezwykle zawodna, a niekiedy wręcz błędna.

W licznych badaniach chemicznych na ekstraktach i sokach z jabłek poznano podstawowe substraty, enzymy i produkty reakcji brązowienia miąższu jabłka [169-171]. Po mechanicznym uszkodzeniu komórek miąższu dochodzi do kontaktu enzymu PPO z substratami polifenolowymi. Uruchomione zostają mechanizmy „reakcji odpowiedzi” żywej tkanki – działa szybki system enzymatyczny i nieenzymatyczny unieszkodliwiania powstających reaktywnych form tlenu, azotu i rodników organicznych [239]. W tej pracy zaplanowano, aby do oceny świeżości jabłka i wskazania elementów składających się na aktywność biologiczną uszkodzonego miąższu, wykorzystać szybką reakcję brązowienia enzymatycznego. W miąższu brązowienie enzymatyczne spełnia ściśle określone funkcje biologiczne. Już sam przegląd licznych prac naukowych o mechanicznych, niszczących badaniach jabłek umożliwiał postawienie hipotezy zapewniającej powodzenie studiów nad obiektywną oceną świeżości jabłek. Istnieją naturalne, biochemiczne i specyficzne dla odmian jabłoni, a tym bardziej zmieniające się wraz z dojrzewaniem lub przejrzywaniem owoców, przystosowania miąższu i zróżnicowana odporność na niszczenie jego komórek [48].

Celem badań w tej pracy było poznanie tej fazy metabolizmu „odpowiedzi na stres” uszkodzania w owocach, która może być wykorzystana w diagnostyce świeżości jabłek przechowywanych lub ciętych świeżych jabłek [232]. Szczegółowo, metodami fizycznymi zbadano mechanizmy i przebieg reakcji uruchomionej uszkodzeniem mechanicznym. Uzupełniono badania analizami zawartości naturalnych produktów chemicznych, które chronią żywą tkankę, spełniają ważne w niej funkcje biologiczne, zabezpieczają tkankę przed niszczącym utlenianiem zachodzącym w bezpośredniej z nią styczności. Aktywność biologiczna produktów metabolizmu wtórnego w miąższu, można przypuszczać, że jest uniwersalna i spełnia podobną ochronną funkcję w tkankach roślinnych i zwierzęcych [132,154].

Rola naturalnych przeciwutleniaczy jest w technologii żywności dobrze udokumentowana. Wydłużają one czas składowania żywności poprzez spowalnianie niekorzystnych reakcji utleniania. Niektóre z nich: flawonoidy i kwasy fenolowe

uznane zostały nawet za wartościowe w żywieniu człowieka [61,88]. Natomiast ich aktywność biologiczna w uszkodzonych roślinach, poza najwcześniej poznaną rolą przeciwutleniającą, polega na zdolności do łączenia się z białkami – enzymami błon komórkowych i z wielocukrami ścian komórkowych. Działanie ich u roślin dotyczy receptorów komórkowych, przekźników i stąd wpływa na ekspresję wielu genów, na sygnały komórkowe włącznie z uruchamianiem lub blokowaniem apoptozy, a także na trwałe połączenia pomiędzy komórkami [168,248,249].

Znacznie więcej obecnie wiadomo o ważnej roli spełnianej w organizmie człowieka i złożonych funkcjach w przewodzie pokarmowym tej bardzo licznej grupy roślinnych metabolitów wtórnych, jakimi są związki polifenolowe [77,183,208,252]. Ponieważ naturalne polifenole uznano za ważne składniki dietetyczne, to konsekwencją tego jest potrzeba szacowania „wartości biologicznej” żywności [212]. Rozumiane jest to najczęściej jako zależność od składu chemicznego i stężenia polifenoli [139,188]. W tym celu powstała wielka liczba metod szacowania pojemności przeciwutleniającej lub zawartości polifenoli. Polifenole są również elementem oceny świeżości jabłek, który można oszacować parametrami opisanymi w tej pracy. Parametry wyznaczane są metodą kinetyczną z opracowanego modelu brązowienia mięszu i metodami potencjometrii redoks.

Aktywność przeciwutleniaczy w systemach biologicznych jest zależna od wielu czynników. Wiadomo, że przy testowaniu przeciwutleniaczy naturalnych *in vitro* należy brać pod uwagę: skład systemu, typ utlenianego substratu, rodzaj enzymu, metodę pomiaru utlenienia i miary aktywności przeciwutleniacza. Biologiczna aktywność polifenoli w organizmach, jak wykazują obecne prace, jest tak złożona, że nie mogą tego wykazać proste testy chemiczne *in vitro*, zwłaszcza wolne od elementów komórkowych [185]. Dlatego badania złożonych reakcji na modelach błon biologicznych [53,62,217] i tkankach zwierząt otwierają nowe perspektywy [186,253]. Lecz i w tych warunkach bardzo trudno jest, jak się okazuje, zbadać różne warianty udziału lub aktywności polifenoli. Dlatego oczekuje się wielu nowych informacji z dotąd niepoznanych, naturalnych i modelowych systemów biologicznych, np. z takich jak mięsz jabłka. Potrzebna jest do tego standaryzacja testów i bardziej specyficzne metody, które określą straty zachodzące wprost w systemach biologicznych. Do tego celu także zmierzały badania przedstawione w tej pracy.

Większość naturalnych przeciwutleniaczy i polifenoli jest wielofunkcyjna, więc protokół przeciwutleniacza wymaga pomiaru nie tylko jednej właściwości pokarmu. Z tego powodu studia nad brązowieniem mięszu i świeżością także prezentują wielokierunkowy układ. Główną grupę metod oceny pojemności przeciwutleniaczej stanowią metody kinetyczne [194]. Opierają się one na tej samej zasadzie: czynnik utleniający indukuje reakcję (faza propagacji), której przebieg można śledzić spektrofotometrycznie lub fluorymetrycznie, gdyż w wyniku

utleniania powstaje substancja barwna (lub fluoryzująca) albo odwrotnie – z barwnej powstaje bezbarwna. Obecność przeciwutleniaczy w próbce spowalnia tę reakcję utleniania (faza terminacji). Szybkość reakcji jest miarą zawartości przeciwutleniaczy, a bezpośrednią miarą może być ilość substancji wskaźnikowej (barwnika) powstającej w reakcji. Metody takie, włącznie z najstarszą metodą Folin-Ciocalteu, rutynowo stosowane były do badań, np. aktywności enzymów i polifenoli w enzymatycznie brązowiejących ekstraktach i przecierach [5,6,176,240].

W tej pracy do pomiaru świeżości mięszu zaproponowano ocenę brązowienia mięszu. Tutaj, jakby przez analogię do sztucznych układów, czynnikiem indukującym reakcję jest mechaniczne uszkodzenie komórek. Szybka reakcja enzymatyczna przebiega na powierzchni żywego mięszu i w kontakcie z komórkami (faza propagacji). Spektrofotometr odbiciowy UV-Vis rejestruje postępujące zmiany absorbancji rozproszonej mięszu w dostępnym zakresie widma od 220 nm do 800 nm. Znalezione charakterystyczne pasma absorbancji w widmach czasowo rozdzielonych. Wzrost lub spadek absorbancji w tych pasmach podczas reakcji korelował ze stężeniem kilku oznaczonych chemicznie substratów [109]. Spektrofotometria odbiciowa UV-Vis umożliwiła śledzenie przemian w łańcuchu reakcji brązowienia mięszu. W paśmie niebieskim widzialne są jedynie brązowe barwniki, które absorbują ok. 440 nm (faza terminacji).

Metody kinetyczne służą do pomiaru przerywania jednocześnie obydwu łańcuchów reakcji zarówno reakcji przeciwutleniaczy przenoszących elektrony, jak i oddających protony. Oceniają jednak efektywność przeciwutleniającą tylko takich składników, które wchodzi w reakcję, a do ich pomiaru zapewniono wystarczającą dużą rozdzielczość czasową i rozdzielczość spektralną. Metody te nie dają pełnej informacji o chemicznym mechanizmie w łańcuchu reakcji. Ponadto nie uwzględniają mniej efektywnych polifenoli, tym bardziej, gdy jest ich niewiele i dotąd nie poznano ich w analizach chemicznych. W pracy stwierdzono, że także fluorescencja zakłóca widma odbiciowe, co można zaobserwować przy dużej rozdzielczości spektralnej i czasowej. Widma dają tylko uśredniony obraz kolejnych, szybkich reakcji zachodzących pomiędzy rodnikami. Podobnie jest przy szacowaniu aktywności polifenoli w ekstrakcie testem kinetycznym. Zbyt ogólnie traktuje on udział obu aktywności, tzn. aktywności przeciwutleniaczy lub utleniaczy. Lecz w badanym żywym układzie biologicznym często łatwiej zweryfikować rolę substratów i ich udział w łańcuchu reakcji. Jest to ważne bo też dostępne w widmach różnicowych czasowo rozdzielonych brązowiejącego mięszu – ze spektrofotometrii światła rozproszonego w zakresie UV-Vis. Gdy nierozpoznane w analizach chemicznych substraty, katalizatory zmieniają profil brązowienia zarejestrowany w UV, to spełniają w układzie ściśle określone funkcje biologiczne, a uzyskane parametry mogą określać świeżość mięszu.

Pomiar wielkości termodynamicznych, takich jak potencjał redoks uszkodzanej tkanki, nie jest prawie brany pod uwagę w badaniach brązowienia enzymatycznego, a przecież daje on informację o zdolności cząstek rodnikowych do utleniania lub redukcji [30]. Potencjał redoks uważa się przede wszystkim za ważny wskaźnik do określania czasu przechowywania żywności utrwalonej i jej świeżości [219]. Na przykład w zakresie badań mikrobiologicznych używany jest do oceny rozwoju procesu fermentacji [242], do prognozowania wzrostu mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych [166]. Jednak tkankę roślinną przed stresami otoczenia zabezpiecza znacznie więcej systemów niż utrwalaony produkt spożywczy. Uszkodzenie komórek elektrodą redoks inicjuje powstawanie reaktywnych form tlenu i organicznych substratów wolnorodnikowych w mięszu. W tej stresowej sytuacji najszybciej działającym systemem jest układ enzymów PPO i związki polifenolowe.

W utrzymaniu świeżości mięszu – dobrej kondycji żywych komórek albo stabilności biochemicznej produktu ciętych świeżych jabłek ważną rolę odgrywają różne składniki. Wiele z nich tworzy grupy, w których zawartość poszczególnych związków jest ściśle skorelowana ze sobą lub spełnia podobne funkcje biologiczne. Dość trudno w takich układach zmieniać poziom ich aktywności lub stężeń i w taki sposób wyjaśniać ich rolę. Widać te trudności już w przypadku badań, np. zawartości w mięszu jabłek polifenoli i kwasu l-askorbinowego [188]. W takim złożonym układzie biologicznym użycie mechanicznego stresu, zastosowanie metod dyfuzyjnej spektrofotometrii UV-Vis lub potencjometrii redoks ułatwia pomiar i śledzenie jego skutków. Metoda kinetyczna odnosi się do bardziej aktywnych składników w mięszu. Natomiast potencjał elektrodowy redoks szacuje całkowity udział przeciwutleniaczy, uwzględnia także wolniej działające, lecz zapewne aktywne składniki [233]. W tej pracy wykorzystano elementarne funkcje biologiczne, które spełnia brązowienie do określenia świeżości mięszu i zachowanej wartości żywieniowej produktu roślinnego.

6.2. Charakterystyka brązowienia i udział polifenoli

Podczas przemian brązowienia enzymatycznego mięszu ulegało zmianie widmo absorpcji substratów i produktów reakcji, które znajdują się w mięszu. Zmiany po pewnym czasie dotyczyły również widma z zakresu światła widzialnego i w efekcie zmieniało się wrażenie barwy, np. z białej na brązową. Poszukiwania związków pomiędzy barwą mięszu a stężeniem polifenoli i aktywnością PPO podczas enzymatycznego brązowienia wymagały żmudnych badań. W tej pracy zostały one ukierunkowane na badania widm odbiciowych w zakresie ultrafioletu i fioletu. Badaniom brązowienia, jak zostanie to przedstawione w dalszej części pracy, nadano teraz całkiem inny sens, chociaż cel ich jest podobny – ocena świeżości owoców i ocena świeżości produktów z tych owoców.

6.2.1. Zakres widzialny brązowienia

Widma odbiciowe w całym zakresie widzialnym Vis, zmierzone w stałych odstępach czasowych (widma czasowo rozdzielone) dla reakcji enzymatycznego brązowienia po raz pierwszy opublikował w 1990 roku Kuczyński i in. [113]. Cechą szczególną tych badań, było spowolnienie reakcji brązowienia w oziębionych do 2°C owocach białych brzoskwiń. Świeżo wykonane przeciery badano w temperaturze 4°C. Analizowano zmiany kształtu widm odbiciowych podczas brązowienia przecierów. W pracy tej wprowadzono do analizy brązowienia enzymatycznego spektrofotometrię w świetle odbitym, widma absorbancji rozproszonej i widma różnicowe czasowo rozdzielone [235]. Podczas brązowienia przecierów, rozważono wpływ barwników na kształt widma absorbancji rozproszonej: antocyjanów, chlorofili, karotenoidów i powstających brązowych barwników. Opisano zmiany w widmach wywołane roztworami inhibitorów brązowienia: kwasu askorbinowego, kwasu szczawowego, kwasu cytrynowego, pirosiarczynu sodu, fluorku sodu [116]. Po raz pierwszy widma odbiciowe z zakresu Vis użyto do porównania względnej efektywności inhibitorów chemicznych m.in. kwasu szczawowego i pirosiarczynu sodu. Ostatnio wyniki te potwierdzone zostały przez innych naukowców [221-223].

Interpretacja wyników badań brązowienia wyrażonych za pomocą absorbancji rozproszonej stała się podobna do interpretacji badań klarownych roztworów lub ekstraktów analizowanych w świetle przechodzącym. Analizując klarowne roztwory, wykorzystuje się zwykle pasmo 390 nm [122] lub (różnicowo) pasma 260 i 280 nm [165]. Kuczyński i in. [116] pokazali na przykładach z zakresu widma Vis jak udział utlenionych barwników antocyjanowych podczas brązowienia, w różnorodny sposób zmienia współrzędne barwy L^* , a^* , b^* . Wartości współrzędnych nie były proporcjonalne do czasu brązowienia i do przyrostu stężeń brązowych barwników powstających w wyniku brązowienia. Stwierdzono, że pomiary metodą kolorymetryczną nie dają jednoznacznych związków ze stężeniem barwników podczas reakcji enzymatycznego brązowienia przecierów. W ten sposób ostatecznie wyjaśniono przyczynę wielu niepowodzeń, gdy korelowano współrzędne L^* , a^* , b^* przecierów i soków z ich składem chemicznym, np. z polifenolami lub z aktywnością enzymów. Wyciągnięto więc wniosek, że podobieństwo współrzędnych L^* , a^* , b^* przecierów nie jest gwarancją zachowania jednorodności składu surowca ani też produktu, zwłaszcza gdy aktywnie postępują zmiany. Pomiary barwy mają ważne zastosowanie i powinny służyć do oceny stopnia zróżnicowania barwy i oceny postrzegania tych zmian przez konsumentów [51].

Po raz pierwszy Aubert i in. [8] wykorzystali pasmo fioletu z widma odbiciowego w badaniach mięszu jabłek. Rozważono udział w widmie odbiciowym antocyjanów, chlorofili, karotenoidów. Do oceny skłonności do brązowienia mię-

szu jabłek jedenastu odmian użyto przyrostu absorbancji rozproszonej w paśmie 390 nm. Nie otrzymano zadowalających korelacji przyrostów absorbancji ze spadkiem jasności ΔL^* , ani z całkowitą różnicą barwy ΔE^* . Wynik ten potwierdza wiadomości znane z kolorymetrii obiektywnej, że pasmo maksymalnej czułości oka ludzkiego (ok. 555 nm) [151] jest zbyt odległe od pasma (od ok. 360 nm do 440 nm), w którym występują maksymalne zmiany wywołane brązowieniem mięszu jabłek.

Podobnie, jak to stwierdzono w pracy Sapersa i Douglasa [202], ocena barwometryczna, tak jak i ocena wzrokowa wykazują „czas martwy”, tzn. brak istotnych różnic w barwie. W tym czasie pomiary barwy nie są współbieżne z wynikami oceny spektrofotometrycznej brązowienia mięszu, które ulegają wyraźnym zmianom. Kuczyński i in. [107] wykazali, że nie wynika to bynajmniej z niskiej czułości aparatury kolorymetrycznej. Kolorymetria obiektywna i produkowana aparatura w zupełności spełniają warunek czułości widzenia obserwatora normalnego [151]. Nie jest to także wynik pomyślnego rozdzielenia metodą kolorymetryczną etapu enzymatycznego od nieenzymatycznego brązowienia, gdyż i takie koncepcje są analizowane [247]. Takie rozdzielenie było możliwe w roztworach klarownych, na co wskazują prace wykonane na utrwalonych sokach [165,247], lecz w zupełnie innym układzie pomiarowym. Obecnie uzyskano taką możliwość również w badaniu mięszu w zakresie UV, jak wykazał Kuczyński [103] z użyciem spektrofotometru odbiciowego UV-Vis.

Pełną charakterystykę spektrofotometryczną mięszu jabłek podczas brązowienia w zakresie Vis, a także opis wpływu inhibicji brązowienia (fizycznej i chemicznej) na cząstki wycięte z jabłka, opublikował po raz pierwszy Kuczyński i in. [115]. Nie zaobserwowano w widmach Vis udziału antocyjanów i ich utleniania sprzężonego podczas brązowienia jabłek, tak jak to stwierdzono w przecierach z brzoskwiń. Zmiany absorbancji rozproszonej następowały w szerokim paśmie w zakresie fioletu. Dlatego w podobny sposób można dyskutować o wynikach z pasma 440 nm, jak i z pasma 390 nm użytego w pracy Auberta i in. [8]. Wyniki umożliwiły jednoznaczną interpretację ocen brązowienia mięszu owoców z kilku odmian. Do tych pasm można również odnosić powstawanie barwników melaninowych, tak jak w pracach z roztworami modelowymi [170]. Ze względu na klasę dokładności użytego spektrokolorymetru (aparatury technicznej) wyniki w paśmie 440 nm są dokładniejsze niż w niższym zakresie widma, a jak to wykazano, mają też drugie zastosowanie – ułatwiają skalowanie dojrzałości mięszu.

Znacznie dłużej trwające brązowienie prowadzi do znacznego przyrostu absorbancji rozproszonej w zakresie widzialnym. Przy współudziale dodatkowych składników w mięszu, grubszej warstwie z pulpy na mięszu, mogą powstawać złożone barwniki – melaniny i zmiany barwy, o których donoszą prace o przecierach i sokach. Zaobserwowano, że w pomiarach mięszu jabłek współrzędne L^* , a^* , b^*

korelują z absorpcją rozproszoną w paśmie 440 nm. Jednak współrzędne L^* , a^* , b^* to aparaturowe parametry ocen sensorycznych i mają złożoną charakterystykę zależności od bodźca fizycznego [14]. Ponadto nie są określone w prostym pomiarze fizycznym i również z tego względu nie zachowują jednorodności wariancji (statystycznej). Sprawia to kłopot w testach statystycznych przy porównywaniu zmienności surowca, produktu lub skuteczności inhibicji brązowienia. Na podstawie wykonanych badań dla typowych warunków cięcia jabłek, zrezygnowano z pomiarów całego widma w zakresie Vis i dalszego określania współrzędnych barwy L^* , a^* , b^* lub parametrów barwy L^* , C^* , h . Poprzestano na pomiarach absorpcji rozproszonej w fiolecie dla miąższu jabłka i taka metoda pomiaru przypomina analizy przezroczystych przecierów i klarownych roztworów [228,234].

Poza pracami Kuczyńskiego i in. [107,115] nie znaleziono opublikowanych widm odbiciowych brązowiejącego miąższu jabłek lub przecierów. Jednak technika spektrofotometrii odbiciowej znana jest od bardzo dawna w badaniach jabłek [1,94,159]. Stosowano ją także do badań innych owoców rolnych i powiązano ze zmianami zawartości barwników: antocyjanów, karotenoidów i chlorofili [34,101,108,150,254]. Pierwsze zarejestrowane widma odbiciowe Vis to widma skórki jabłek, które badano na początku XX wieku w poszukiwaniu pasm i filtrów optycznych przydatnych do sortowania owoców wg zróżnicowanego wybarwienia [1,159]. W nowszych pracach analizę widma Vis skórki wykorzystano do pomiaru stopnia rozpadu chlorofilu w skórce jabłek [255], a także do równoczesnego pomiaru barwy skórki charakterystycznej dla dojrzałych jabłek z kilku odmian [100]. Natomiast zakres bliskiej podczerwieni wykorzystuje się do oceny zawartości ekstraktu w jabłkach i stosuje w liniach sortowniczych [27,82,124,145]. Towarzyszące zastosowaniom spektrofotometrii odbiciowej prace metodyczne wykonywano wielokrotnie na miąższu i w zakresie Vis. Kształty opublikowanych widm i ich skale podobne są do widm plastrów natychmiast po wycięciu. Także głębokość i zasięg oświetlenia próbki miąższu w układzie spektrofotometru z kulą rozpraszającą, oceniane są na kilka milimetrów do wnętrza miąższu, chociaż niektóre poglądy można uznać za dyskusyjne [52,118].

Dotychczas nie używano widm czasowo rozdzielonych i spektrofotometrii odbiciowej (dyfuzyjnej) miąższu do charakterystyki szybkich reakcji metabolicznych w jabłkach. Podobne badania znane są jednak od dawna w naukach biofizycznych [235]. Praktyczne zastosowanie w medycynie to np. pomiary i analizy sprawności wymiany tlenowej, które wykonuje się wprost w naczyniach krwionośnych pod skórą pacjenta [149].

Obecnie na szybki rozwój spektrofotometrii odbicia rozproszonego pozwala dostępność laserów diodowych, światłowodów, a najnowsze metody wykorzystują nano- i pikosekundową modulację światła laserowego [35]. Możliwe są też bardzo rozległe badania w warunkach polowych, w sadzie i przechowalni [255].

Oczekiwane jest powszechne wprowadzenie metod spektrofotometrii odbiciowej do oceny jakości jabłek zamiast metod kolorymetrycznych, ponieważ zapewnią znacznie większą czułość i powtarzalność pomiarów, a także ułatwią wnioskowanie na podstawie analiz statystycznych.

6.2.2. Brązowienie w zakresie UV

W tej pracy wykazano, że zmiany widma miększu w zakresie ultrafioletu wyprzedzają znacznie zmiany w zakresie widzialnym, a rzeczywisty, enzymatyczny proces brązowienia miększu nie jest widoczny okiem ludzkim. Jednak miąższ i jego świeżość badano początkowo tylko w zakresie światła widzialnego i od tego rozpoczęto studia nad reakcją enzymatycznego brązowienia zachodzącą wprost w ciętej tkance.

Najwięcej informacji o brązowieniu enzymatycznym w zakresie ultrafioletu pochodzi z badań na modelach, tzn. rozcieńczonych ekstraktach z owoców. Już w publikacjach sprzed prawie 50 lat prezentowane są widma reakcji brązowienia i jej inhibicji uzyskane z roztworów polifenoli [68,170]. Współczesne analizy polifenoli metodami HPLC [161] w różnie przygotowanych ekstraktach z jabłek, a głównie w sokach wykonanych wg różnych technologii tłoczenia, są znacznie dokładniejsze. Wyniki licznych analiz chemicznych zwróciły uwagę na możliwość oceny zróżnicowania procesów redoks, jakie muszą występować w różnych strefach owocu. Brano to już pod uwagę ponad 60 lat temu w pracach z zakresu biologii, analizując układy redoks w różnych tkankach i na granicach faz – żywa tkanka i powietrze [243]. Wyniki tych fizjologicznych badań owoców stymulowały wykonanie analiz w zakresie ultrafioletu. Dotyczy to opublikowanych pasm ok. 260 nm, 280 nm i 320 nm w klarownych roztworach i przebiegu reakcji według reguł i warunków układów redoks.

Kuczyński i in. [107] analizowali zmiany w widmach odbiciowych UV brązującego miększu już po 2 min i wykazali zadowalającą czułość spektrofotometru dwuwiązkowego z kulą rozpraszającą do badań naukowych. Skłoniło to ich do poszukiwań, podobnej jak w widmach Vis zarejestrowanych na przecierach brzoskwińowych, konstruktywnej interpretacji szybkich zmian – spadku, a również i wzrostu absorbancji rozproszonej w kilku szerokich pasmach widma UV [109].

Prezentowane są od bardzo dawna w licznych publikacjach wyniki analiz chemicznych polifenoli w sokach lub ekstraktach z jabłek [31,57,167], a obecnie już coraz częściej w jabłkach [128,188]. Biorą one pod uwagę (zwłaszcza przy ocenie technologii tłoczenia) zawartość polifenoli w miększu, w skórce jabłka, gnieździe nasiennym i w nasionach. Awad i in. [10,11] opisali największą ilość czynników wpływających na zmienność, licznych polifenoli w jabłkach. Autorzy uwzględnili warunki uprawy w sadzie, położenie jabłka na drzewie, stronę nasłonecznioną,

różne części owocu, a także komórki gromadzące polifenole i inne. Natomiast Leja i in. [128] uwzględnili zmiany polifenoli w skórce podczas długiego przechowywania owoców w komorach chłodniczych. Jednak elementy budowy tkankowej znacznie się różnią rodzajem i stężeniem akumulowanych w nich polifenoli [38]. Także w niejednakowym stopniu polifenole są z nich wydobywane podczas ekstrakcji. Problemy z analizą chemiczną polifenoli, a zwłaszcza ich ekstrakcją z tkanek owoców omawiane są w najnowszych pracach [103,194,195]. Wskazują one na coraz nowsze metody ekstrakcji [148], dokładniejszy rozdział chromatograficzny i nowe składniki – niespodziewanie duże ilości bezbarwnych antocyjanów w jabłkach (bardzo liczna grupa związków), których zawartości w ogólnym udziale polifenoli w jabłkach dotychczas niedoceniano [3,63]. Obecnie wydzielono już 6 grup, do których należą polifenole z jabłek [63]. Kolekcje opublikowanych i zidentyfikowanych w jabłkach polifenoli sięgają ponad 15 różnych związków. Jednak ekstrakcja ilościowa polifenoli z jabłek nadal nie jest dokładna, gdyż są one silnie i bardzo różnie związane z elementami strukturalnymi komórek i tkanek. Według analiz chemicznych [128,171,188] ich zawartość w owocach jest bardzo zmienna i może się różnić od 2 do 5 razy dla odmian używanych w sokownictwie. Nadal brakuje uszeregowania polifenoli pod względem udziału i roli w enzymatycznym brązowieńniu mięszu. Natomiast już najstarsze analizy chemiczne wskazują, że w przecierze z czystego mięszu jabłek do głównych składników polifenolowych można zaliczyć: kwas chlorogenowy, epikatechinę, a także ksyloglukozyd floretyny [137,169,170].

W tej pracy wykorzystano wyniki badań skłonności odmian do brązowieńnienia mięszu, żeby optymalnie wybrać zestaw 9 odmian do jednocześnie wykonanej analizy chemicznej. Wybrano odmiany w ten sposób, aby pokrywały maksymalnie szeroki zakres brązowieńnienia. Na wybranych odmianach poznano dotychczas nieznanne i szczególne profile czterech polifenoli występujących w mięszu: kwasu chlorogenowego, epikatechiny, ksyloglukozydu floretyny, procyanidyny B2 [109]. Decydujący wpływ na skład i proporcje stężeń polifenoli miał stan dojrzałości konsumpcyjnej owoców, który był przedmiotem zainteresowania i analizy. Zwrócono uwagę na odmianę ‘Szampion’ o niezwykle niskiej zawartości kwasu chlorogenowego w mięszu (podobnie ‘Gala’ i ‘Elstar’), lecz o wysokiej zawartości epikatechiny [98]. Wyniki tych porównań zostały potwierdzone (wykonane w naszej strefie klimatycznej) kilkoma nowszymi i dokładniejszymi w skali bezwzględnej metodami analitycznymi [141,188]. Pierwszy raz wskazano na krańcowo różne odmiany ‘Bankroft’ i ‘Boiken’. Odmiana ‘Bankroft’ o najwyższej zarejestrowanej ilości epikatechiny i przeciętnej ksyloglukozydu floretyny, natomiast ‘Boiken’ przeciwnie, z najniższą zaobserwowaną ilością epikatechiny i najwyższą obserwowaną ilością ksyloglukozydu floretyny, a obie dość zasobne w kwas chlorogenowy.

W kilku pracach wykazane zostało, że enzym oksydaza polifenolowa jabłek jest co najmniej kilkakrotnie bardziej aktywna w reakcji z kwasem chlorogenowym niż

z katechinami [170]. Ponadto w mieszaninie katechin z kwasem chlorogenowym szybkość utleniania katechin jest znacznie większa niż oddzielnie, natomiast utlenianie samego kwasu jest wtedy wolniejsze [173]. Podobnie Oleszek [170] stwierdził, że modelowy roztwór ksyloglukozydu floretyny z kwasem chlorogenowym albo z epikatechiną utlenia się szybko z wytworzeniem bardzo ciemnych produktów. Z tych badań modelowych wiadomo było, że na szybkość brązowienia soków i przecierów, a prawdopodobnie także miąższu może wpływać współdziałanie substratów fenolowych. Określano to jako proporcję zawartości kwasu chlorogenowego do epikatechiny albo kwasu chlorogenowego do ksyloglukozydu floretyny w jabłkach. Dlatego gdy badano brązowienie ekstraktów z jabłek, to zawsze przyczyną szybkiej reakcji brązowienia były wysokie stężenia kwasu chlorogenowego, a powstawanie intensywniejszej brązowej barwy wymagało wyższych stężeń flawonoidów. Dużą skłonność do brązowienia pewnej grupy zbadanych odmian wyjaśniano przemianami z udziałem kwasu chlorogenowego [188]. Drugim czynnikiem zmian barwy mogły być pochodne flawonoidów, przy udziale których barwniki brązowe są silniej zabarwione niż te wprost z kwasu chlorogenowego. Dlatego Oszmiański i Sorzyński [177] podali prostą receptę. Szybkość brązowienia enzymatycznego przetworów jabłkowych jest zależna od proporcji flawonoidów do kwasów fenylopropenowych (np. kwasu chlorogenowego). Ponadto, że utlenione katechiny mają bardziej ciemnobrązowy kolor, gdyż maksimum pochłaniania roztworu jest przy dłuższej fali światła niż utlenionego kwasu chlorogenowego. Dla katechin jest to już bliskie 400 nm, a dla kwasu w zakresie niewidzialnym ok. 320 nm. Uzyskano informacje praktyczne o kinetyce brązowienia roztworów modelowych, które udało się przenieść do produkcji soków i przecierów z jabłek [218].

Metody i wyniki dotychczas opublikowane są jednak odległe od wytwarzania barwników w miąższu. Procesy oksydoredukcyjne w uszkodzonej tkance miąższu nie zachodzą w roztworach, tak jak to ma miejsce w badaniach soków. Komórki uszkodzone pozostają w żywej tkance i środowiskiem reakcji jest w większości granica faz oraz specyficzny dla żywych komórek układ ścian i błon. Wiele metabolitów występuje w postaci trwałych połączeń, np. glukozydowych zwiększających ich polarność. Metabolity te szybko mogą się łączyć z celulozą ścian i błonami, a tylko część jest dostępna w rozpuszczalnej i wolnej formie. Dla poznania przebiegu tego typu reakcji często efektywne jest utworzenie (np. w badaniach biofizycznych) większego agregatu o regularnej lipidowo-białkowo-barwnikowej strukturze [62,217]. Dlatego przemiany z udziałem polifenoli należało zbadać w warunkach najbardziej zbliżonych do naturalnych, aby uzyskane informacje były przydatne w przyszłości do kontroli świeżości w technologiach sadowniczych, przechowalniczych i przetwórczych.

Pasma UV, w których występuje zanik lub powstawanie chromoforów kwasu chlorogenowego, epikatechiny, ksyloglukozydu floretyny trudno jest znaleźć

w ciętym miększu. Jak to wykazano w zakresie Vis w badaniach chlorofili, karotenoidów i antocyjanów także istotny wpływ na widma ma rozpuszczalnik i stężenie barwników [62,100,101,108]. Wynika to oczywiście z otrzymywania widm elektromagnetycznych z ośrodka o dużej gęstości optycznej, w którym zachodzi agregacja barwników, kopigmentacja, fluorescencja i reabsorpcja światła. Pomimo tego i pomimo różnic w strukturze tkanki badanych odmian [156,157] w tej pracy wykazano wpływ różnej zawartości kwasu chlorogenowego w miększu na zmiany absorbancji rozproszonej w paśmie 342 nm.

Absorpcja światła ultrafioletowego UV przez miększ jest niezwykle silna, gdyż w tym zakresie wiele substancji organicznych pochłania światło. Wiadomo, że prostymi metodami spektrofotometrycznymi można analizować tylko pasmo brązowych barwników (melanin). Ogromną różnicę w absorpcji miększu (2-3- krotny wzrost absorbancji) widać przy porównaniu widma UV i widma Vis.

Niewiele jest metod fizycznych lub chemicznych umożliwiających śledzenie zmian stężeń substratów i produktów w miejscu uszkodzenia tkanki. Z analiz chemicznych polifenoli w miększu (np. metodą HPLC) można uzyskać informacje o stężeniu początkowym w miejscu uszkodzenia albo w brązowej już pulpie z uszkodzonej tkanki [5,6]. Amiot i in. [6] podczas badań świeżego, a potem uszkodzonego przez uderzenie miększu z 11. odmian jabłek stwierdzili duże ubytki substratów, które wynikły z brązowienia miększu. Przekraczały one 50% stężenia kwasu chlorogenowego. Znaczne też były ubytki epikatechiny i innych polifenoli w miększu.

Pomimo że w widmach UV zachodzą zmiany wywołane enzymatycznym brązowaniem i związane są z tak bardzo różnymi substratami i produktami, to ich pasma absorbancji rozproszonej nakładają się na siebie. Jednak zmiany te zachodzą w czasie i obserwowane w widmach różnicowych, wyraźniej ujawniają powstawanie i ubytek substancji chemicznych [107]. Taka postać wyników jest jednak niewygodna do analiz ilościowych, bo są to widma lub co najmniej kilka pasm, jak wykazano w następnej pracy [103].

Z widm czasowo rozdzielonych otrzymano parametryzację po ich opracowaniu metodami chemometrycznymi i przejrzyste informacje [103]. Do takiego opracowania skłoniły analizy istotnych korelacji stężeń polifenoli określanych w miększu z kilkoma pasmami widm UV i przy różnych czasach brązowienia [98,109]. Przesunięcie w czasie przyrostu lub spadku absorbancji w niektórych pasmach dawało nadzieję na utworzenie funkcji aproksymujących zawartość kilku polifenoli na podstawie pomiarów absorbancji rozproszonej i czasu [107]. Analizy numeryczne wykonane na różnorodnych układach parametrów, które pobrano z widm rozdzielonych czasowo, doprowadziły do optymalizacji i w efekcie do ograniczenia pomiarów. Z widma UV wykorzystano 6 pasm: pasma UV-A (380, 346, 332), pasmo UV-B (310) i pasma UV-C (280, 258) i 6 czasów pomiarowych

kinetyki: 0, 2, 4, 6, 8, 12 min. Zadowalająca zgodność stężeń przewidywanych na podstawie widm rozdzielonych czasowo i oznaczonych metodą HPLC wskazuje, że dobrze wybrano pasma związane z substratami reakcji i czas w warunkach eksperymentu. Wyniki te są zadowalające, przy tak bardzo zróżnicowanych właściwościach optycznych tkanek [103].

Przedstawione badania brązowienia mięszu wykazały, że nie ma podstaw, by odrzucić hipotezę o silnym związku zmian absorbancji mięszu w zakresie UV-Vis z polifenolami, które są znanymi substratami enzymatycznego brązowienia soków i przecierów z jabłek. Wyniki wskazują na dominującą rolę zawartości kwasu chlorogenowego w przemianach i zapewnianiu dużej szybkości, wykorzystania innych grup polifenoli do tworzenia brązowych barwników w mięszu. W tej pracy wykazano także, że najszybsze ogniwo łańcucha reakcji, które zaobserwowano w UV jest istotnie związane z objętością przestrzeni międzykomórkowych, a więc najprawdopodobniej z ilością tlenu dostępnego do reakcji. Pasma absorbancji rozproszonej w dalekim UV mogłoby także odpowiadać udziałowi ksylo- glikozydu floretyny w reakcji brązowienia mięszu.

Prezentowane wyniki i ich analiza upoważniają do przedstawienia najbardziej prawdopodobnego wyjaśnienia. Podstawą rozdziału kilku grup polifenoli w metodzie kinetycznej, korzystającej z widm odbiciowych UV uszkodzonego mięszu [103], jest wykorzystanie sprzężenia i selektywności szlaku przemian. Jest to łańcuch reakcji redoks podczas brązowienia mięszu, a także uwolnionej treści na matrycy komórkowej. Trudno jest odnieść tę analizę i jej chemometryczne opracowanie do znanych schematów analiz chemicznych na podstawie kinetyki chemicznej. Lecz można się spodziewać, że takimi metodami uda się wykryć współdziałania i niepoznane jeszcze substraty aktywności biologicznej w mięszu podczas brązowienia w różnych warunkach przebiegu tej reakcji.

W analizie chemometrycznej utworzono składowe główne, tzn. funkcje, które wiążą zawartość polifenoli w mięszu z pomiarami spektrofotometrycznymi brązowiejącego mięszu. Funkcje te szacują stężenia biologicznie aktywnych substancji i są to miary fizyczne. Mogą być one wartościową oceną świeżości mięszu. Świeżość w tych analizach, powiązana jest z formą aktywności biologicznej przy usuwaniu reaktywnych form tlenu z uszkodzonego mięszu.

Często badacze wskazują, że na zawartość polifenoli ma wpływ zastosowana technologia dojrzewania owoców po zbiorze i przejrzenie w komorze przechowalniczej, stopień dojrzałości owoców przyjętych do badań, a więc ich świeżość. Wykazano, że w owocach umieszczonych w chłodni w początkowym okresie następuje synteza kwasu chlorogenowego [74]. Porównano stężenia polifenoli w owocach dla stadium dojrzałości konsumpcyjnej (dla mięszu najbardziej przydatnego, jako świeżo cięte jabłka) i dla stadium dojrzałości handlowej. W stadium dojrzałości konsumpcyjnej stwierdzono generalnie niższy poziom kwasu chloroge-

nowego, a wyższe stężenie epikatechiny [103,188]. Najwięcej jednak analiz polifenoli wykonywanych jest w stadium tzw. dojrzałości handlowej jabłek. Niedokładnie określone stadium dojrzałości jabłek może być, jak wynika z dużego zakresu zmienności wyników brązowienia przedstawionych w tej pracy, powodem rozbieżności w podawanej przez różnych autorów, zawartości polifenoli [5,128,188]. Niekiedy stadium dojrzałości można określić dokładniej metodami fizykochemicznymi, np. mierząc wydzielanie etylenu [6]. Dlatego w tej pracy, do obiektywnego skalowania owoców wg stadium (stopnia) dojrzałości ich miąższu, przygotowano technikę prostej spektrofotometrii odbiciowej w widzialnym paśmie 440 nm, fluorescencję chlorofilu i potencjometrię elektrodową redoks. Teraz każdy owoc może być zmierzony metodą fizyczną, którą cechuje duża precyzja opisu. Dokładność metod fizycznych umożliwia poznanie struktury zmienności parametrów materiału, wpływu wielu czynników interesujących naukowców zajmujących się problemami sadownictwa, przechowywalnictwa i przetwórstwa [3,240].

6.3. Pomiar świeżości poprzez brązowienie miąższu

Świeżość żywej tkanki roślinnej jest obecnie doceniana w ocenie jakości owoców bowiem wiadomo, że kształtuje wartość żywieniową produktu. Nadal określana jest organoleptycznie – wrażeniami towarzyszącymi jedzeniu [192]. Metody oceny jakości jabłek są stale doskonalone w badaniach naukowych, a zwłaszcza przy okazji zmiany technologii [214,215]. Ta sama cecha jakości z upływem czasu jest inaczej rozumiana, a wtedy inaczej mierzona, wyrażana i oceniana. Świeżość nadal nie jest dokładnie rozpoznaną cechą. Nie jest także opisana parametrami jakości z zakresu analiz fizykochemicznych – parametrami barwy, tekstury lub składem chemicznym [219]. Zapewne sytuacja taka jest zadowalająca przy ocenie całych owoców, lecz brak obiektywnych metod nie pozwoli zapewnić określonej aktywności biologicznej, jakiej będzie oczekiwał konsument np. od ciętych świeżych jabłek. Świeżość zawsze pozostanie subiektywną, konsumencką oceną organoleptyczną a będzie odniesieniem dla metod obiektywnych (aparaturowych). Wiele rozwiązań przedstawiono w tej pracy do wykorzystania przy wprowadzaniu obiektywnych metod określania świeżości.

Należało w pracy zwrócić uwagę na dużą dokładność pomiarów optycznych lub redoks. Z badań wynika, że nierównomierny rozwój i dojrzewanie lub przejrzenie owoców są głównymi przyczynami niejednorodności surowca. Ulegają zmianie precyzyjnie ustalone parametry w technologiach sadowniczych, chłodniczych, przetwórczych i wpływają na jakość surowca i produktu [215]. Ostatnio stwierdzono, że istotne jest miejsce w owocu, istotne są również różnice pomiędzy stroną z barwą zasadniczą lub z rumieńcem i w układzie radialnym, a ponadto określono znaczny udział czynnika czasu. Już przy parametrze jędrności [104]

pojawia się wyraźna asymetria rozkładów statystycznych i niejednorodność wariancji parametrów fizycznych owoców. Teraz otrzymano te same efekty – np. dla nowo wprowadzonego parametru „trwałość barwy” miąższu cząstek wyciętych z jabłek. Niewielka zmiana stadium dojrzałości owocu, i to w stanie dojrzałości konsumpcyjnej, skutkowała znacznymi zmianami trwałości barwy cząstek. Podobny kłopot jest z modelowaniem innych szybko zmieniających się parametrów, np. opisujących nietrwałe owoce truskawki lub maliny [94,111].

Badając jabłka w tej pracy, można było zachować naturalną strukturę zmienności plonu zebranego w sadzie. W ramach tej struktury, jedynie do badań metodycznych, wprowadzano klasy wybarwienia. Następnie wyeliminowano tę klasyfikację i posługiwano się parametrem – absorbancją rozproszoną w paśmie 440 nm każdej cząstki świeżo wyciętej z jabłka. Użyto go do oceny zróżnicowania dojrzałości miąższu jabłek. W ten sposób model kinetyki brązowienia stał się parametryczny i opisuje wszystkie owoce zebrane w sadzie, które poddano wpięrcu przechowywaniu do osiągnięcia dojrzałości konsumpcyjnej, a potem przetwarzaniu na cięte świeże jabłko. Przedstawione powyżej problemy ze zmiennością miąższu można było pomijać poza sadownictwem, gdy surowiec wymieszano, wykonano z niego sok i uzyskano uśrednioną informację [3]. Jednakże i tu były niespodzianki. Oszmiański, Sorzyński i Lee wykazali [173,178], że już niewielki dodatek surowca z większą zawartością kwasu chlorogenowego powoduje dramatyczne przyspieszenie degradacji polifenoli i to w bardzo dużej masie przecieru jabłkowego, a jest wygodne w produkcji soków klarowanych [218].

Wraz z rozwojem metod pomiarowych udoskonalone zostały metody statystyki doświadczalnej. Statystyka dostarcza metod opisu i wnioskowania. Nie wszystkie wyniki można przybliżać rozkładami normalnymi. Przy wykorzystaniu niektórych miar, zwłaszcza aparaturowych ocen z zakresu organoleptyki, brak zgodności z rozkładem normalnym jest oczywisty [56,229]. Ogranicza to wprost użycie średniej, odchylenia i trzeba wprowadzać specjalne procedury postępowania z wynikami pomiarów [14,199,227]. Obecnie dostępnych jest wiele metod pomiarowych, a stąd i różnorodne parametry fizyczne. Wymaga to stosowania w badaniach liniowych i nieliniowych współzależności pomiędzy nimi i redukcji parametrów (wymiarów) [39,227]. Zastosowania metod statystyki, nazywane w chemii żywności chemometrią [25,28], umożliwiają powiązanie wielu parametrów pochodzących z analiz widmowych z substratami brązowienia. W ten sposób powstają miary optymalne. Zastosowanie nowych metod w naukach sadowniczych, w technologii przetwórstwa jest również zależne od możliwości zbadania wielu próbek (z wielu odmian i okresów przechowywania) nowoczesnej, ale i drogiej aparatury chemicznej. Te procedury analityczne wymagają znacznego uproszczenia, aby mogły być wykorzystane powszechnie w badaniach. Taką rolę mogą pełnić obiektywne metody oceny świeżości jabłek.

Po analizie możliwości badawczych, wybrano dwie metody do realizacji głównego celu badań – oceny świeżości miąższu: spektrofotometrię odbiciową w zakresie widzialnym, którą badano pasmo 440 nm światła odbitego od cząstek jabłka [107,113] i potencjometrię elektrodową redoks, którą rejestrowano potencjał elektrody uszkodzającej komórki miąższu jabłek [99]. Użyto zatem metod fizycznych, żeby określać aktywność biologiczną miąższu jako reakcji na mechaniczne uszkodzenie. Ponieważ obie metody nie były stosowane w badaniach enzymatycznego brązowienia, udowodniono, że dają one wiarygodne informacje o owocach i o zmianach podczas brązowienia. Dotąd można było mieć zastrzeżenia do możliwości metod fizycznych z uwagi na bardzo dużą zmienność właściwości badanego miąższu jabłek, który teraz zbadano i opisano parametrami.

6.3.1. Kryteria optyczne świeżości

Badania wykonane w tej pracy wykazały, że parametr optyczny (absorbancja rozproszona na 440 nm – A_0) miąższu cząstki świeżo wyciętej z jabłka dobrze klasyfikuje jabłka w stadium dojrzałości konsumpcyjnej pod względem długości okresu przechowywania i stopnia ich dojrzałości. Przeprowadzone badania fluorymetryczne miąższu wyjaśniły to zjawisko. Ustalono, że dużą zmienność współczynnika odbicia przy długości fali światła 440 nm dla miąższu, natychmiast po jego przecięciu (dotyczy to także absorbancji rozproszonej przy 440 nm), można wyjaśnić różną zawartością chlorofilu w tej tkance. Zróżnicowany rozkład chlorofilu w miąższu stał się bardzo istotnym elementem upraszczającym ocenę zróżnicowania dojrzałości miąższu jabłek konsumpcyjnych. Wartości absorbancji rozproszonej na 440 nm – A_0 , można również zaproponować do standaryzacji świeżości całych jabłek wyjętych z komory przechowalniczej. Umożliwiają to określone i zestawione dla wielu odmian wartości absorbancji miąższu jabłek w stadium dojrzałości konsumpcyjnej. Parametrem tym opisano również naturalną strukturę dojrzałości owoców po przechowywaniu. Zauważono równocześnie, że rozkład statystyczny tego parametru ma bardzo dużą zmienność w badanej próbie. Wynika z tego, że nie jest możliwe utrzymanie zmienności parametrów optycznych cząstek z jabłek w takich granicach, żeby ich barwa nie była rozróżniana przez konsumenta. Może się przez to wydawać producentowi ciętych jabłek, że koniecznością jest sortowanie surowca, lub że dla części surowca można opóźnić i zaniedbać hamowanie brązowienia. Jednak taka struktura zmienności parametru jest „etykietą naturalności” produktu i odróżnia świeże owoce od produktu utrwalonego i najczęściej już ujednoliconego.

Po przecięciu miąższu reakcja enzymatycznego brązowienia jest natychmiastowa. Dlatego w tej pracy często stosowano wstępne schłodzenie surowca i bardzo szybką aplikację inhibitorów na powierzchnię. Ustalono, że w dotych-

czas wykonanych pracach technologicznych używany był zbyt długi czas w operacji przygotowania cząstek do inhibicji chemicznej i fizycznej, a potem do pomiaru barwy odniesienia. Wynika tak z porównania opublikowanych współrzędnych barwy L^* , a^* , b^* dla cząstek. Okazuje się i zostanie to poniżej wyjaśnione, że najczęściej zajmowano się tylko testowaniem skuteczności inhibitorów, a stosowano je również na „brązowe” tkanki.

Do oceny efektywności zabiegów hamowaniu brązowienia enzymatycznego stosowanych jest wiele procedur pomiarowych: kolorymetria, spektrokolorymetria, ekstrakcja i pomiar stężenia barwników, porównywanie produktu z fotografiami lub przez zespół przygotowany do skalowania organoleptycznego. Zwykle prezentowane są przebiegi czasowe zmierzonych parametrów i omawiane względne ich zmiany lub różnice wywołane czynnikami. Jednak metodami tymi nigdy nie określano dopuszczalnych zmian parametrów cząstek z jabłka podczas brązowienia i nie podano kryterium akceptacji ich świeżości lub jej odrzucenia.

W badaniach inhibicji brązowienia najbardziej popularna jest uproszczona analiza wyników wprowadzona przez Sapersa i Douglasa [202]. Na podstawie przeglądu literatury i używanych parametrów optycznych wybrali oni jasność L^* do oceny efektywności inhibitorów, a także zaproponowali pomiar odbicia w zakresie fioletu. Pomiaru odnosili (standaryzowali) do wyników otrzymanych z próbek świeżo po ich wycięciu. Prezentowali wyniki procentowe w funkcji czasu na wykresach kinetyki brązowienia. Określali czas trwania płaskiej, początkowej części wykresu i nachylenie fazy wzrostu – szybkość procesu w warunkach prowadzonych badań. Jeszcze dzisiaj należy uznać te pierwsze pomiary za niezwykle dokładne. Wskazali [202] okres czasu, w którym zmiany wywołane brązowieniem nie są rejestrowane jako zmiana jasności L^* . W tej pracy wykazano, że zmiany można w sposób ciągły (od ok. 2 min) mierzyć w zakresie widzialnego fioletu w świetle odbitym w paśmie 440 nm.

Ponieważ często używano względnych parametrów, które wprowadził Sapers i Douglas [202], testowano efektywności inhibitorów także na cząstkach z jabłek, które były w niewidoczny sposób „brązowe” i mogły być zaakceptowane przez konsumenta. Wynika to z faktu, że współrzędna L^* nie zmienia wartości natychmiast, od chwili przecięcia mięszu, a także nie umożliwia odróżnienia świeżo uciętych cząstek z jabłek od nieaktywnych biologicznie w mięszu bo wybielonych substancjami chemicznymi. Niektórzy jednak wskazywali na ujemne wyniki otrzymane w pierwszych pomiarach zaraz po inhibicji. Taka metodyka pomiarów i analiza wyników ma wartość w rutynowych pracach technologicznych, jak u Sapersa i współpracowników [204-207], lecz jak stwierdzono teraz, nie przydaje się w badaniach brązowienia lub udziału polifenoli w świeżości jabłek.

Tworzenie wskaźników do oceny aktywności polifenoli w mięszu i dokładna ocena świeżości wymaga użycia bardzo precyzyjnej aparatury spektrofotometrycz-

nej i stosowania metod chemometrycznych do opracowania pomiarów. Natomiast uproszczenie metody do jednego pasma 440 nm, tworzy analizę łatwiejszą do uruchomienia w badaniach technologicznych przy ocenie świeżości surowca i efektywności technologii. Ponieważ niektóre prace informują o tworzeniu się wielobarwnych związków melaninowych, uwzględniono tę informację w wykonanych pracach. Zastosowane proste inhibitory nie wprowadziły istotnych zmian kształtu widma Vis mięszu do momentu, gdy zmiany ciętego mięszu były jeszcze akceptowane organoleptycznie [114]. Można byłoby jednak oczekiwać takich zmian w zakresie widzialnym, gdyby zastosować silniejsze inhibitory albo obserwować brązowienie cząstek znacznie dłużej i nie zakończyć badań po przekroczeniu 0,15 Abs (przyrost absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm).

W tej pracy używano parametru, którego skala zmian umożliwia utworzenie obiektywnego kryterium świeżości dla brązowiejących cząstek z jabłek. Są to dla mięszu „zmiany zauważane” i „zmiany akceptowane” przez konsumenta. Wartości krytyczne ustalono na podstawie znanej z kolorymetrii obiektywnej czułości oka ludzkiego [151] i na podstawie zmienności barwy świeżo pociętego surowca. Podobną próbę ustalenia limitów dla przyrostu absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm wykonano na podstawie ocen organoleptycznych cząstek z kilku odmian [115]. Wtedy to wyniki ocen porównano z przyrostem absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm, a także z wartościami całkowitej różnicy barwy dE^* . Limit „zmiany zauważane” wynosił 0,04 Abs i odpowiadała temu całkowita różnica barwy ok. $dE^* = 2$. Natomiast limit „zmiany akceptowane” w mięszu (lub kryterium odrzucenia) wynosił ok. 0,08-1,2 Abs i dla zbadanych odmian odpowiadał całkowitej różnicy barwy $dE^* = 4-6$.

Zmiany absorbancji cząstek z jabłek, wywołane brązowaniem, mogą być zanotowane aparaturowo już od drugiej minuty po wycięciu cząstki, gdy brązowienie mięszu nie jest hamowane w normalnych warunkach otoczenia. Po 6 do 8 min zmiany w widmie dla wielu odmian, osiągają rejon widzialnego fioletu i konsument zauważy już tę różnicę [115]. Jednak w tym czasie, jak stwierdzono w naszych badaniach, zachodzą reakcje enzymatyczne najistotniejsze dla dalszego rozwoju brązowienia. Po 8 min zmieniają się istotnie współrzędne barwy L^* , a^* , b^* , a po 32 min parametr całkowitej różnicy barwy dE^* dla wielu odmian przekroczy wartość 4. Ta wartość wskazuje, że obserwator łatwo odróżnia zmianę barwy. W tym zakresie czasowym zmiany całkowitej różnicy barwy dE^* są zwykle mniejsze od 6, a więc można zmierzyć i wyskalować wrażenie zmiany barwy. Do tego celu służy parametr całkowitej różnicy barwy dE^* wg normy CIE $L^*a^*b^*$. Jednak w wielu pracach analizuje się skuteczność hamowania brązowienia i korzysta z całkowitej różnicy barwy $dE^* \gg 10$. Cząstki z jabłka, które uzyskują dE^* powyżej 10, mają inną barwę i nie można używać dE^* jako skali oceny wrażenia

różnicy w barwie. Należy opisywać barwę (lecz nie porównywać różnych barw) za pomocą trzech parametrów z przestrzeni barw.

W tej pracy przedstawiono pierwsze badania naukowe, w których wykorzystano widma enzymatycznego brązowienia otrzymane w świetle odbitym od miąższu jabłek. W ten sposób tworzone są podstawy do wprowadzenia standaryzacji w ocenie świeżości miąższu. Ponieważ pomiarami optycznymi na miąższu każdej cząstki z jabłka, zastąpiono klasy o podobnym stopniu wybarwienia skórki jabłek, wartości z tych pomiarów wykorzystano w utworzonym modelu kinetycznym brązowienia. W modelu brązowienia użyto więc absorbancji rozproszonej miąższu każdej świeżo wyciętej cząstki z jabłka. Modelem regresyjnym („regresja użytkownika” [227]), którego trzonem jest funkcja kinetyki I-rzędu uzupełniona w liniową zależność od optycznej oceny stadium dojrzałości miąższu i od okresu przechowywania jabłek, opisano (oddzielnie dla każdej odmiany) pomiary absorbancji rozproszonej w paśmie 440 nm wykonane na wszystkich cząstkach z jabłek. Uzyskano wysoki stopień dopasowania modelu do pomiarów wykonanych dla miąższu jabłek z ponad trzydziestu odmian. Wynik ten uzasadnia posługiwanie się odtąd parametrami: szybkością brązowienia – v , absorbancją wysycenia brązowienia – A_f , czasem połówkowym brązowienia – $t_{1/2}$.

Zaobserwowano, że miąższ z różnych odmian różnił się czasem połówkowym brązowienia (stałą kinetyki), jednak dla cząstek z jabłek w każdej odmianie czas połówkowy był stały, pomimo bardzo różnego okresu przechowywania jabłek. Szybkość brązowienia cząstek w każdej odmianie, tak samo jak i brązowienia wysycenia A_f (wg wzoru 5, s. 3), zmalała u cząstek wyciętych z jabłek dłużej przechowywanych, jak również zmalała u cząstek z owoców bardziej dojrzałych. Chociaż odmiany różniły się czasem połówkowym brązowienia, to stosunek szybkości brązowienia cząstek ciętych w powietrzu do szybkości brązowienia ciętych pod wodą był niezależny od odmiany, stały i równy ok. 2. Był on zadziwiająco stabilny, pomimo różnej zawartości ekstraktu, różnej jędrności, a także zawartości lub proporcji polifenoli w miąższu badanych odmian. Szczególne przypadki, które odnotowano, gdy wpływ cięcia pod wodą był mniej efektywny, nie zostały dokładniej przebadane. Wydaje się, że stosunek szybkości brązowienia cząstek ciętych w powietrzu do szybkości brązowienia ciętych pod wodą należałoby dołączyć do wskaźników opisu świeżości miąższu.

Stwierdzono, że po bardzo szybkim, krótkim brązowieniu cząstek z jabłek (test surowca) lub po dziesięciodniowym brązowieniu w obniżonej temperaturze z użyciem prostych inhibitorów (test technologii) otrzymywano te same kształty widm przyrostu absorbancji rozproszonej w Vis. Można więc zastosować szybką ocenę „test surowca” i odnieść ją do dłuższego okresu przechowywania wymaganego od produktu. Ponieważ metoda kinetyczna nadaje się do ocen świeżości i zastosowań w technologiach, zmierzono parametry optyczne plastrów o różnej

grubości w świetle przechodzącym i odbitym od miąższu. W ten sposób określono wpływ grubości plastra na zmienność wyników i poznano wymagania stawiane aparaturze przy tworzeniu standardowej metody pomiarowej.

Metodą kinetyczną w paśmie 440 nm zbadano najszerszy zakres zmienności materiału sadowniczego w postaci cząstek wyciętych z jabłek gotowych do konsumpcji. Uzyskano zwięzły, parametryczny opis właściwości miąższu i świeżości jabłek z wielu odmian o wysokiej jakości. Spełniono praktyczny aspekt badań miąższu jabłek – tworzenia obiektywnych kryteriów świeżości i zakresu jej tolerancji. Można na podstawie tych wyników (liczbowych) sformułować zalecenia do przeniesienia metody ze skali laboratoryjnej do sadownictwa, przechowywania i przetwórstwa. Ponieważ w badaniach uzyskano istotny związek pomiędzy widmami spektrofotometrycznymi brązowiejącego miąższu i zawartością w nim polifenoli przyjęto, że parametry kinetyki enzymatycznego brązowienia miąższu w sposób syntetyczny opisują świeżość miąższu jabłek. Wykazano, że metoda spektrofotometryczna i model kinetyki opracowany regresyjnie są na tyle dokładne, że dają możliwość rozwiązania problemu wyboru optymalnych parametrów technologii – z jednej strony przez szybką ocenę świeżości surowca i produktu, a z drugiej – przez dokładną ocenę aktywności inhibitorów i wykrywanie ich nadużywania. Znacznie one wyprzedzają możliwości zaobserwowania zmian metodą wzrokową. Informacje o zachowanej przez miąższ aktywności biologicznej uzyskane z parametrów fizycznych, mogą pomóc w automatyzacji kontroli jakości, a także w zachowaniu bezpieczeństwa produkcji ciętych świeżych jabłek.

6.3.2. Kryteria potencjometryczne świeżości

Pomiary miąższu elektrodą redoks nie są szerzej znane w literaturze związanej z przechowywaniem jabłek lub zagadnieniami jakości [99]. Metodami potencjometrii elektrodowej, a najczęściej woltamperometrycznymi, badane są polifenole w przecierach, sokach lub w roztworach modelowych [30,166,224]. Celowe było poznanie zmian potencjału elektrody redoks podczas brązowienia miąższu uszkodzonego tą elektrodą, oszacowanie rozkładu tego potencjału wewnątrz miąższu jabłka, wpływu strony jabłka z rumieńcem i zróżnicowania odmianowego.

W obecności tlenu polifenole utleniane są na drodze enzymatycznej do chinonów, które charakteryzują się wysokim potencjałem redoks [155,184]. Potencjał elektrody redoks jest miarą potencjalnej zdolności do utleniania, którą mają związki organiczne z komórek. Chinony są bardzo aktywne i utleniają inne związki fenolowe, aminokwasy, kwasy organiczne. Określa się w ten sposób tzw. potencjał mieszany. Zróżnicowanie potencjału elektrody redoks w złożonym układzie można próbować wyjaśnić różnicami w zawartości związków fenolowych, stopniem rozdrobnienia uszkodzonej

tkanki i objętością przestrzeni międzykomórkowej wypełnionej m.in. tlenem, a w tym znaczny jest udział różnic odmianowych, stadium dojrzałości – świeżości miększu.

Następujące ograniczenia krępowały możliwość użycia elektrodowego potencjału redoks do oceny właściwości przeciwutleniających składników w żywności [184,242]:

- operacje technologicznego utrwalania lub przetwarzania mocno zmieniają potencjał redoks żywności poprzez zmiany pH i przez tworzenie nowych składników (np. przeciwutleniaczy z utlenionych polifenoli i związków organicznych [33]),
- potencjał standardowy cząstek rodników, które są składnikami żywności jest trudny do określenia [184],
- redoks nie daje informacji o zdolności molekuly do oddawania atomu wodoru.

W badaniu świeżości owoców i cząstek wyciętych z jabłek, dotychczasowe ograniczenia kwalifikują elektrodowy potencjał redoks do tego, aby był jak najbardziej użyteczny. Za przeciwutleniacz w analizach uznany może zostać każdy składnik, który oddaje atom wodoru albo przekazuje elektron do rodnika. W tym znaczeniu mechanizm aktywności przeciwutleniającej można przedstawiać na dwa sposoby. Pierwszy odnosi się do oddawania atomu wodoru przez molekulę przeciwutleniacza do drugiego rodnika (np. w celu powstrzymania rozprzestrzeniania się reakcji rodnikowej). Drugi sposób – pomiary redoks, dotyczy przepływu elektronu z substratu redukującego do utleniających cząstek rodnikowych. Te dwa elementy uwzględniono w metodach, które zaproponowane zostały do oceny świeżości i zaprezentowane poprzez wyniki pomiarów kinetycznych i redoks. Pomiar potencjału redoks umożliwia ocenę zdolności składników redukujących do rozwijania jedynie przepływu elektronów. Wartości potencjału redoks informują o rzeczywistej zdolności układu do redukcji i utleniania molekul i dotyczą wszystkich form (utlenionej lub zredukowanej) obecnych w systemie. Z powodu termodynamicznej natury, potencjał elektrody redoks nie informuje o szybkości reakcji. Jednak w systemie, który pozwala poznać co najmniej dwa stany potencjału elektrody redoks, pomiar jest użyteczny do przewidywania, czy i w jakim kierunku może zachodzić reakcja redukcji lub utleniania. To niezmiernie ważna informacja przy ocenie świeżości jabłek.

Kuczyński [99] po raz pierwszy zbadał zmiany potencjału elektrody redoks uszkodzającej miąższ jabłek. Stwierdził, że po uszkodzeniu miąższu wzrostowi brązowienia odpowiada wzrost potencjału elektrody redoks do wartości wysycenia. Wzrost potencjału elektrody redoks do wartości wysycenia wyjaśniono formowaniem się brązowych barwników melaninowych. W procesie brązowienia zasobność w aktywne składniki jest w oczywisty sposób zmniejszana. Można tą sytuację potraktować podobnie do wytwarzania na ogrzewanej żywności (np. w procesie pieczenia albo wypalania kawy, lub kakao) brązowych barwników. Roślinne barw-

niki melaninowe znane są z silnych właściwości zmiatania rodników i jako redukujące i blokujące aktywność enzymu PPO [18,29]. Nie przypisywano im dotąd doniosłej roli w żywieniu, tak jak np. flawonoidom – znaczącej wartości biologicznej dla człowieka lub rośliny [19,77].

W tej pracy porównano pomiary redoks z widmami spektrofotometrycznymi podczas brązowienia mięszu. Wynik potwierdził możliwość użycia elektrody redoks do rejestrowania potencjału redoks w treści komórkowej już od chwili zniszczenia komórek. Najwcześniejsze i istotne korelacje chromoforów w widmach UV z potencjałem elektrody redoks wystąpiły w pasmach 260 i 280 nm. Mogą to być formy związane ze zbadaną zawartością ksyloglukozydu floretyny w mięszu [31] albo też składniki ściśle skorelowane w użytej tu metodzie analizy chemicznej, lub wspólnie występujące w mięszu jabłka. Położenie i podwójne pasmo przyrostu absorpcji w widmie UV jest dość charakterystyczne. Autorzy wielu prac zwracają uwagę na bardzo niskie stężenia ksyloglukozydu floretyny w mięszu, a wzrost zawartości jedynie w próbkach pobranych z gniazdem nasennym. Opóźnione w czasie, lecz istotne korelacje potencjału elektrody redoks z absorbancją w zakresie powyżej 380 nm, mogą mieć związek z powstającymi w mięszu brązowymi barwnikami. Tak więc analiza widma potwierdziła użyteczność pomiarów elektrodą redoks natychmiast po jej wbiciu jak również po wysyceniu na elektrodzie.

Przyrost potencjału elektrody redoks, który następuje po uszkodzeniu mięszu jest oceną efektywności przeciwutleniającej mięszu od strony jego zasobów, a więc jest oceną jego wartości biologicznej. Uszkadzając mięsz elektrodą, zebrano informację tylko w dwóch stanach redoks: natychmiast po uszkodzeniu mięszu – redoks wbicia i po dłuższym czasie utleniania – redoks wysycenia na elektrodzie. Uzyskane bardzo zróżnicowane wyniki świadczą o tym, że w uszkodzonym jabłku są pewne przeciwutleniacze, które mogą zareagować błyskawicznie i są inne o dłuższym czasie działania. Tym samym wykazano, że elektrodowy potencjał redoks daje ważne informacje o statusie przeciwutleniającym i odnosi się do stężeń polifenoli lub nowych produktów w mięszu. Na tym zjawisku i wprowadzonych parametrach można opierać obiektywny pomiar świeżości mięszu jabłek.

Poznano także rozkład elektrodowego potencjału redoks wysycenia w owocu. Zdecydowanie najwyższe wartości potencjału elektrody redoks uzyskiwano zawsze bliżej skórki jabłka i od strony bez rumieńca (nie nasłonecznionej). Interpretować to można bardziej równomiernym rozmieszczeniem i większą aktywnością pewnej grupy polifenoli lub produktów brązowienia w części nenasłonecznionej mięszu, natomiast przemieszczeniem się ku skórcie lub ich przemianą w części silniej nasłonecznionej.

Są to dobrze rokujące wyniki badań i należałoby je uzupełnić. Podana interpretacja zróżnicowania potencjału elektrody redoks wymaga potwierdzenia w ana-

lizach chemicznych. Uruchamiany przez miąższ mechanizm detoksykacji można także badać w szerszej skali, uwzględniając stadium dojrzałości owoców, okres przechowywania chłodniczego. W pracy nie zbadano tych zagadnień, zaobserwowano jedynie bardzo dobrą zgodność stanu termodynamicznego miąższu z pomiarami kinetycznymi.

Z powodu prostoty i wiarygodności potencjał redoks powinien znaleźć zastosowanie w ocenie pojemności przeciwutleniającej owoców (surowca) i ciętych świeżych jabłek. Do pomiaru używa się dość dużych elektrod i jest on łatwy do wykonania. Możliwe jest opracowanie standardu dla świeżego miąższu na podstawie dwóch zaproponowanych wartości elektrodowego potencjału redoks. Kontrolowanie świeżości polegałoby na prostym porównaniu z parametrami deklarowanymi dla surowca lub produktu.

6.4. Ochrona świeżości miąższu

Świeżość miąższu uznano za jeden z elementów wartości biologicznej produktu roślinnego [212]. Pojęcie „wartość biologiczna” obejmuje wartość odżywczą rośliny jadalnej, jej smakowitość i znaczenie w utrzymaniu zdrowia ludzi. O wartości biologicznej pokarmu roślinnego decydują nie tylko poznane składniki organiczne i nieorganiczne, wywierające określony wpływ na organizm ludzki, poprzez ich właściwości służące utrzymaniu zdrowia, ale też, takie jak smak i zapach – pobudzające apetyt. Wartość biologiczną można scharakteryzować dopiero po przeprowadzeniu doświadczeń żywieniowych. Słowa, które napisał Schuphan w latach 60. XX wieku: „w niedalekiej przyszłości może się okazać, że inne, mniej zbadane lub w ogóle niezbadane składniki owocu o właściwościach probiotycznych zaskoczą nas, że jeszcze bardziej docenimy świeże produkty pochodzenia roślinnego” wydają się jak najbardziej słuszne [212].

Zaobserwowano, że wiele z testowanych technik inhibicji enzymatycznego brązowienia miąższu stymuluje procesy degradacji i sprzyja utracie jego świeżości. Analizowano wyniki badań i stwierdzono, że brązowienie ciętego miąższu można bardzo efektywnie kontrolować poprzez obniżanie temperatury miąższu, cięcie pod wodą i szybkie jej odwirowanie, stosowanie bardzo małych stężeń inhibitorów oksydazy polifenolowej [204]. Lecz badając miąższ spektrofotometrycznie lub elektrodą redoks miąższ uszkodzony, można jedynie oceniać efekty wtórne, których przyczyny sięgają dalej do zmian w błonach cytoplazmatycznych i układach enzymatycznych, metabolizmu komórkowego i sterowania intensywnością procesów fizjologicznych znacznie głębiej w miąższu. Wiadomo, że polifenole z uszkodzonych komórek po wnikięciu do tkanki są utleniane już na ścianach i błonach komórkowych, tam gdzie zlokalizowane są peroksydazy. Komórki roślinne detoksykują wiele związków aromatycznych, syntetyzując ich

połączenia glukozydowe. Glukozyłacja następuje dopiero w cytozolu i są one w aktywny sposób, a więc z udziałem wzmożonego oddychania, transportowane do wakuoli i tam magazynowane. Związki fenolowe, lecz głównie pochodne kwasów, zmieniają przepuszczalność błon cytoplazmatycznych. Wiadomo obecnie, że pierwotny efekt wywierany przez fenole na błonę komórkową przejawia się słabą peroksydacją lipidów. Peroksydację inicjują też powstające podczas utleniania fenoli ich formy wolnorodnikowe. Zmiany w błonach cytoplazmatycznych uruchamiają transdukcję sygnału na poziomie komórki poprzez jony wapnia, nadtlenek wodoru [168]. Synteza nowych białek enzymatycznych w żywych komórkach jest efektem selektywnej ekspresji genów i indukcji nowych szlaków metabolicznych. Generowanie reaktywnych form tlenu i peroksydacja lipidów błonowych, którą rozpoczynają uwolnione polifenole, pełni w tym procesie funkcję sygnałową. Indukuje proces aklimatyzacyjny w tkance, ale także ją uszkadza [50]. W efekcie (jako najlepiej poznana) można mierzyć syntezę etylenu stresowego. Jednak zmiana ulega intensywność wielu procesów fizjologicznych: gospodarka wodna, mineralna, wzrasta oddychanie. Prowadzi to do zmian równowagi metabolicznej w świeżym, ale nie w „utrwalonym” mięszu. Zmiany te w pewnych warunkach mogą ułatwiać przystosowanie się tkanki do stresu, chociaż obserwator zauważy jedynie więdnienie – utratę świeżości.

W tej pracy zaobserwowano, badając w różnych warunkach barwniki brązowe w mięszu, że w nieunikniony sposób mięsz odtwarza z nich zewnętrzne bariery ochronne. W wielu pracach omawiano różne klasy związków organicznych, które biorą udział w realizacji funkcji obronnych, np. podczas oddziaływań z mikroorganizmami patogennymi, owadami lub są związkami sygnałnymi użytymi do oddziaływań zespołowych [117,232]. W tej pracy stwierdzono po uszkodzeniu aktywację rodników prowadzącą ostatecznie do obniżenia aktywności zewnętrznych enzymów i wytworzenia w powierzchniowej warstwie mięszu brązowe barwniki. Znaną właściwością melanin (brązowe barwniki) jest tworzenie dość skutecznej bariery ochronnej, nierozpuszczalnej w wodzie i w alkoholach, trudno przepuszczalnej dla powietrza i pary wodnej. Jednakże bariera, wytworzona z dużej masy treści komórkowej lub w większej objętości tkanki, przede wszystkim zablokuje oddychanie tlenowe i w najbliższych komórkach skieruje procesy biologiczne ku degradacji [76]. Nie powinno się dopuścić do takich błędów w technologii ciętych świeżych jabłek.

Zmierzono dla mięszu jabłek wielu odmian „wysycenie brązowienia”, wykorzystując model „testowania surowca”. Stwierdzono, że procesy metaboliczne zachodzące w owocach przy zastosowanych warunkach i technice cięcia, należy skierować do ustalenia równowagi. Ochronną rolę brązowienia można wykorzystać w praktyce, do utrzymania świeżości mięszu i trwałości produktu ciętych świeżych

jabłek. Brązowienie może częściowo przejąć funkcję skórki, lecz nieuchronnie przy cięciu zostaje uruchomiony przyspieszony proces przejrzenia miąższu [115].

Podobnie jest z wartością biologiczną całych przechowywanych i przejrzejających owoców. Stwierdzono, że jabłka dłużej przechowywane w chłodni miały wyższą zawartość barwników brązowych – wyższą absorbancję miąższu świeżo wyciętego z jabłek. Oczywiście, że w owocach po długim przechowaniu zmniejszyła się zasobność przeciwutleniająca i powstały brązowe barwniki podczas przechowywania, chociaż tak niewiele prac potwierdza ubytek w takich owocach związków polifenolowych [31]. Czy efektywność przeciwutleniająca w miąższu nadal działa, określono to w inny sposób i otrzymano mniejszą, w stosunku do krócej przechowywanych jabłek, szybkość początkową brązowienia miąższu, a także niższą absorbancję wysycenia brązowienia.

Można wprowadzić do opisu i oceny odmian parametr – skłonność do brązowienia. Dogodnym mógłby być parametr dość niezależny od długości okresu przechowywania jabłek i niewielkich zmian dojrzałości. Takim parametrem jest czas połówkowy brązowienia – $t_{1/2}$ wyznaczony dla odmian przy cięciu cząstek w powietrzu albo pod wodą. Stwierdzono, że szybkość brązowienia – v lub absorbancja wysycenia – A_f , zależne są nie tylko od cech odmianowych, lecz także od długości okresu przechowywania i dojrzałości jabłek.

Małą skłonność do brązowienia miąższu wykazały odmiany pochodzące od ‘Koksy Pomarańczowej’ lub ‘Golden Delicious’ i od spokrewnionych z nimi: ‘Jonagold’, ‘Jonagored’, ‘Gala’, ‘Elstar’, ‘Szampion’, ‘Ligol’. Przedstawione w tej pracy aparaturowe uszeregowanie odmian wg skłonności do brązowienia zgodne jest z wynikami ocen organoleptycznych sadowników [156]. Porównanie brązowienia i analiz chemicznych polifenoli odkrywa nowe kierunki hodowli odmian. Można zauważyć, że zabiegi hodowlane ograniczyły brązowienie miąższu w nowszych odmianach poprzez obniżenie zawartości kwasu chlorogenowego i prawdopodobnie innych jeszcze niezbadanych polifenoli. Nie wiemy, czy w ten sposób uzyskano owoce bardziej odporne na choroby i różne stresy [237] lub, czy jest to ulepszony zestaw polifenoli o korzystniejszym wpływie na zdrowie ludzi [231,232]. Hodowcy przy ich produkcji kierowali się ocenami organoleptycznymi, analizami chemicznymi i oczywiście licznymi wymaganiami agrotechnicznymi. Potrzebna byłaby ocena ich aktywności biologicznej (w pracochłonnych badaniach żywieniowych), a to dopiero wniosłoby istotny wkład do oceny ich świeżości.

Poznana w tej pracy duża bioróżnorodność brązowienia miąższu może uzupełnić metodykę stale prowadzonych eksperymentów z zakresu biochemii owoców, a także wprowadzonej do sadownictwa biotechnologii. Wydaje się, że wykorzystanie sprzężenia technik chromatograficznych ze spektrofotometrią odbiciową i potencjometrią redoks, umożliwi najszybsze przebadanie profili metabolitów wtór-

nych w roślinach transgenicznych, ale wcześniej uzupełni zasób informacji o profile tych metabolitów wtórnych w tradycyjnych odmianach jabłoni, tak jak to zaproponował Harborne [66]. Użyta w pracy kontrola zmian na szlakach metabolizmu może okazać się niezwykle czułą, ponieważ na skutek działania mechanizmów regulatorowych na poziomie transkrypcji DNA, syntezy białek i nowych inhibitorów, szereg enzymów posiadających określone funkcje w roślinach wykazuje znacznie zmieniony poziom aktywności.

Badania doprowadziły także, jak się wydaje, do bardzo praktycznych wniosków dla technologii – zrozumienia funkcji osłonowej procesu brązowienia mięszu. Wynikająca stąd aktywność biologiczna tkanki roślinnej została poznana w stopniu niezbędnym do jej wykorzystania w technologiach utrwalania świeżości. Produkt świeży – minimalnie przetwarzany, nieodłącznie jest związany z prowokowaniem zmian na powierzchni, które przenoszą się do głębiej leżącej żywej tkanki. Aby uzyskać akceptację takiego produktu lub tolerancję jego warstwy powierzchniowej u konsumenta, proces i zmiany w świeżości muszą być poznane, zrozumiane i zaakceptowane przez konsumentów [192]. Należy tu jednak przypomnieć o warunkach sanitarnych: braku zanieczyszczeń mikrobiologicznych, chemicznych i fizycznych w produkcji, które nigdy nie były jednak kojarzone i nie są nadal przedmiotem ocen świeżości. Zanieczyszczenia mogą być dodatkami lub powstawać z surowca w procesie przetwarzania, przechowywania i mieć postać ciekłą, gazową i stałą. Problemy te dotyczą wymagań zachowania bezpieczeństwa i jakości żywności gotowej do spożycia i muszą być realizowane na bardzo wiele sposobów [1,2,73,138]. Zaproponowane metody standaryzacji świeżości mogą także ułatwić wykrywanie niektórych substancji obcych, które oddziałują na mechanizmy obronne, naprawcze i aktywność enzymatyczną tkanki.

Definicja produktu minimalnie przetworzonego często określa lub wskazuje na metody przydatne w ocenie jego jakości. W tej pracy zajmujemy się i definiujemy produkt „minimalnie przetworzony z owoców”, jako w znacznym stopniu przygotowany do bezpośredniego spożycia, u którego w pewnym stopniu wzrosła wartość żywieniowa. Zachowano w nim procesy życiowe tkanki i wartość biologiczną podobną do świeżego surowca. Jedynie stres przetwarzania uruchomił proces szybszego przejrzenia, lecz tkanka aktywnie wraca do równowagi i zachowuje obiektywnie teraz określaną aktywność biologiczną [4]. Technologia powinna ograniczać udział warunków stresowych i ułatwiać powrót tkanki do fizjologii cechującej świeże jabłko.

Żeby uzyskać trwałość świeżości produktu, konieczne jest zachowywanie w ciągły sposób odpowiednich warunków otoczenia. Przemysł przetwórczy nie stykał się dotąd z tak trudnymi wymaganiami, jakie stawiają świeże owoce i nadal będzie dążył do maksymalnego utrwalenia, a więc ograniczenia świeżości mięszu w produkcji. Obecnie stosowane są różnorodne zabiegi, np.

powlekanie [13,121,123,138,179] lub wysycanie tkanki jabłek [17], a nawet wysycanie sokiem z bakteriami probiotycznymi [7,15,41]. Trudno byłoby generalnie ustalić standardy świeżości w tak zróżnicowanych technologiach. Należy jednak przyjąć definicję, że produkt, który utracił w znacznej części aktywność biologiczną w mięszu – świeżość, którą można, jak to wykazano w tej pracy, zmierzyć i porównać z aktywnością w surowcu nazywamy przetworzonym niedostrzegalnie [36].

Przy produkcji ciętych jabłek możliwe jest cięcie nożami w powietrzu lub pod wodą. W tej pracy opisano zalety techniki cięcia pod wodą lub w roztworze inhibitora i jest to nowość w przypadku jabłek. Chociaż do cięcia owoców lub warzyw stosowano już nóż wodny, chyba nie w pełni doceniono ten zabieg [204]. Zrozumiałe jest, że materiały ściernie, gorąca para, soda kaustyczna nadmiernie zniszczą komórki, wzrasta powierzchnia cięcia i możliwość zakażenia mikrobiologicznego, więc nie będą one stosowane przy produkcji świeżych sałatek [204,245].

Istotnym elementem cięcia owocu, na który zwrócono uwagę w tej pracy, jest cięcie w roztworze. Taki sposób cięcia uniemożliwia zetknięcie się świeżo przeciętej tkanki z fazą gazową (zapowietrzenie komórek). To ułatwia natychmiastowe zwilżenie tkanki przez wodę przy ruchu noża, a także lepsze wymywanie treści komórkowej. Po cięciu pod wodą i natychmiastowym odwirowaniu roztworu, z miejsca cięcia mogą zostać wyługowane (usunięte) związki rozpuszczalne w wodzie: węglowodany, substancje pektynowe, niektóre glikozydy, wiele kwasów organicznych i niektóre związki fenolowe. Znajdujące się w wodzie substraty fenolowe szybko utleniają się. Eliminuje to ich toksyczny wpływ na tkankę, a ponadto kondensujące z tego roztworu produkty na błonach i ściankach komórkowych blokują enzym PPO [19,60]. Ostatecznie mięsz przetrzymywany jest zaledwie przez kilka sekund w roztworze, bo roztwór jest natychmiast odwirowany. Wykorzystuje się także w ten sposób przeciwtleniające działanie wody [219], ogranicza się stres niskiego ciśnienia osmotycznego wody i dalsze ługowanie komórek [131,144]. Badania technologiczne i efekty tego zabiegu zostały opisane i porównane w pracy Kuczyńskiego i in. [115]. Zastosowana procedura cięcia zasadniczo różni się od tych, w których ucięte kawałki jabłek zanurza się do roztworów na 10 sekund lub znacznie dłużej, a osusza, przetaczając je po bibule [133,196,205]. Obecnie stwierdzono, że efektem cięcia mięszu zanurzonego w wodzie, dla wielu zbadanych odmian, jest obniżenie do połowy szybkości brązowienia cząstek z jabłek w normalnych warunkach otoczenia, w porównaniu z cząstkami wyciętymi w powietrzu. Jest to bardzo istotna cecha badanego świeżego materiału.

Duża trwałość barwy świeżych przecierów jabłkowych z dodatkiem soku z rabarbaru [47,176] wskazała na skuteczny inhibitor – kwas szczawiowy. Ze

względem na szkodliwe działanie kwasu szczawiowego nie jest on dopuszczony jako dodatek do żywności. Jest spożywany z niektórymi owocami (pomarańcze) i warzywami (rabarbar) w większych ilościach. Kuczyński i in. najwcześniej porównali skuteczność kwasu szczawiowego w przecierach z brzoskwiń [113], a potem na cząstkach z jabłek [114]. Obecnie najwyższą skuteczność roztworów kwasu szczawiowego przy tych samych, małych stężeniach na powierzchni cięcia, potwierdzają porównania wielu inhibitorów brązowienia [180,223]. Aktywność inhibicyjna kwasu szczawiowego może być wzmocniona przez obniżenie pH roztworu [64] kwasem cytrynowym albo przez przeciwutleniające działanie kwasu askorbinowego, tylko gdy występuje duży wyciek treści komórkowej dla niektórych odmian. Stosując roztwory z kwasem szczawiowym i prowadząc badania w skali półprzemysłowej, po dwutygodniowym przechowywaniu schłodzonych cząstek, Son i in. [221-223] uzyskali akceptowalny stopień brązowienia – rejestrowali zmiany jasności L^* . Porównanie jasności cząstek świeżo wyciętych z wynikami Kuczyńskiego i Varoquaux [114] wskazuje na to, że wyniki odpowiadały jakby plastron nieschłodzonym i przetrzymywanym przez ok. 30 min.

Analiza użytych zabiegów (cięcia w powietrzu lub w roztworze) i parametrów jabłek doprowadziła do stwierdzenia, że powinny być stworzone techniczne warunki do wymywania wycieku treści komórkowej, aby w ten sposób ograniczać brązowienie. Badania te wykazują, że właściwie przeprowadzone cięcie jest równie ważne jak hamowanie ciemnienia przez inhibitory chemiczne, które tylko częściowo mogą wyeliminować szkodliwy wpływ grubej warstwy z uszkodzonych komórek. Zaproponowano „test surowca”, zanim zostanie on skierowany do produkcji (rozdz. 4.1.2. s. 3). Umożliwia to przewidywanie efektów zachowania świeżości po zabiegu technologicznym i dostosowanie produkcji do bardzo zmiennego surowca.

Podsumowując wyniki wielu testów hamowania brązowienia można stwierdzić, że najlepszą trwałość przechowalniczą cząstek z jabłek uzyskano, efektywnie usuwając do roztworu treść komórkową i odwirowując ją, blokując PPO jedynie na powierzchni i zapewniając cząstkom z jabłek bardzo dobre warunki oddychania tlenowego i wilgotność pary nasyconej w opakowaniu. Opisane badania mogą wnieść propozycję – wprowadzenia bardzo licznej grupy odmian jabłek do nowej technologii. Świeżość surowca powinna być kontrolowana metodami obiektywnymi, aby dostosować do niego zabiegi inhibicji i od początku, określić trwałość ciętych jabłek. Oczekuje się, że „nowe jabłka” i nowe produkty zachowają dużą zmienność cech i charakterystyczną świeżość mięszu tradycyjnych jabłek.

7. WNIOSKI

Na podstawie pomiarów procesu enzymatycznego brązowienia miąższu jabłek i studiów nad zmianami wartości biologicznej, świeżości jabłek wywołanych przejrzeniem, przedstawiono wnioski, które precyzują ocenę świeżości i tworzą podstawy nowych metod jej określania dla potrzeb oceny jakości przechowywanych jabłek i świeżych produktów z jabłek.

1. Do obiektywnego opisu zmian świeżości miąższu jabłek można zastosować model kinetyki pierwszego rzędu dla enzymatycznego brązowienia wywołanego uszkodzeniem mechanicznym i parametry wyznaczone z pomiarów odbicia od miąższu światła o długości fali 440 nm.

2. Po dłuższym okresie przechowywania lub w bardziej zaawansowanym stadium dojrzałości, jabłka mają wyższą absorpcję rozproszoną miąższu, mniejszą szybkość brązowienia i niższy przyrost absorpcji do wysycenia brązowienia – parametry te są określane z modelu brązowienia miąższu jabłek o dojrzałości konsumpcyjnej.

3. Odmiany charakteryzuje czas połówkowy brązowienia ciętego miąższu, który jest niezależny od długości okresu przechowywania jabłek i zróżnicowania dojrzałości w stanie dojrzałości konsumpcyjnej.

4. Na granicy miąższu z powietrzem powstaje bariera ochronna, do tworzenia której zużyty zostaje tlen z przestrzeni międzykomórkowych, uszkodzone komórki i ich związki fenolowe, a także wytwarzane są brązowe barwniki w komórkach. Największa szybkość brązowienia związana jest z dużą zawartością kwasu chlorogenowego w miąższu.

5. Zablockowanie na powierzchni cięcia miąższu aktywności oksydazy polifenolowej albo usunięcie treści komórkowej z powierzchni cięcia lub obniżenie temperatury zmniejsza szybkość powstawania brązowych barwników, lecz nie zatrzymuje ich wytwarzania w miąższu i utworzenia brązowienia charakterystycznego dla materiału. Stan ten opisuje parametr modelu kinetyki pierwszego rzędu jakim jest przyrost absorpcji do wysycenia brązowienia.

6. Potencjał elektrody redoks w chwili wbicia w miąższ, jak również potencjał elektrody po wysyceniu brązowienia, charakteryzuje reakcję miąższu na mechaniczne uszkodzenie, potwierdza aktywność biologiczną polifenoli w jabłku i może być miarą zmian świeżości miąższu jabłek.

7. Świeżość miąższu można scharakteryzować metodą kinetyczną i wskaźnikami oceniającymi aktywność biologiczną poszczególnych grup polifenoli w miąższu. Wskaźniki mogą być utworzone za pomocą analizy wielowymiarowej widm spektrofotometrycznych światła UV odbitego od odciętego miąższu jabłka podczas 10 min brązowienia w normalnych warunkach otoczenia.

8. PIŚMIENNICTWO

1. **Abbott J.A.:** Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharv. Biol. Technol.*, 15 (3), 207-225, 1999.
2. **Abbott J.A., Saftner R.A., Gross K.C., Vinyard B.T., Janick J.:** Consumer evaluation and quality measurement of fresh-cut slices of 'Fuji,' 'Golden Delicious,' 'Gold Rush,' and 'Granny Smith' apples. *Postharv. Biol. Technol.*, 33 (2), 127-140, 2004.
3. **Alonso-Salces R.M., Herrero C., Barranco A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F.:** Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions. *Food Chem.*, 93 (1), 113-123, 2005.
4. **Alzamora S.M., Salvatori D., Tapia M.S., López-Malo A., Welti-Chanes J., Fito P.:** Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *J. Food Eng.*, 67 (1-2), 205-214, 2005.
5. **Amiot M.J., Aubert S., Nicolas J., Goupy P.M., Aparicio P.:** Phenolic composition and browning susceptibility of various apple and pear cultivars at maturity. *Acta Hort.*, 343, 67-69, 1993.
6. **Amiot M.J., Tacchini M., Aubert S., Nicolas J.:** Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.*, 57 (4), 958-962, 1992.
7. **Ananta E., Volkert M., Knorr D.:** Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int. Dairy Journal*, 15 (4), 399-409, 2005.
8. **Aubert S., Amiot M.J., Nicolas J.:** Browning criteria of apples. *Sci. Aliments*, 12, 625-647, 1992.
9. **Awad M.A., de Jager A.:** Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples and other fruits. *Postharv. Biol. Technol.*, 27 (1), 53-58, 2003.
10. **Awad M.A., de Jager A., Dekker M., Jongen W.M.F.:** Formation of flavonoids and chlorogenic acid in apples as affected by crop load. *Scientia Horticulturae*, 91 (3-4), 227-237, 2001.
11. **Awad M.A., de Jager A., van Westing L.M.:** Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae*, 83 (3-4), 249-263, 2000.
12. **Babicz Zielinska E.:** Food preferences among the Polish young adults. *Food Qual. Pref.*, 10 (2), 139-145, 1999.
13. **Baldwin E.A., Nisperos M.O., X. C., Hagenmaier R.D.:** Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharv. Biol. Technol.*, 9 (2), 151-163, 1996.
14. **Barylko-Pikielna N.:** Zarys analizy sensorycznej żywności. WNT, Warszawa, 1975.
15. **Betoret N., Puente L., Díaz M.J., Pagán M.J., García M.J., Gras M.L., Martínez Monzó J., Fito P.:** Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *J. Food Eng.*, 56 (2-3), 273-277, 2003.
16. **Biegańska-Marecik R.:** Technologia produkcji jabłek mało przetworzonych w postaci plastrów pakowanych w atmosferze modyfikowanej, Rozpr. dokt., AR im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, 2003.
17. **Biegańska-Marecik R., Czapski J.:** Porównanie przydatności odmian jabłek do produkcji plastrów o małym stopniu przetworzenia. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2 (2), 115-127, 2003.
18. **Billaud C., Brun-Mérimeé S., Louarme L., Nicolas J.:** Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple—I: Enzymatic browning and enzyme activity inhibition. *Food Chem.*, 84 (2), 223-233, 2004.

19. **Billaud C., Maraschin C., Nicolas J.:** Inhibition of polyphenoloxidase from apple by Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with l-cysteine under various conditions of pH and temperature. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37 (1), 69-78, 2004.
20. **Blahovec J., Patocka K., Paprstein F.:** Some mechanical characteristics of apples. *Zahradnictvo*, 17 (4), 263-274, 1990.
21. **Blankenship S.M., Dole J.M.:** 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharv. Biol. Technol.*, 28 (1), 1-25, 2003.
22. **Bourne M.C.:** Measure of shear and compression components of puncture test. *J. Food Sci.*, 31, 282-291, 1966.
23. **Bourne M.C.:** Use of the penetrometer for deformation testing of foods. *J. Food Sci.*, 38, 720-728, 1973.
24. **Bourne M.C.:** Converting from empirical to rheological tests on foods - it's a matter of time. *Cereal foods world*, 39 (1), 37-39, 1994.
25. **Bro R., Heimdal H.:** Enzymatic browning of vegetables. Calibration and analysis of variance by multiway methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 34 (1), 85-102, 1996.
26. **Bro R., van den Berg F., Thybo A., Andersen C.M., Jorgensen B.M., Andersen H.:** Multivariate data analysis as a tool in advanced quality monitoring in the food production chain. *Trends Food Sci. Techn.*, 13 (6-7), 235-244, 2002.
27. **Brown G.K., Segerlind R.S.:** Near-Infrared reflectance of bruised apples. *Transaction of the ASAE*, 17-19, 1974.
28. **Brown S.:** *Chemometrics Primer: Introduction*. 2001.
29. **Brun-Mérimeé S., Billaud C., Louarme L., Nicolas J.:** Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple—II. Kinetic study and mechanism of inhibition. *Food Chem.*, 84 (2), 235-241, 2004.
30. **Brylka J., Więkowska E.:** Potencjometryczne oznaczanie wybranych układów redoks w obecności katalazy lub peroksydazy. *Przem. Spoż.* 54 (1), 50-51, 56, 2003.
31. **Burda S., Oleszek W., Lee C.Y.:** Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J. Agric. Food Chem.* (38), 945-948, 1990.
32. **Cadwallader K., Weenen H.:** *Freshness and Shelf Life of Foods*. Edit. Keith Cadwallader and Hugo Weenen. 2002.
33. **Calligaris S., Manzocco L., Anese M., Nicoli M.C.:** Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *Int. Dairy Journal*, 14 (5), 421-427, 2004.
34. **Clydesdale F.M.:** The measurement of color – 1; The sample as a problem – 2; Color & turbidity in solutions – 3; Pigment content and color in fruits and vegetables – 4. *Food Technol.*, 23 (15), 16-36, 1969.
35. **Cubeddu R., D'Andrea C., Pifferi A., Taroni P., Torricelli A., Valentini G., Dover C., Johnson D., Ruiz-Altisent M., Valero C.:** Nondestructive quantification of chemical and physical properties of fruits by time-resolved reflectance spectroscopy in the wavelength range 650-1000 nm. *Appl. Opt.*, 40 (4), 2001.
36. **Czapski J.:** Warzywa i owoce mało przetworzone (1) i (2). *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 8 i 9, 30; 29-31, 1996.
37. **Czernawski D.S., Romanowski J.M., Stiepanowa N.W.:** *Modelowanie matematyczne w biofizyce*. PWN, Warszawa, 1979.

38. **Dai G.H., Nicole M., Andary C., Martinez C., Bresson E., Boher B., Daniel J.F., Geiger J.P.:** Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49 (5), 285-306, 1996.
39. **Dąbkowski J.:** O problemie redukcji wymiarów. *Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej*, Kraków, 2000.
40. **De Belie N., Schotte S., Coucke P., De Baerdemaeker J.:** Development of an automated monitoring device to quantify changes in firmness of apples during storage. *Postharv. Biol. Technol.*, 18 (1), 1 - 8, 2000.
41. **D'Haeze W., Holsters M.:** Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends in Microbiology*, 12 (12), 555-561, 2004.
42. **Di Natale C., Macagnano A., Martinelli E., Paolesse R., Proietti E., D'Amico A.:** The evaluation of quality of post-harvest oranges and apples by means of an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 78 (1-3), 26-31, 2001.
43. **Dixon R.A., Lamb C.J., Masoud S., Sewalt V.J.H., Paiva N.L.:** Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses – a review. *Gene*, 179 (1), 61-71, 1996.
44. **Dobrzański B.jr., Rybczyński R., Kuczyński A.P.:** Mechanical resistance of storage apple. [In:] De Baerdemaeker J., *Control Applications in Post-Harvest and Processing Technology*. De Baerdemaeker J. Elsevier Science, 77-83, 1995.
45. **Drozdowicz M.:** *Przechowalnictwo owoców*. Polskie Wydawnictwa Gospodarcze, Warszawa, 1957.
46. **Drozdowicz M.:** *Technologia przechowywania i uszlachetniania owoców i warzyw*. [Pr. zb. pod red. Drozdowicza]. Zakład Wydaw. CRS, Warszawa, 1976.
47. **Duden R.:** Einfluss von Oxalsäure auf Polyphenoloxydase und Peroxydase. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 125, 382-385., 1965.
48. **Eisele T.A., Drake S.R.:** The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *J. of Food Composition and Analysis*, 18 (2-3), 213-221, 2005.
49. **Escarpa A., González M.C.:** Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427 (1), 119-127, 2001.
50. **Feijó J.A., Costa S.S., Prado A.M., Becker J.D., Certal A.C.:** Signalling by tips. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (5), 589-598, 2004.
51. **Francis F.J.:** Quality as influenced by color. *Food Qual. Pref.*, 6 (3), 149-155, 1995.
52. **Fraser D.G., Künnemeyer R., McGlone V.A., Jordan R.B.:** Letter to the Editor. *Postharv. Biol. Technol.*, 22 (3), 191-194, 2001.
53. **Gabrielska J., Gruszecki W.I.:** Zeaxanthin (dihydroxy- β -carotene) but not β -carotene rigidifies lipid membranes: a ¹H-NMR study by carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1285 (2), 167-174, 1996.
54. **Gasik A., Horubała A.:** Aktywność enzymów oksydoredukcyjnych (PPO i PO) oraz zawartość związków polifenolowych a podatność na brunatnienie miazgi jabłkowej. *Przem. Spoż.* 8, 185-191, 1990.
55. **Gasik A., Horubała A., Kubisz E.:** Wpływ dodatku przeciwutleniaczy do miazgi jabłkowej na zawartość związków fenolowych w soku. *Przem. Spoż.* 5, 140-142, 1991.

56. **Geodecki M., Grundas S., Kuczyński A.P.:** The effect of the number of winter wheat kernels in a spikelet on the statistical distribution of kernel thickness. *Acta Agrophysica*, 4(3), 661-667, 2004.
57. **Gliszczyńska-Świgło A., Tyrakowska B.:** Quality of Commercial Apple Juices Evaluated on the Basis of the Polyphenol Content and the TEAC Antioxidant Activity. *J. Food Sci.*, 68 (5), 263-280, 2003.
58. **Gomis D.B., Palomino N.F., Alonso J.J.M.:** Capillary liquid chromatographic determination of neutral phenolic compounds in apple juices. *Analytica Chimica Acta*, 426 (1), 111-117, 2001.
59. **González J.J., Valle R.C., Bobroff S., Biasi W.V., Mitcham E.J., McCarthy M.J.:** Detection and monitoring of internal browning development in 'Fuji' apples using MRI. *Postharv. Biol. Technol.*, 22 (2), 179-188, 2001.
60. **González-Aguilar G.A., Wanga C.Y., Buta J.G.:** Inhibition of browning and decay of fresh-cut radishes by natural compounds and their derivatives. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 34 (5), 324-328, 2001.
61. **Grassmann J., Hippeli S., Elstner E.F.:** Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 40 (6-8), 471-478, 2002.
62. **Gruszecki W.I.:** Formy zagregowane wiolaksantyny i cykl wiolaksantynowy, *Rozprawy – habilitacje*, UMCS w Lublinie, 1991.
63. **Guyot S., Le Bourvellec C., Marnet N., Drilleau J.F.:** Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35 (3), 289-291, 2002.
64. **Guyot S., Veronique C., Souquet J.-M., Moutounet M.:** Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2458-2462, 1995.
65. **Harborne J.B.:** Do natural plant phenols play a role in ecology. *Acta Hort.*, 381, 36-43, 1994.
66. **Harborne J.B.:** *Ekologia biochemiczna*. PWN, 1997.
67. **Harker F.R., Gunson F.A., Jaeger S.R.:** The case for fruit quality: an interpretive review of consumer attitudes, and preferences for apples. *Postharv. Biol. Technol.*, 28 (3), 333-347, 2003.
68. **Henze R.E.:** Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione. *Sciences, New Series*, 123 (3209), 1174-1175, 1956.
69. **Hoehn E., Gasser F., Guggenbühl B., Künsch U.:** Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Postharv. Biol. Technol.*, 27 (1), 27-37, 2003.
70. **Horubała A.:** Otrzymywanie mętnego soku o jasnej barwie. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 7, 16-18, 1992.
71. **Horubała A.:** Zmiany barwy soków owocowych w procesach technologicznych ich otrzymywania i przechowywania. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 8, 31-34, 1996.
72. **ISO-7563.** Fresh fruits and vegetables – Vocabulary. 7563, 1998.
73. **Isolini D.:** Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. *Roller S., Woodhead Publishing Limited, Cambridge*, 2004.
74. **Jacxsens L., Devlieghere F., Ragaert P., Vanneste E., Debevere J.:** Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.*, 83 (3), 263-280, 2003.
75. **Jankiewicz L.S.:** *Fizjologia roślin sadowniczych*. PWN, Warszawa, 1984.
76. **Jones A.:** Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends in Plant Sci.*, 5 (5), 225-230, 2000.
77. **Jóźwiak Z., Bartosz G.:** *Biofizyka, wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami*. PWN, Warszawa, 2005.

78. **Kader A.A., Ben-Yehoshua S.:** Effects of superatmospheric oxygen levels on postharvest physiology and quality of fresh fruits and vegetables. *Postharv. Biol. Technol.*, 20 (1), 1-13, 2000.
79. **Kahle K., Kraus M., Richling E.:** Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49 (8), 797-806, 2005.
80. **Kim D.M., Smith N.L., Lee C.Y.:** Apple Cultivar Variations in Response to Heat Treatment and Minimal Processing. *J. Food Sci.*, 58 (5), 1111-1114, 1124, 1993.
81. **Kim D.M., Smith N.L., Lee C.Y.:** Quality of minimally processed apple slices from selected cultivars. *J. Food Sci.*, 58 (5), 1115-1117, 1175, 1993.
82. **Kleynen O., Leemans V., Destain M.F.:** Selection of the most efficient wavelength bands for 'Jonagold' apple sorting. *Postharv. Biol. Technol.*, 30 (3), 221-232, 2003.
83. **Kleynen O., Leemans V., Destain M.F.:** Development of a multi-spectral vision system for the detection of defects on apples. *J. Food Eng.*, 69 (1), 41-49, 2005.
84. **Konopacka D., Plocharski W.J.:** Effect of raw material storage time on the quality of apple chips. *Drying Technology*, 19 (3-4), 559 - 570, 2001.
85. **Konopacka D., Plocharski W.J.:** Effect of storage conditions on the relationship between apple firmness and texture acceptability. *Postharv. Biol. Technol.*, 32 (2), 205-211, 2004.
86. **Kopcewicz J., Lewak S.:** *Fizjologia roślin*. PWN, Warszawa, 2002.
87. **Krajewska B.:** Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Tech.*, 35 (2-3), 126-139, 2004.
88. **Kroon P., Williamson G.:** Perspective - Polyphenols: dietary components with established benefits to health? *J Sci Food Agric*, 85, 1239-1240, 2005.
89. **Kruczyńska D.:** Doniesienie prywatne. *Inst. Sadow. i Kwiaciars.*, 2005.
90. **Kuczyński A.P.:** Szybkie schładzanie próżniowe nietrwałych produktów rolnych. *Post. Nauk Rol.*, 6, 115-123, 1981.
91. **Kuczyński A.P.:** Analyse des durch Reifen der Erdbeerfruchte Hervorgerufenen Farbenwechsels. 3.Tagung Agrophysik 3. bis 6. Dezember Schloß Reinhardsbrunn, 359-362, 1984.
92. **Kuczyński A.P.:** Maturity vs puncture force in predicting the varietal differences of strawberry fruits. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 304, 131-138, 1985.
93. **Kuczyński A.P.:** Preliminary tests of vacuum chamber for a quick cooling of fresh agricultural products. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 297, 363-369, 1986.
94. **Kuczyński A.P.:** Metodyczne aspekty oceny podstawowych cech fizycznych owoców truskawki., *Rozprawa doktorska*, Wydz. Ogrodniczy AR w Lublinie, 1989.
95. **Kuczyński A.P.:** Application of physical data to quality control of minimally processed apples. [In:] De Baerdemaeker J., *Control Applications in Post-Harvest and Processing Technology*. De Baerdemaeker J. Elsevier Science, 223-227, 1995.
96. **Kuczyński A.P.:** The effect of cultivar on apple slice whiteness and enzymatic browning. *Zemledská Technika*, 43 (2), 51-54, 1995.
97. **Kuczyński A.P.:** Susceptibility to browning of apple cultivars; physical properties and phenolic composition of tissue. *Mat. konfer. 6-th Intern. Conf. on Agrophysics*, Lublin 15-18.09, *Book of Abstracts*, 1997, 259-260.
98. **Kuczyński A.P.:** Fizyczne metody badań polifenoli uczestniczących w ciemnieniu enzymatycznym miąższu jabłek. [In:] *Kopacz S., II Konf. pt.: Flawonoidy i ich zastosowanie*. Kopacz S. Ofic. Wydaw. Politech. Rzeszów, Rzeszów, 115-132, 1998.

99. **Kuczyński A.P.:** Redox potential in the tissue of cold-stored apples as an indicator of enzymatic activity and browning. *Acta Hort.*, 485, 231-237, 1999.
100. **Kuczyński A.P.:** Metoda spektrofotometrycznego opisu barwy skórki owocu jabłoni charakterystycznej dla odmiany. *Acta Agrophysica*, 37, 95-104, 2000.
101. **Kuczyński A.P.:** Usprawnienie metody pomiaru barwy pszenicy twardej. *Inż. Rol.*, 9 (20), 147-154, 2000.
102. **Kuczyński A.P.:** Badania widm fluorescencyjnych miąższu jabłek. *Acta Agrophysica*, 58, 97-104, 2001.
103. **Kuczyński A.P.:** Exploring reflectance spectra of apple slices and their relation to active phenolic compounds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 12/53 (1), 151-158, 2003.
104. **Kuczyński A.P.:** Ocena jędrności przechowywanych jabłek przy zastosowaniu statystycznej metody redukcji wymiarów w modelu. *Acta Agrophysica*, 98 (2(4)), 787-802, 2003.
105. **Kuczyński A.P., Bzowska-Bakalarz M.:** Moduł sprężystości tkanki korzenia buraka cukrowego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 321, 97-104, 1987.
106. **Kuczyński A.P., Bzowska-Bakalarz M.:** Metoda badania właściwości mechanicznych korzenia buraka cukrowego przy pomocy fali ultradźwiękowej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 351, 77-83, 1988.
107. **Kuczyński A.P., De Baerdemaeker J., Oszmiański J.:** An optical reflectance method for studying the enzymatic browning reaction in apple. *Int. Agrophysics*, 8, 421-425, 1994.
108. **Kuczyński A.P., Grundas S., Szwed-Urbaś K., Segit Z.:** Metoda oceny barwy semoliny otrzymanej z wybranych linii pszenicy twardej (*Triticum Durum Desf.*). *Acta Agrophysica*, 37, 105-112, 2000.
109. **Kuczyński A.P., Oszmiański J.:** Quantitative UV-VIS diffuse reflectance spectrophotometry for the measurements of the enzymatic browning of apple tissue. *Mat. konfer. 6-th Intern. Conf. on Agrophysics, Lublin 15-18.09 Book of Abstracts*, 1997, 261-262.
110. **Kuczyński A.P., Rybczyński R.:** Assessment of the mechanical resistance of raspberries to constant uniaxial loading. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 399, 125-128, 1993.
111. **Kuczyński A.P., Rybczyński R.:** Pomiar odporności mechanicznej owoców maliny w teście pełzania. *Acta Agrophysica*, 4 (3), 707-713, 2004.
112. **Kuczyński A.P., Szukiewicz Z., Rybczyński R., Wieniarska W.:** A spectrophotometric method for the assessment of the mechanical strength of raspberry fruits. *Int. Agrophysics*, 8, 427-430, 1994.
113. **Kuczyński A.P., Varoquaux P.:** Etude de la couleur des pulpes de peches blanches et leur brunissement par la méthode réflectométrique. 9^o Colloque sur les recherches fruitieres, Avignon 4-5-6 décembre, 259-267, 1990.
114. **Kuczyński A.P., Varoquaux P.:** Method for estimation of enzymatic browning and its suppression in apple slices. *Int. Agrophysics*, 10, 43-49, 1996.
115. **Kuczyński A.P., Varoquaux P., Souty M.:** Reflectance spectra of 'ready-to-use' apple products for determination of enzymatic browning. *Int. Agrophysics*, 7, 85-92, 1993.
116. **Kuczyński A.P., Varoquaux P., Varoquaux F.:** Reflectometric method to measure the initial colour and browning rate of white peach pulps. *Sci. Aliments*, 12, 213-221, 1992.
117. **Laloi C., Apel K., Danon A.:** Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (3), 323-328, 2004.

118. **Lammertyn J., Peirs A., De Baerdemaeker J., Nicolai B.:** Light penetration properties of NIR radiation in fruit with respect to non-destructive quality assessment. *Postharv. Biol. Technol.*, 18 (2), 121-132, 2000.
119. **Lange E., Ostrowski W.:** Przechowywalność owoców. Wyd. 2. PWRiL, Warszawa, 1992.
120. **Larrigaudiere C., Lenthéric L., Vendrell M.:** Relationship between enzymatic browning and internal disorders in controlled-atmosphere stored pears. *J Sci Food Agric*, 78 (2), 232-236, 1998.
121. **Le Tien C., Vachon C., Mattescu M.A., Lacroix M.:** Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes. *J. Food Sci.*, 66 (4), 512-516, 2001.
122. **Lee G.C., Lee C.Y.:** Inhibitory effect of caramelisation products on enzymic browning. *Food Chemistry*, 60 (2), 231-235, 1997.
123. **Lee J.Y., Park H.J., Lee C.Y., Choi W.Y.:** Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 36, 323-329, 2003.
124. **Leemans V., Destain M.F.:** A real-time grading method of apples based on features extracted from defects. *J. Food Eng.*, 61 (1), 83-89, 2004.
125. **Leistner L., Gorris L.G.M.:** Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Techn.*, 6 (2), 41-46, 1995.
126. **Leja M., Mareczek A.:** Effect of mechanical damage of greenhouse lettuce on some biochemical processes occurring in it during storage. *Folia Horticulturae*, 7/1, 75-89, 1995.
127. **Leja M., Mareczek A.:** Metabolizm związków fenolowych w mechanicznie uszkodzonych korzeniach marchwi. *Mater. Ogólnopol. Konf. Nauk. pt.: Nauka Praktyce Ogrodniczej*, AR Lublin, 1995, 669-671.
128. **Leja M., Mareczek A., Ben J.:** Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chem.*, 80 (3), 303-307, 2003.
129. **Leja M., Mareczek A., Rożek S.:** Metabolic changes in certain biochemical compounds in short-term stored carrot root slices. *Folia Horticulturae*, 7/2, 69-82, 1995.
130. **Leja M., Mareczek A., Rożek S.:** Phenolic metabolism in root slices of selected carrot cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19 (3), 319-325, 1997.
131. **Lewicki P.P., Porzecka-Pawlak R.:** Effect of osmotic dewatering on apple tissue structure. *J. Food Eng.*, 66 (1), 43-50, 2005.
132. **Lopaczynski W., Zeisel S.H.:** Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*, 21 (1-2), 295-307, 2001.
133. **Lozano-de-Gonzalez P.G., Barrett D.M., Wrolstad R.E., Durst R.W.:** Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. *J. Food Sci.*, 58 (2), 399-404, 1993.
134. **Lu Y., Yeap Foo L.:** Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.*, 68 (1), 81-85, 2000.
135. **Lüthy J.:** Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control*, 10 (6), 359-361, 1999.
136. **Macheix J.J., Delaporte N.:** Distribution of the main o-diphenolic compounds in the apple (*Pirus Malus L.*). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 6 (1), 19-22, 1973.
137. **Mangas J.J., Rodriguez R., Suarez B., Picinelli A., Dapena E.:** Study of the phenolic profile of cider apple cultivars at maturity by multivariate techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4046-4052, 1999.
138. **Maniak B., Wójcik W., Dobrzański B jr.:** Zastosowanie chitosanu w produkcji mało przetworzonych jabłek. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2 (1), 41-50, 2003.

139. **Mareczek A., Leja M., Ben J.:** Total phenolics, anthocyanins and antioxidant activity in the peel of the stored apples. *J. of Fruit Ornamental Plant Research*, 8 (2), 59-64, 2000.
140. **Markowski J., Plocharski W.:** Aktywność antyoksydacyjna oraz skład chemiczny soków jabłkowych dostępnych na polskim rynku. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 8-9, 2005.
141. **Markowski J., Plocharski W.:** Zmiany składu związków fenolowych przy przerobieniu jabłek na soki i przeciery. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 4, 33-36, 2006.
142. **Martins S., Van Boekel M.:** A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chem.*, 90 (1-2), 257-269, 2005.
143. **Mattheis J.P., Fellman J.K.:** Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharv. Biol. Technol.*, 15 (3), 227-232, 1999.
144. **Mavroudis N.E., Dejmek P., Sjöholm I.:** Osmotic-treatment-induced cell death and osmotic processing kinetics of apples with characterised raw material properties. *J. Food Eng.*, 63 (1), 47-56, 2004.
145. **McGlone V.A., Jordan R.B., Martinsen P.J.:** Vis/NIR estimation at harvest of pre- and post-storage quality indices for 'Royal Gala' apple. *Postharv. Biol. Technol.*, 25 (2), 135-144, 2002.
146. **McLellan M.R., Blanpied G.D., Massey L.M.:** Harvest data and CA storage management effects on quality of processed apple slices. *J. Food Sci.*, 55 (4), 1046-1048, 1990.
147. **McLellan M.R., Massey L.M.J.:** Effect of postharvest storage and ripening of apples on the sensory quality of processed applesauce. *J. Food Sci.*, 49, 1323-1326, 1984.
148. **Merken H.M., Merken C.D., Beecher G.R.:** Kinetics method for the quantitation of anthocyanins, flavonols, and flavones in food. *J. Agric. Food Chem.*, 49(6), 2727-32, 2001.
149. **Merschbrock U., Hoffmann J., Caspary L., Huber J., Schickaly U., Lubbers D.W.:** Fast wavelength scanning reflectance spectrophotometer for noninvasive determination of hemoglobin oxygenation in human skin. *Int. J. Microcirc.*, 14, 274-281., 1994.
150. **Merzlyak M.N., Chivkunova O.B.:** Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 55 (2-3), 155-163, 2000.
151. **Mielicki J.:** Zarys wiadomości o barwie. Fundacja Rozwoju Polskiej Kolorystyki, Łódź, 1997.
152. **Mika A.:** Jabłoni. MULTICO Ofic. Wydaw., Warszawa, 2002.
153. **Miller N.J., Diplock A.T., Rice-Evans C.A.:** Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1794-1801, 1995.
154. **Mittler R.:** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9), 405-410, 2002.
155. **Mochizuki M., Yamazaki S.i., Kano K., Ikeda T.:** Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim. Biophys. Acta-General Subjects*, 1569 (1-3), 35-44, 2002.
156. **Mohr W.P.:** Applesauce 'grain'. *J. Texture Studies*, 4, 263-268, 1973.
157. **Mohr W.P.:** Influence of cultivar, fruit maturity and fruit anatomy on apple sauce particle size and texture. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 24, 403-413, 1989.
158. **Mohr W.P., Adair R.G., Craven D.J.:** Processing qualities of apple varieties and selections; Processing qualities of apple cultivars; Apple cultivars for juice and cider production. *Smithfield Technical Bull.*, 3, 6, 7, (1974, 1983, 1988), 1988.
159. **Mohsenin N.N.:** Electromagnetic radiation properties of foods and agricultural products. Gordon and Breach, Science Publishers, Inc., New York, 1984.

160. **Mohsenin N.N.:** Physical properties of plant and animal materials. Gordon and Breach, Science Publishers, Inc., New York, 1986.
161. **Molnár-Perl I., Füzfa Z.:** Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *J. Chromatogr.*, 1073 (1-2), 201-227, 2005.
162. **Molski A.:** Wprowadzenie do kinetyki chemicznej. WNT, Warszawa, 2001.
163. **Murata M., Haruta M., Murai N., Tanikawa N., Nishimura M., Homma S., Itoh Y.:** Transgenic apple (*Malus domestica*) shoot showing low browning potential. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5243-5248, 2000.
164. **Nicolas J., Cheynier V., Fleuriet A., Rouet-Mayer M.A.:** Polyphenols and enzymatic browning. Polyphenolic Phenomena, Scalbert ed. INRA Edition, Paris., 165-175, 1993.
165. **Nicoli M.C., Massini R., Lerici C.R., Mastrocola D.:** Detection of enzymatic browning in fruit products. *Process in Food Preserv. Proc.*, 2, 63-69, 1988.
166. **Notsu H., Tatsuma T.:** Simultaneous determination of phenolic compounds by using a dual enzyme electrodes system. *J. Electroanal. Chem.*, 566 (2), 379-384, 2004.
167. **Oleszek W., Amiot M.J., Aubert S.Y.:** Identification of some phenolics in pear fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (6), 1261-1265, 1994.
168. **Oleszek W., Głowniak K., Leszczyński B.:** Biochemiczne oddziaływania środowiskowe. Wydaw. Akad. Med., Lublin, 2001.
169. **Oleszek W., Lee C.Y., Jaworski A.W., Price K.R.:** Identification of some phenolic compounds in apples. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 430-432, 1988.
170. **Oleszek W., Lee C.Y., Price K.R.:** Apple phenolics and their contribution to enzymatic browning reactions. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 58 (2), 273-283, 1989.
171. **Oszmiański J.:** Zmiany związków fenolowych w produkcji i przechowywaniu koncentratu soku jabłkowego – skrót pr. doktor. *Zesz. Nauk. AR Wrocław Technol. Żyw.*, 163., 31-49, 1986.
172. **Oszmiański J.:** Przemiany enzymatyczne związków fenolowych w układach modelowych i ekstraktach owocowych. Pr. habil. *Zesz. Nauk. AR Wrocław Technol. Żyw.*, 67, 1988.
173. **Oszmiański J., Lee C.Y.:** Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1202-1204, 1990.
174. **Oszmiański J., Lee C.Y.:** Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J. Agric. Food Chem.*, 38 (10), 1892-1895, 1990.
175. **Oszmiański J., Ramos T., Bourzeix M.:** Fractionation of phenolic compounds in red wine. *Am. J. End. Vitic.*, 39, 3, 1988.
176. **Oszmiański J., Sokół-Łętowska A., Kuczyński A.P.:** Effect of rhubarb juice on phenolics and colour of unclarified apple juice. *Fruit Proces.*, 6, 179-182, 1995.
177. **Oszmiański J., Sorzyński J.:** Wpływ sposobu otrzymywania soku jabłkowego na zawartość związków polifenolowych i barwę. *Zesz. Nauk. AR Wrocław Technol. Żyw.*, 136, 57-63, 1981.
178. **Oszmiański J., Sorzyński J.:** Changes in the polyphenolic compounds of apple pulp. *Acta Alim. Pol.*, 12 (1), 11-19, 1986.
179. **Park H.J.:** Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends Food Sci. Techn.*, 10 (8), 254-260, 1999.
180. **Paździoch-Czochra M., Wideńska A.:** Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity. *Anal. Chim. Acta*, 452 (2), 177-184, 2002.

181. **Péneau S., Hoehn E., Roth H.R., Escher F., Nuessli J.:** Importance and consumer perception of freshness of apples. *Food Qual. Pref.*, 17 (1-2), 9-19, 2006.
182. **Pérez-Illarbe J., Hernández T., Estrella I., Vendrell M.:** Cold storage of apples (cv. Granny Smith) and changes in phenolic compounds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 204 (1), 52 - 55, 1997.
183. **Peri L., Pietraforte D., Scorza G., Napolitano A., Fogliano V., Minetti M.:** Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acidic pH of the stomach: A new biological function for polyphenols with a catechol group? *Free Radic. Biol. Med.*, 39 (5), 668-681, 2005.
184. **Peyrat Maillard M.N., Bonnely S., Berset C.:** Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51 (4), 709-716, 2000.
185. **Piskula M.:** Niektóre czynniki wpływające na wchłanianie i metabolizm flawonoidów, Pr. habil., Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żwności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, 2001.
186. **Piskula M.K., Terao J.:** Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, 128, 117-1178, 1998.
187. **Plocharski W.J., Konopacka D.:** The relation between mechanical and sensory parameters of apples. *Acta Hort.*, 485, 309-318, 1999.
188. **Podsędek A., Wilska-Jeszka J., Anders B., Markowski J.:** Compositional characterisation of some apple varieties. *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 268-272, 2000.
189. **Pre-Aymard C., Fallik E., Weksler A., Lurie S.:** Sensory analysis and instrumental measurements of 'Anna' apples treated with 1-methylcyclopropene. *Postharv. Biol. Technol.*, 36 (2), 135-142, 2005.
190. **Puchalski C.:** Metodyczne aspekty badania tarcia i jędrności jabłek pod kątem oceny ich jakości, Pr. habil., Zesz. Nauk. - Rozprawy 275, AR w Krakowie, 2001.
191. **Puite K.J., Schaart J.G.:** Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. *Plant Science*, 119 (1-2), 125-133, 1996.
192. **Ragaert P., Verbeke W., Devlieghere F., Debevere J.:** Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality and Preference*, 15 (3), 259-270, 2004.
193. **Reid W.S.:** Optical detection of apple skin, bruise, flesh, stem and calyx. *J. Agric. Eng. Res.*, 21, 291-295, 1976.
194. **Robards K.:** Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr.*, 1000 (1-2), 657-691, 2003.
195. **Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W.:** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66 (4), 401-436, 1999.
196. **Rocculi P., Romani S., Rosa M.D.:** Evaluation of physico-chemical parameters of minimally processed apples packed in non-conventional modified atmosphere. *Food Res. International*, 37 (4), 329-335, 2004.
197. **Rodgers S.:** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – a review. *Trends Food Sci. Techn.*, 12 (8), 276-284, 2001.
198. **Rontein D., Basset G., Hanson A.D.:** Metabolic Engineering of Osmoprotectant Accumulation in Plants. *Metabolic Engineering*, 4 (1), 49-56, 2002.
199. **Ruszczyc Z.:** Metodyka doświadczeń zootechnicznych. PWRiL, Warszawa, 1981.
200. **Rybczyński R., Dobrzański B.jr.:** Fizyczne aspekty pomiaru jędrności jabłek. *Acta Agrophysica rozprawy i monografie*, 69, 75, 2002.

201. **Samotus B., Duliński J., Siwanowicz R., Leja M., Ścigalski A.:** Metoda piknometryczna oznaczania suchej masy w bulwach ziemniaka. *Acta Agraria et Silvestria*, 25, 67-78, 1986.
202. **Sapers G.M., Douglas F.W.:** Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juice of raw apple and pear fruits. *J. Food Sci.*, 52 (5), 1258-1262, 1285, 1987.
203. **Sapers G.M., Garzarella L., Pilizota V.:** Application of browning inhibitors to cut apple and potato by vacuum and pressure infiltration. *J. Food Sci.*, 55 (4), 1049-1053, 1990.
204. **Sapers G.M., Hicks K.B.:** Inhibition of enzymatic browning in fruits and vegetables. *ACS Symp. Ser. No. 405 Chemistry and Technology*, 3, 29-43, 1989.
205. **Sapers G.M., Hicks K.B., Philips I.G., Garzarella L., Matulaitis R.M., McCormack T.J., Sondey S.M., Seib P.A., Ei-Atawy Y.S.:** Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives polyphenol oxidase inhibitors and complexing agents. *J. Food Sci.*, 54 (4), 997-1002, 1989.
206. **Sapers G.M., Miller R.L., Douglas F.W.J., Hicks K.B.:** Uptake and fate of ascorbic acid-2-phosphate in infiltrated fruits and vegetable tissue. *J. Food Sci.*, 56 (2), 419-422, 1991.
207. **Sapers G.M., Ziolkowski M.A.:** Comparison of erythrocin and ascorbic acids as inhibitors of enzymatic browning in apple. *J. Food Sci.*, 52 (6), 1732-1733, 1747, 1987.
208. **Schaefer S., Baum M., Eisenbrand G., Dietrich H., Will F., Janzowski C.:** Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Molecular Nutrit. Food Res.*, 50 (1), 24-33, 2006.
209. **Schaefer S., Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C.:** Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Molecular Nutrit. Food Res.*, 50 (4-5), 413-417, 2006.
210. **Schieber A., Hilt P., Streker P., Endreß H.-U., Rentschler C., Carle R.:** A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Sci. and Emerging Technol.*, 4 (1), 99-107, 2003.
211. **Schieber A., Keller P., Carle R.:** Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 910 (2), 265-273, 2001.
212. **Schuphan W.:** Jakość produktów pochodzenia roślinnego. *PWRiL*, Warszawa, 1966.
213. **Schwerdtfeger E.:** Freshness as a part of vegetable quality. *Acta Hort.*, 2 (Supplement) (93), 35-44, 1979.
214. **Shewfelt R.L.:** Flavor and color of fruits as affected by processing. [In:] *Commercial Fruit Processing*. AVI Publishing Co, 481-529, 1986.
215. **Shewfelt R.L.:** What is quality? *Postharv. Biol. Technol.*, 15 (3), 197-200, 1999.
216. **Shyu S.-L., Hwang L.S.:** Effects of processing conditions on the quality of vacuum fried apple chips. *Food Res. Intern.*, 34 (2-3), 133-142, 2001.
217. **Sielewiesiuk J.:** Fotoprotekcyjna rola karotenoidów w świetle badań modelowych, Pr. habil., UMCS w Lublinie, 1988.
218. **Sieliwanowicz B., Hałasińska A.G., Trzcńska M., Jakubowski A., Lipowski J., Skąpska S.:** Zmiany zawartości związków fenolowych, parametrów barwy i aktywności przeciwutleniającej w czasie przechowywania soków z wybranych odmian jabłek. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 4 (1), 83-91, 2005.
219. **Sikorski Z.:** Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. *WNT*, Warszawa, 1996.

220. **Soliva-Fortuny R.C., Lluch M.A., Quiles A., Grigelmo-Miguel N., Martin-Belloso O.:** Evaluation of Textural Properties and Microstructure During Storage of Minimally Processed Apples. *J. Food Sci.*, 68 (1), 2003.
221. **Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y.:** Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2071-2074, 2000.
222. **Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y.:** Rhubarb juice as a natural antibrowning agent. *J. Food Sci.*, 65 (7), 1288-1289, 2000.
223. **Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y.:** Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chem.*, 73 (1), 23-30, 2001.
224. **Sousa W.R., da Rocha C., Cardoso C.L., Silva D.H.S., Zanoni M.V.B.:** Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *J. of Food Comp. and Anal.*, 17, 619-633, 2004.
225. **Spanos G.A., Wrolstad R.E.:** Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage - A review. *J. Agric. Food Chem.*, 40 (9), 1478-1487, 1992.
226. **Starzyńska A., Leja M., Mareczek A.:** Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. *Plant Sci.*, 165 (6), 1387-1395, 2003.
227. **STATISTICA for Windows (Computer program manual).** Version 5.5. StatSoft Inc., 2000.
228. **Stearns E.L.:** The practice of absorption spectrophotometry. Wiley-Interscience, USA, 1969.
229. **Szot B., Kuczyński A.P., Grzegórski S.:** Charakterystyka podstawowych cech geometrycznych ziarna pszenicy ozimej rozkładem normalnym-sklejonym. *Rocz. Nauk Rol.*, C-74-4, 81-88, 1980.
230. **Thomson J.:** Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health – 3. *Trends Food Sci. Techn.*, 14 (5-8), 210-228, 2003.
231. **Tomás-Barberán F.A., Espin J.C.:** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 853-876, 2001.
232. **Treutter D.:** Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regul.*, 34 (1), 71-89, 2001.
233. **Tsao R., Yang R.:** Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1018 (1), 29-40, 2003.
234. **Tucholka D.:** Metody spektroskopii absorpcyjnej i odbiciowej w analizie chemicznej, Skrypty AR w Poznaniu, 1992.
235. **Twardowski J.:** Biospektroskopia. PWN, Warszawa, 1989.
236. **Upchurch B.L., Throop J.A., Aneshansley D.J.:** Detecting internal breakdown in apples using interactance measurements. *Postharv. Biol. Technol.*, 10 (1), 15-19, 1997.
237. **Valentines M.C., Vilaplana R., Torres R., Usall J., Larrigaudiere C.:** Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharv. Biol. Technol.*, 36 (3), 227-234, 2005.
238. **Vamos L., Gajzago I.:** Mesurement of enzymatic browning of fruit with the spectrocoulometer "Spekol". *Die Nahrung*, 18 (8), 765-773, 1974.
239. **van Breusegem F., Vranová E., Dat J.F., Inzé D.:** The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.*, 161 (3), 405-414, 2001.

240. **Van der Sluis A.A., Dekker M., de Jager A., Jongen W.M.F.:** Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3606-3613, 2001.
241. **Van der Sluis A.A., Dekker M., Jongen W.M.F.:** Flavonoids as bioactive components in apple products. *Cancer Letters*, 114, 107-108, 1997.
242. **Van Dijk C., Ebbenhorst-Selles T., Ruisch H., Stolle-Smits T., Schiivens E., Van Deelen W.:** Product and redox potential analysis of sauerkraut fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 132-139, 2000.
243. **Van Fleet D.S.:** The significance of oxidation in the endodermis. *Amer. J. Bot.*, 29 (9), 747-755, 1942.
244. **Varoquaux P., Mazollier J., Albagnac G.:** The influence of raw material characteristics on the storage life of fresh-cut butterhead lettuce. *Postharv. Biol. Technol.*, 9 (2), 127-139, 1996.
245. **Varoquaux P., Wiley R.C.:** Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. [In:] Wiley R. C., *Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*. Wiley R. C. Chapman & Hall, London, 226-268, 1997.
246. **Verrips C.T., Warmoeskerken M.M.C.G., Post J.A.:** General introduction to the importance of genomics in food biotechnology and nutrition. *Current Opinion in Biotechnol.*, 12 (5), 483-487, 2001.
247. **Voegel-Turenne C., Mahfouz M., Allaf K.:** Three models for determining the induction time in the browning kinetics of the Granny Smith apple under static conditions. *J. Food Eng.*, 41 (3-4), 133-139, 1999.
248. **Waldron K.W., Parker M.L., Smith A.C.:** Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Sci. and Food Safety*, 2, 101-119, 2003.
249. **Waldron K.W., Smith A.C., Parr A.J., Ng A., Parker M.L.:** New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends Food Sci. Technol.*, 8 (7), 213-221, 1997.
250. **Wiley R.C.:** *Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*. Wiley R. C., Chapman & Hall, London, 1994.
251. **Yuwana Y., Duprat F.:** Prediction of apple bruising based on the instantaneous impact shear stress and energy absorbed. *Int. Agrophysics*, 12, 133-140, 1998.
252. **Zgirski A., Gondko R.:** *Obliczenia biochemiczne*. PWN, Warszawa, 1998.
253. **Zieliński H.:** *Studia nad naturalnymi antyoksydantami pochodzenia roślinnego o istotnym znaczeniu w żywności i w stresie oksydacyjnym układu oddechowego u ludzi*, Pr. habil., Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, PAN w Olsztynie, 2004.
254. **Zude M.:** Comparison of indices and multivariate models to non-destructively predict the fruit chlorophyll by means of visible spectrometry in apple fruit. *Anal. Chim. Acta*, 481 (1), 119-126, 2003.
255. **Zude-Sasse M., Truppel I., Herold B.:** An approach to non-destructive apple fruit chlorophyll determination. *Postharv. Biol. Technol.*, 25 (2), 123-133, 2002.

9. STRESZCZENIE

Zastosowano fizyczne metody do obiektywnego monitorowania świeżości jabłek, w których wykorzystano pomiary aktywności procesu enzymatycznego utleniania, z udziałem polifenoli, po mechanicznym uszkodzeniu miąższu. Użyto analizy spektrofotometrycznej do badań kinetyki brązowienia miąższu oraz pomiarów potencjału elektrody redoks w miąższu jako miar aktywności biologicznej tkanki. Utworzono model brązowienia i zweryfikowano przydatność jego parametrów do opisu zmian świeżości jabłek o dojrzałości konsumpcyjnej.

Zbadany materiał pochodził z ponad trzydziestu odmian z doświadczenia odmianowego po długim przechowywaniu w komorach chłodniczych. Cechowała go bardzo duża zmienność, którą oceniono jednością 10-40 N (pomiar przebija-kiem Ø 7,9 mm, odchylenie standardowe dla odmiany – $s = 2-6$ N), zawartością ekstraktu 10-16% ($s = 0,5-2\%$), objętością przestrzeni międzykomórkowych 17-50% i zawartością w 100 g miąższu kwasu chlorogenowego 3-25 mg, epikatechiny 7-45 mg i ksyloglukozydu floretyny 0,5-7,5 mg. Nowe parametry mogą znaleźć zastosowanie w ocenie jakości jabłek przechowywanych i produktów ze świeżo ciętych jabłek.

Zmiany wywołane enzymatycznym brązowieniem w widmach UV-Vis (250-450 nm) i przyrost zawartości brązowych barwników w miąższu (pasmo 440 nm) wyrażano przyrostem absorbancji rozproszonej $A = \log(1/R)$, gdzie R – jest refleksyjnością tkanki. Analiza chemometryczna wykazała ścisły związek zawartości polifenoli oznaczonych HPLC w miąższu z widmami odbiciowymi UV-Vis czasowo rozdzielonymi, które uzyskano na granicy faz miąższu i powietrza, oraz ich związek z potencjałem elektrody redoks wbitej w miąższ. Analiza ponadto wykazała zróżnicowanie czasowe w przemianach substratów na nieenzymatycznym etapie reakcji brązowienia, a w widmach, charakterystyczne pasma dla substratów fenolowych. Stwierdzono, że możliwe jest tworzenie wskaźników świeżości jabłek z analizy uszkodzanego miąższu, co wynika z wykonanego oszacowania stężeń polifenoli w miąższu na podstawie widm spektrofotometrycznych czasowo rozdzielonych.

Efekty enzymatycznego brązowienia, w których uczestniczył tlen z przestrzeni międzykomórkowych, rejestrowano metodą kinetyczną od 1-3 min w ultrafiolecie (ok. 275 nm), a po 6-12 min, efekt ten obserwowano w widzialnym fiolecie 365-390 nm. Wykazano ścisły związek potencjału elektrody redoks wbitej w miąższ ($E_0 = 420-580$ mV) z pomiarami kinetycznymi po 3-4 min w pasmach 260 nm i 275 nm, oraz potencjału wysycenia na elektrodzie redoks ($E_f = 510-650$ mV) z pomiarami kinetycznymi w widzialnym fiolecie.

Zaproponowano opis brązowienia uszkodzonej mechanicznie świeżej tkanki, w którym pierwszy etap jest szybką reakcją związaną z nadmiarem enzymu PPO

w miąższu, a drugi to faza nieenzymatycznego, sprzężonego np. z kwasem chlorogenowym, utleniania polifenoli zależna od tlenu w przestrzeniach międzykomórkowych. Do praktycznej oceny zmian świeżości i przejrzenia przechowywanych jabłek uproszczono opis brązowienia i zastosowano model kinetyki I-rzędu względem barwników melaninowych absorbujących światło w paśmie 440 nm. Uwzględnia on zróżnicowanie dojrzałości owoców i okresy przechowywania jabłek.

Stwierdzono, że w świeżych owocach po zróżnicowanym okresie przechowywania i przy zróżnicowanej dojrzałości owoców (w dojrzałości konsumpcyjnej) stale aktywne są mechanizmy biologiczne w reakcji na uszkodzenie. Tę aktywność charakteryzuje stały i charakterystyczny dla każdej odmiany jabłek czas połowkowy brązowienia miąższu ($t_{1/2} = 5-45$ min), który wzrasta jedynie przy cięciu miąższu pod wodą. Maleje aktywność biologiczna substratów w jabłkach przejrzałych określana malejącą szybkością początkową brązowienia miąższu cząstek wyciętych z jabłek w powietrzu ($v = 0,003-0,035 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$, $s = 0,002-0,017 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$), a także malejącą szybkością brązowienia cząstek wyciętych pod wodą ($v = 0,001-0,02 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1}$). Miąższ cząstek z jabłek przejrzałych charakteryzują się wyższą absorbancją rozproszoną, którą określa się na miąższu świeżo wyciętym z jabłek ($A_0 = 0,2-0,5 \text{ Abs}$, $s = 0,01-0,3 \text{ Abs}$), a także mniejszym przyrostem absorbancji ($A_f = 0,05-0,35 \text{ Abs}$, $s = 0,03-0,1 \text{ Abs}$), co następuje przy osiągnięciu wysycenia brązowienia miąższu.

Zaobserwowano, że w świeżym miąższu proces brązowienia postępuje w kierunku utworzenia bariery ochronnej przed rodnikami organicznymi i przed tlenem. Następną cechą charakterystyczną świeżego miąższu jest obniżenie szybkości brązowienia o połowę, po wycięciu go pod wodą i wypłukaniu z treści komórkowej, lecz wtedy tylko nieznacznie maleje charakterystyczna dla każdej odmiany, absorbancja miąższu osiągnięta po wysyceniu brązowienia – $A_0 + A_f$ i nie zmienia się stała kinetyczna reakcji brązowienia miąższu ($K_M = 0,23 \text{ Abs}$ w normalnych warunkach otoczenia). Podobnie, obniżenie temperatury miąższu lub powierzchniowe inhibitory PPO, obniżają jedynie szybkość brązowienia i wydłużają trwałość barwy wyciętych cząstek (trwałość – $t_{0,08} = 2-80$ min, def. jako czas przyrostu absorbancji do $0,08 \text{ Abs}$ w normalnych warunkach otoczenia i przy cięciu w powietrzu).

Z wykonanych badań wynika, że brązowienie miąższu jabłek można traktować jako cechę odmianową, a analiza wskazuje na związek oceny świeżości z przejrzeniem i z aktywnością enzymatyczną polifenoli w tkance, oraz na jej związek z mechanizmami naprawczymi w miąższu i autentyczną wartością odżywczą jabłek. Za obiektywne miary świeżości jabłek i ciętego miąższu mogą służyć fizyczne miary aktywności biologicznej tkanki jako reakcja na uszkodzenie w wyniku cięcia lub przebicia.

Słowa kluczowe: ocena świeżości; polifenole; jakość owoców; spektrofotometria odbiciowa, elektroda redoks

10. SUMMARY

STUDIES ON THE DYNAMICS OF BROWNING AND ITS APPLICATION IN THE ESTIMATION OF APPLE FLESH FRESHNESS

Physical methods were applied for objective monitoring of apple freshness on the basis of measurements of the activity of the pathway of enzymatic oxidation with phenolics participation, activated by mechanical bruising. Spectrophotometric analysis of apple flesh browning and measurements in apple flesh by means of the redox electrode were applied as objective measures of the biological activity of tissue after bruising. The created model of browning was verified on apples in consumption maturity. The description of changes in flesh freshness was performed for apples of over thirty cultivars originating from a cultivar experiment, after two long-term periods of normal cold storage at 3-6 C, 89-95% RH.

Tested material was characterized by considerable variability, e.g. flesh firmness: 10-40 N (by flat penetrometer Ø 7.9 mm and standard deviation for cultivars $s = 2-6$ N), total soluble solids 10-16 Brix, and intercellular spaces 17-50%, content in the flesh (per 100 g) of chlorogenic acid 3-25 mg, epicatechine 7-45 mg, and phloretin-xyloglucoside 0.5-7.5 mg. The new parameters may find application in quality assessment of stored apples and of fresh cut apple products.

Changes caused by enzymatic browning in UV-Vis spectra (250-450 nm) and increase in the content of brown pigments in the flesh (440 nm band) were expressed by differences in diffuse absorbance $A = \log(1/R)$, where R is the reflectance of apple flesh. Chemometric analysis showed a close relation between the content of HPLC determined phenolics in the flesh, time-dependent UV-Vis reflectance spectra and the potential of redox electrode inserted in the flesh, all collected at the flesh-air phase boundary. The analysis also showed a time-course hierarchy in substrate transformations at the non-enzymatic stage of the browning reaction, and – in the spectra – bands characteristic for phenolics.

The possibility of creating freshness indexes on the basis of analysis of bruised apple flesh was demonstrated - concentrations of polyphenols in apple flesh were estimated on the basis of time-dependent spectrophotometric spectra.

The effects of enzymatic browning, with participation of oxygen from the intercellular spaces, were registered with the kinetic method from the first 1-3 minutes in UV (approx. 275 nm), and after 6-12 minutes the strong effects were observed in visible violet (365-390 nm). A close relation was shown between the potential of redox electrode inserted in apple flesh ($E_0 = 420-580$ mV) and kinetic measurements after 3-4 min in bands of 260 nm and 275 nm, and of the saturation potential on redox electrode ($E_f = 510-650$ mV) in visible violet. A model of browning of mechanically bruised fresh apple tissue was proposed. The first stage is a reaction controlled by excess content of the PPO enzyme in the flesh, and the second is non-enzymatic oxidation of polyphenols, coupled e.g. with chlorogenic acid, dependent on oxygen from the intercellular spaces. For the practical estimation

of changes in freshness and over-ripening of apples in storage, the scheme of browning was simplified and a first-order kinetics model was applied relative to melanin pigments absorbing in the band of 440 nm. The model includes the effect of varied ripeness of the fruits and of the period of storage.

Different periods of storage and various levels of fruit ripeness (within consumption ripeness) had a bearing on the activity of biological mechanisms and on the response of fruits to bruising. What remained constant was the half-life of browning ($t_{1/2} = 5\text{--}45$ min), characteristic for cultivars, which increased only in the case of apple flesh slicing under water. The biological activity of substrates decreased in over-ripening apples, described as a decrease in the browning rate of the wedges sliced in air ($v = 0.003\text{--}0.035$ Abs $\cdot$ min $^{-1}$, $s = 0.002\text{--}0.017$ Abs $\cdot$ min $^{-1}$) and also of wedges sliced under water ($v = 0.001\text{--}0.02$ Abs $\cdot$ min $^{-1}$). The flesh of over-ripening apples was characterized by higher diffuse absorbance, determined in freshly sliced apple flesh ($A_0 = 0.2\text{--}0.5$ Abs, $s = 0.01\text{--}0.3$ Abs), and by lower increase in diffuse absorbance ($A_f = 0.05\text{--}0.35$ Abs, $s = 0.03\text{--}0.1$ Abs) till reaching the final equilibrium of browning.

It was observed that in fresh tissue browning developed in the direction of recreating protective barriers against organic radicals and oxygen. Another characteristic feature of fresh apple flesh is reduced browning rate by half, after slicing under water and rinsing of cell contents. Browning continues and there is only a slight decrease in the cultivar-characteristic value of flesh absorbance attained at sill browning $-A_0 + A_f$. This does not change the kinetic constant of enzymatic browning of apple flesh ($K_M = 0.23$ Abs under normal environmental conditions). Likewise, reduced temperature of apple flesh and surface-effect PPO inhibitors cause only a reduction in the browning rate and extend the colour stability of sliced wedges (colour stability $t_{0.08} = 2\text{--}80$ min, defined as time of absorbance increase to 0.08 Abs under normal conditions, when sliced in air).

The studies show that apple flesh browning can be treated as a varietal feature. Analysis indicates that estimation of apple freshness is related with over-ripening and as well as with enzymatic activity of phenolics in the tissue, with repair mechanisms in apple flesh, and with authentic nutritional value of apples. Physical measures of biological activity of tissue as a response to bruising due to slicing or puncture can be used as freshness indices of apples and of sliced apples.

Keywords: freshness identification; polyphenols, fruit quality; reflectance spectrophotometry; redox electrode

Adres autora:

Adam Paweł Kuczyński
Instytut Agrofizyki
im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin
tel. 081-7445061
e-mail: akucyski@demeter.ipan.lublin.pl

