

MONIKA ADAMCZYK, EWA REMBIAŁKOWSKA

## PORÓWNANIE WYBRANYCH WYRÓŻNIKÓW JAKOŚCIOWYCH JABŁEK Z PRODUKCJI EKOLOGICZNEJ I KONWENCJONALNEJ

### Streszczenie

W pracy dokonano oceny wybranych cech wartości odżywczej i jakości sensorycznej jabłek odmian Lobo i Cortland, pochodzących z certyfikowanego sadu ekologicznego i sadu konwencjonalnego. Pod względem wartości odżywczej w jabłkach oznaczano zawartość: suchej masy, cukrów ogółem, cukrów redukujących, kwasów organicznych, witaminy C, flawonoli i antocyjanów.

Wykazano, że badane odmiany jabłek ekologicznych zawierały istotnie więcej suchej masy, cukrów ogółem, kwasów organicznych, witaminy C, flawonoli i antocyjanów w porównaniu z owocami z uprawy konwencjonalnej. Jabłka konwencjonalne wyróżniały się natomiast większą zawartością cukrów redukujących i wyższym stosunkiem zawartości cukrów do kwasów.

Jakość sensoryczną jabłek oceniono metodą ilościowej analizy opisowej (QDA) oraz w kategoriach jakości konsumenckiej (ocena preferencji). W przypadku większości wyróżników sensorycznych stwierdzono brak istotnych różnic między owocami z obu systemów produkcji. Jedynie wyżej oceniono smak kwaśny i cierpki (w ocenie metodą profilowania) jabłek ekologicznych, natomiast smak słodki owoców z uprawy konwencjonalnej.

**Słowa kluczowe:** jabłka, wartość odżywcza, jakość sensoryczna, uprawa ekologiczna

### Wprowadzenie

Znaczenie i popularność jabłek jest uwarunkowana wartością odżywczą, jak też dostępnością owoców w sprzedaży przez cały rok. Obecnie zwraca się dużą uwagę na ich walory zdrowotne. Jest to związane z zawartością tzw. bioaktywnych substancji o charakterze przeciwutleniającym. Do najważniejszych zalicza się: kwas L-askorbinowy i polifenole, w tym flawonole i antocyjany. Wyżej wymienione związki chronią organizm człowieka przed chorobami układu krwionośnego, serca oraz nowotworami. Mimo, że jabłka zawierają niewiele związków biologicznie aktywnych, to stanowią ważne ich źródło z uwagi na to, że udział jabłek w całkowitym spożyciu owoców, jak podaje GUS, wynosi ok. 50%.

---

*Mgr inż. M. Adamczyk, dr hab. E. Rembiałkowska, Katedra Żywności Funkcjonalnej i Towaroznawstwa,  
Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa*

Swój specyficzny smak jabłka zawdzięczają nie tylko zawartości cukrów, ale również kwasów organicznych, a przede wszystkim stosunkowi zawartości cukrów do kwasów [9]. Dodatkowo flawonoidy determinują barwę owoców.

Ekologiczne metody uprawy są określane jako przyjazne dla środowiska. Żywność pochodząca z gospodarstw ekologicznych cechuje się znacznie korzystniejszymi walorami zdrowotnymi niż żywność konwencjonalna. Według niektórych autorów żywność ta jest bardziej wartościowa, ponieważ może przyczyniać się do promocji zdrowia konsumenta [4]. Przede wszystkim zawiera mniej azotanów(V) i azotanów(III) oraz pozostałości pestycydów, natomiast więcej witaminy C i innych witamin, cukrów ogółem, wartościowego białka oraz składników mineralnych [16]. W ostatnich kilku latach wzrósł popyt na żywność ekologiczną, jako pochodzącą z kontrolowanej i bezpiecznej produkcji. Dlatego też istnieje większe zapotrzebowanie na badania naukowe w zakresie jakości surowców z rolnictwa ekologicznego.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu sposobu uprawy i odmiany jabłek na wybrane cechy wartości odżywczej i jakości sensorycznej.

### Material i metody badań

Doświadczenie wykonano w Zakładzie Żywności Ekologicznej SGGW. Materiałem badawczym były jabłka odmian Lobo i Cortland. Pochodziły one z certyfikowanego sadu ekologicznego i położonego w tej samej okolicy sadu konwencjonalnego. Sady zlokalizowane były w województwie łódzkim. Opis zabiegów agrotechnicznych w sadach przedstawiono w tab. 1. Analizy przeprowadzono na materiale w stadium dojrzałości konsumpcyjnej.

Tabela 1

Opis zabiegów agrotechnicznych w sadach.

Description of the agro-technological measures applied in orchards.

Sad Orchard	Nawożenie Fertilisation	Ochrona sadu Orchard Protection	Wydajność Productivity of orchard
Ekologiczny Organic	Wprowadzono pod drzewa obornik w ilości 15 t/ha sadu. Średnio w jednym roku dostarczono do gleby 3,2 kg N/ha, 1,5 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /ha, 4 kg K <sub>2</sub> O/ ha, 1 kg MgO/ha i 3,6 kg CaO/ha.	Zastosowanie wywaru ze skrzypu polnego i wyciągu z pokrzywy.	5,25 ton/ha
Konwencjonalny Conventional	Zastosowano nawozy mineralne: Calcinit i mocznik. Średnio w jednym roku wprowadzono do gleby 100 kg N/ha i 158 kg CaO/ha.	Stosowano opryski pestycydami: Miedzian, Chorus, Score, Delan, Shavit, Folicur, Punch BIS, Captan, Euparen, Diazol 500 EW, Owadofos 540 EC, Piryamol 500 EW, Mitac 200 EC, Folar, Roundup i Dicoherb.	50 ton/ha

Ocena sensoryczna jabłek składała się z dwóch części: oceny konsumenckiej i profilowania sensorycznego. W badaniach konsumenckich zastosowano metodę parzystą w celu określenia preferencji barwy skórki i wyglądu zewnętrznego [15]. Próbkę jednostkową stanowiło 8 owoców reprezentatywnych dla danej partii jabłek. W ocenie brało udział 50 konsumentów. W drugiej części badań, ocenę sensoryczną przeprowadzono z zastosowaniem metody ilościowej analizy opisowej QDA (Quantitative Descriptive Analysis) wg Stone'a i Sidela [17], stosując procedurę analityczną opisaną w normach ISO [8, 15]. Lista terminów opisujących wyróżniki sensoryczne jabłek oraz określenia brzegowe załączone są w tab. 2.

Tabela 2

Wyróżniki jakości sensorycznej jabłek oraz odpowiadające im definicje i określenia brzegowe.  
Characteristic parameters of the sensory quality of apples, and their corresponding definitions & anchoring qualifications.

Wyróżniki Characteristics	Definicje Definitions	Określenia brzegowe Anchoring qualifications
Zapach kwaśny Acidic odour	Zapach niedojrzałego jabłka lub śliwki	niewyczuwalny b. intensywny
Zapach aromatyczny słodko-nektarowy Aromatic sweet-nectar odour	Łagodny zapach typu jabłkowego i nektarowego	niewyczuwalny b. intensywny
Zapach innych owoców Odour of another fruit	Słodki zapach typu owocowego, (np.: gruszkowy, brzoskwiniowy, morelowy)	niewyczuwalny b. intensywny
Zapach trawiasty Grassy odour	Zapach charakterystyczny dla świeżo ściętej trawy lub świeżo zerwanej kory z drzewa	niewyczuwalny b. intensywny
Twardość Firmness	Opór jaki stawia próbka przy rozgryzaniu	miękki twardy, zbity
Soczystość Juiciness	Stopień soczystości próbki	suche, mączyste b. soczyste
Smak słodki Sweet taste	Podstawowa jakość smaku, nie wymaga definiowania	niewyczuwalny b. intensywny
Smak kwaśny Sour taste	Podstawowa jakość smaku, nie wymaga definiowania	niewyczuwalny b. intensywny
Smak cierpki Tart taste	Wrażenie ściągające, odczuwalne szczególnie na krawędziach języka	niewyczuwalny b. intensywny
Smak aromatyczno-jabłkowy Aromatic apple taste	Smak charakterystyczny dla świeżego, w pełni dojrzałego, aromatycznego jabłka, np.: typu Koksasa	pusty, wodnisty pełny, aromatyczny
Jakość ogólna General quality	Ogólne wrażenie sensoryczne dobrego zharmonizowania wszystkich wyróżników smakowo-zapachowych	zła bardzo dobra

Ocenę wykonano w Laboratorium Analiz Sensorycznych Wydziału Nauk o Żywności Człowieka i Konsumpcji z zastosowaniem skomputeryzowanego systemu wspomagania analiz sensorycznych ANALSENS NT. Próbkę do badań sensorycznych stanowiły owoce uprzednio wyselekcjonowane pod względem wybarwienia i wielkości owoców. Jako próbkę jednostkową pobierano z dwóch jabłek po 1/8 części.

Reprezentatywne próby jabłek (po 15 owoców) poddano analizom chemicznym. Oznaczano zawartość: suchej masy metodą wagową wg PN-90/A-75101/03 [11], witaminy C wg PN-90/A-75101/11 [14], flawonoli metodą Christa-Müllera [18], antocyjanów metodą Fuleki i Francis [7], cukrów bezpośrednio redukujących oraz cukrów ogółem wg PN-90/A-75101/07 [13]. Oznaczano także kwasowość ogólną metodą potencjometryczną wg PN-90/A75101/04 [12]. Dodatkowo dokonywano pomiaru masy owoców.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Startgraphics 4.1., stosując dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z uwzględnieniem sposobu uprawy i odmiany ( $\alpha = 0,05$ ). Korzystano także z tablic statystycznych do metody parzystej według normy [15].

## Wyniki i dyskusja

Wyniki zawartości wybranych cech wartości odżywczej jabłek przedstawiono w tab. 3. Otrzymane wyniki wskazują, że jabłka z uprawy ekologicznej wykazały istotnie więcej suchej masy (15,13%) w stosunku do owoców konwencjonalnych (13,95%). Wśród badanych odmian wyższą zawartością suchej masy charakteryzowały się jabłka odmiany Cortland.

Istotnie większą zawartość cukrów ogółem i kwasów organicznych oznaczono w jabłkach ekologicznych, odpowiednio  $10,43 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  i  $0,47 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Można zauważyć, że większą zawartością cukrów ogółem charakteryzowała się odmiana Lobo, natomiast druga odmiana zawierała więcej kwasów organicznych. W przypadku związków o właściwościach przeciwutleniających można stwierdzić, że zawartość witaminy C, flawonoli i antocyjanów była większa odpowiednio o 22, 14 i 27% w owocach z sadów ekologicznych w porównaniu z jabłkami konwencjonalnymi. Większą zawartością witaminy C odznaczały się jabłka odmiany Cortland, z kolei flawonoli i antocyjanów było więcej w owocach Lobo.

Jabłka uprawiane metodami konwencjonalnymi zawierały istotnie więcej cukrów redukujących ( $7,36 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) i wykazały wyższą wartość stosunku zawartości cukrów ogółem do kwasów organicznych (26,27). Wśród badanych odmian jabłek, Cortland charakteryzowała się większą zawartością cukrów redukujących i mniejszym stosunkiem cukrów do kwasów, druga odmiana wykazała odwrotne zależności.

Tabela 3

Zawartość wybranych wyróżników jakości jabłek w zależności od sposobu uprawy i odmiany.  
Contents of some selected nutritive values of apples in relation to the production system and apple cultivar.

Odmiana Cultivar	Sucha masa / Dry matter [g·100 g <sup>-1</sup> ]		NIR <sub>0,05</sub> / odmiany / NIR <sub>0,05</sub> / of the cultivar (B)	Witamina C / Vitamin C [mg·100 g <sup>-1</sup> s.m.]		NIR <sub>0,05</sub> / odmiany / NIR <sub>0,05</sub> / of cultivar (B)
	Ekologiczne Organic $\bar{x} \pm SD$	Konwenc. Conventional $\bar{x} \pm SD$		Ekologiczne Organic $\bar{x} \pm SD$	Konwenc. Conventional $\bar{x} \pm SD$	
Lobo	14,84±0,091	13,76±0,074	14,30	5,99±0,237	3,64±0,249	4,82
Cortland	15,43±0,108	14,15±0,045	14,79	6,98±0,143	6,50±0,161	6,74
$\bar{x}$	15,13	13,95		6,49	5,07	0,456
	NIR <sub>0,05</sub> / uprawy / NIR <sub>0,05</sub> / of the cultivation system (A) 0,082					
	NIR <sub>0,05</sub> / interakcji/ NIR <sub>0,05</sub> / of the interaction A x B 0,070					
	Flawonole / Flavonols [mg·100g <sup>-1</sup> s.m.]					
Lobo	8,086±0,145	7,32±0,150	7,70	1,70±0,030	1,20±0,023	1,45
Cortland	6,73±0,128	5,48±0,123	6,10	1,35±0,028	1,01±0,018	1,18
$\bar{x}$	7,41	6,39		1,523	1,11	0,042
	NIR <sub>0,05</sub> / uprawy / NIR <sub>0,05</sub> / of the cultivation system (A) 0,158					
	NIR <sub>0,05</sub> / interakcji/ NIR <sub>0,05</sub> / of the interaction A x B 0,117					
	Cukry ogółem / Total sugars [g·100g <sup>-1</sup> s.m.]					
Lobo	10,68±0,188	10,58±0,216	10,63	6,30±0,112	6,56±0,140	6,43
Cortland	10,18±0,165	9,88±0,099	10,03	8,04±0,151	8,15±0,160	8,09
$\bar{x}$	10,43	10,22		7,17	7,36	N.I.
	NIR <sub>0,05</sub> / uprawy / NIR <sub>0,05</sub> / of the cultivation system (A) 0,150					
	NIR <sub>0,05</sub> / interakcji/ NIR <sub>0,05</sub> / of the interaction A x B 0,146					
	Kwasy organiczne / Organic acids [g·100g <sup>-1</sup> s.m.]					
Lobo	0,46±0,013	0,38±0,008	0,42	23,06 0,282	27,85±0,027	25,46
Cortland	0,48±0,009	0,40±0,009	0,44	21,20±0,072	24,70±0,342	22,94
$\bar{x}$	0,47	0,39		22,13	26,27	0,345
	NIR <sub>0,05</sub> / uprawy / NIR <sub>0,05</sub> / of the cultivation system (A) 0,008					
	NIR <sub>0,05</sub> / interakcji/ NIR <sub>0,05</sub> / of the interaction A x B 0,009					
	NIR <sub>0,05</sub> / A x B 0,172					
	Antocyjany / Anthocyanins [mg·100g <sup>-1</sup> s.m.]					
	NIR <sub>0,05</sub> / A x B 0,120					
	Cukry redukujące / Reducing sugars [g·100g <sup>-1</sup> s.m.]					
	NIR <sub>0,05</sub> / A x B 0,022					
	Stosunek cukry ogółem / kwasy organiczne / Total sugars to organic acids ratio					
	NIR <sub>0,05</sub> / A x B 0,192					

Objaśnienia / Explanatory notes:

ś. m. – świeża masa / fresh matter;  $\bar{x}$  – wartość średnia / mean value;

SD – odchylenie standardowe / standard deviation; N.I. – różnice statystycznie nieistotne / no statistically significant differences

W literaturze podawane są zbliżone wartości do otrzymanych w niniejszej pracy. Z badań DeElla i Prange'a [6] wynika, że zawartość suchej masy była większa w jabłkach z produkcji ekologicznej w porównaniu z owocami konwencjonalnymi, odnośnie witaminy C podobne wyniki otrzymali Pither i Hall [10] oraz Bloksma i wsp. [2]. Ponadto w pracy Bloksmy i wsp. [2] nie stwierdzono istotnych różnic zawartości suchej masy i związków fenolowych pomiędzy jabłkami pochodzącymi z drzew nawożonych kompostem a owocami z drzew nawożonych mineralnie. Natomiast brak istotnych różnic w zawartości witaminy C w jabłkach ekologicznych między analizowanymi sposobami produkcji oraz istotnie większą zawartość związków fenolowych, w tym głównie flawonoidów, stwierdzili Weibel i wsp. [19]. W dostępnej literaturze brak było badań dotyczących zawartości antocyjanów w jabłkach ekologicznych. Wyniki badań dotyczące węglowodanów były zróżnicowane. Badacze DeEll i Prange [5] oraz Andrews i wsp. [1] oznaczyli większą zawartość cukrów ogółem w jabłkach z produkcji ekologicznej, z kolei w innych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic między jabłkami z obydwu metod uprawy [19, 20]. W przeciwieństwie do prezentowanych wyników, dane literaturowe wskazują, że nie ma istotnych różnic pod względem zawartości kwasów organicznych w owocach z obu sposobów uprawy [2, 19, 20].

Jabłka ekologiczne odznaczały się istotnie mniejszą masą owoców w porównaniu z jabłkami konwencjonalnymi. Odmiana Cortland charakteryzowała się większą masą owoców w stosunku do drugiej badanej odmiany (tab. 4).

Tabela 4

Masa jabłek w zależności od sposobu uprawy i odmiany.

Weight of apples in relation to the production system and cultivar.

Odmiana Cultivar	Masa owoców / Weight of apples [g]			NIR <sub>/0,05/</sub> odmiany NIR of cultivar (B)
	Ekologiczne / Organic $\bar{x} \pm SD$	Konwenc. / Conventional $\bar{x} \pm SD$	$\bar{x}$	
Lobo	158,1 ± 46,41	185,7 ± 32,48	171,9	18,54
Cortland	188,3 ± 40,96	212,2 ± 40,32	200,2	
$\bar{x}$	173,2	198,9		
NIR <sub>/0,05/</sub> uprawy / NIR <sub>/0,05/</sub> of the cultivation system (A) 18,54				
NIR <sub>/0,05/</sub> interakcji / NIR <sub>/0,05/</sub> of the interaction A x B N.I.				

Objaśnienia jak w tab. 3 / Explanatory notes as in Tab. 3

Wyniki badań konsumenckich wyglądu zewnętrznego i barwy skórki jabłek przedstawiono w tab. 5. W ocenie preferencji stwierdzono, że odmiana Lobo z uprawy ekologicznej odznaczała się istotnie lepszą barwą skórki i gorszą oceną wyglądu zewnętrznego w stosunku do owoców konwencjonalnych. Natomiast w przypadku odmiany Cortland odnotowano brak istotnych różnic w preferencji między próbkami jabłek z obu typów uprawy.

Tabela 5

Wyniki oceny preferencji jabłek przeprowadzonej metodą parzystą.

Assessment results of the preference apples; the assessment was conducted using a paired comparison test.

Odmiana Cultivar	Wygląd zewnętrzny / External appearance			Barwa skórki / Peel colour		
	Liczba ocen / Number of assessment results		Opracowanie statystyczne Statistically elaborated results	Liczba ocen / Number of assessment results		Opracowanie stat- ystyczne Statistically elabo- rated results
	Ekol. Organic	Konw. Conventional		Ekol. Organic	Konw. Conventional	
Lobo	8	42	Różnice istotne statystycznie Sta- tistically significant differ- ences ( $\alpha \leq 0,01$ )	32	18	Różnice istotne statystycznie Statistically signifi- cant difference ( $\alpha \leq 0,01$ )
Cortland	19	31	N.I.	19	31	N.I.

N.I. – różnice statystycznie nieistotne / no statistically significant differences

Konsumenci przy uzasadnieniu swojego wyboru wskazywali, że owoce ekologiczne odmiany Lobo w stosunku do konwencjonalnych odznaczały się wadami skórki (parch jabłoni) oraz zbyt dużym zróżnicowaniem wielkości. Konsumenci preferowali bardziej barwę ekologicznej odmiany Lobo z powodu intensywniejszego rumieńca.

Wyniki oceny sensorycznej przeprowadzonej metodą profilowania przedstawiono w tab. 6. Po przeprowadzeniu analizy statystycznej można stwierdzić, że jedynie intensywność smaku kwaśnego i cierpkiego była wyższa w jabłkach ekologicznych w porównaniu z konwencjonalnymi.

Smak słodki jabłkach konwencjonalnych został istotnie wyżej oceniony. Wyższa ocena smaku kwaśnego i niższa smaku słodkiego owoców z uprawy ekologicznej ma swoje odzwierciedlenie w wynikach badań analitycznych, czyli w niższym stosunku zawartości cukrów ogółem do kwasów organicznych. W przypadku pozostałych cech sensorycznych wykazano brak istotnych różnic między próbkami owoców z różnych sposobów produkcji.

W analizie sensorycznej odnotowano istotny wpływ odmiany jabłek na cechy sensoryczne, takie jak: twardość, soczystość, smak aromatyczno-jabłkowy i jakość ogólną. Owoce odmiany Cortland oceniono wyżej pod względem intensywności wyżej wymienionych cech sensorycznych. W pracy Weibela i wsp. [19] stwierdzono w ocenie przeprowadzonej metodą profilowania, że jabłka z produkcji ekologicznej były wyżej ocenione pod względem aromatu i jakości ogólnej. W innych badaniach [5] wykazano, że odmiany jabłek McIntosh i Cortland z sadów ekologicznych i konwencjonalnych nie różnią się pod względem soczystości, słodkości, kwasowości i wyczuwalności obcych zapachów. Różnice odnotowano jedynie w ocenie jędrności odmiany McIntosh na korzyść owoców z uprawy ekologicznej. Według Bordeleau'a i wsp. [3]

Tabela 6

Wyniki oceny intensywności cech sensorycznych jabłek przeprowadzonej metodą profilowania.  
Results of the sensory assessment of apples; the assessment was conducted using a profile method.

Wyróżniki Characteristics	Odmiana / Cultivar						NIR <sub>0,05/</sub> interakcji NIR <sub>0,05/</sub> of the interaction A x B	
	Lobo		Cortland		Ekol. Organic $\bar{x}$	Konw. Conventional $\bar{x}$		NIR <sub>0,05/</sub> uprawy NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivation system(A)
	Ekol. Organic $\bar{x} \pm SD$	Konw. Conventional $\bar{x} \pm SD$	Ekol. Organic $\bar{x} \pm SD$	Konw. Conventional $\bar{x} \pm SD$				
Zapach kwaśny $\bar{x}$	2,41±2,040	1,90±1,279	2,92±2,048	2,48±1,836	2,66	2,19	N.I.	
	2,15		2,69					
	NIR <sub>0,05/</sub> odmiany / NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivar (B) N.I.							
Zapach słodko-nektar. $\bar{x}$	3,11±2,317	3,52±2,184	3,61±2,021	4,31±2,613	3,36	3,92	N.I.	
	3,31		3,95					
	NIR <sub>0,05/</sub> odmiany / NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivar (B) N.I.							
Zapach innych owoców $\bar{x}$	1,29±1,817	1,30±1,247	1,56±1,422	1,20±0,912	1,42	1,25	N.I.	
	1,29		1,38					
	NIR <sub>0,05/</sub> odmiany / NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivar (B) N.I.							
Zapach trawiasty $\bar{x}$	1,56±1,747	1,78±2,057	1,75±1,911	1,69±2,056	1,66	1,73	N.I.	
	1,67		1,72					
	NIR <sub>0,05/</sub> odmiany / NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivar (B) N.I.							
Twardość $\bar{x}$	1,98±1,920	2,40±1,657	4,11±1,563	3,25±1,587	3,04	2,83	N.I.	
	2,19		3,68					
	NIR <sub>0,05/</sub> odmiany / NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivar (B) 0,725							
Soczystość $\bar{x}$	2,79±2,082	2,90±1,521	4,85±1,464	3,90±1,372	3,82	3,40	N.I.	
	2,85		4,38					
	NIR <sub>0,05/</sub> odmiany / NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivar (B) 0,698							



Smak słodki	$\bar{x}$	3,00±1,976	3,84±1,446	3,68±1,691	4,46±1,464	3,34	4,15	0,699	N.I.
		3,42		4,07					
Smak kwaśny		NIR <sub>0,05/</sub> odmiany /cultivar (B) N.I.							
	$\bar{x}$	3,97±2,569	2,40±1,739	4,56±1,672	3,30±1,735	4,26	2,85	0,828	N.I.
	3,18		3,93						
Smak cierpki		NIR <sub>0,05/</sub> odmiany / NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivar (B) N.I.							
	$\bar{x}$	1,81±2,224	0,49±0,514	1,84±1,510	0,93±0,786	1,82	0,71	0,602	N.I.
	1,15		1,38						
Smak aromat.- jabłk.		NIR <sub>0,05/</sub> odmiany / NIR <sub>0,05/</sub> of the cultivar (B) N.I.							
	$\bar{x}$	3,13±2,369	2,84±2,058	4,60±2,080	4,15±2,039	3,87	3,49	N.I.	N.I.
	2,98		4,38						
Jakość ogólna		NIR <sub>0,05/</sub> odmiany /of the cultivar (B) 0,902							
	$\bar{x}$	4,11±1,498	4,01±1,494	5,17±1,959	5,03±0,908	4,64	4,52	N.I.	N.I.
	5,06		5,10						
		NIR <sub>0,05/</sub> odmiany /of the cultivar (B) 0,637							

Objasnienia jak w tab. 3 / Explanatory notes as in Tab. 3;

Objasnienia cech sensorycznych jak w tab. 2 / Explanatory notes referring to the sensory attributes as in Tab. 2

oraz Bloksmy i wsp. [2], silniejszym wybarwieniem odznaczały się jabłka uprawiane metodami ekologicznymi w stosunku do owoców konwencjonalnych. Tak więc część cytowanych powyżej wyników badań została potwierdzona w niniejszej pracy.

### **Wnioski**

1. Metoda uprawy wpłynęła w istotny sposób na zawartość wybranych składników jabłek. Owoce pochodzące z produkcji ekologicznej zawierały istotnie więcej suchej masy, witaminy C, flawonoli, antocyjanów, cukrów ogółem i kwasów organicznych. Związków biologicznie czynnych było o około 20% więcej w tych jabłkach. Świadczy to o wyższej wartości odżywczej jabłek ekologicznych w porównaniu z owocami konwencjonalnymi.
2. Zawartość cukrów redukujących i wartość stosunku zawartości cukrów ogółem do kwasów organicznych były wyższe w jabłkach konwencjonalnych w stosunku do owoców ekologicznych.
3. Wśród badanych odmian większą zawartością suchej masy, witaminy C, cukrów redukujących i kwasów organicznych odznaczały się jabłka odmiany Cortland, z kolei druga odmiana Lobo charakteryzowała się większą zawartością flawonoli, antocyjanów, cukrów ogółem oraz wyższym stosunkiem cukrów ogółem do kwasów organicznych.
4. Odmiana jabłek i sposób uprawy miały istotny wpływ na masę owoców.
5. Wyniki oceny konsumenckiej były rozbieżne. Ekologiczne jabłka odmiany Lobo były bardziej preferowane pod względem barwy skórki, a mniej pod względem wyglądu zewnętrznego. W przypadku odmiany Cortland nie wykazano różnic statystycznie istotnych między sposobami uprawy.
6. Jabłka pochodzące z uprawy ekologicznej odznaczały się bardziej intensywnym smakiem kwaśnym i cierpkim, z kolei owoce konwencjonalne charakteryzowały się istotnie wyższą intensywnością smaku słodkiego. Na pozostałe wyróżniki sensoryczne sposób uprawy nie miał istotnego wpływu.
7. Odmiana jabłek miała wpływ na niektóre cechy sensoryczne. Wyższą ocenę intensywności takich cech, jak: twardość, soczystość, smak aromatyczno-jabłkowy i jakość ogólna otrzymała odmiana Cortland.

### **Literatura**

- [1] Andrews P. K., Fellman K. J., Glover J., D., Reganold J., P.: Soil and plant mineral nutrition and fruit quality under organic, conventional and integrated apple production systems in Washington State, USA. *Acta Horticulturea*, 2001, **564**, 291-298.
- [2] Bloksma J., Northolt M., Huber M., Jansonius P., Zanen M.: Parameters for apple quality-2 and the development of the 'inner quality concept'. Ed. Louis Bolk Instituut. Driebergen 2004.

- [3] Bordeleau G., Midak M., Myers-Smith I., Szeremeta A.: Food Quality: A comparison of organic and conventional fruits and vegetables. Course Project – Den Kong. Veter. og Landbohøjskole. Denmark 2002.
- [4] Bylica T.: Walory żywności ekologicznej. Żywność ekologiczna, kontrolowana jako narzędzie profilaktyki zdrowotnej. Polski Klub Ekologiczny, Koło Miejskie w Gliwicach, kwiecień, Gliwice 1997, s. 25-27.
- [5] DeEll J.R., Prange R., K.: Postharvest quality and sensory attributes of organically and conventionally grown apples. Hort Science, 1992, **27**, 1096-1099.
- [6] DeEll J., Prange R.: Postharvest physiological disorders, diseases and mineral concentrations of organically and conventionally grown McIntosh and Cortland apples. Canad. J. Plant Sci., 1993, **73**, 223-230.
- [7] Fuleki Fleki., Francis F.J.: Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. J. Food Sci., 1968, **33**, 72-77.
- [8] ISO 13299: 2003. Sensory analysis – Methodology – General guidance for establishing a sensory profile.
- [9] Pieniżek S. A. (red.): Sadownictwo. Wyd. PWRiL. Warszawa 2000.
- [10] Pither R., Hall M. N.: Analytical survey of the nutritional composition of organically grown fruit and vegetables. Technical Memorandum. Campden Food and Drink Research Association, 1990, p. 597.
- [11] PN-90/A-75101/03. Oznaczenie zawartości suchej masy metodą wagową. Przetwory owocowe i warzywne.
- [12] PN-90/A75101/04. Oznaczenie kwasowości ogólnej. Przetwory owocowe i warzyw.
- [13] PN-90/A-75101/07. Oznaczenie zawartości cukrów i ekstraktu bezcukrowego. Przetwory owoc. i warzyw.
- [14] PN-90/A75101/11. Oznaczanie zawartości witaminy C. Przetwory owocowe i warzywne.
- [15] PN-ISO 6658: 1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Wytyczne ogólne.
- [16] Rembalkowska E.: Jakość żywności pochodzącej z gospodarstw organicznych. W: Jakość żywności a rolnictwo ekologiczne. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2002, s. 19-30.
- [17] Stone H., Sidel J. L.: Sensory evaluation practices. Wyd. Academic Press. Orlando 1985.
- [18] Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Walewska E.: Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych. Wyd. PZWL. Warszawa 1970.
- [19] Weibel F.P., Bickel R., Leuthold S., Alföldi T.: Are organically grown apple tastier and healthier? A comparative field study using conventional and alternative methods to measure fruit quality. Acta Horticulturae, 2000, **517**, 417-426.
- [20] Woese K., Lange D., Boess Ch., Bögl K. W.: A comparison of organically and conventionally grown foods – results of a review of the relevant literature. J. Sci. Food Agric., 1997, **74**, 281-293.

#### **THE COMPARATIVE ASSESSMENT OF SOME SELECTED QUALITY CHARACTERISTICS OF APPLES FROM THE ORGANIC AND CONVENTIONAL PRODUCTION**

##### **S u m m a r y**

In the paper, some selected nutritive and sensory attributes of the two apple cultivars: 'Lobo' and 'Cortland' produced in a certified organic orchard and in a conventional orchard were assessed. For the purpose of assessing a nutritive value of the apples analyzed, the following component contents were determined: dry matter, total sugars, reducing sugars, organic acids, vitamin C, flavonols, and anthocyanins. The results obtained proved that the contents of dry matter, total sugars, vitamin C, flavonols, antho-

cyanins, and organic acids were significantly higher in organic apples compared with apples produced conventionally. The conventionally produced apples were characterized by a higher content of reducing sugars, and by a higher ratio of total sugars to organic acids.

The sensory attribute of the apples assessed was estimated using a Quantitative Descriptive Analysis (QDA), and, additionally, as a consumers' quality (preferences assessment). For the majority of the sensory attributes, no significant differences between apples from the two production systems were determined. With regard to tastes (assessed using a profile method), the organic apples had a better acidity and tart taste whereas the conventionally produced apples had a better sweet taste.

**Key words:** apples, nutritive value, sensory attribute, organic production ✕

ŁUKASZ BOBAK, TERESA SKIBA, WIESŁAW KOPEĆ

## ZASTOSOWANIE TECHNIK MEMBRANOWYCH DO POZYSKIWANIA NISKOCZĄSTECZKOWYCH PROTEIN BIAŁKA JAJA KURZEGO

### Streszczenie

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania membranowych technik filtracyjnych do częściowego rozdzielenia niskocząsteczkowych protein białka jaja kurzego. Proteiny te wykazują aktywność biologiczną lizozymu – enzymu muramidazy o masie cząsteczkowej  $143 \cdot 10^2$  Da oraz inhibitora proteinaz cysteinowych – cystatyny o masie cząsteczkowej  $126 \cdot 10^2$  Da. Proces mikrofiltracji natywnego białka jaja oraz jego roztworów, sporządzonych z udziałem 0,15 M NaCl (w stosunku 1:1 i 1:4), przeprowadzono techniką cross-flow, przy użyciu filtra rurkowego wykonanego z polipropylenu o nominalnym rozmiarze porów 0,2–0,6  $\mu\text{m}$ . W uzyskanych filtratach oznaczono aktywność lizozymu i cystatyny (jako zdolność do inhibowania proteinazy cysteinowej – papainy) i ustalono, że odzyskano od 60 do 80% aktywnych substancji niskocząsteczkowych. Zasadnicze znaczenie dla efektywności procesu miało zjawisko tworzenia warstwy białkowej na membranie (polaryzacja stężeniowa – fouling), powodujące spadek szybkości filtracji. Jednak warstwa ta przyczyniała się do poprawy wzbogacenia permeatów w niskocząsteczkowe substancje aktywne. Po przefiltrowaniu ponad 20–30% objętości przetwarzanego białka jaja uzyskano znaczący przyrost aktywności cystatyny względem roztworu wyjściowego.

**Słowa kluczowe:** filtracja membranowa, lizozym, cystatyna

### Wprowadzenie

W procesach membranowych, stosowanych do rozdzielenia biopolimerów na podstawie różnic ich mas cząsteczkowych, najczęściej wykorzystywane są techniki mikrofiltracji (MF) i ultrafiltracji (UF). W procesach ultrafiltracji stosuje się membrany o przepuszczalności cząstek do 100 nm i ciśnienia do 1 MPa, natomiast w procesie mikrofiltracji membrany o wyższej przepuszczalności i niższe ciśnienia [6].

Techniki membranowe są wykorzystywane w przetwórstwie jajczarskim do usunięcia wody z białka jaja przed procesem suszenia, co jest dwukrotnie tańsze niż jej

odparowanie w wieżach suszarniczych [8]. Podjęto także próby zastosowania membran w procesach frakcjonowania białka jaja [1]. Zastosowanie membran do separacji protein niskocząsteczkowych białka jaja było przedmiotem szeregu badań skupiających się głównie na izolacji lizozymu – enzymu o aktywności muramidazy, ale również cystatyny – inhibitora proteinaz cysteinowych [1, 2, 3, 4].

Optymalizację procesu prowadzono głównie w zakresie: doboru przepuszczalności membran, tzw. punktu odcięcia molekularnego (cut off), warunków pH, siły jonowej, itp. W mniejszym stopniu analizowano warunki techniczne procesu, wyznaczające możliwość jego przebiegu w warunkach przemysłowych, szczególnie kwestię polaryzacji stężeniowej membran (fouling), decydującej o efektywności filtracji. Przyczyną foulingu jest tworzenie się, w bezpośrednim sąsiedztwie membrany, warstwy granicznej roztworu o wyższym stężeniu separowanych składników (białka) [6]. Zasadniczym efektem zjawiska foulingu jest spadek szybkości filtracji, aż do jej zaniku. Przeciwdziałać polaryzacji membran można poprzez: wprowadzenie dodatkowej ilości rozpuszczalnika do nadawy (roztworu zasilającego moduł filtracyjny), zastosowanie turbulentnego przepływu lub intensywnego mieszania nadawy [6].

W celu wydzielenia składnika niskocząsteczkowego z mieszaniny np. białek wykorzystuje się diafiltrację, polegającą na ciągłym uzupełnianiu retentatu rozpuszczalnikiem w miarę uzyskiwania filtratu (permeatu) wzbogaconego w izolowany składnik. Można również zwiększać stężenie określonego składnika w permeacie przez filtrację rozcieńczonej nadawy.

Filtracja białka jaja bez rozcieńczenia, w celu jego frakcjonowania i rozdzielenia białek, może być przeprowadzona z użyciem membran mikrofiltracyjnych, gdyż m.in. ze względu na dużą lepkość strukturalną białka membrany ultrafiltracyjne szybko ulegają polaryzacji.

W badaniach, w których zastosowano technikę mikrofiltracji, do rozdzielenia roztworów białka, rozcieńczonych w stosunku od 1:1 do 1:8, użyto membrany o porowatości od 0,2 do 0,6  $\mu\text{m}$ , odzyskując w permeacie od 20 do blisko 40% aktywnego lizozymu [1, 4]. Czystość preparatów była zależna od przepuszczalności membran. Zastosowanie membrany o punkcie odcięcia ok.  $300 \cdot 10^3 \text{ Da}$  znacząco (około 4–5 krotnie) zwiększyło aktywność właściwą lizozymu wyrażoną na jednostkę masy białka. Zastosowanie membran o jeszcze mniejszej przepuszczalności wydatnie zwiększa czystość preparatów, ale straty białka są duże. Użycie membrany mikrofiltracyjnej pozwala natomiast zdecydowanie zwiększyć ilość uzyskiwanych substancji biologicznych, przy małej czystości uzyskiwanych preparatów białka. Działanie to jest celowe wówczas, gdy preparaty, np. do celów farmaceutycznych, będą nadal oczyszczane innymi technikami.

Celem przeprowadzonych badań była próba zastosowania i optymalizacji warunków procesu mikrofiltracji do odzysku aktywnych biologicznie substancji niskoczą-

steczkowych białka jaja w formie preparatów o małym stopniu oczyszczenia. Założono prowadzenie procesu przy niskim stopniu rozcieńczenia białka jaja z ewentualnym zastosowaniem dodatkowej diafiltracji.

### Material i metody badań

Surowcem do badań było białko świeżych jaj kurzych od niosek rasy Tetra SL żywionych standardowo. Przed przeprowadzeniem właściwego procesu białko poddawano wstępnej filtracji przez lejek Schotta o średnicy otworów 1 mm w celu uzyskania homogennego materiału. Następnie białko nierozcieńczone lub rozcieńczone 0,15 M roztworem NaCl poddawano procesowi mikrofiltracji krzyżowej (cross-flow) niskociśnieniowej ( $50 \cdot 10^3$  Pa), z wykorzystaniem rurkowego polipropylenowego modułu filtracyjnego o nominalnej średnicy porów 0,2–0,6  $\mu\text{m}$  zintegrowanego z pompą perystaltyczną typu BIO FLOW 2000 Mk II™. Zastosowany typ pompy perystaltycznej wyposażonej w regulator natężenia przepływu i ciśnienia podawanej nadawy pozwolił na kontrolowanie parametrów procesu. Jednorazowo poddawano filtracji 1 dm<sup>3</sup> białka lub jego roztworów o pH = 8,8.

Podczas prowadzenia procesu monitorowano spadek ilości strumienia filtratu w czasie oraz zbierano frakcje stanowiące 10% objętości nadawy (surowca wyjściowego).

Dobór warunków procesu filtracji, szczególnie w zakresie stopnia rozcieńczenia białka jaja oraz przeprowadzenia procesu diafiltracji, opracowano w badaniach wstępnych. Założono, że proces prowadzony będzie bądź do ustania filtracji (strumień permeatu = 0) wynikającego z polaryzacji membran lub do odfiltrowania całej ilości danego roztworu NaCl. W związku z powyższym realizowano trzy niezależne warianty doświadczenia:

- Filtracja białka jaja (pH=8,8) do uzyskania 30% permeatu (w stosunku do wyjściowej ilości surowca) oraz diafiltracja po dodaniu 30% 0,15 M roztworu NaCl prowadzona do uzyskania 30% permeatu;
- Filtracja białka jaja rozcieńczonego 0,15 M roztworem NaCl w stosunku 1:1 do uzyskania 50% permeatu (w stosunku do wyjściowej ilości surowca) oraz diafiltracja po dodaniu 50% 0,15 M roztworu NaCl prowadzona do uzyskania 50% permeatu,
- Filtracja białka jaja rozcieńczonego 0,15 M roztworem NaCl w stosunku 1:4 do uzyskania 80% permeatu (w stosunku do wyjściowej ilości surowca). W surowcu wyjściowym i uzyskiwanych frakcjach filtratów oznaczano stężenie białka, aktywność lizozymu oraz cystatyny.

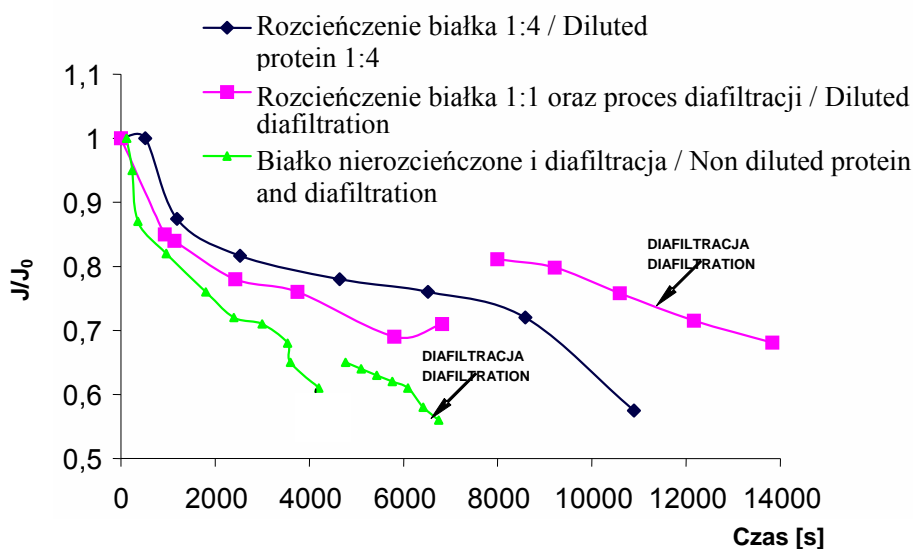
Stężenie białka oznaczano spektrofotometrycznie metodą biuretową przy długości fali  $\lambda = 540$  nm.

Aktywność lizozymu oznaczano metodą spektrofotometryczną – turbidymetryczną poprzez pomiar dynamiki zmiany zmętnienia zawiesiny bakterii *Micrococcus lysodeicticus*. Oznaczenie prowadzono w stałej temp 25°C przy długości fali  $\lambda = 450$  nm, określając spadek absorbancji w ciągu 6 min [5].

Aktywność cystatyny oznaczano jako zdolność inhibowania aktywności papainy wobec syntetycznego substratu BANA [7]. Jednostka aktywności inhibicyjnej odpowiada 1 jednostce aktywności enzymatycznej papainy, czyli ilości enzymu, który hydrolizuje 1,0 mM substratu w ciągu 1 min, w standardowych warunkach (37°C).

## Wyniki i dyskusja

Na rys. 1. przedstawiono przebieg procesu filtracji pełnego białka jaja i jego rozтворów, wyrażony względnym spadkiem szybkości, w stosunku do wartości wyjściowej, strumienia filtratu  $J_0$ . W wyniku filtracji nierozcieńczonego białka jaja po uzyskaniu permeatu w ilości około 30% wyjściowej nadawy, nastąpiła silna polaryzacja stężeniowa membrany, a natężenie strumienia filtratu osiągało wartość 0 (spadek oznaczono pionową kreską na rys. 1).



Rys. 1. Względny spadek szybkości filtracji [ $J/J_0$ ] w stosunku do wyjściowego strumienia filtratu  $J_0$ .

Fig. 1. A relative decrease in the filtration rate compared with the initial permeate flux ( $J/J_0$ ).

W celu dalszego odzyskania substancji aktywnych, również z warstwy białkowej wydzielonej na membranie, wprowadzono do koncentratu 30% 0,15 M roztworu NaCl i proces prowadzono do uzyskania objętości permeatu w ilości odpowiadającej dodatkowemu roztworowi. Po rozcieńczeniu białka jaja w stosunku 1:1 dynamika spadku war-



tości filtracji była mniejsza niż w przypadku białka nierozcieńczonego. Chociaż nastąpiło zmniejszenie strumienia filtratu do wartości ok. 0,7 (w porównaniu ze strumieniem wyjściowym), proces filtracji został doprowadzony do końca, co umożliwiło wydzielenie permeatu w ilości równoważnej do roztworu NaCl użytego do rozcieńczenia białka (50%). Zastosowanie procesu diafiltracji pozwoliło na zwiększenie wielkości względnej strumienia filtratu powyżej 0,8, ale cały proces był około 2-krotnie dłuższy niż w przypadku białka nierozcieńczonego (rys. 1). Najmniejszy spadek w procesie filtracji występował po rozcieńczeniu białka w stosunku 1:4 (prowadzący do uzyskania 80% permeatu). Tym niemniej spadek prędkości względnej strumienia był zbliżony do wartości łącznej filtracji i diafiltracji białka nierozcieńczonego, a czas procesu był około 50% dłuższy (rys. 1).

Zastosowanie membrany mikrofiltracyjnej umożliwia uzyskanie dużych szybkości filtracji, ale wpływa na zwiększenie ilości białek przechodzących do permeatu. W wyniku łącznego procesu filtracji i diafiltracji białka niepoddanego wstępnemu rozcieńczaniu do permeatu przeszło ok. 15% wyjściowej ilości protein (tab. 1). Po rozcieńczeniu białka w stosunku 1:1 i ponownym procesie jego diafiltracji (łączna ilość wprowadzonego roztworu NaCl odpowiadająca dwukrotnej objętości białka) ilość białka oznaczona w permeatach odpowiadała ok. 20% jego wyjściowej zawartości. Natomiast przy rozcieńczeniu 1:4 odfiltrowano aż ok. 40% wyjściowej ilości protein (tab. 1).

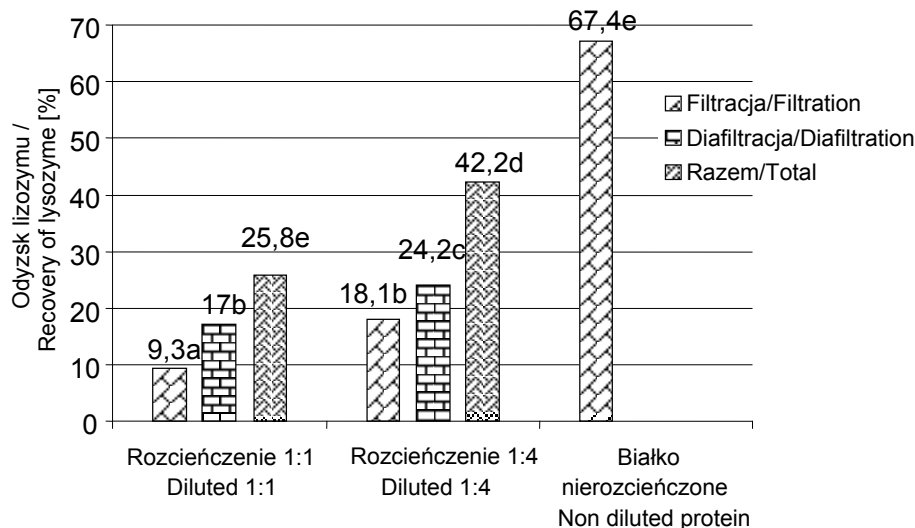
Przy zastosowaniu technik ultrafiltracyjnych ilości białka odzyskanego w permeatach wynoszą ok. 10% [1], co jest zbliżone do wyników własnych uzyskanych w badaniach białka nierozcieńczonego i poddanego diafiltracji. Zastosowanie membran ultrafiltracyjnych o przepuszczalności  $100 \cdot 10^3$ – $300 \cdot 10^3$  Da prowadzi do kilkukrotnego lub nawet wyższego wzrostu aktywności specyficznej lizozymu [1, 4]. W badaniach własnych, pomimo wysokiego stopnia odzyskania aktywnego lizozymu w permeatach, sięgającego od 27 do 67%, jego aktywność właściwa jest tylko co najwyżej 2- do 3-krotnie wyższa niż w surowcu wyjściowym (rys. 2), o czym decyduje wysoka przepuszczalność membrany. Nie odnotowano zasadniczego wpływu stopnia rozcieńczenia białka na tę zależność. Należy jednak podkreślić, że oznaczone aktywności lizozymu w uzyskanych diafiltratach były wyższe niż w pierwotnym procesie filtracji (tab. 1). Wydaje się, że zastosowane w badaniach własnych warunki nie sprzyjają rozkładowi kompleksów lizozymu z innymi białkami bądź też należy zastosować zwiększenie prędkości liniowej retentatu, co może prowadzić do zrywania warstwy białkowej i umożliwiać transport lizozymu przez membranę. Należy jednak podkreślić, że w przypadku filtracji białka nierozcieńczonego oraz rozcieńczonego w stosunku 1:1, i następujących po nich diafiltracji, otrzymane filtry mogą być bezpośrednio wykorzystane do wydzielania z nich lizozymu metodą chromatografii jonowymiennej, a straty białka sięgają tylko 15–20%.

Tabela 1

Charakterystyka procesu filtracji w zależności od stopnia rozcieńczenia białka jaja.  
Profile of the filtration process depending on the egg white dilution ratio.

Frakcja filtratu Fraction of filtrate [%]	Białko nierozcieńczone / Non-diluted protein			Białko rozcieńczone / Diluted protein 1:1			Białko rozcieńczone / Diluted protein 1:4				
	Stężenie białka Protein content [mg/cm <sup>3</sup> ]	Lizozym – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of lysozyme	Cystatyna – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of cystatin	Frakcja filtratu Fraction of filtrate [%]	Stężenie białka Protein content [mg/cm <sup>3</sup> ]	Lizozym – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of lysozyme	Cystatyna – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of cystatin	Frakcja filtratu Fraction of filtrate [%]	Stężenie białka Protein content [mg/cm <sup>3</sup> ]	Lizozym – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of lysozyme	Cystatyna – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of cystatin
10	13,2	0,97	1,14	10	6,8	0,88	1,67	10	13,2	1,06	1,62
20	25,5	1,43	1,92	20	9,2	1,27	1,65	20	12,5	1,49	1,92
30	32,0	1,63	2,37	30	11,6	1,98	1,94	30	11,9	1,50	2,70
				40	12,0	2,41	2,62	40	10,1	1,95	2,09
				50	13,6	2,26	2,59	50	9,1	1,97	1,93
								60	10,5	1,91	1,92
								70	7,3	1,96	1,76
								80	6,2	1,89	1,79
Sredni przyrost aktywności właściwej Average increase in the specific activity	14,8 <sup>a</sup>	1,74 <sup>A</sup>	2,75 <sup>a</sup>		21,0 <sup>b</sup>	2,01 <sup>B</sup>	2,73 <sup>a</sup>		39,2 <sup>c</sup>	1,72 <sup>A</sup>	1,97 <sup>b</sup>

A, B – te same litery w indeksach dwóch wartości średnich oznaczają brak różnicy statystycznie istotnej przy p = 0,05;  
A, B – the same letters in indices of two mean values denote no statistically significant difference at p = 0.05.



a, b – te same litery w indeksach dwóch wartości średnich oznaczają brak różnicy statystycznie istotnej przy  $p = 0,05$

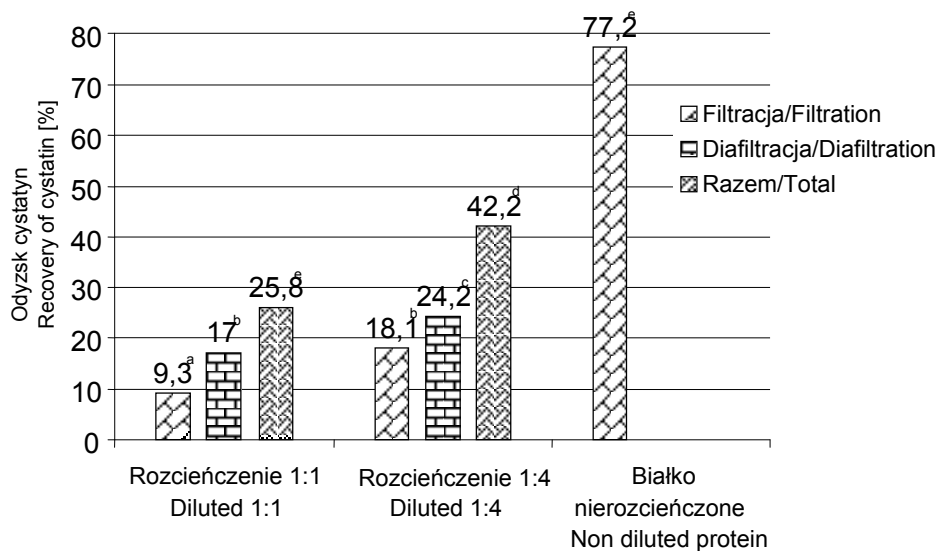
a, b – the same letters in indices of two mean values denote no statistically significant difference at  $p = 0.05$

Rys. 2. Odzysk aktywnego lizozymu w filtratach [% aktywnego lizozymu w surowcu wyjściowym].

Fig. 2. Recovery of active lysozyme in permeates [% of active lysozyme in a raw material].

Znacznie korzystniej mikrofiltracja wpłynęła na stopień odzysku aktywnej cystatyny. Przy rozcieńczeniu białka w stosunku 1:4 odzysk inhibitora w filtratach sięgał blisko 80%, chociaż wzrost aktywności właściwej był tylko około 2-krotny (tab. 1, rys. 3). Korzystnie stopień odzysku cystatyny kształtował się również w wyniku filtracji białka nierozcieńczonego i rozcieńczonego w stosunku 1:1, szczególne znaczenie miał proces diafiltracji dodatkowej, prowadząc do uzyskania w permeatach aż od 29 do 36% aktywnej cystatyny. Zwraca uwagę wysoka aktywność cystatyny w permeacie uzyskanym przy filtracji białka nierozcieńczonego. Przyrost aktywności jest 3–4-krotny, co jest wartością zbliżoną do wyników uzyskiwanych przy użyciu membrany o mniejszej porowatości, do wstępnej obróbki roztworów zawierających cystatynę [3].

W trakcie procesu filtracji roztworów białka jaja odnotowano znaczący przyrost aktywności właściwej cystatyny po odfiltrowaniu około 20–30% objętości roztworów białka, co wskazuje, że występują wówczas najkorzystniejsze warunki do selektywnego wydzielania inhibitora z białka jaja.



a, b – te same litery w indeksach dwóch średnich oznaczają brak różnicy statystycznej istotnej przy  $p=0,05$

a, b – the same letters in indices of two mean values denote no statistically significant difference at  $p = 0.05$

Rys. 3. Odzysk aktywnej cystatyny w filtratach.

Fig. 3. Recovery of active cystatin in permeates.

## Wnioski

1. Mikrofiltracja nierozcieńczonego białka jaja prowadzi do szybkiej polaryzacji membrany, co umożliwia uzyskanie tylko 30% permeatu.
2. Diafiltracja następująca po procesie wstępnej filtracji, polegająca na wprowadzeniu do roztworów białka jaja (białko pełne i rozcieńczone w stosunku 1:1) dodatkowej porcji rozpuszczalnika, w istotnym stopniu zwiększa ilość odzyskanych substancji aktywnych.
3. Mikrofiltracja membranowa roztworów białka jaja prowadzi do odzyskania w permeacie od około 25 do 70% aktywnego lizozymu i od około 40 do 80% aktywnej cystatyny. Technika ta może być wykorzystana jako wstępny etap oczyszczania substancji biologicznie aktywnych.
4. Stopień oczyszczenia preparatów lizozymu i cystatyny w uzyskanych filtratach jest niski i nie przekracza 2–3 razy aktywności właściwej w surowcu, maleje on ze wzrostem stopnia rozcieńczenia białka jaja.


### Literatura

- [1] Chiang B.H., Su C.K., Tsai G.J., Tsai G.T.: Egg white lysozyme purification by ultrafiltration on an affinity chromatography. *J. Food Sci.*, 1993, **58**, 303-306.
- [2] Kopeć W., Trziszka T., Chrzanowska J.: The method of direct isolation of lysozyme from egg white using chromatography and ultrafiltration. *Proc. XX World's Poultry Cong. WPSA, New Dehli, India 2000*, **3**, pp. 37-41.
- [3] Kopeć W., Korzeniowska M., Trziszka T.: An attempt to industrial process of simultaneous isolation of lysozyme and cystatin from egg white. *Proceed. 11<sup>th</sup> Europ. Poultry Conf WPSA, Bremen, 2002*, pp. 1-8. Abstract: *Arch. Geflügelk.*, 2002, **66**, 55-56.
- [4] Leśniewski G., Kijowski J.: Otrzymywanie lizozymu z białka jaja kurzego metodą bezpośredniej ultrafiltracji. *Zywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **2 (23)**, 59-69.
- [5] Li-Chan E., Nakai S., Sim J., Bragg D.D., Lo K.V.: Lysozyme separation from egg white by cation exchange chromatography. *J. Food Sci.*, 1986, **54**, 1032-1036.
- [6] Rautenbach R.: *Procesy membranowe*. WNT. Warszawa 1996.
- [7] Siewiński M.: Method of purification of thiol proteinase inhibitors from human urine. *Cancer Biochem. Biophys.* 1991, **12**, 33-44.
- [8] Trziszka T.: *Jajczarstwo*. Wyd. AR. Wrocław 2000.

### THE APPLICATION OF MEMBRANE TECHNIQUES TO RECOVER PROTEINS OF LOW MOLECULAR WEIGHT FROM HEN'S EGG WHITE

#### Summary

The objective of the study was to verify the possibility of using membrane filtration techniques for partial separation of biologically active proteins from an egg white. Such proteins show a biological activity of both the lysozyme, i.e. a muramidase enzyme of a molecular weight being  $143 \cdot 10^2$  Da, and the cysteine proteinase inhibitor, i.e. a cystatin having a molecular weight of  $126 \cdot 10^2$  Da. The microfiltration process of a native egg white and its solutions, prepared using a 0.15 M NaCl (the ratios were 1:1 and 1:4) was performed using a *crossflow* technique; tubular filters of polypropylene were used, their porosity being 0.2–0.6  $\mu\text{m}$ . In the filtrates produced, the activity of lysozyme and cystatin was determined (regarded as the ability to inhibit cysteine proteinase – papaine), and it was stated that amounts of active, low weight substances recovered ranged from 60% to 80%. The fouling phenomenon had a key effect on the entire process efficiency; it was the creation of a new protein layer on the membrane. The new layer on the membrane generated a decrease in the filtration rate. On the other hand, owing to the said new layer on the membrane, there was an improvement in enriching permeates with low weight active substances. As soon as more than 20–30% of the egg white processed have been filtrated, an essential increase in the activity of cystatin was stated compared to the initial solution.

**Key words:** membrane filtration, lysozyme, cystatin 

KRZYSZTOF DWIECKI, PAWEŁ GÓRNAŚ,  
MAŁGORZATA NOGAŁA-KAŁUCKA, STANISŁAW WITKOWSKI,  
KRZYSZTOF POLEWSKI

## **WPLYW IZOMERÓW OPTYCZNYCH $\alpha$ -TOKOFEROLU NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ MEMBRANY LIPIDOWEJ**

### **Streszczenie**

Celem badań było określenie w jaki sposób obecność różnych izomerów optycznych  $\alpha$ -tokoferolu wpływa na przepuszczalność membrany lipidowej, stanowiącej prosty model błony komórkowej. Ze względu na swą hydrofobowość  $\alpha$ -tokoferol łatwo rozpuszcza się w lipidowym rdzeniu błony komórkowej, wpływając tym samym na jej strukturę, stabilność i inne właściwości. D- $\alpha$ -tokoferol jest naturalną formą witaminy E, występującą m. in. w olejach roślinnych czy warzywach. Natomiast DL- $\alpha$ -tokoferol jest syntetyczną formą tej witaminy, która może być stosowana jako dodatek do żywności. Niektórzy autorzy uważają, że mimo takiej samej budowy chemicznej syntetyczna forma  $\alpha$ -tokoferolu może wykazywać odmienne działanie *in vivo* w porównaniu z formą naturalną, dlatego też ważne jest poznanie mechanizmów oddziaływania tokoferolu z innymi cząsteczkami o dużym znaczeniu biologicznym i strukturami komórkowymi na poziomie molekularnym.

W badaniach zastosowano D- $\alpha$ -tokoferol oraz mieszaninę izomerów D i L  $\alpha$ -tokoferolu ( $\alpha$ -T). Do przygotowania liposomów (membran lipidowych) użyto dipalmitynianu fosfatydylocholino (DPPC) oraz L- $\alpha$ -fosfatydylocholino (lecytyny) z żółtka jaja (PC). Do monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w membranie lipidowej zastosowano metodę fluorescencyjną z użyciem sondy (barwnika) – kwasu 1-anilinonaftaleno-8-sulfonowego (ANS).

Proces wnikania sondy ANS do membrany DPPC w fazie żelowej zachodził na drodze natychmiastowej absorpcji (w czasie od jednej do kilku sekund) z pominięciem fazy adsorpcji. Dodatek  $\alpha$ -tokoferolu do membrany nie zmieniał szybkości wnikania sondy. Jedynie w przypadku D- $\alpha$ -tokoferolu ilość zaabsorbowanej sondy wynosiła 25% wartości odpowiadającej samej membranie DPPC i DPPC z DL- $\alpha$ -tokoferolem.

W membranie DPPC zaobserwowano wyraźny wzrost jej przepuszczalności związany z głównym przejściem krystalicznym. W przypadku membrany DPPC z D- $\alpha$ -tokoferolem i DL- $\alpha$ -tokoferolem stwierdzono, że maksymalny wzrost przepuszczalności błony w wyniku zmiany fazy membrany był o około 60% mniejszy niż ma to miejsce w samym DPPC, a zmiany przepuszczalności obserwowane w temperaturze głównego przejścia krystalicznego charakteryzowały się łagodniejszym przebiegiem.  $\alpha$ -Tokoferol hamował wnikanie sondy ANS do membrany w fazie ciekłokrystalicznej. Nie zaobserwowano istotnych różnic w przepuszczalności membrany w obecności D i DL- $\alpha$ -tokoferolu.

---

*Mgr inż. K. Dwiecki, mgr inż. P. Górnaś, dr hab. K. Polewski prof. AR, Katedra Fizyki, ul. Wojska Polskiego 38/42, 60-637 Poznań; dr hab. M. Nogala-Kałucka prof. AR, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań; dr hab. Stanisław Witkowski, Wydz. Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet Białostocki, 15-433 Białystok*

**Słowa kluczowe:** membrana lipidowa, przepuszczalność membrany,  $\alpha$ -tokoferol, fluorescencja, ANS

## Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie przeciwutleniaczami w aspekcie ich zdolności do wiązania wolnych rodników, a tym samym zapobiegania wielu schorzeniom cywilizacyjnym, takim jak choroby układu krążenia czy nowotwory. Pamiętać jednak należy że substancje te mogą wykazywać inne od przeciwutleniających właściwości, wpływając jednocześnie na wiele funkcji życiowych organizmu człowieka. Przykładem takiego związku jest  $\alpha$ -tokoferol, powszechnie występujący w naszej diecie przeciwutleniacz rozpuszczalny w tłuszczach. Ze względu na swą hydrofobowość  $\alpha$ -tokoferol łatwo rozpuszcza się w lipidowym rdzeniu błony komórkowej, wpływając tym samym na jej strukturę, stabilność i inne właściwości [8]. D- $\alpha$ -tokoferol jest naturalną formą witaminy E, występującą m. in. W olejach roślinnych czy warzywach. Natomiast DL- $\alpha$ -tokoferol jest syntetyczną formą tej witaminy, która może być stosowana jako dodatek do żywności. Istnieją sprzeczne doniesienia co do wpływu obu form tokoferolu na organizm człowieka [1, 7]. Niektórzy autorzy uważają, że mimo takiej samej budowy chemicznej syntetyczny tokoferol może wykazywać odmienne działanie *in vivo* w porównaniu z witaminą E pochodzenia naturalnego, dlatego też ważne jest poznanie mechanizmów oddziaływania tokoferolu z innymi cząsteczkami o dużym znaczeniu biologicznym i strukturami komórkowymi na poziomie molekularnym. Układem przydatnym w tego rodzaju badaniach mogą być membrany lipidowe (liposomy), które są prostym modelem błony komórkowej [3].

Celem podjętych badań było określenie w jaki sposób obecność różnych izomerów optycznych  $\alpha$ -tokoferolu wpływa na przepuszczalność membrany lipidowej.

## Materiał i metody badań

W badaniach zastosowano D- $\alpha$ -tokoferol oraz mieszaninę izomerów D i L  $\alpha$ -tokoferolu (w stosunku ilościowym 1:1) – ( $\alpha$ -T), o czystości chromatograficznej. Preparaty przygotowano na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu Białostockiego. Do przygotowania liposomów (membran lipidowych) użyto dipalmitynianu fosfatydylocholiny (DPPC) oraz L- $\alpha$ -fosfatydylocholiny (lecytyny) z żółtka jaja (PC), firmy Sigma Aldrich (Niemcy) o czystości 99%. Wodne zawiesiny membran przygotowano w sposób następujący: do 2 cm<sup>3</sup> chloroformowego roztworu DPPC o stężeniu 0,2 mg/cm<sup>3</sup> dodano 2 cm<sup>3</sup> odpowiedniego izomeru  $\alpha$ -tokoferolu ( $\alpha$ -T), uzyskując w ten sposób mieszaninę, w której stężenie  $\alpha$ -T wynosiło 75  $\mu$ M. Stężenie  $\alpha$ -T dobrano w taki sposób, by membrana znajdowała się w fazie lamelarnej [2]. Otrzymane mieszaniny odparowano w celu wytworzenia cienkiej warstwy filmu lipidowego. Powstałe filmy uwodniono poprzez intensywne ich mieszanie w wodzie bidestylowanej (10 cm<sup>3</sup>), w temperaturze powyżej głównego przejścia krystalicznego

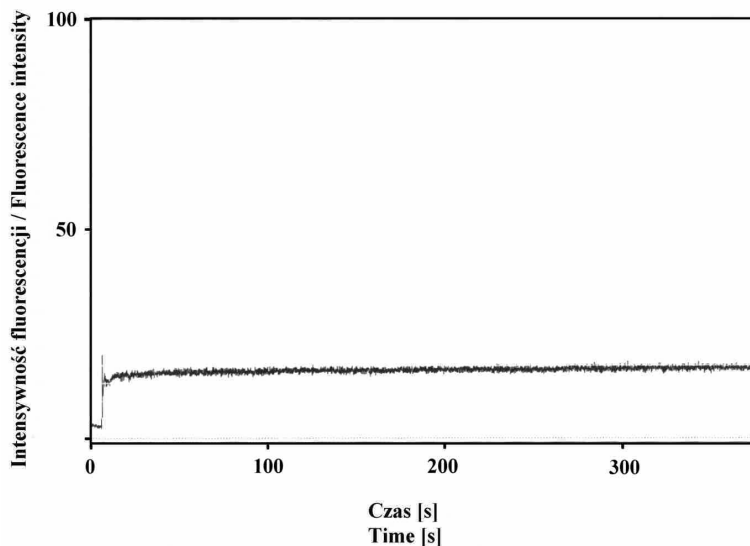
membrany DPPC (51°C), przez 20 min. Do monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w membranie lipidowej zastosowano metodę fluorescencyjną z wykorzystaniem sondy (barwnika) – kwasu 1-anilinonaftaleno-8-sulfonowego (ANS) firmy Sigma Aldrich (Niemcy). Substancja ta jest często stosowana do badania zmian przepuszczalności i struktury membran lipidowych i komórkowych [4, 5]. Metodyka została zmodyfikowana na potrzeby wykonywanych pomiarów. Sonda została wprowadzona do układu wodnej zawiesiny membrany. W celu szybkiego zmieszania składników zastosowano mieszadło magnetyczne. Pomiarów intensywności emisji fluorescencji w czasie i w zależności od temperatury dokonano za pomocą spektrofluorymetru RF 5001 PC firmy Shimadzu, przy długości fali wzbudzenia równej 380 nm i emisji 485 nm. Pomiarów w czasie wykonano w temp. 20°C, a więc w fazie żelowej membrany lipidowej. Pomiarów temperaturowe wykonywano w zakresie temp. 20–62°C. Wszystkie pomiary wykonano bezpośrednio po przygotowaniu próbek.

## **Wyniki i dyskusja**

### ***Pomiary w czasie***

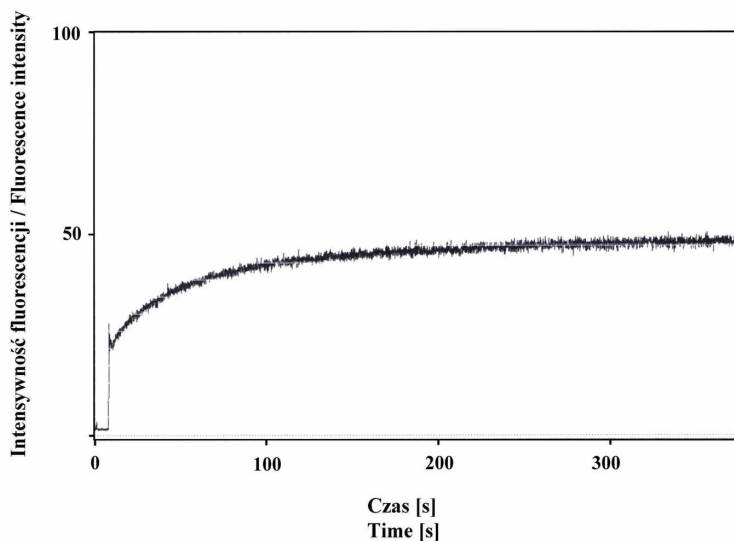
Pomiary dynamiki wnikania sondy ANS do membrany lipidowej przeprowadzone w temp. pokojowej (20°C) wykazały, że dodanie ANS do samej membrany DPPC prowadziło do wzrostu intensywności emisji fluorescencji ANS, co świadczy o zaabsorbowaniu sondy przez membranę (rys. 1a). Absorpcja zachodziła natychmiast po dodaniu ANS do układu (w ciągu od jednej do kilku sekund), dalsza inkubacja liposomów z sondą (do 375 s) nie prowadziła do wzrostu intensywności fluorescencji. Można więc powiedzieć, że w przypadku DPPC wnikanie ANS do wnętrza membrany zachodziło z pominięciem fazy adsorpcji sondy na powierzchni błony, co zaobserwowano w przypadku analogicznego doświadczenia wykonanego z użyciem membrany lecytynowej (PC) (rys. 1b). Zjawisko to wynika prawdopodobnie z różnicy w budowie morfologicznej membran DPPC i PC. Membrana DPPC składa się z fosfolipidów mających w swojej budowie reszty nasyconego kwasu tłuszczowego (palmitynowego) w konformacji trans, natomiast PC zawiera reszty kwasów tłuszczowych o różnym stopniu nienasycenia (reszty kwasu oleinowego, linolowego) i reszty kwasów nasyconych (palmitynowego i stearynowego). Taka budowa zapewnia większą płynność membrany oraz zwiększa odległości pomiędzy cząsteczkami w monowarstwie [6].





Rys. 1a. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC w temp. 20°C.

Fig. 1a. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane at a room temperature (20°C).

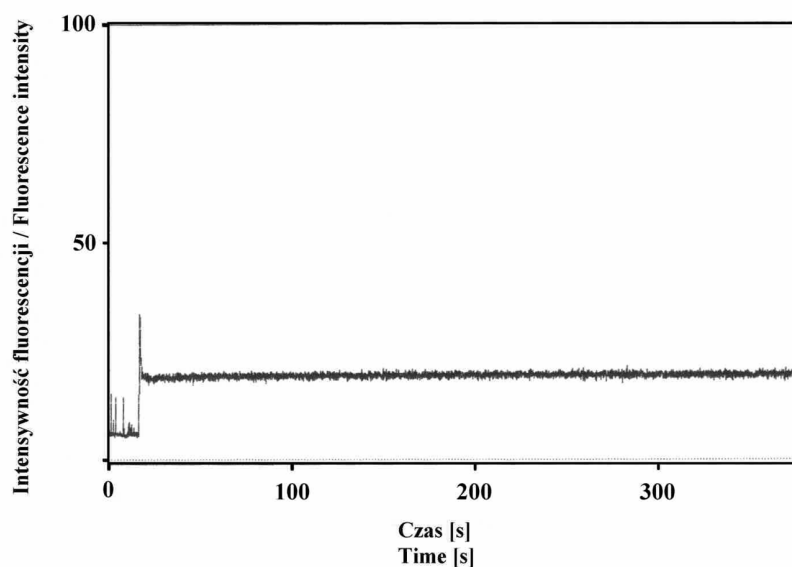


Rys. 1b. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie PC w temp. 20°C.

Fig. 1b. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the PC membrane at a room temperature (20°C).

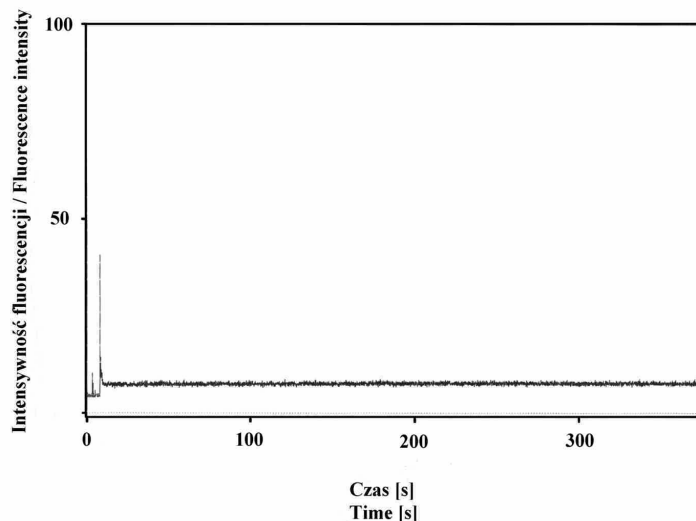
W membranie PC ANS zaadsorbowany na powierzchni membrany lub w jej części hydrofilowej powoli dyfunduje do jej hydrofobowego obszaru, czego nie obserwuje się w przypadku DPPC. Również mniejsze uporządkowanie łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych w membranie PC, która w temp. pokojowej znajduje się w fazie ciekłokrystalicznej (w przeciwieństwie do membrany DPPC, będącej w bardziej uporządkowanej fazie żelowej), może powodować powolną dyfuzję zaadsorbowanej sondy do wnętrza membrany. Dodanie do membrany DPPC racemicznej mieszaniny

izomerów D i L  $\alpha$ -tokoferolu (rys. 2) nie spowodowało zmian w szybkości absorpcji sondy i końcowej intensywności fluorescencji (a więc ilości zaabsorbowanego barwnika). W przypadku membrany DPPC z wbudowanym D- $\alpha$ -tokoferolem (rys. 3) stwierdzono, że końcowa wartość fluorescencji ANS (a więc ilość zaabsorbowanego barwnika) wynosiła około 25% intensywności fluorescencji zanotowanej w przypadku samego DPPC i DPPC z DL- $\alpha$ -tokoferolem. Nie stwierdzono natomiast różnic szybkości dyfuzji barwnika do membrany, pomiędzy samym DPPC i membraną zawierającą obie formy tokoferolu. Można więc powiedzieć, że tylko obecność naturalnego izomeru tokoferolu (D- $\alpha$ -tokoferolu) zmienia strukturę membrany w fazie żelu.



Rys. 2. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC z dodatkiem DL- $\alpha$ -tokoferolu w temp. 20°C.

Fig. 2. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the PC membrane with DL- $\alpha$ -tocopherol at a room temperature (20°C).

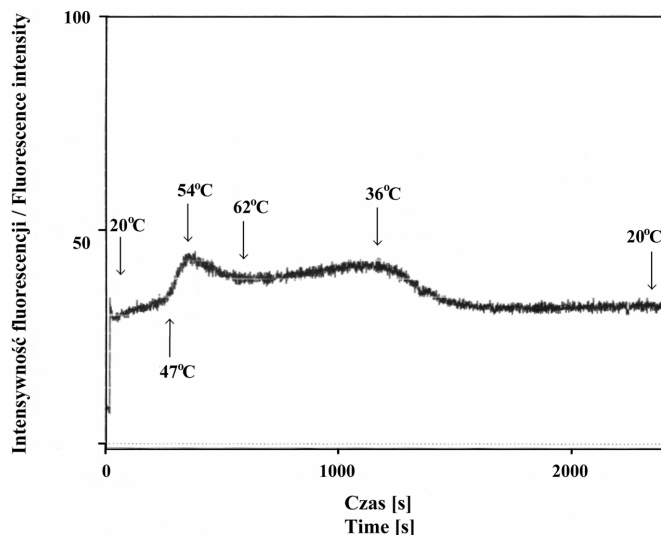


Rys. 3. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC z dodatkiem D- $\alpha$ -tokoferolu w temp. 20°C.

Fig. 3. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane with the added D- $\alpha$ -tocopherol at a room temperature (20°C).

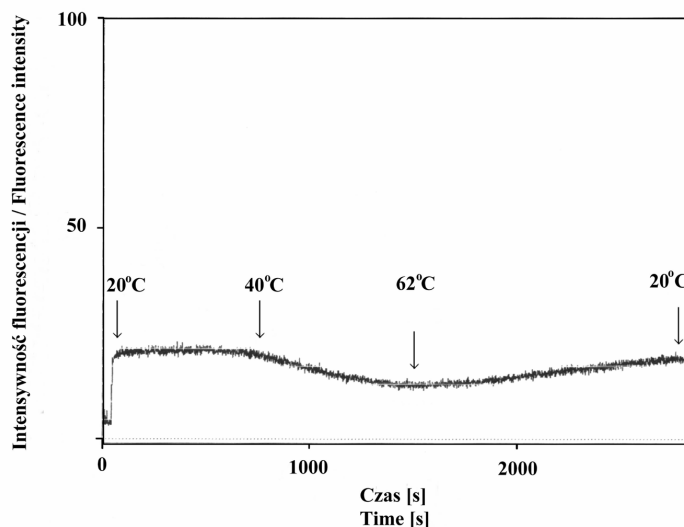
#### *Pomiary temperaturowe*

Na podstawie pomiarów szybkości dyfuzji ANS do membrany lipidowej w zależności od temperatury stwierdzono istotne różnice przepuszczalności pomiędzy membraną DPPC i zawierającą  $\alpha$ -tokoferol. Na rys. 4a przedstawiono zmiany intensywności emisji fluorescencji sondy ANS podczas procesu ogrzewania i ochładzania membrany lipidowej. W zakresie temp. od 20 do 47°C następował powolny wzrost intensywności fluorescencji, wynikający ze wzrostu przepuszczalności membrany. Przepuszczalność membrany DPPC gwałtownie rosła powyżej temp. 47°C i osiągała maksimum w temp. 54°C. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane z głównym przejściem krystalicznym membrany, które występuje w temp. 41°C. Membrana przechodzi wtedy z uporządkowanego stanu sztywnego (fazy żelowej) do stanu płynnego (fazy ciekłokrystalicznej), charakteryzującego się mniejszym uporządkowaniem łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych w cząsteczce fosfolipidu. Część łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych przechodzi z konformacji trans do gauche [6]. W omawianym przypadku zmiana ta mogła doprowadzić do wnikięcia większej ilości ANS na skutek „rozluźnienia” cząsteczek fosfolipidów w dwuwarstwie. Dalsze ogrzewanie, w zakresie temp. 54–62°C spowodowało obniżenie intensywności fluorescencji o około 25% w stosunku do fluorescencji maksymalnej, co związane jest z obniżaniem się intensywności fluorescencji układu na skutek utraty energii w wyższych temperaturach. W analogicznym doświadczeniu wykonanym na membranie lecytynowej (PC), (rys. 4b) w fazie ciekłokrystalicznej zaobserwowano spadek intensywności emisji układu powyżej temp. 40°C, z minimum w temp. 62°C oraz wzrost intensywności przy ochładzaniu układu.



Rys. 4a. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC w zróżnicowanej temperaturze. (Strzałki wskazują temperaturę pomiaru).

Fig. 4a. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane at different temperatures (the arrows indicate the temperature of the measurement).



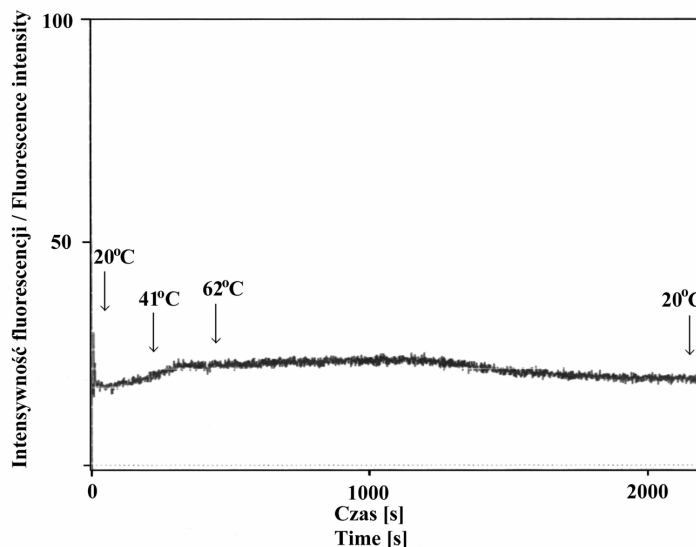
Rys. 4b. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie PC w zróżnicowanej temperaturze. (Strzałki wskazują temperaturę pomiaru).

Fig. 4b. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the PC membrane at different temperatures. (Arrows indicate the temperature of measurement).

Ochładzanie roztworu zawierającego liposomy DPPC powodowało z kolei wzrost intensywności fluorescencji z maksimum w temp. około 36°C. Zmniejszenie intensywności fluorescencji poniżej tej temperatury następowało w wyniku ewakuacji ANS z wnętrza membrany, na skutek głównego przejścia krystalicznego. Wolniejsze tempo spadku intensywności fluorescencji przy ochładzaniu układu (w porównaniu z ogrzewaniem) spowodowane było dłuższym okresem trwania procesu ochładzania. Natężenie fluorescencji w temp. 20°C po ochłodzeniu układu było o około 9% większe

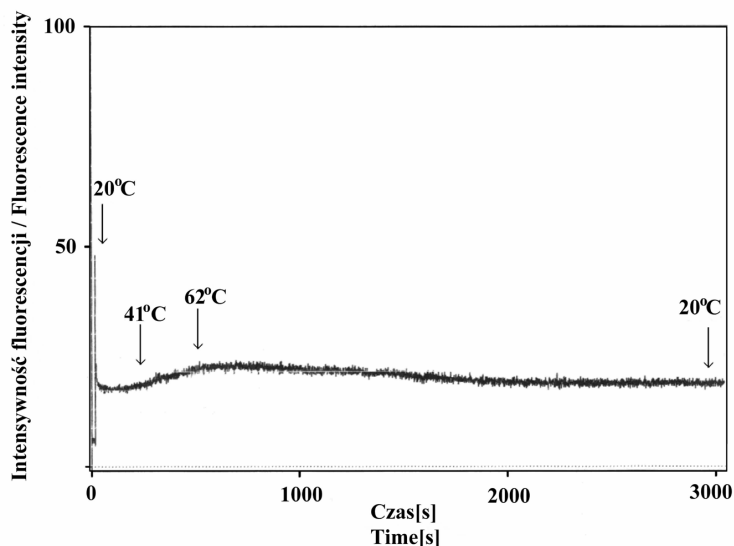
od natężenie początkowego w tej samej temperaturze (przed rozpoczęciem ogrzewania układu), co świadczy o tym, że część sondy ANS, która dostała się do membrany na skutek wzrostu temperatury, nie opuściła jej wnętrza.

Pomiary szybkości dyfuzji barwnika do membrany DPPC zawierającej D i DL- $\alpha$ -tokoferol w zależności od temperatury (rys. 5, 6) wykazały, że maksymalny wzrost fluorescencji, związany ze wzrostem przepuszczalności błony na skutek zmiany temperatury układu, był o około 60% mniejszy niż ma to miejsce w przypadku samego DPPC. W obu przypadkach nie zanotowano charakterystycznego dla samego DPPC wyraźnego wzrostu przepuszczalności związanego z głównym przejściem krystalicznym. Zmiany przepuszczalności charakteryzowały się łagodniejszym przebiegiem niż w przypadku samej membrany DPPC, obserwowano jednak wzrost intensywności emisji fluorescencji dodatnio skorelowany ze wzrostem temperatury układu, również spadek temperatury obniżał fluorescencję ANS.



Rys. 5. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC z dodatkiem D- $\alpha$ -tokoferolu w zróżnicowanej temperaturze. (Strzałki wskazują temperaturę pomiaru).

Fig. 5. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane with D- $\alpha$ -tocopherol at different temperatures (the arrows indicate the temperature of measurement).



Rys. 6. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC z dodatkiem DL- $\alpha$ -tokoferolu w zróżnicowanej temperaturze. (Strzałki wskazują temperaturę pomiaru).

Fig. 6. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane with DL- $\alpha$ -tocopherol at different temperatures. (The arrows indicate the temperature of measurement).

Wzrost intensywności fluorescencji w temp. 54–62°C, a więc w zakresie temperatur, w którym obserwowano spadek intensywności emisji fluorescencji układu ANS – DPPC oraz brak wyraźnego maksimum emisji może świadczyć o tym, że  $\alpha$ -tokoferol nie tyle uniemożliwia zmianę konformacji reszt kwasów tłuszczowych fosfolipidu, co raczej przez swoją obecność w membranie hamuje wnikanie sondy. Końcowa intensywność fluorescencji w temp. 20°C była równa intensywności fluorescencji układu w tej samej temperaturze przed rozpoczęciem ogrzewania, co świadczy o tym, że cały barwnik, który wniknął do membrany, w wyniku głównego przejścia krystalicznego został usunięty z jej wnętrza. Obecność  $\alpha$ -tokoferolu zmniejsza przepuszczalność membrany w fazie ciekłokrystalicznej.

## Wnioski

1. Proces wnikania sondy ANS do membrany DPPC w fazie żelowej zachodzi na drodze natychmiastowej absorpcji (w ciągu od jednej do kilku sekund) z pominięciem fazy adsorpcji. Dodatek  $\alpha$ -tokoferolu do membrany nie zmienia szybkości wnikania sondy, jedynie w przypadku D- $\alpha$ -tokoferolu ilość zaabsorbowanej sondy wynosi 25% wartości zanotowanej w przypadku samego DPPC i DPPC z DL- $\alpha$ -tokoferolem.
2. W membranie DPPC zaobserwowano wyraźny wzrost jej przepuszczalności związany z głównym przejściem krystalicznym. W przypadku membrany DPPC z D i DL- $\alpha$ -tokoferolem stwierdzono, że maksymalny wzrost przepuszczalności błony w wyniku zmiany fazy membrany jest o około 60% mniejszy niż ma to

miejsce w samym DPPC, a zmiany przepuszczalności obserwowane w temperaturze głównego przejścia krystalicznego charakteryzują się łagodniejszym przebiegiem.  $\alpha$ -Tokoferol hamuje wnikanie sondy ANS do membrany w fazie ciekłokrystalicznej. Nie zaobserwowano istotnych różnic w przepuszczalności membrany w obecności D i DL- $\alpha$ -tokoferolu.

*Praca została wykonana w ramach grantu KBN 2 P06T 01627.*

### Literatura

- [1] Devaraj S., Adams-Huet B., Fuller C.J., Jialal I.: Dose-response comparison of RRR-alpha-tocopherol and all-racemic alpha tocopherol on LDL oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997, **17**, 2273-2279.
- [2] Dwiecki K., Sieger A., Górnaś P., Nogala-Kałużka M., Polewski K.: Oddziaływania membrany lipidowej z D- $\alpha$ -tokoferolem w zależności od jego stężenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (40), Supl. 37-44.
- [3] Lasic D.D.: Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**, 307-321.
- [4] Maddaiah V.T., Kumbar U.: Membrane permeability transition promoted by phosphate enhances 1-anilino-8-naphthalene sulfonate fluorescence in calcium-loaded liver mitochondria. *J. Bioenerg Biomembr.*, 1993, **25** (4), 419-27.
- [5] Ohyashiki T., Mohri T.: Fluorescence probe studies on the interaction of phlorizin with rabbit intestinal brush border membranes. *J. Biochem.*, 1983, **93** (4), 1167-1173.
- [6] Stryer L.: *Biochemia*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1999.
- [7] Thiel R.J.: Natural vitamins may be superior to synthetic ones. *Medical Hypotheses*, 2000, **55** (6), 461-469.
- [8] Wang X., Quinn P.: Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 1999, **38**, 309-336.

### THE IMPACT OF OPTICAL ISOMERS OF $\alpha$ -TOCOPHEROL ON THE PERMEABILITY OF LIPID MEMBRANE

#### S u m m a r y

The objective of the investigations performed was to determine the way various optical isomers of  $\alpha$ -tocopherol affect the permeability of lipid membrane - a simple model of the cell membrane. Owing to its hydrophobic properties,  $\alpha$ -tocopherol is easily soluble in the lipid core of cell membrane, and this phenomenon impacts the structure, stability, and other properties of the cell membrane. D- $\alpha$ -tocopherol is a natural form of vitamin E, which is also present in plant oils and vegetables. And the DL- $\alpha$ -tocopherol is a synthetic vitamin E commonly used as a food additive. Some authors claim that, despite the same chemical structure of the two forms of vitamin E, the synthetic vitamin E may have a different effect *in vivo* compared with the natural form of this vitamin. Thus, it is important to identify mechanisms of interactions ensuing among  $\alpha$ -tocopherol, other biologically significant molecules, and cell structures on a molecular level.

In the investigations carried out, the D- $\alpha$ -tocopherol and mixture of D and L- $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -T) were applied. The liposomes (lipid membranes) were made from the phosphatidyl choline dipalmitate (DPPC) and the L- $\alpha$ -phosphatidyl choline (PC) of egg yolk. A fluorescence probe method with an 8-anilino-1-

naphthalene-sulfonic acid (ANS) as a colouring dye was applied to monitor structural changes occurring in the lipid membrane.

The process of ANS probe penetrating the DPPC membrane being in a gel phase occurred by immediate absorption (it lasted between one to several seconds), with no adsorption phase present. When  $\alpha$ -tocopherol was added to the membrane, the penetration rate of the probe did not change. The D- $\alpha$ -tocopherol was the only case when the amount of absorbed ANS was 25% of the value corresponding with the pure DPPC membrane and with DPPC with DL- $\alpha$ -tocopherol.

In the DPPC membrane, a significant increase in the membrane permeability was stated. It was attributed to the crystalline transition. In the case of DPPC with D- $\alpha$ - and DL- $\alpha$ -tocopherol added, it was noted that the maximal increase in the membrane permeability due to the change in the membrane phase was about 60% lower than in the case of DPPC alone, and the changes in the membrane permeability as observed in the temperature of the main crystalline transition, were characterized by a milder course.  $\alpha$ -tocopherol inhibited the process of the ANS probe penetrating the membrane in a liquid crystalline phase. No significant differences were found in the membrane permeability in the presence of D and DL- $\alpha$ -tocopherol.

**Key words:** lipid membrane, membrane permeability,  $\alpha$ -tocopherol, fluorescence, ANS 



PAWEŁ GÓRNAŚ, ALEKSANDER SIGER,  
MAŁGORZATA NOGALA-KAŁUCKA, KRZYSZTOF POLEWSKI

**PORÓWNANIE ZMIAN OKSYDACYJNYCH I EFEKTYWNOŚCI  
WIĄZANIA WOLNYCH RODNIKÓW W TRAKCIE  
PRZECHOWYWANIA OLEJÓW ROŚLINNYCH TŁOCZONYCH NA  
ZIMNO ORAZ ICH RAFINOWANYCH ODPOWIEDNIKÓW**

**Streszczenie**

Celem podjętych badań było porównanie zmian stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych – sojowego i słonecznikowego, uzyskanych metodami tłoczenia na zimno oraz rafinacji - w czasie ich przechowywania oraz określenie efektywności wiązania wolnych rodników przez układy natywnych przeciwutleniaczy, zawartych w testowanych olejach. Próby termostatowano w temp. 60°C bez dostępu światła. W celu określenia zachodzących zmian oznaczono: liczbę nadtlenkową, ilość wiązanych rodników DPPH<sup>•</sup> oraz zawartość tokoferoli w trakcie przechowywania olejów.

Na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdzono, że najszybciej w temp 60°C procesy utleniania zachodziły w oleju słonecznikowym tłoczonym na zimno, znacznie wolniej w obu olejach rafinowanych, natomiast najwolniej w oleju sojowym tłoczonym na zimno. Najwyższą efektywność wiązania wolnych rodników DPPH<sup>•</sup> przez układ obecnych przeciwutleniaczy stwierdzono w rafinowanym oleju sojowym, a pozostałe oleje wykazały niższą aktywność, ale o zbliżonych do siebie wartościach. W trakcie przechowywania olejów następowało zmniejszenie zawartości tokoferoli, przy czym było ono zróżnicowane w przypadku poszczególnych homologów oraz zależało od rodzaju badanego oleju.

**Słowa kluczowe:** olej roślinny, tokoferol, liczba nadtlenkowa (LOO), DPPH<sup>•</sup>.

**Wprowadzenie**

Triacyloglicerole stanowią 98% masy wszystkich komponentów tłuszczowych wchodzących w skład olejów roślinnych [2, 10]. Zawartość innych składników, takich jak: związki fenolowe, tokoferole, karotenoidy, sterole, fosfolipidy, woski czy skwalen są uzależnione od gatunku i rodzaju rośliny oleistej, od położenia geograficznego jej

---

*Mgr inż. P. Górnaś, dr hab. K. Polewski prof. AR, Katedra Fizyki, ul. Wojska Polskiego 38/42, 60-637 Poznań, mgr inż. A. Siger, dr hab. M. Nogala-Kałucka prof. AR., Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań*

uprawy, a także późniejszego procesu technologicznego otrzymywania oleju [2]. Trwałość roślinnych olejów tłoczonych na zimno jest uwarunkowana głównie jakością nasion [16], ich przechowywaniem oraz sposobem uzyskiwania oleju [18]. Przeprowadzany proces rafinacji olejów roślinnych to szereg etapów polegających na usuwaniu z oleju związków wpływających na walory smakowo-zapachowe, jak również tych, których obecność pogarsza trwałość otrzymywanego oleju [15]. Najbardziej niekorzystnym etapem rafinacji jest dezodoryzacja powodująca hydrolizę, polimeryzację, tworzenie się kwasów tłuszczowych o konfiguracji trans oraz zmniejszenie zawartości tokoferoli i polifenoli. Ilość powstających kwasów trans zależy od zawartości i rodzaju kwasów tłuszczowych w odwanianym oleju, a także od temperatury, ciśnienia i czasu trwania procesu [2].

Organizm ludzki nie potrafi syntetyzować tokoferoli, stąd ich najbogatszym źródłem są oleje roślinne obecne w racjonalnej diecie. Mają one właściwości przeciwutleniające, a ich aktywność uzależniona jest od homologicznej formy, ilości, jak również innych związków obecnych w olejach, które mogą oddziaływać synergistyczne. Spożywanie m.in. olejów roślinnych zapewnia utrzymanie potencjału przeciwutleniającego naszego organizmu na określonym poziomie [7]. Stąd do przygotowywania posiłków, zamiast tradycyjnie stosowanych olejów rafinowanych, poleca się coraz szerszą gamę olejów tłoczonych na zimno ze względu na zawartość związków biologicznie czynnych, takich jak: fosfolipidy, sterole czy karotenoidy [5]. Potencjał przeciwutleniający jest szeroko stosowanym i ważnym parametrem charakteryzującym różnego rodzaju produkty pochodzenia roślinnego np. wina, soki, herbaty, oleje, jak również świeże owoce, warzywa itp. Określanie potencjału związane jest z substancjami zdolnymi do ochrony biologicznych systemów przed szkodliwymi reakcjami będącymi przyczyną nadmiernego utleniania, wywołanego reaktywnymi formami tlenu oraz obecnością wolnych rodników.

W związku z pojawieniem się na naszym rynku szerokiego asortymentu olejów tłoczonych na zimno, w niniejszej pracy przebadano tak uzyskany olej sojowy i słonecznikowy w celu porównania stabilności oksydacyjnej i efektywności wiązania wolnych rodników przez zawarte w nich układy naturalnych przeciwutleniaczy, analizom poddano także ich rafinowane odpowiedniki.

### **Materiał i metody badań**

W badaniach użyto następujących olejów zakupionych na lokalnym rynku: sojowego tłoczonego na zimno (EFAVIT ZWO Poznań), sojowego rafinowanego (DAVID – Włochy) o liczbie nadtlenkowej odpowiednio 2,22 i 1,99 oraz słonecznikowego tłoczonego na zimno (EFAVIT ZWO Poznań) i słonecznikowego rafinowanego (DAVID – Włochy) o liczbie nadtlenkowej 2,06 i 3,05. Próby olejów przechowywano na płytkach Petriego o grubości warstwy 1 cm, w temp.  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  bez dostępu światła.

Użyte standardy tokoferoli (-T) to: alfa- ( $\alpha$ -T), beta- ( $\beta$ -T), gamma- ( $\gamma$ -T), delta- ( $\delta$ -T), o stopniu czystości  $\geq 95\%$  (Calbiochem).

#### *Oznaczanie liczby nadtlenkowej*

Liczbę nadtlenkową (LOO) oznaczano zgodnie z PN-ISO 3960 [11]. Otrzymane wartości liczby nadtlenkowej prób olejów przechowywanych w temp.  $60^{\circ}\text{C}$  przedstawiono również w formie stałej utleniania  $k_{\text{LOO}}$  [19].

#### *Przygotowanie prób do oznaczeń tokoferoli*

Do 1 g oleju dodawano 0,25 g pirogalolu, 4 ml alkoholu etylowego absolutnego oraz 1 ml 60% KOH i zmydlano. Następnie ekstrahowano próbę eterem etylowym. Ekstrakty substancji niezmydlających się (SNZ) przemywano do zaniku reakcji alkalicznej i sączono przez warstwę bezwodnego  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Eter odparowywano, a SNZ przenoszono ilościowo heksanem do kolbki miarowej.

#### *Oznaczenia tokoferoli w olejach przy zastosowaniu HPLC*

Rozdziału, identyfikacji jakościowej i ilościowej homologicznych tokoferoli dokonywano metodą HPLC (Waters-600) z kolumną LiChrosorb Si 60 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Fazę ruchomą stanowił *n*-heksan z 1,4-dioksanem w stosunku 97:3 (v/v) o szybkości przepływu 1,5 ml/min. Stosowano detektor fluorymetryczny (Waters<sup>TM</sup> 474) przy wzbudzeniu  $\lambda = 295$  nm i emisji  $\lambda = 330$  nm oraz komputerowy system sterowania Waters Millenium 33. Zawartość tokoferoli obliczano na podstawie krzywych kalibracyjnych wykonywanych ze standardów tokoferoli [11].

#### *Oznaczanie efektywności wiązania rodników DPPH<sup>•</sup>*

Efektywność wiązania wolnych rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrozylowych (DPPH<sup>•</sup>) wykonano według Espina i wsp. [6]. Metoda ta polega na spektrofotometrycznym pomiarze zmiany intensywności barwy roztworu w zależności od pozostałości rodników DPPH<sup>•</sup> po reakcji z układem przeciwutleniaczy zawartych w próbie. Pełną charakterystykę właściwości przeciwutleniających układu przeciwutleniaczy zawartych w badanych olejach wyrażono za pomocą następujących wyróżników:

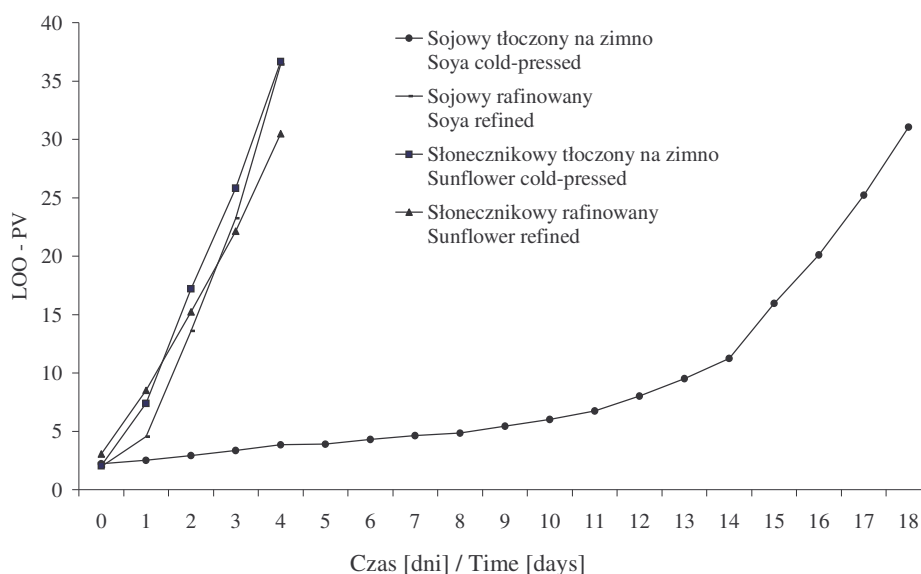
- stałej wiązania wolnych rodników DPPH<sup>•</sup> ( $k_{\text{DPPH}^{\bullet}}$ ) [3],
- stężenia przeciwutleniacza potrzebnego do zmniejszenia początkowej zawartości rodników DPPH<sup>•</sup> o połowę ( $\text{EC}_{50}$ ) [4],
- czasu potrzebnego ( $T_{\text{EC}_{50}}$ ) do osiągnięcia stałego stężenia DPPH<sup>•</sup> przy stężeniu przeciwutleniaczy odpowiadającym  $\text{EC}_{50}$  [17],
- efektywności przeciwrodnikowej (AE) wyrażonej w ekwiwalentach Troloxu [1, 17]

### Analiza statystyczna wyników

Wszystkie analizy wykonywano w trzech równoległych powtórzeniach, a otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując w tym celu jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz testy post-hoc Tuckey'a na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ . Stosowano program Statistica 6,0 firmy StatSoft.

### Wyniki i dyskusja

W przeprowadzonych badaniach oleje sojowy i słonecznikowy tłoczone na zimno, jak i rafinowane, testowano w temp. 60°C bez dostępu światła. Próby ulegały bardzo szybko zmianom oksydacyjnym, rejestrowanym poprzez wzrost liczby nadtlenkowej. Oleje miały zbliżone początkowe wartości LOO. Jedynie w oleju słonecznikowym rafinowanym wynosiła ona 3,05, co niewątpliwie mogło wpłynąć na jego szybsze utlenianie. Krygier i wsp. [9] podkreślają, że rozważając różnice w stabilności oleju tłoczonego na zimno i rafinowanego należy zwrócić uwagę na różne wyjściowe wartości LOO.



Rys. 1. Zmiany wartości liczby nadtlenkowej olejów roślinnych przechowywanych w temp. 60°C.

Fig. 1. Change of peroxide value in plant oils in temperature of 60°C.

Na rys. 1. przedstawiono graficznie krzywe utleniania badanych prób olejów, które są średnią z trzech powtórzeń. Z testowanych olejów najwolniej ulegał utlenianiu olej sojowy tłoczony na zimno (tab. 1), osiągając LOO powyżej 25 po 17 dniach, natomiast pozostałe oleje przekroczyły tę wartość LOO po 4 dniach testu (rys. 1).

Tabela 1

Stałe prędkości utleniania ( $k_{LOO}$ ) olejów roślinnych przechowywanych w temp. 60°C.

Rate constant of peroxidation ( $k_{LOO}$ ) in plant oils stored at 60°C.

Olej roślinny Plant oil	Stała $k_{LOO}$ [LOO·dzien <sup>-1</sup> ] 60°C Constant $k_{PV}$ [PV·day <sup>-1</sup> ] 60°C
Sojowy tłoczony na zimno Cold-pressed soya oil	$13,68 \times 10^{-2} \pm 0,539 \times 10^{-2}$ (a)*
Sojowy rafinowany Refined Soya oil	$75,60 \times 10^{-2} \pm 1,638 \times 10^{-2}$ (c)*
Słonecznikowy tłoczony na zimno Cold-pressed sunflower oil	$72,89 \times 10^{-2} \pm 1,105 \times 10^{-2}$ (c)*
Słonecznikowy rafinowany Refined sunflower	$56,75 \times 10^{-2} \pm 0,803 \times 10^{-2}$ (b)*

\* – odmiennymi inskrypcjami literowymi oznaczono wartości średnie różniące się statystycznie istotnie na poziomie  $\alpha = 0,05$  / different inscription letters point to mean values that differ statistically significantly on a level of significance being  $\alpha = 0,05$ .

Tabela 2

Zawartość tokoferoli w olejach roślinnych.

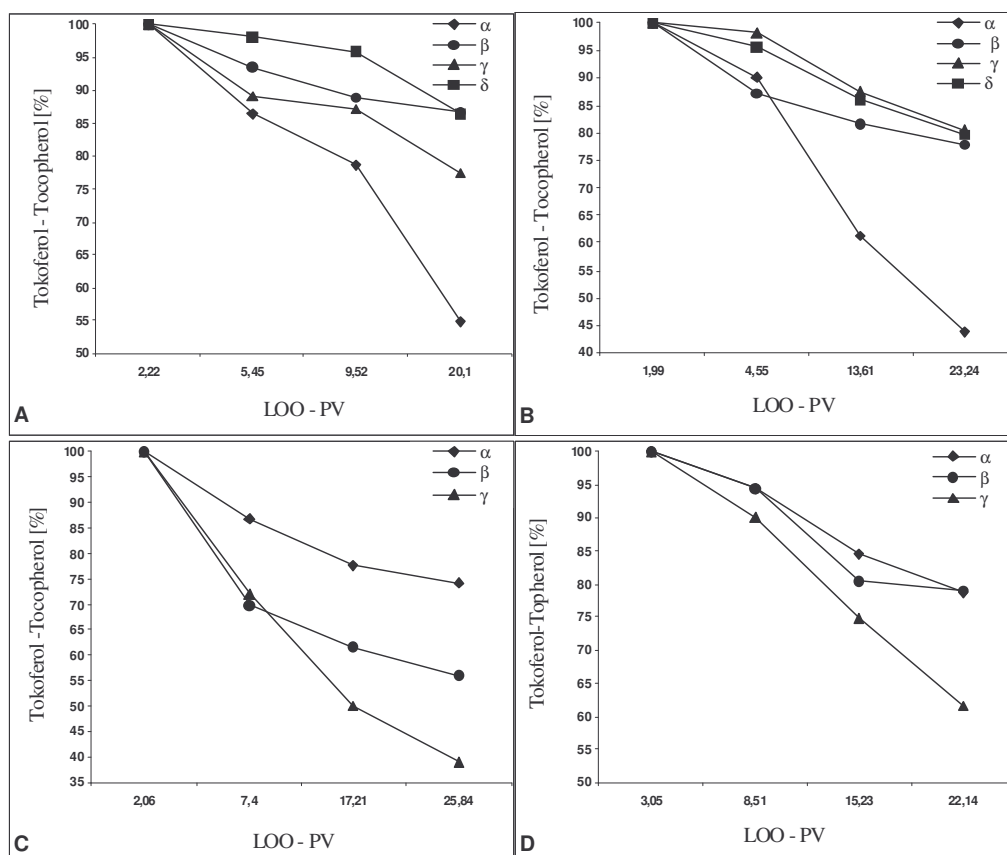
Contents of tocopherols in plant oils.

Olej roślinny Plant oil	Zawartość tokoferoli Contents of tocopherols [mg/100g]				Suma tokoferoli Tocopherols total [mg/100g]
	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	
Sojowy tłoczony na zimno Cold-pressed soya oil	15,90	0,90	36,24	5,68	$58,72 \pm 0,124$ (a)*
Sojowy rafinowany Refined soya oil	20,18	2,35	74,01	24,31	$120,85 \pm 0,142$ (b)*
Słonecznikowy tłoczony na zimno Cold-pressed sunflower oil	79,11	3,45	4,13	-	$86,69 \pm 0,096$ (a)*
Słonecznikowy rafinowany Refined sunflower oil	87,85	1,80	1,12	-	$90,77 \pm 0,055$ (b)*

Objaśnienia jak w tab. 1. / Denotations as in Tab. 1.

Stałe  $k_{LOO}$  (tab. 1) przedstawiają różnice pomiędzy szybkością utleniania się poszczególnych olejów, a wynikają one ze składu oraz ilości przeciwutleniaczy, a także substancji towarzyszących w badanych olejach. Przeprowadzone doświadczenia nie potwierdzają badań przeprowadzonych przez Rotkiewicz [14], w których wykazano, że oleje tłoczone na zimno charakteryzuje mniejsza stabilność niż rafinowane. W przypadku prób oleju sojowego właśnie tłoczony charakteryzował się większą stabilnością oksydacyjną w temp. 60°C. Początkowa zawartość sumaryczna

tokoferoli w olejach była statystycznie istotnie różna. Olej sojowy rafinowany zawierał dwukrotnie więcej tokoferoli ogółem w porównaniu z jego tłoczonym odpowiednikiem. Olej słonecznikowy rafinowany zawierał statystycznie istotnie więcej tokoferoli ogółem w porównaniu z olejem słonecznikowym tłoczonym na zimno.

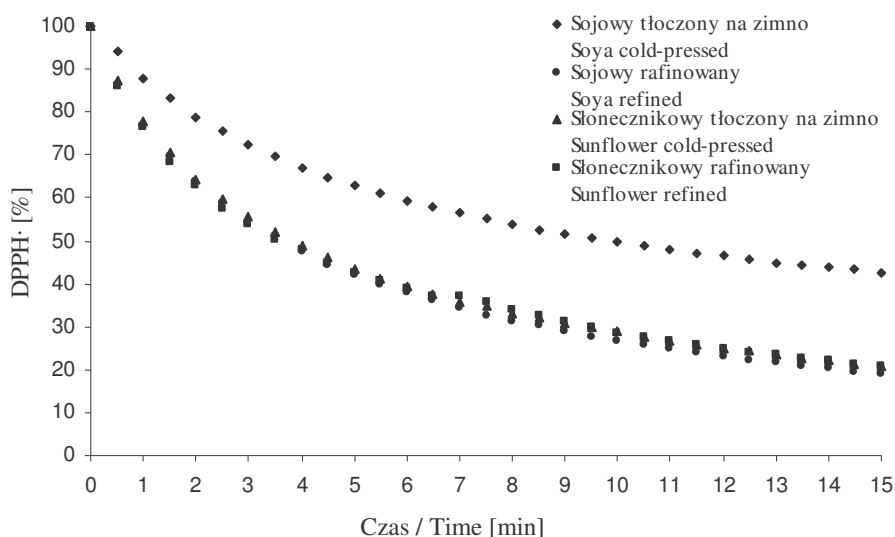


Rys. 2. Zmiany zawartości tokoferoli w olejach (A – sojowy tłoczony na zimno, B – sojowy rafinowany, C – słonecznikowy tłoczony na zimno, D – słonecznikowy rafinowany).

Fig. 2. Changes in the tocopherol contents in oils (A – cold-pressed soya oil; B – refined soya oil; C – cold-pressed sunflower oil; D – refined sunflower oil).

Dokonując oceny homologów tokoferoli stwierdzono, że olej słonecznikowy rafinowany zawierał więcej  $\alpha$ -T, a mniej  $\beta$ - i  $\gamma$ -T niż olej słonecznikowy tłoczony na zimno. W trakcie procesu utleniania w badanych olejach następowało statystycznie istotne zmniejszanie się zawartości tokoferoli (rys. 2). W olejach słonecznikowych najszybciej ulegał rozkładowi  $\gamma$ -T, a w przypadku olejów sojowych  $\alpha$ -T. Pod względem zawartości tokoferoli oleje rafinowane wykazywały wartości wyższe niż tłoczone na zimno (tab. 2). Podobne obserwacje wynikają z badań Krygiera i wsp. [9].

Doświadczenie z wiązaniem rodników DPPH<sup>•</sup> przez układ przeciwutleniaczy zawarty w badanych olejach wykazało, że kinetyka tego wiązania w poszczególnych olejach była różna. Szczególnie duże różnice zaobserwowano w przypadku oleju sojowego tłoczonego na zimno i rafinowanego (rys. 3).



Rys. 3. Zmniejszanie zawartości rodników DPPH pod wpływem przeciwutleniaczy zawartych w olejach roślinnych.

Fig. 3. Quantity of DPPH radicals decreasing owing to the impact of antioxidants in plant oils.

Najsukuteczniej wiązały rodniki DPPH<sup>•</sup> próby olejów sojowego rafinowanego, pośrednio słonecznikowego rafinowanego i słonecznikowego tłoczonego na zimno, a najwolniej sojowego tłoczonego na zimno. W doświadczeniu przeprowadzonym z 57 olejami roślinnymi nad zdolnością przeciwutleniaczy do wiązania rodników DPPH<sup>•</sup> Espin [6] dowiódł także zróżnicowanej efektywności w ich dezaktywacji. Niewątpliwą zaletą metody z rodnikami DPPH<sup>•</sup> jest fakt, że oznaczenie przeprowadza się w temperaturze pokojowej, co eliminuje ryzyko termicznego niszczenia testowanych substancji [3]. Uzyskanych wyników nie można jednak przypisać konkretnemu przeciwutleniaczowi, lecz ich układowi zawartemu w próbce [13]. Zmniejszenie ilości przeciwutleniaczy w olejach powodowało wzrost LOO, co równocześnie wpływało na zmniejszenie skuteczności wiązania rodników DPPH<sup>•</sup> i wpływało na różnice pozostałych wyróżników procesu autooksydacji w każdym z czterech badanych olejów (tab. 3).

Tabela 3

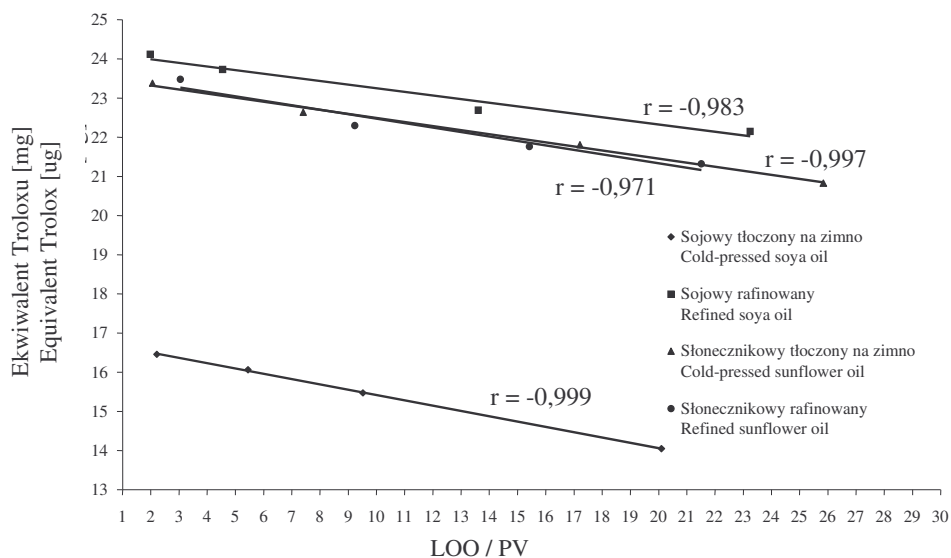
Charakterystyka właściwości przeciwutleniającej DPPH<sup>•</sup> olejów roślinnych przechowywanych w temp. 60°C.

The profile of DPPH\* antioxidant feature of plant oils stored at 60°C.

Olej roślinny Plant oil	LOO	Stała $k_{DPPH}$ Constant $k_{DPPH}$ [%DPPH* $\cdot$ min $^{-1}$ ]	$T_{EC50}$ [min]	$EC_{50}$ [mg]	AE	Ekwiwalent Troloxu Trolox equivalent [ $\mu$ g]
Sojowy tłoczony na zimno Cold-pressed soya oil	2,22	$5,42 \times 10^{-2}$	12,78	90,50	$0,86 \times 10^{-3}$	16,46
	5,45	$5,09 \times 10^{-2}$	13,62	93,33	$0,79 \times 10^{-3}$	16,06
	9,52	$4,95 \times 10^{-2}$	14,00	96,62	$0,74 \times 10^{-3}$	15,47
	20,10	$4,38 \times 10^{-2}$	15,82	104,92	$0,60 \times 10^{-3}$	14,05
Sojowy rafinowany Refined soya oil	1,99	$10,66 \times 10^{-2}$	6,50	57,89	$2,66 \times 10^{-3}$	24,12
	4,55	$10,27 \times 10^{-2}$	6,75	58,80	$2,52 \times 10^{-3}$	23,73
	13,61	$9,41 \times 10^{-2}$	7,37	62,34	$2,18 \times 10^{-3}$	22,69
	23,24	$8,99 \times 10^{-2}$	7,71	64,89	$2,00 \times 10^{-3}$	22,15
Słonecznikowy tłoczony na zimno Cold pressed sunflower oil	2,06	$9,94 \times 10^{-2}$	6,97	60,46	$2,37 \times 10^{-3}$	23,38
	7,40	$9,22 \times 10^{-2}$	7,52	63,12	$2,11 \times 10^{-3}$	22,64
	17,21	$8,64 \times 10^{-2}$	8,03	65,09	$1,91 \times 10^{-3}$	21,81
	25,84	$7,89 \times 10^{-2}$	8,79	67,83	$1,68 \times 10^{-3}$	20,83
Słonecznikowy rafinowany Refined sunflower oil	3,05	$9,75 \times 10^{-2}$	7,11	61,66	$2,28 \times 10^{-3}$	23,48
	8,51	$8,90 \times 10^{-2}$	7,79	64,36	$2,00 \times 10^{-3}$	22,30
	15,23	$8,52 \times 10^{-2}$	8,14	66,29	$1,85 \times 10^{-3}$	21,76
	22,14	$8,08 \times 10^{-2}$	8,58	67,31	$1,73 \times 10^{-3}$	21,32

Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy LOO, a całkowitą aktywnością przeciwutleniającą wyrażoną w ekwiwalentach Troloxu. Uzyskano wysokie współczynniki korelacji liniowej ( $r$ ), co świadczy o znacznym wpływie LOO na efektywność wiązania rodników DPPH\* (rys. 4). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że nie tylko zawartość homologów tokoferoli wpływała na szybkość procesu utleniania olejów. Dowodem jest to, że olej sojowy tłoczony na zimno wykazywał znacznie większą trwałość niż sojowy rafinowany, mimo że zawartość początkowa tokoferoli była dwukrotnie mniejsza. Dlatego należałoby rozpatrzyć także wpływ pozostałych substancji towarzyszących w olejach, jak związki fenolowe, sterole, beta-karoten czy fosfolipidy.





Rys. 4. Zależność aktywności przeciwutleniającej olejów roślinnych wyrażonej w ekwiwalentach Troloxu od liczby nadtlenkowej.

Fig. 4. The dependence between antioxidant activity, expressed in equivalents of Trolox, of plants oils and the peroxide value.

Efekt ten mógł być wywołany np. obecnością fosfolipidów. Są one usuwane w procesie rafinacji, aby zapobiec nadmiernemu ciemnieniu olejów podczas dezodoryzacji w wysokiej temperaturze [8]. Fosfolipidy wykazują efekt „tarczy” przed tlenem, tworząc ochronną powierzchnię graniczną pomiędzy olejem a powietrzem, tym samym zmniejszając jego dostęp i ilość w oleju [18]. Mimo, że olej sojowy tłoczony na zimno charakteryzował się wysoką odpornością na utlenianie, to jego aktywność w wiązaniu rodników DPPH<sup>•</sup> była najniższa, co prawdopodobnie wiąże się z mniejszą zawartością tokoferoli w porównaniu z olejem sojowym rafinowanym. Oznacza to, że oleje tłoczone na zimno niekoniecznie musi cechować mniejsza odporność na utlenianie, a z drugiej strony olej najbardziej trwały nie musi wykazywać najlepszej aktywności przeciwrodnikowej. Będzie to zależało od rodzaju przeciwutleniczy, ich ilości i wzajemnych proporcji, jak również od pozostałych substancji towarzyszących obecnych w olejach roślinnych.

## Wnioski

1. W warunkach przeprowadzonego testu najszybciej utleniały się próby oleju słonecznikowego tłoczonego na zimno, a najwolniej zimno tłoczonego sojowego.
2. Podczas przechowywania prób olejów następował spadek zawartości tokoferoli, przy czym ubytek poszczególnych homologów był zróżnicowany w oleju sojowym, jak i w słonecznikowym.

3. Badane oleje różniły się między sobą efektywnością oraz szybkością wiązania rodników DPPH<sup>•</sup>. Najszybszy w usuwaniu rodników DPPH<sup>•</sup> okazał się układ przeciwutleniaczy w oleju sojowym rafinowanym, a najwolniej wiązały rodniki przeciwutleniacze zawarte w oleju sojowym tłoczonym na zimno. Wraz ze wzrostem LOO olejów zmniejszała się ich efektywność w usuwaniu rodników DPPH<sup>•</sup>.

*Pracę wykonano w ramach grantu KBN 2 P06T 01627*

### Literatura

- [1] Aruoma O. I.: Methodological considerations for characterizing potential antioxidant action of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 2003, **523**, 9-20.
- [2] Beardsell D., Francis J., Ridley D.: Health promoting constituents in plant derived edible oils. *J. Food Lipid.*, 2002, **9** (1), 1-34.
- [3] Bondet V., Brand-Williams W., Berset C.: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1997, **30**, 609-615.
- [4] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. -Wiss. u. – Technol*, 1995, **28**, 25-30.
- [5] Eitenmiller R., Lee J.: *Vitamin E - Food Chemistry, Composition, and Analysis*. Marcel Dekker, Inc., USA 2004.
- [6] Espin J. C., Soler-Rivas C., Wichers H.J.: Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48** (3), 648-656.
- [7] Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A.: The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 1996, **31**, 671-701.
- [8] Kim I., Kim J., Lee K, Tak T.: Phospholipids separation (degumming) from crude vegetable oil by polyimide ultrafiltration membrane. *J. Membrane Sci.*, 2002, **205**, 113-123.
- [9] Krygier K., Wroniak M., Dobczyński K., Kiełt I., Grzeźkiewicz S., Obiedziński M.: Charakterystyka wybranych rynkowych olejów roślinnych tłoczonych na zimno. *Rośliny Oleiste*, 1998, Tom **XIX**, 573-582.
- [10] Lechner M., Reiter B., Lorbeer E.: Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. *J. Chromatography*, 1999, **857**, 231-238.
- [11] Nogala-Kalućka M., Gogolewski M., Lampart-Szczapa E., Jaworek M., Siger A., Szulczewska A.: Determination of vitamin E active compounds as biological antioxidants occurring in oilseeds of the selected rape varieties. *Rośliny Oleiste*, 2003, **XXIV**, 587-596.
- [12] PN-ISO 3960:1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenującej.
- [13] Prakash A.: Antioxidant activity. *Analytical Progress*, 2001, **19** (2), 1-5.
- [14] Rotkiewicz D., Konopka I., Sobieski G.: Stabilność olejów tłoczonych i ekstrahowanych na zimno. *Rośliny Oleiste*, 1995, **XVI**, 193-300.
- [15] Rotkiewicz D., Konopka I., Żylik S.: Stan badań nad optymalizacją procesu przetwórstwa nasion rzepaku. *Rośliny Oleiste*, 1999, **XX**, 151-168.
- [16] Rotkiewicz D., Konopka I.: Trwałość olejów rzepakowych tłoczonych na zimno z nasion o zróżnicowanej jakości. *Rośliny Oleiste*, 1998, **XIX**, 583-591.

- [17] Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura-Calixto F.: A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **76**, 270-276.
- [18] Szukalska E.: Wybrane zagadnienia utleniania tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, 2003, **38 (1-2)**, 42-57.
- [19] Topallar H., Bayrak Y., Iscan M.: A Kinetic study on the auto-oxidation of sunflower seed oil, *JAACS*, 1997, **74**, 1323-1327.

**THE COMPARATIVE ANALYSIS OF OXIDATIVE CHANGES AND EFFECTIVENESS  
OF QUENCHING FREE RADICALS WHILE STORING COLD PRESSED  
VEGETABLE OILS AND THEIR REFINED EQUIVALENTS**

S u m m a r y

The objective of the investigations performed was to compare changes in the oxidative stability of two plant oils: soya oil and sunflower oil, occurring when storing them. Both the soya oil and sunflower oil were produced using cold pressure and refining processes. Another aim was to determine the effectiveness of quenching free radicals by systems of native antioxidants contained in the oil samples tested. The samples were thermostated at 60°C, and without light. In order to identify changes, the following parameters were determined: peroxide value, quantity of free radicals (DPPH) being scavenged, and tocopherol contents during the oil storage.

On the basis of the results obtained, it was stated that the rate of oxidation processes was the highest at 60°C in the cold-pressed sunflower oil; it was significantly lower in the two refined oils, and in the cold-pressed soya oil, it was the lowest. The active antioxidant system present in the oils appeared to be the most efficient in quenching free radicals DPPH in the refined soya oil. Its effectiveness was lower in all other oils, although its value was comparable (similar). The tocopherol contents decreased while storing oil samples, and the decrease degree was different for individual tocopherol homologues; additionally, it depended on the type of oil.

**Key words:** plant oil, tocopherol, peroxide value (PV), DPPH\* 

KINGA GRODZKA, ADRIANA MACIEJEC, KRZYSZTOF KRYGIER

**PRÓBY ZASTOSOWANIA CELULOZY MIKROKRystalicznej  
JAKO ZAMIENNIKA TŁUSZCZU W EMULSJACH  
MAJONEZOWYCH**

Streszczenie

Celem pracy była ocena przydatności celulozy mikrokrystalicznej, jako zamiennika tłuszczu, do otrzymania emulsji majonezowych o zmniejszonej zawartości tłuszczu i określenie wpływu dodatku tego składnika na właściwości fizykochemiczne i sensoryczne niskotłuszczowych emulsji majonezowych oraz ich porównanie z dostępnymi produktami rynkowymi bez dodatku celulozy.

Zastosowano dwa preparaty celulozy mikrokrystalicznej koloidalnej: Vivapur MCG 591 i Vivapur MCG 611 firmy J. Rettenmaier & Söhne. Preparaty różniły się zawartością soli sodowej karboksymetylocelulozy w swoim składzie (Vivapur MCG 611: 11,3–18,8% Na – CMC, Vivapur MCG 591: 9–15% Na – CMC). Zastosowano trzy dawki celulozy: 0,5; 1,0 i 2,0%.

Uzyskano trzy rodzaje emulsji majonezowych metodą na „zimno” o zawartości tłuszczu: 5, 15 i 30%.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że możliwe jest uzyskanie niskotłuszczowych emulsji majonezowych z zastosowaniem celulozy mikrokrystalicznej. Celuloza mikrokrystaliczna nadaje wysoką lepkość emulsjom majonezowym. Sensoryczna ocena konsystencji potwierdziła, że dzięki zastosowaniu celulozy mikrokrystalicznej w emulsjach majonezowych uzyskano pożądaną konsystencję gotowego wyrobu, a najkorzystniejszy okazał się jednoprocenowy dodatek celulozy Vivapur MCG 611.

**Słowa kluczowe:** celuloza mikrokrystaliczna, zamiennik tłuszczu, majonez niskotłuszczowy, konsystencja

**Wprowadzenie**

Postęp w zakresie technologii żywności umożliwia zastąpienie tłuszczu w produktach spożywczych zamiennikami, co pozwala na uzyskanie wyrobów o obniżonej wartości energetycznej, cieszących się popytem wśród konsumentów. Nie jest to proces łatwy, ponieważ tłuszcz w produkcji przyczynia się do korzystnej charakterystyki smakowej żywności oraz odpowiedniej konsystencji [3]. Produkcja żywności niskoenergetycznej wymaga zastosowania odpowiednich hydrokoloidów

---

*Mgr inż. K. Grodzka, mgr inż. A. Maciejec, prof. dr hab. K. Krygier, Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, grodzka@alpha.sggw.waw.pl*

[10]. Celuloza mikrokrystaliczna znalazła zastosowanie jako zamiennik tłuszczu. Dodatek ten jest w stanie zastąpić tłuszcz w produkcie, nadając mu sensoryczne odczucie tłuszczu w ustach, a zarazem dobrą konsystencję [4].

Celuloza mikrokrystaliczna jest dopuszczonym do stosowania dodatkiem do żywności o symbolu E 460(i), a należy do grupy hydrokoloidów polisacharydowych [2]. Substancja ta tworzy bardzo zbliżony układ do emulsji typu olej w wodzie. Koloidalna sieć, którą tworzy celuloza mikrokrystaliczna, powoduje unieruchomienie cząsteczek wody i tłuszczu, ograniczając jego koalescencję [12]. Celuloza absorbuje wodę w ilości przekraczającej kilkakrotnie jej masę. Trójwymiarowe usieciowanie nierozpuszczalnych cząsteczek MCC nadaje unikalne właściwości reologiczne tej substancji. Słabe wiązania utrzymujące sieć są wrażliwe na ścinanie i struktura łatwo ulega załamaniu [5]. W miarę upływu czasu w układzie koloidalnym wytwarza się przestrzenna sieć (przez powstanie wiązań wodorowych), która powoduje wzrost lepkości i powstanie żelu. Zaprzestanie mieszania (ścinania) powoduje szybkie odtworzenie struktury [4, 11]. To powoduje uzyskanie krótkiej, żelowej struktury i nadanie produktowi pożądanej, kremowej tekstury oraz odczucie tłuszczu w ustach. Pozwala to na stworzenie produktu niskotłuszczowego o teksturze przypominającej majonez tradycyjny.

Celem pracy była ocena przydatności celulozy mikrokrystalicznej, jako zamiennika tłuszczu, do otrzymania emulsji majonezowych o zmniejszonej zawartości tłuszczu i określenie wpływu dodatku tego składnika na właściwości fizykochemiczne i sensoryczne niskotłuszczowych emulsji majonezowych oraz ich porównanie z dostępnymi produktami rynkowymi bez dodatku celulozy.

### **Materiał i metody badań**

Prace badawcze zrealizowano w trzech seriach, w których analizowano emulsje różniące się zawartością tłuszczu (5, 15 i 30%), z różnymi dodatkami celulozy mikrokrystalicznej (0,5; 1 i 2%) oraz porównywano wyroby doświadczalne z majonezem rynkowym o takiej samej zawartości tłuszczu. Majonez rynkowy został wybrany z grupy dostępnych produktów o zawartości tłuszczu 30% i spośród kilku przebadanych majonezów na podstawie uzyskania najwyższej oceny sensorycznej.

Materiał do badań stanowiły dwa preparaty celulozy mikrokrystalicznej koloidalnej: Vivapur MCG 591 i Vivapur MCG 611 firmy J. Rettenmaier&Söhne. Preparaty te różniły się zawartością soli sodowej karboksymetylocelulozy w swoim składzie (Vivapur MCG 611: 11,3–18,8% Na – CMC, Vivapur MCG 591: 9–15% Na – CMC). Zastosowano trzy dawki celulozy: 0,5; 1 i 2%.

Celuloza mikrokrystaliczna koloidalna uzyskiwana jest w wyniku procesu produkcyjnego obróbki pulpy drzewnej do frakcji celulozy, a następnie po dodaniu środka hydrofilnego dyspergującego, jako sól sodowa karboksymetylocelulozy

(CMC). Oprócz CMC, jako środek dyspergujący może być wykorzystana guma guar, ksantan, alginiany, maltodekstryna [2, 4, 12].

Emulsje majonezowe otrzymywano na podstawie receptur przedstawionych w tab. 1.

Tabela 1

Receptury emulsji majonezowych niskotłuszczowych otrzymanych metodą z rozpraszaniem celulozy mikrokrystalicznej typu: Vivapur MCG 611 i Vivapur MCG 591.

The recipes for low fat mayonnaise emulsions produced using Vivapur MCG 611 i Vivapur MCG 591 – microcrystalline cellulose preparations in the dispersed form.

Dodatek celulozy mikrokrystalicznej – MCG 611 lub MCG 591 [%] Microcrystalline cellulose added in the form of MCG 611 OR MCG 591 preparations	Dodatek tłuszczu Fat added [%]	Pozostałe składniki + baza* Other ingredients + basis*
0,5	5	7 % AAD, 80,6 % woda /water
	15	5,5 % AAD, 72,1 % woda/water
	30	5 % AAD, 57,6 % woda/water
1	5	7 % AAD, 80,1 % woda/water
	15	5,5 % AAD, 71,6 % woda/water
	30	5 % AAD, 57,1 % woda/water
2	5	7 % AAD, 79,1 % woda/water
	15	5,5 % AAD, 70,6 % woda/water
	30	5 % AAD, 56,1 % woda/water

\* baza: cukier – 1,5 %, sól – 0,8 %, musztarda – 4%, ocet 0,6% / \* basis: sugar – 1,5%, salt – 0,8%, mustard – 4%, vinegar – 0,6%

AAD – E-1422 acetylowany adypinian diskrobiowy – skrobia modyfikowana kleikująca na zimno: Pregeflo CH 20 firmy Roquette / AAD-E-1422 acetylated distarch adipate – a modified starch that becomes glutinous when cold: “Pregeflo CH 20” manufactured by „Roquette”

Niskotłuszczowe emulsje majonezowe otrzymano metodą „na zimno” (bez obróbki cieplnej fazy wodnej emulsji majonezowej) w homogenizatorze próżniowym HP-1,5 firmy PT-MASZ. Stosowano maksymalną prędkość obrotów homogenizatora wynoszącą 2825 obr./min. Proces przebiegał w warunkach podciśnienia – panujące w zbiorniku głównym ciśnienie było zredukowane o 24–48% w stosunku do ciśnienia atmosferycznego. Czas homogenizacji wynosił 1,5 min. Celulozę mikrokrystaliczną należało najpierw uaktywnić w wodzie poprzez jej rozproszenie [4, 6], co wykonano za pomocą homogenizatora firmy Janke&Kunkel, ULTRA – TURRAX T 25, stosując ustawienie 13500 obr./min przez 1,5 min. Wykonano po 3 serie każdego rodzaju majonezu.

Zakres badań otrzymanych niskotłuszczowych emulsji majonezowych obejmował oznaczenia kwasowości ogólnej, lepkości pozornej, stabilności i analizę sensoryczną po 24 h od wytworzenia emulsji. Dodatkowo przeprowadzono test przechowalniczy – emulsje majonezowe przetrzymywano przez 4 tygodnie w słoikach typu twist-off

w temp. 10°C. Po tym czasie badano lepkość pozorną i stabilność emulsji niskotłuszczowych.

Pomiar lepkości pozornej wykonywano za pomocą reowiskozymetru Rheotestu – 2, typ RV2. Pomiaru dokonywano w temp. 20°C i szybkości ścianania 0,3333 [s<sup>-1</sup>]. Zasada metody polega na mierzeniu momentu obrotowego, jaki ciecz wywiera na obracający się element pomiarowy (cylinder lub walec) zanurzony w badanej cieczy.

Przy oznaczeniu stabilności emulsji zastosowano metodę wirówkową [1]. Zasada metody polega na przyspieszeniu koalescencji (zmian w emulsji) przez termostatowanie jej w podwyższonej temperaturze, a następnie wirowanie.

Kwasowość ogólną oznaczano zgodnie z PN-A-86950 [8].

Ocenę sensoryczną metodą profilowania [7, 9] przeprowadził dziesięcioosobowy, przeszkolony zespół o sprawdzonej wrażliwości sensorycznej. Oceniano następujące wyróżniki: adhezyjność, gęstość, jednorodność, sprężystość i kleistość:

- adhezyjność jest cechą konsystencji, która określa stopień przyklepności próbki do łyżeczki oraz konsystencję w momencie opadania z łyżeczki,
- gęstość to doustne odbieranie wrażenia lepkości przy rozprowadzaniu próbki w jamie ustnej,
- jednorodność to wrażenie gładkości i jednolitości próbki,
- sprężystość to wrażenie elastycznego odkształcania się próbki podczas jej oceny,
- kleistość to cecha, która określa stopień przylegania próbki do podniebienia i języka.

## Wyniki i analiza

Wyniki oznaczeń emulsji majonezowych o 30-procentowej zawartości tłuszczu i zróżnicowanych dodatkach celulozy mikrokrystalicznej przedstawiono w tab. 2.

Największą lepkością, zmierzoną po 24 h, odznaczały się emulsje z dodatkiem 2% MCG 611 i 2% MCG 591. Lepkości emulsji z najmniejszą, 0,5-procentową i 2-procentową zawartością MCG nie różniły się znacząco, natomiast były dwukrotnie wyższe od lepkości majonezu rynkowego. Wszystkie badane emulsje odznaczały się wysoką lepkością w porównaniu z lepkością majonezu rynkowego. Tę wysoką wartość lepkości nadała celuloza mikrokrystaliczna [4].

Po czterech tygodniach przechowywania lepkość prawie wszystkich emulsji wzrosła, jedynie lepkość emulsji z 2-procentowym dodatkiem MCG 611 zmalała.

Stabilność wirówkowa wszystkich emulsji przed i po teście przechowalniczym wynosiła 100%. Zatem wytworzone emulsje niskotłuszczowe charakteryzowały się bardzo dużą trwałością.

Parametry fizykochemiczne emulsji majonezowych o zawartości tłuszczu 30%, z różnymi dodatkami celulozy mikrokrystalicznej: Vivapur MCG 611 i Vivapur MCG 591.

Physical-chemical parameters of mayonnaise emulsions containing 30% of fat with different additives in the form of microcrystalline cellulose preparations: Vivapur MCG 611 and Vivapur MCG 591.

Parametry Parameters	MCG 611-2%	MCG 611-1%	MCG 611-0,5%	MCG 591-2%	MCG 591-1%	MCG 591-0,5%	Majonez rynkowy Commercia l mayonnaise
Kwasowość ogólna Total acidity [%]	0,13	0,13	0,13	0,15	0,15	0,14	0,36
Lepkość po 24 h Viscosity after 24 h [mPa·s 10 <sup>5</sup> ]	4,47	3,95	3,73	4,37	4,28	3,37	1,91
Lepkość po 4 tygodniach Viscosity after 4 weeks [mPa·s 10 <sup>5</sup> ]	4,25	5,45	5,89	5,78	4,95	3,81	-

Niskotłuszczowe emulsje majonezowe poddano sensorycznej ocenie konsystencji, a wyniki tej oceny przedstawiono na rys. 1. Adhezyjność – ta cecha emulsji majonezowych o zawartości tłuszczu 30% oceniona została w zakresie 5,84–7,68 pkt w dziesięciostopniowej skali. Emulsja z MCG 611–1% miała najbardziej zbliżoną wartość adhezji w stosunku do majonezu rynkowego.

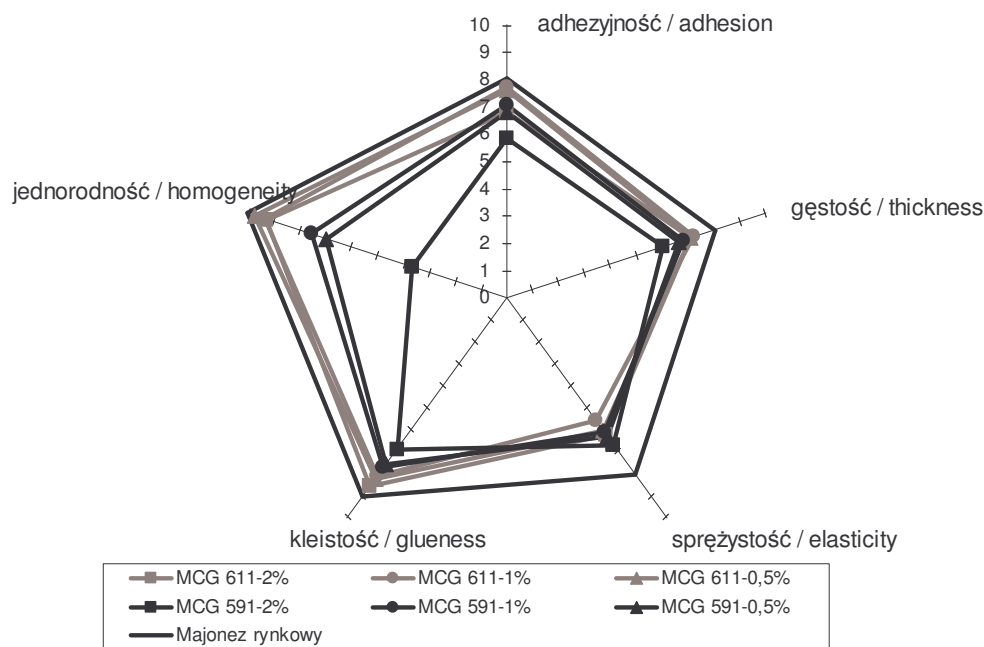
Wszystkie emulsje miały zbliżoną gęstość do majonezu rynkowego, emulsja z MCG 611 odznaczała się najwyższą wartością.

Sprężystość została oceniona we wszystkich emulsjach majonezowych niżej o około 2 pkt w stosunku do majonezu rynkowego.

Kleistość w przypadku emulsji majonezowych o zawartości 30% tłuszczu: najniżej została oceniona próbka MCG 591 – 2%, a najwyższej próbka MCG 611 – 2%.

Jednorodność emulsji z celulozą mikrokrystaliczną Vivapur MCG 611 została ocenione zdecydowanie lepiej niż z celulozą Vivapur MCG 591. Jedna z próbek znacząco różniła się od majonezu rynkowego – o 6 pkt.





Rys. 1. Wyniki oceny sensorycznej konsystencji emulsji majonezowych i majonezu rynkowego o zawartości tłuszczu 30%.

Fig. 1. Results of the sensory assessment of consistence of mayonnaise emulsions and market mayonnaise containing 30% of fat.

Na podstawie przeprowadzonych badań oceny fizykochemicznej i sensorycznej można stwierdzić, że najwyższej oceniono majonez niskotłuszczowy z dodatkiem celulozy MCG 611 w ilości 1%, najniższej natomiast majonez z dodatkiem MCG 591 w ilości 2%.

W drugiej serii przeanalizowano emulsje majonezowe o zawartości tłuszczu 15% z różnymi dodatkami celulozy mikrokrystalicznej, a wyniki tych badań przedstawiono w tab. 3. Lepkość otrzymanych emulsji była wciąż wyższa od lepkości majonezu rynkowego zawierającego 30% tłuszczu. Lepkość po czterech tygodniach przechowywania, podobnie jak w poprzednim etapie, wzrosła w większości prób, tylko w przypadku celulozy Vivapur 611 – 2% zmalała. Stabilność wynosiła 100% we wszystkich próbach.

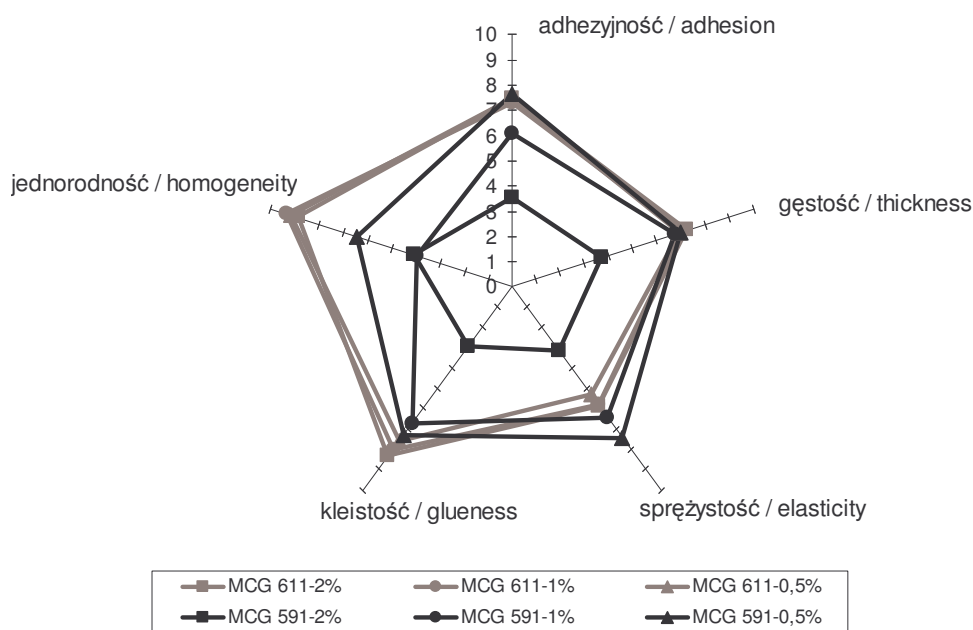
W przypadku oceny sensorycznej (rys. 2) emulsji o 15-procentowej zawartości tłuszczu, podobnie jak emulsji 30-procentowej, niżej zostały ocenione próby z celulozą MCG 591. Emulsja z MCG 591 – 2% różniła się znacznie od reszty prób. Gęstość i kleistość wszystkich prób, za wyjątkiem MCG 591 – 2%, ocenione zostały na podobnym poziomie. Największą adhezyjnością i sprężystością odznaczała się próba MCG 591 – 0,5%, a największą jednorodnością MCG 611 – 1%.

Tabela 3

Parametry fizykochemiczne emulsji majonezowych o zawartości tłuszczu 15% z różnymi dodatkami celulozy mikrokrystalicznej: Vivapur MCG 611 i Vivapur MCG 591.

Physical-chemical parameters of mayonnaise emulsions containing 15% of fat with different additives in the form of microcrystalline cellulose preparations: Vivapur MCG 611 and Vivapur MCG 591.

Parametry Parameters	MCG 611-2%	MCG 611-1%	MCG 611-0,5%	MCG 591-2%	MCG 591-1%	MCG 591-0,5%
Kwasowość ogólna Total acidity [%]	0,16	0,15	0,17	0,14	0,15	0,15
Lepkość po 24 h Viscosity after 24 h [mPa·s 10 <sup>5</sup> ]	3,28	2,66	2,52	3,74	2,13	2,05
Lepkość po 4 tygodniach Viscosity after 4 weeks [mPa·s 10 <sup>5</sup> ]	3,24	3,23	2,86	4,20	3,13	2,60



Rys. 2. Wyniki oceny sensorycznej konsystencji emulsji majonezowych o zawartości tłuszczu 15%.

Fig. 2. Results of the sensory assessment of consistence of mayonnaise emulsions and market mayonnaise containing 15% of fat.

Na podstawie badań fizykochemicznych i oceny sensorycznej drugiej serii można stwierdzić, że najlepiej ocenionym majonezem niskotłuszczowym okazał się majonez z dodatkiem celulozy MCG 611 w ilości 1%, najniżej zaś oceniono majonez z dodatkiem MCG 591 w ilości 2%.

Trzecia seria badań obejmowała uzyskanie emulsji o 5-procentowej zawartości tłuszczu z różnymi dodatkami celulozy mikrokrystalicznej, a wyniki przedstawiono w tab. 4.

Lepkość otrzymanych emulsji majonezowych była wciąż duża i większa od majonezu rynkowego. Tak, jak w poprzednich dwóch seriach, lepkość po 4 tygodniach wzrosła, również w przypadku próby MCG 611 – 2%. Emulsje były stabilne przed i po czterotygodniowym przechowywaniu.

Tabela 4

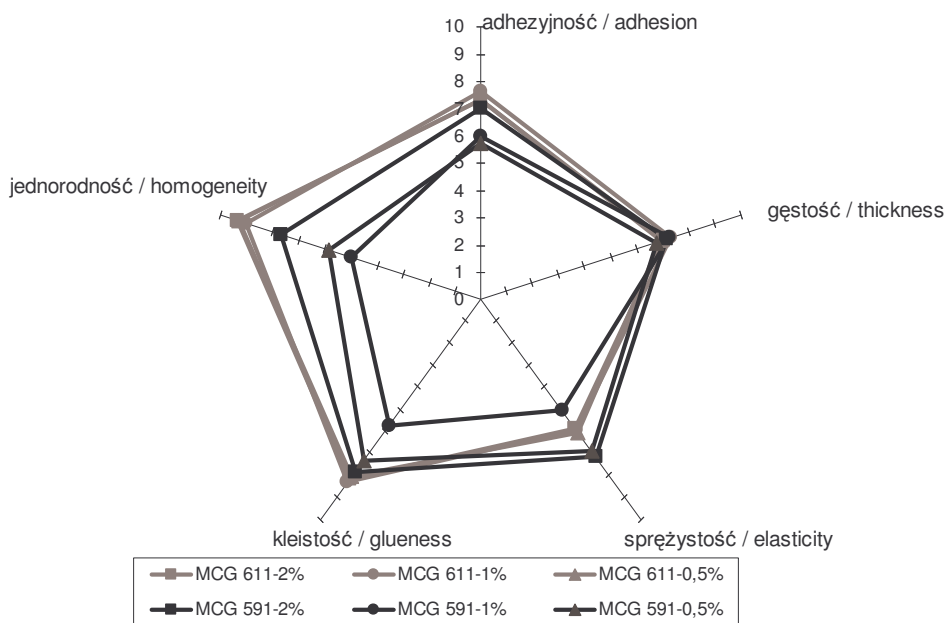
Parametry fizykochemiczne emulsji majonezowych o zawartości tłuszczu 5% z różnymi dodatkami celulozy mikrokrystalicznej: Vivapur MCG 611 i Vivapur MCG 591.

Physical-chemical parameters of mayonnaise emulsions containing 5% of fat with different additives in the form of microcrystalline cellulose preparations: Vivapur MCG 611 and Vivapur MCG 591.

Parametry / Parameters	MCG 611–2%	MCG 611–1%	MCG 611–0,5%	MCG 591–2%	MCG 591–1%	MCG 591–0,5%
Kwasowość ogólna Total acidity [%]	0,16	0,15	0,17	0,15	0,14	0,17
Lepkość po 24 h Viscosity after 24 h [mPa·s 10 <sup>5</sup> ]	3,59	3,03	2,09	3,45	3,03	2,34
Lepkość po 4 tygodniach Viscosity after 4 weeks [mPa·s 10 <sup>5</sup> ]	4,08	3,37	2,59	4,32	3,10	2,58

Sensorycznie (rys. 3) emulsje majonezowe z dodatkiem celulozy Vivapur MCG 611 zostały ocenione lepiej niż te z dodatkiem celulozy Vivapur MCG 591. W przypadku celulozy MCG 611 nie miała znaczenia wielkość tego dodatku. Próby zostały ocenione na tym samym poziomie, niezależnie od ocenianej cechy sensorycznej. Różnice natomiast zaobserwowano w przypadku celulozy MCG 591, najlepiej została oceniona emulsja zawierająca 2% MCG 591, emulsje MCG 591 – 1% i MCG 591 – 0,5% nie różniły się pod względem wyróżników adhezyjności, gęstości i jednorodności.

Na podstawie przeprowadzonych badań fizykochemicznych i oceny sensorycznej można stwierdzić, że w trzeciej serii badań wszystkie majonezy z dodatkiem celulozy MCG 611 wykazywały podobne właściwości. Najniżej ocenionym majonezem był majonez z dodatkiem celulozy MCG 591 w ilości 1%.



Rys. 3. Wyniki oceny sensorycznej konsystencji emulsji majonezowych o zawartości tłuszczu 5%.

Fig. 3. Results of the sensory assessment of consistence of mayonnaise emulsions and market ayonnaise containing 5 % of fat.

## Wnioski

- Otrzymanie stabilnych, dobrej jakości emulsji majonezowych o zawartości tłuszczu 5, 15 i 30% możliwe jest z zastosowaniem celulozy mikrokrystalicznej w ilości 0,5, 1 i 2%, z dodatkiem substancji stabilizującej.
- Celuloza mikrokrystaliczna nadaje dużą lepkość emulsjom majonezowym. Każda emulsja z dodatkiem celulozy mikrokrystalicznej, spośród badanych, charakteryzowała się większą lepkością w stosunku do majonezu rynkowego bez celulozy.
- Stabilność wszystkich emulsji majonezowych z dodatkiem celulozy mikrokrystalicznej wynosiła 100%.
- Sensoryczna ocena konsystencji potwierdziła, że zastosowanie celulozy mikrokrystalicznej w emulsjach majonezowych nadaje pożądaną konsystencję gotowemu wyrobowi. Najlepsze efekty uzyskano przy 1-procentowym dodatku celulozy Vivapur MCG 611.
- Dodatek celulozy Vivapur MCG 591 wpływał na wyższe oceny wyróżników konsystencji w emulsjach o mniejszej zawartości tłuszczu.
- Emulsje majonezowe o zawartości tłuszczu 5 i 15% z dodatkiem celulozy mikrokrystalicznej Vivapur 611 w ilości 1% określono jako najlepsze, natomiast

majonez o najniższej jakości, to majonez z zastosowaniem celulozy Vivapur 591 w ilości 2% przy zawartości tłuszczu 15%.

### Literatura

- [1] Acton J., Saffle R.: Stability of oil/water emulsion. *J. Food Sci.* 1971, **36**, 11-18.
- [2] Grodzka K., Krygier K.: Celuloza i jej pochodne jako dodatki do żywności. *Przem. Spoż.*, 2004, **58** (8), 44-49.
- [3] Guinard J.X., Mazzucchelli R.: The sensory perception of texture and mouthfeel. *Trends Food Sci. Technol.*, 1997, **8** (1), 1-6.
- [4] Humphreys W.M.: Fiber-Based Fat Mimetics: Microcrystalline Cellulose. *Handbook of Fat Replacers*, by CRC Press LLC, 1996, pp. 131-144.
- [5] <http://www.fmcbiopolymer.com/Biopolymer/V2/PopProd/Functionalproperties.html>
- [6] <http://www.fmcbiopolymer.com/Biopolymer/V2/PopProd/Properdispersion.html>
- [7] Matuszewska L., Szczecińska A., Baryłko-Pikielna N.: Przydatność sensorycznej metody profilowej w interpretacji preferencji konsumenckich wybranych produktów. *Żywność. Technologia. Jakość.* 1998, **14** (1), 6-21.
- [8] PN-A-86950: 1995. Majonez.
- [9] PN-ISO 11036: 1999. Analiza sensoryczna. Metodologia. Profilowanie tekstury.
- [10] Pszczola E.D.: High Technology. Taking ingredients to a new level. *Food Technol.*, 1997, **6**, 79-80.
- [11] Reier G.E.: Avicel PH Microcrystalline Cellulose. *FMCBioPolymer*. 1998, pp. 1-6.
- [12] Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K.: *Kompendium dodatków do żywności*. Wyd. Hortimex. Konin 2003, s. 210-223.

### ATTEMPTS TO APPLY MICROCRYSTALLINE CELLULOSE AS A FAT REPLACER IN LOW FAT MAYONNAISE EMULSIONS

#### S u m m a r y

There were three objectives of this study: to assess the usefulness of microcrystalline cellulose applied as a fat replacer to produce in mayonnaise emulsions of a decreased fat content; to determine the impact of this ingredient added on the physical-chemical and sensory properties of low fat mayonnaise emulsions; and to compare emulsions produced with market products with no microcrystalline cellulose added.

Two preparations of microcrystalline cellulose were used: Vivapur MCG 591 and Vivapur MCG 611 manufactured by a company "J. Rettenmaier&Söhne". These preparations differed in the content of sodium carboxymethylcellulose (Vivapur MCG 611: 11,3–18,8% Na – CMC, Vivapur MCG 591: 9–15% Na – CMC). The microcrystalline cellulose was applied in three various doses: 0,5%, 1%, and 2%.

Three types of low fat mayonnaise emulsions were produced using a 'cold method', and their fat content was: 5%, 15% i 30%.

Based on the results of the investigations performed, it was proved that it was possible to produce low fat mayonnaise emulsions with microcrystalline cellulose added. Owing to the addition of microcrystalline cellulose, low fat mayonnaise emulsions got a high viscosity. And the sensory analyse of consistency confirmed that the final product had a required level of consistency when the microcrystalline cellulose had been added to the mayonnaise emulsions. Also, it was proved that the best consistency was obtained when a Vivapur MCG 611 preparation was added and its dose proportion was 1%.

**Key words:** microcrystalline cellulose, fat replacer, low fat mayonnaise, consistency 

STANISŁAW KALISZ, MONIKA KUROWSKA

## ZMIANY ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH I WITAMINY C W SOKACH I PÓLKONCENTRATACH TRUSKAWKOWYCH PODCZAS ICH PRZECHOWYWANIA

### Streszczenie

Celem pracy było określenie zmian wybranych aktywnych biologicznie składników w sokach i półkoncentratach truskawkowych, przechowywanych w temp. 4°C. W obydwu produktach oznaczano zawartość antocyjanów i polifenoli ogółem. W sokach dodatkowo zbadano aktywność przeciwutleniającą DPPH<sup>\*</sup>, a w półkoncentratach zawartość witaminy C. Badaniom poddano produkty z dwóch odmian truskawek: Honeoye, popularnych jako owoc świeży, i z odmiany przemysłowej Senga Sengana.

W sokach z truskawek odmiany Honeoye zawartość antocyjanów bezpośrednio po ich wytworzeniu wynosiła średnio 22,9, a z 'Sengi Sengany' 22,3 mg/100 ml, natomiast polifenoli ogółem odpowiednio 123,2 i 105,8 mg/100 ml. Po 3 miesiącach przechowywania lepszą zachowalność związków antocyjanowych stwierdzono w sokach wyprodukowanych z odmiany przemysłowej. Aktywność przeciwutleniająca soków uzyskanych z truskawek 'Honeoye' wynosiła 14,8 μmola Troloxu/ml zaś w przypadku 'Sengi Sengany' 7,6 μmola Troloxu/ml. Zarówno w przypadku soków, jak i półkoncentratów stwierdzono zróżnicowane zmiany zawartości składników biologicznie czynnych w trakcie ich przechowywania. Badania chromatograficzne zawartości antocyjanów w półkoncentratach uwiaryściły zróżnicowanie stabilności poszczególnych monomerów w czasie, co wpłynęło na tempo zachodzących zmian.

**Słowa kluczowe:** truskawki, soki, półkoncentraty, polifenole, antocyjany, aktywność przeciwutleniająca

### Wprowadzenie

W ostatnich latach można zaobserwować wzrost świadomości żywieniowej społeczeństwa. Konsument coraz częściej przed zakupem uwzględnia nie tylko cenę i cechy wizualne, ale także skład produktu. Nabywcy chcą, aby podczas przetwarzania oraz przechowywania produkt tracił jak najmniej cennych składników, a tym samym wykazywał cechy jak najbardziej zbliżone do surowca, z którego został wytworzony. Do codziennej diety chętniej i częściej włączane są więc soki, nektary i inne produkty owocowe [8].

---

*Dr inż. S. Kalisz, mgr inż. M. Kurowska, Zakład Technologii Owoców i Warzyw, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa*

Przerabianie surowców na zagęszczone soki, które są półproduktem do dalszego przerobu, zmniejsza koszty transportu i przechowywania, a składowanie w odpowiedniej niskiej temperaturze zapewnia wysoką jakość. Ponadto dysponowanie półproduktem jednoskładnikowym pozwala komponować produkty wieloskładnikowych zależnie od potrzeb. Jednakże w przypadku surowców szczególnie wrażliwych na czynniki technologiczne, celem złagodzenia negatywnych skutków obróbki termicznej, koncentrację soków powinno kończyć się na etapie półkoncentratów po uzyskaniu 40–50°Bx.

Takim bez wątpienia mało stabilnym surowcem, a zarazem atrakcyjnym z uwagi na walory sensoryczne, są truskawki. Ostatnio coraz częściej podkreśla się szeroko pojęte aspekty żywieniowe i zdrowotne tych owoców, co związane jest między innymi z obecnością w ich składzie związków polifenolowych. Jak wiadomo, związki te, a zwłaszcza obecne w przeważającej ilości w truskawkach antocyjany, tworzą potencjał przeciwutleniający tych owoców. Antocyjany są jednak związkami labilnymi. Tempo i charakter zmian antocyjanów zależy zarówno od odmiany owoców, jak też zawartości w nich barwników, obecności innych składników, pH środowiska, temperatury [1, 2, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 15, 16].

Celem pracy było określenie zmian wybranych składników aktywnych biologicznie, takich jak związki fenolowe i witamina C, w sokach i półkoncentratkach truskawkowych w trakcie ich przechowywania.

### **Materiał i metody badań**

Materiał badawczy stanowiły, przygotowane w skali laboratoryjnej, soki i półkoncentraty z truskawek. Truskawki odmiany Honeoye pochodziły z okolic Płońska, natomiast 'Senga Sengana' z okolic Grójca. Do odważonej partii owoców dodawano enzym Rohapect 10L firmy AB Enzymes Poland w dawce 100 mg/kg owoców i prowadzono depeptylizację przez 1,5 godz. w temp. 50°C. Następnie miazgę tłoczono w laboratoryjnej prasie warstwowej. Otrzymany sok niezwłocznie rozlewano do słoików o pojemności 200 ml i poddawano pasteryzacji przez 20 min w temp. 90°C. Po obróbce termicznej produkt niezwłocznie chłodzono, a następnie przechowywano przez 3 miesiące w temp. 4°C. Soki z każdej odmiany truskawek pobierano do badań co 30 dni, a analizy przeprowadzano w 3 powtórzeniach.

W przypadku otrzymywania półkoncentratów owoce analogicznie depeptylizowano enzymem Rohapect 10L w dawce 100 mg/kg owoców przez 1,5 godz. w temp. 50°C. Zdepeptylizowaną miazgę tłoczono w laboratoryjnej prasie warstwowej, a otrzymany sok doprowadzano do wrzenia w kuchence mikrofalowej celem inaktywacji enzymów. Następnie sok schładzano, poddawano zagęszczaniu w wyparce próżniowej firmy Büchi i normalizowano do zawartości ekstraktu 40%. Otrzymany półkoncentrat rozlewano do słoików o pojemności 15 ml i przechowywano w warunkach chłodniczych w temp. 4°C. Próbkę produktów z obu odmian truskawek pobierano do badań co 14 dni, a analizy przeprowadzano w 3 powtórzeniach.



Zawartość antocyjanów ogółem w sokach oznaczano metodą Francisa i Fuleki [3]. Pomiar zawartości antocyjanów w półkoncentratkach prowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w zestawie firmy Shimadzu, składającym się z detektora UV-VIS SPD-10A VP, pompy LC-10AT VP, pieca CTO-10AS VP, degazera DEGASEX™ model DG-400 (firmy Phenomenex), współpracującego z programem do zbierania danych Chromax 2003. Rozdział prowadzono z zastosowaniem kolumny Luna 5  $\mu\text{m}$  C18(2) 250 x 4,6 mm firmy Phenomenex. Analizy wykonywano metodą izokratyczną przy przepływie 1 ml/min. Temp. termostatowania kolumny wynosiła 25°C. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina woda : acetonitryl : kwas mrówkowy (810:90:100; v/v/v). Rejestrację widma prowadzono przy 520 nm. Zawartość antocyjanów podawano w przeliczeniu na Cy-3-glukozyd. Zawartość witaminy C w półkoncentratkach prowadzono metodą HPLC w identycznym zestawie w tych samych warunkach detekcji przy 254 nm, a jako eluent stosowano 0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Próbkę do oznaczeń HPLC oczyszczano w minikolumnach Sep-Pak C18 firmy Waters. W tym celu 1 g próbki koncentratu przenoszono do kolbki o poj. 10 ml i uzupełniano 0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a następnie наносzono na szczyt kolumny Sep-Pak. Po odrzuceniu pierwszych 5 ml resztę zbierano do oznaczania witaminy C. Następnie wprowadzano 5 ml 0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  wymycia związków nieabsorbujących się w złożu. Pozostałą na minikolumnie frakcję wymywano 50% metanolem zakwaszonym HCl w ilości 1 ml/l i zbierano ją do tej samej kolbki, a następnie używano do oznaczenia zawartości antocyjanów.

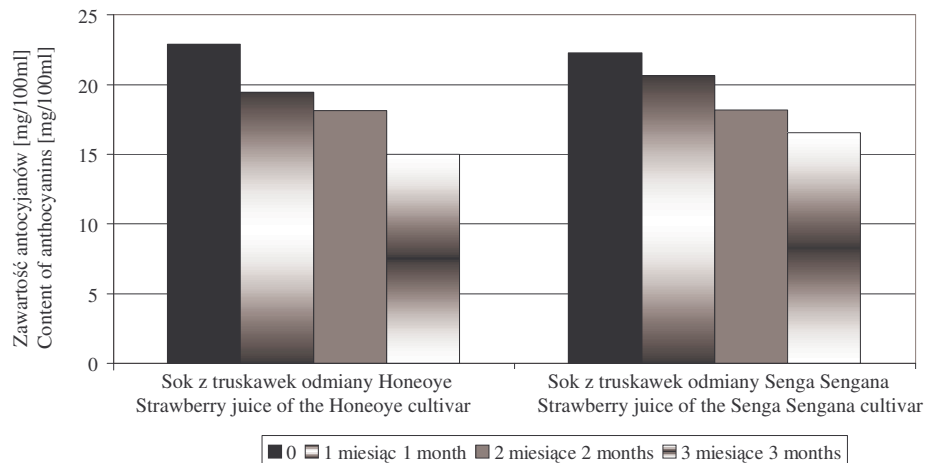
Część analityczna obejmowała także oznaczanie zawartości polifenoli ogółem metodą Folina-Ciocalteu'a [9], wyrażając wynik w przeliczeniu na kwas galusowy. W sokach badano aktywność przeciwnadrodnikową wobec wolnych rodników 2,2 difenyl-1-pikrylhydrazylowych (DPPH<sup>\*</sup>) metodą Yena oraz Chena [17], a ubytek rodników DPPH<sup>\*</sup> obliczano na podstawie krzywej wzorcowej.

## Wyniki i dyskusja

W próbkach soków otrzymanych z truskawek odmiany Honeoye bezpośrednio po produkcji stwierdzono 22,9 mg antocyjanów w 100 ml soku. Z kolei soki z truskawek odmiany Senga Sengana zawierały 22,3 mg antocyjanów w 100 ml soku (rys. 1).

Podczas przechowywania soków w warunkach chłodniczych obserwowano zmniejszenie zawartości badanych związków w sokach z obydwu odmian truskawek. Po 3-miesięcznym przechowywaniu w warunkach chłodniczych (4°C) w sokach z owoców odmiany Honeoye pozostało 66% wyjściowej ilości antocyjanów. Nieco mniejsze straty badanych związków odnotowano w sokach uzyskanych z odmiany przemysłowej Senga Sengana, w których zachowalność antocyjanów po 3 miesiącach wyniosła blisko 74%.



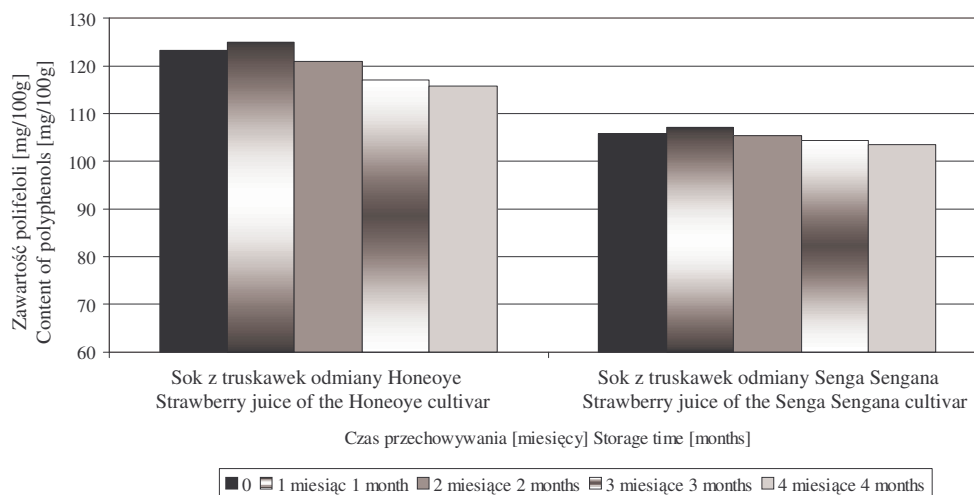


Rys. 1. Zmiany zawartości antocyjanów w sokach truskawkowych w trakcie przechowywania.  
 Fig. 1. Changes in the content of anthocyanins in strawberry juices during their storage.

Dokonując analizy uzyskanych wyników zaobserwowano, że w sokach z truskawek odmiany Senga Sengana nie tylko ubytek antocyjanów był łagodniejszy, ale ponadto ich straty w poszczególnych okresach były bardziej równomierne, wynosząc w skali miesiąca około 9%. W przypadku soków z truskawek odmiany Honeoye opisywanej prawidłowości nie odnotowano. Przypuszczalnie było to związane między innymi ze zróżnicowaną stabilnością poszczególnych antocyjanów, co potwierdzają wyniki uzyskane w dalszej części badań prowadzonych na półkoncentratach, gdzie śledzono także zmiany w składzie jakościowym tych związków. Jednakże w celu ugruntowania słuszności tej tezy konieczne są dalsze, kilkuletnie badania większej liczby odmian truskawek. Kierunek i charakter zmian antocyjanów zależy bowiem od wielu czynników. Wymienić tu można poziom ich zawartości w surowcu, warunki środowiskowe, rodzaj samego związku, stopień dojrzałości surowca, odmianę czy też warunki klimatyczne przy wzroście [4, 10, 11, 13].

Antocyjany są jednymi z wielu związków zaliczanych do grupy substancji biologicznie czynnych i nie powinny być rozpatrywane samodzielnie, w związku z czym dokonano również pomiaru zawartości polifenoli ogółem. Związki polifenolowe decydują zarówno o cechach sensorycznych żywności, jak i wpływają na jej potencjał przeciwutleniający, a zarazem stanowią podstawową grupę naturalnych związków przeciwutleniających [1, 14].

Badane bezpośrednio po produkcji soki z owoców odmiany Honeoye zawierały 123,2 mg związków polifenolowych w 100 ml soku, zaś z odmiany Senga Sengana 105,8 mg/100 ml (rys. 2).



Rys. 2. Zmiany zawartości polifenoli ogółem w sokach truskawkowych w trakcie przechowywania.  
Fig. 2. Changes in the content of polyphenols in strawberry juices during their storage.

Trzymiesięczne przechowywanie w warunkach chłodniczych zasadniczo nie obniżyło zawartości badanych związków, co świadczy o ich stabilności w niskiej temperaturze. Po miesiącu przechowywania zaobserwowano nieznaczny wzrost zawartości polifenoli, później już utrzymywała się stała tendencja malejąca. Efekt wzrostu ilości związków polifenolowych w czasie był już obserwowany między innymi w badaniach prowadzonych przez Ayala-Zavale i wsp. [1]. Zaistniały stan rzeczy przypuszczalnie wiąże się z tym, że sok nie był poddany filtracji, wskutek czego w pierwszym okresie składowania doszło do wytrącania się osadu. Powstałe w ten sposób związki mogły następnie wpłynąć na wynik oznaczenia podnosząc ogólną zawartość polifenoli. Stosowany w metodzie chemicznej oznaczania polifenoli ogółem odczynnik Folina-Ciocalteu'a reaguje nie tylko z polifenolami, ale także z innymi zawartymi w układzie biologicznym związkami, jak np. z witaminą C, aminokwasami, białkami. Produkty przemian antocyjanów i pozostałych substancji, zachodzących w czasie przechowywania, mogą bowiem wchodzić w reakcje z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a, a zaistniałe zmiany mają w większej mierze charakter jakościowy niż ilościowy.

Uwzględniając ścisły wpływ polifenoli, w tym antocyjanów, na aktywność przeciwutleniającą, przeprowadzono pomiar zdolności wiązania wolnych rodników DPPH<sup>\*</sup> (tab. 1). Soki uzyskane z truskawek odmiany Honeoye wykazywały aktywność przeciwutleniającą 14,8  $\mu$ moli Troloxu/ml próbki, zaś soki z truskawek odmiany Senga Sengana 12,2  $\mu$ moli Troloxu/ml próbki.

Tabela 1

Aktywność przeciwutleniająca soków truskawkowych w trakcie ich przechowywania.  
The antioxidant activity in strawberry juices during their storage.

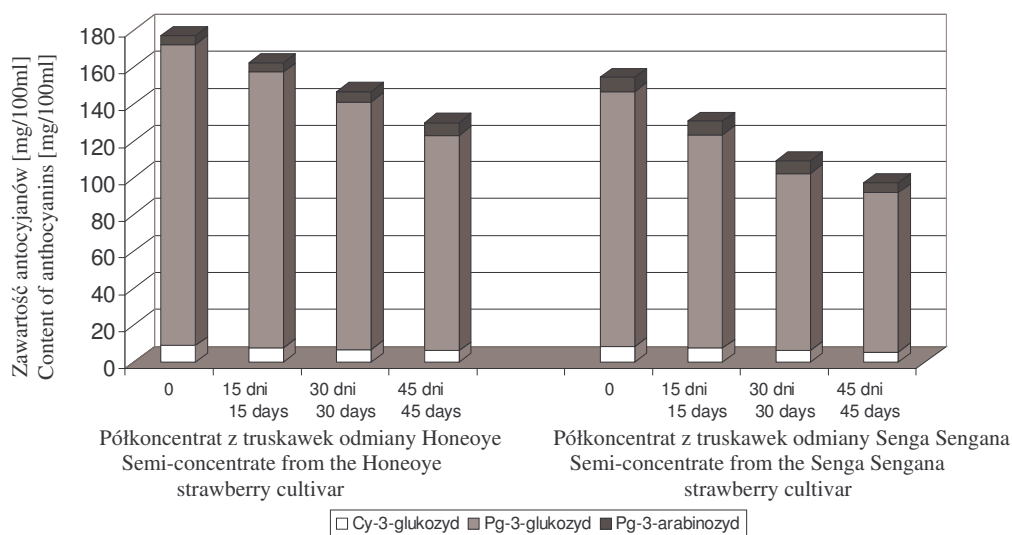
Czas przechowywania [miesiące] Period of storing [months]	Aktywność przeciwutleniająca [ $\mu$ mole Troloxu /ml próbki] Antioxidant activity [ $\mu$ moles of Trolox eq./1 ml of samples]	
	Sok z truskawek odm. Honeoye Juice from Honeoye strawberry cultivar	Sok z truskawek odm. Honeoye Juice from Honeoye strawberry cultivar
0	14,9	12,2
1	11,5	9,6
2	10,6	8,3
3	8,1	7,6

W obydwu rodzajach soków nastąpiło zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej w trakcie przechowywania. Jednak analogicznie, jak w przypadku antocyjanów, w sokach z przemysłowej odmiany truskawek (Senga Sengana) tempo niekorzystnych zmian było wolniejsze, a ich charakter bardziej uporządkowany. Aktywność przeciwutleniająca truskawek związana jest przede wszystkim z bogactwem składników polifenolowych [1, 11, 12, 16]. Jak podają Stewart i wsp. [12], za potencjał przeciwutleniający truskawek w około 40÷50% odpowiadają katechiny, do 40% kwas askorbinowy, do 20% antocyjany, zaś pozostałą aktywność przypada na flawony i flawonole.

Drugi z przeprowadzonych eksperymentów obejmował produkcję i ocenę półkoncentratów truskawkowych o ekstrakcie 40%. W otrzymanym produkcie dokonano analizy ilościowego i jakościowego składu antocyjanowego. Półkoncentraty z truskawek odmiany Honeoye zawierały 177,0 mg antocyjanów/100 g produktu, natomiast wyprodukowane z owoców 'Senga Sengana' 154,5 mg/100 g (rys. 3). Dominującym monomerem był pelargonidyno-3-glukozyd, który w półkoncentracie z odmiany deserowej stanowił 92,4%, a w odmianie przemysłowej 89,6% ogólnego składu antocyjanowego. Cyjanidyno-3-glukozyd w otrzymanych półkoncentratach z truskawek odmian Honeoye i Senga Sengana stanowił odpowiednio 5,0 i 5,4%, natomiast pelargonidyno-3-arabinozyd 2,6 i 5,0%.

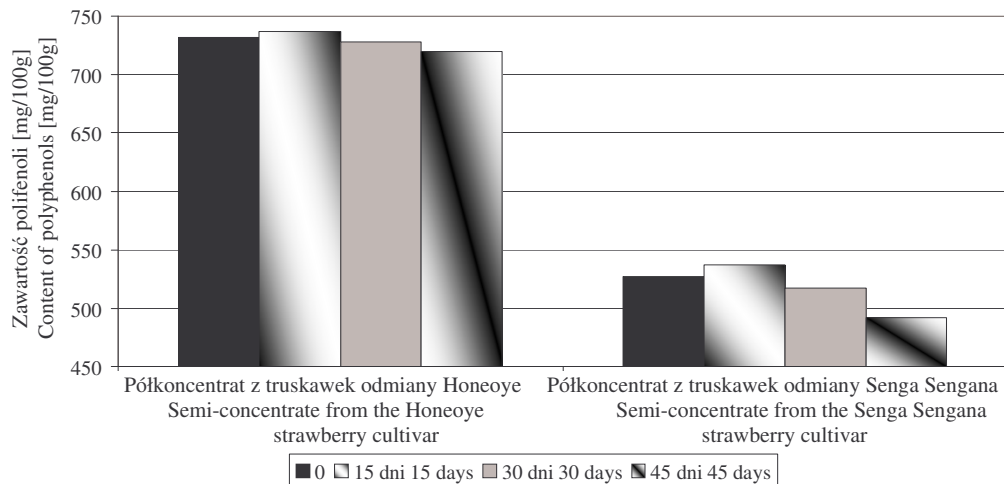
Po 6 tygodniach przechowywania w temp. 4°C w półkoncentratach z truskawek odmiany deserowej pozostało 73,4% wyjściowej zawartości antocyjanów, natomiast w półkoncentratach z odmiany Senga Sengana 63,0%. Zaobserwowano także, że w półkoncentratach z truskawek 'Senga', ubytki antocyjanów w skali miesiąca przekraczały straty stwierdzone z truskawek 'Honeoye', a w początkowym okresie składowania różnice szybkości negatywnych zmian w tym zakresie były blisko dwukrotne. W miarę upływu czasu tempo niepożądanych przemian w tym zakresie zrównywało się. Przypuszczalnie taki charakter przemian związany był z różnicami w zawartości substancji towarzyszących oraz wynikał z różnej stabilności

poszczególnych antocyjanów. W obydwu rodzajach badanych półkoncentratów następowało zmniejszenie udziału pelargonidyno-3-glukozydu przy jednoczesnym wzroście udziału pelargonidyno-3-arabinozydu, co było szczególnie wyraźne w przypadku zagęszczonych soków z truskawek 'Honeoye'. Ilość cyjanidyno-3-glukozydu w ogólnym składzie antocyjanowym w badanym okresie wykazywała również tendencję spadkową. Jak podają inni autorzy [1, 11, 14], wzajemny stosunek różnych antocyjanów jest bardzo istotny zarówno ze względu na zróżnicowaną ich stabilność, jak i istnienie ścisłych zależności pomiędzy zawartością i udziałem poszczególnych monomerów antocyjanowych truskawek a ich barwą. Ponadto zdolność przeciwutleniająca antocyjanów jest uważana za jedną z najważniejszych ich właściwości biologicznych.



Rys. 3. Zmiany zawartości antocyjanów w półkoncentraty truskawkowych w trakcie przechowywania.  
Fig. 3. Changes in the content of anthocyanins in strawberry semi-concentrates during their storage.

Zawartość polifenoli ogółem w półkoncentraty z truskawek odmiany Honeoye wynosiła 731,5 mg/100 g, zaś z odmiany Senga Sengana 527,3 mg/100 g (rys. 4). Analogicznie, jak w przypadku soków, zmiany ilościowe tych związków w czasie były nieznaczne. Przymuszczenie użycie jako materiału wyjściowego soków nieklarowanych w efekcie doprowadziło do przemian o charakterze jakościowym. Wyjaśnienie tego problemu wymaga kontynuowania prac badawczych z zastosowaniem selektywniejszych metod badawczych. Dopiero dokładniejsze przeanalizowanie tych aspektów, a także uwzględnienie zmienności materiału badawczego pozwoli na sformułowanie zadowalających wniosków.

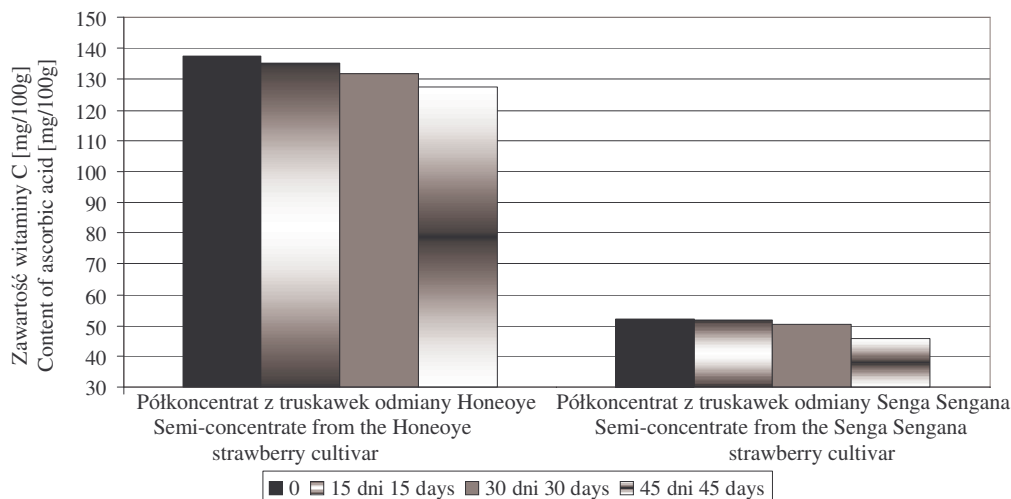


Rys. 4. Zmiany zawartości polifenoli ogółem w półkoncentraty truskawkowych w trakcie przechowywania.

Fig. 4. Changes in the content of polyphenols in semi-concentrates strawberry concentrates during storage.

W półkoncentratach bezpośrednio po produkcji stwierdzono 137,3 i 52,3 mg/100 g witaminy C odpowiednio w produktach z truskawek odmian Honeoye i Senga Sengana (rys. 5). Przechowywanie półkoncentratów przez okres 6 tygodni w temp. 4°C spowodowało niewielki spadek zawartości witaminy C, co jest korzystne zarówno ze względu na aspekt żywieniowy, jak i fakt, że związek ten w dużej mierze decyduje o właściwościach przeciwutleniających. Jak podają Stewart i wsp. [12], w przypadku truskawek aktywność pochodząca od witaminy C stanowi do 40% ogólnych właściwości przeciwutleniających. Po 6 tygodniach przechowywania, zawartość witaminy C w półkoncentratach wyprodukowanych z truskawek odmiany Honeoye wyniosła 92,8%, a z 'Sengi Sengany' 87,6% wartości stwierdzonej bezpośrednio po produkcji. Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność przechowywania w niskiej temperaturze produktów, które zawierają składniki mało stabilne.

Obecność witaminy C w przetworach owocowych jest ważna ze względu na aktywność witaminową i przeciwutleniającą. Jednak w wyniku obecności produktów rozkładu antocyjanów lub na drodze nieenzymatycznego utleniania może ona intensyfikować rozkład tych barwników. Ponadto, jeżeli stężenie kwasu askorbinowego będzie przewyższać stężenie antocyjanów, wówczas witamina C może intensyfikować ich degradację [4, 6, 7, 10].



Rys. 5. Zmiany zawartości witaminy C w półkoncentraty truskawkowych w trakcie przechowywania.  
 Fig. 5. Changes in the content of ascorbic acid in strawberry semi-concentrates during their storage.

## Wnioski

1. Zmniejszenie zawartość antocyjanów w trakcie przechowywania soków truskawkowych bezpośrednio wiąże się ze zmianami zdolności unieczynniania rodników DPPH<sup>•</sup>.
2. Zmiany antocyjanów w koncentraty mają charakter zarówno ilościowy, jak i jakościowy, co wynika z różnej stabilności poszczególnych monomerów. Tempo i rodzaj tych przemian jest odmienny w przypadku różnych odmian truskawek.
3. Złożony skład soków i koncentratów wymaga dalszych szczegółowych badań, które pozwolą oszacować wpływ poszczególnych substancji zawartych w tym materiale na ich potencjał przeciwutleniający.

## Literatura

- [1] Ayala-Zavala J.F., Wang S.Y., Wang C.Y., Gonzalez-Aguilar G.A.: Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebens.-Wiss. u.-Technol.*, 2004, **37**, 687-695.
- [2] Andersen Ø.M., Fossen T., Torskangerpoll K., Fossen A., Hauge U.: Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochem.*, 2004, **65**, 405-410.
- [3] Fuleki T., Francis F.J.: Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.*, 1968, **33**, 72.
- [4] Garzon G. A., Wrolstad R. E.: Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. *J. Food Sci.*, 2002, **67**, **4**, 1288-1299.
- [5] Heinonen, M., Meyer, A.S., Frankel, E.N.: Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4107-4112.

- [6] Kalisz B., Kalisz S., Oszmiański J.: Wpływ flawonów tarczycy bajkalskiej na aktywność przeciwutleniającą i stabilizację antocyjanów oraz barwy kompotów i dżemów truskawkowych. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2004, **3** (1), 73-83.
- [7] Kalt W., Forney C.F., Martin A., Prior R.L.: Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4638-4644.
- [8] Nosecka B., Bugała A., Mierwiński J., Strojewska I., Szczepaniak I., Świetlik J.: Rynek owoców i warzyw. Stan i perspektywy. IERiGŻ, Warszawa 2004, s. 25.
- [9] Peri C., Pompei G.: An assay of different phenolic fractions in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1971, **22**, 2, 55.
- [10] Skrede G., Wrolstad R.E., Lea P., Enersen G.: Colour stability of strawberry and black currant syrups. *J Food Sci.*, 1999, **57**, 172.
- [11] Skupień K., Oszmiański J.: Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *Eur Food Res Technol.*, 2004, **219**, 66-70.
- [12] Stewart D., Deighton N., Davies H. V.: Antioxidants in soft fruit. <http://www.scri.sari.ac.uk/Document/AnnReps/01Indiv/15Antiox.pdf>. *Plant Biochem. Cell Biol.*, 94-98.
- [13] Sturma K., Koronb D., Stampara F.: The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. *Food Chem.*, 2003, **83**, 417-422.
- [14] Wang H., Cao G., Prior R.L.: Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 701-705.
- [15] Wang, S.Y., Lin, H.S.: Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48**, 140-146.
- [16] Wang S.Y., Zheng W.: Effect of plant growth temperature and antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 4977-4982.
- [17] Yen G-C, Chen H-Y: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 27-32.

#### CHANGES IN THE CONTENT OF POLYPHENOLS AND ASCORBIC ACID IN STRAWBERRY JUICES AND SEMICONCENTRATES DURING THEIR STORAGE

##### S u m m a r y

The objective of this study was to determine changes in some selected bio-active components of strawberry juices and half-concentrates stored at a temperature of 4°C. The contents of anthocyanins and polyphenols were measured in two products investigated. Additionally, the antioxidant activity of DPPH<sup>•</sup> was determined in juices, and the content of ascorbic acid in semi-concentrates. The investigation included products from two strawberry cultivars: Honeoye, which is a very popular fresh fruit, and Senga Sengana – an industrial cultivar.

Immediately upon the production, juices produced from the Honeoye cultivar contained, averagely, 22,9 mg/100 ml of anthocyanins, and from the Senga Sengana cultivar: 22,3 mg/100 ml; the content of total polyphenols was 123,2 and 105, 8 mg/100 ml, respectively. It was stated that the stability of anthocyanins was better in juices produced from the industrial cultivar, after they have been stored for 3 months. The antioxidant activity of juices produced from the Honeoye strawberries was 14,8 μmol of Trolox/1ml of juice, and it was 7,6 μmol of Trolox/1ml of juice in the juices from the Senga Sengana cultivar. Diverse changes in the content of bioactive components, active while storing juices, were found both in juices and in semi-concentrates under investigation. The chromatography analyses of the anthocyanins contents in semi-concentrates showed a time-dependent differentiation of the stability of individual monomers, and this differentiation impacted the rate of changes occurring.

**Key words:** strawberries, juices, semi-concentrates, polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity 

PATRYCJA KŁOS, ELEONORA LAMPART-SZCZAPA

**CYTOMETRYCZNA OCENA APOPTOZY NA PODSTAWIE  
POMIARU AKTYWNOŚCI KASPAZ JAKO METODA ANALIZY  
ODDZIAŁYWAŃ BIAŁEK ŁUBINU WĄSKOLISTNEGO (*LUPINUS  
ANGUSTIFOLIUS*, ODMIANA BARON) NA UKŁAD  
IMMUNOLOGICZNY CZŁOWIEKA**

Streszczenie

Białko łubinowe, ze względu na dużą wartość odżywczą i funkcjonalność, znajduje coraz szersze zastosowanie w żywieniu człowieka. Czynnikiem ograniczającym wykorzystanie protein łubinu jako składnika żywności może być jego niekorzystne oddziaływanie na komórki układu immunologicznego człowieka.

W celu zbadania tego wpływu przeanalizowano białka łubinu (*L. angustifolius*, odmiana Baron) w celu sprawdzenia ich zdolności do indukowania apoptozy w populacji hodowlanej ludzkich limfocytów, wykorzystując metodę cytometrycznego pomiaru aktywności kaspaz.

Materiał do założenia hodowli stanowiły limfocyty wyizolowane z krwi osoby atopowej. Komórki hodowlane poddano działaniu odpowiednio: induktora apoptozy (fitohemaglutyniny roślinnej, PHA) oraz ekstraktu białka łubinowego. Po upływie 48 h od momentu założenia hodowli dokonano cytometrycznego pomiaru poziomu apoptozy poprzez ocenę aktywności kaspaz w populacji komórek hodowlanych.

Wykazano podwyższoną, w stosunku do próby kontrolnej, aktywność kaspazową w limfocytach, którym podano ekstrakt białka łubinowego. Uzyskane wyniki dowodzą zdolności badanych białek łubinowych do indukowania apoptozy (wzmóżonej aktywności kaspaz) w hodowli ludzkich limfocytów.

**Słowa kluczowe:** łubin, białka, apoptoza, kaspazy, limfocyty, cytometria

## Wprowadzenie

Łubin, jako źródło białka, zyskuje obecnie coraz szersze znaczenie w żywieniu człowieka [6]. Białko nasion łubinu charakteryzuje się dużą wartością odżywczą i funkcjonalnością porównywalną z białkiem sojowym.



Czynnikiem ograniczającym wykorzystanie łubinu jako składnika żywności może być stwierdzona niedawno zdolność zawartych w nim białek do wpływania na odpowiedź układu immunologicznego człowieka [3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15]. W literaturze dostępne są doniesienia na temat występowania objawów reakcji alergicznej, w tym również tak niebezpiecznych, jak szok anafilaktyczny po spożyciu produktów zawierających dodatek białek łubinu [5, 7, 8, 9, 11, 14, 15] lub inhalacji pyłu pochodzącego z mąki łubinowej [3, 12]. Ponadto stwierdzono, że istnieje zagrożenie wystąpieniem reakcji krzyżowych pomiędzy alergenami pochodzącymi z łubinu oraz z orzeszków ziemnych [1, 4, 8, 9] czy soi [1].

Niebezpieczeństwo może stanowić również fakt, że łubin, jak pozostałe rośliny strączkowe, wykazuje zdolność akumulacji metali ciężkich, w tym niklu [13], które mogą działać jako tzw. hapteny i w ten sposób stymulować odpowiedź układu immunologicznego.

Innego rodzaju wpływem na układ odpornościowy może być zdolność pewnych substancji do indukowania apoptozy limfocytów [10]. Jak dotąd, w literaturze brak danych na temat wykazywania takich właściwości przez białka łubinowe czy też doniesień o próbach wykonania sprawdzających je testów.

W niniejszej pracy przeprowadzono badania pilotażowe, których celem było uzupełnienie charakterystyki białek łubinowych poprzez sprawdzenie ich zdolności do indukowania apoptozy ludzkich limfocytów. Do oceny takich właściwości łubinowych protein po raz pierwszy zastosowano metodę cytometrycznego pomiaru aktywności kaspaz.

### **Materiały i metody badań**

Materiał doświadczalny stanowiły rozdrobnione w warunkach laboratoryjnych i pozbawione łuski nasiona łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*, odmiana Baron), z których ekstrahowano białko.

Materiał do założenia hodowli stanowiły limfocyty izolowane z krwi (pobranej w Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Poznaniu) osoby (kobieta, lat 59) cierpiącej na alergię z powodu długotrwałego zawodowego kontaktu z łubinem. Symptomy alergii u tej kobiety (objawy nosowo-spojówkowe, duszność wdechowa i wydechowa, OAS, objawy ogólne) pojawiały się wskutek wdychania pyłu z rozdrobnionych nasion łubinu, jak również spożywania produktów z jego dodatkiem. U badanej osoby nie występowały reakcje alergiczne w dzieciństwie ani wcześniej w życiu dorosłym. Testy skórne wykazały słabo dodatnią (+) odpowiedź na groszek zielony. Wyniki testów komercyjnych były ujemne.

Poszczególne etapy doświadczenia to: ekstrakcja białek łubinu, izolacja limfocytów z krwi, założenie hodowli komórkowej oraz cytometryczny pomiar apoptozy.

Na badania z wykorzystaniem materiału ludzkiego uzyskano pozwolenie Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Poznaniu.

#### *Ekstrakcja białek łubinu*

Preparat łubinowy (1 g) zawieszano w 6 ml buforu Tris- HCl (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 500 mM NaCl). Po dokładnym wymieszaniu zawiesinę inkubowano 0,5 h w temp. 4°C, a następnie wirowano (Hermle Z400K) przez 20 min, przy 400 x g. Do supernatantu dodawano 4 M siarczan(VI) amonu do końcowego stężenia 0,2 M. Roztwór umieszczano na 30 min w kuwecie z lodem. Po upływie tego czasu roztwór wirowano przez 20 min, przy 10000 x g. W supernatancie oznaczano stężenie białka metodą Bradford [2]. Otrzymany ekstrakt białkowy oczyszczano, stosując filtry mikrobiologiczne Millex-GV o średnicy porów 0,2 µm (Millipore). Tak przygotowany ekstrakt białkowy przechowywano w temp. 4°C, nie dłużej niż jeden miesiąc.

#### *Izolacja limfocytów*

Krew, w ilości 10 ml, pobierano jałowo do probówek typu S-Monovette (Sarstedt) zawierających kryształki heparyny litowej. Wszystkie etapy izolacji limfocytów wykonywano przy stole o laminarnym przepływie powietrza (Microflow Microsafe SL).

Pobraną krew przenoszono do probówek wirówkowych (Blue Max™ Jr. Polypropylene Conical Tube), (Becton-Dickinson Labware) i rozcieńczano medium hodowlanym (D-MEM), (Gibco) w stosunku 1:1, dodając gentamycynę (Polfa Tarchomin) do stężenia końcowego 40 µg/ml. Tak przygotowaną mieszaninę podwarstwiano za pomocą igły punkcyjnej, roztworem gradientowym (Gradisol L), (Aqua Medica) w stosunku 3:1 i wirowano przez 30 min przy 400 x g (Hermle Z400K). Wyodrębnioną po wirowaniu warstwę limfocytów (interfaza) zbierano delikatnie i zawieszano w 5 ml płynu Hanksa (HBSS), (Gibco), wzbogaconego gentamycyną, o stężeniu końcowym 40 µg/ml. Mieszaninę wirowano przez 10 min, przy 400 x g. Osad limfocytów zawieszano w 5 ml 0,9% NaCl i wirowano przez 10 min przy 300 x g. Osad komórek ponownie zawieszano w 5 ml 0,9% NaCl, po czym ustalano liczbę wyizolowanych limfocytów, zliczając je za pomocą cytometru przepływowego (Cyturon Absolute), (Ortho Diagnostic Systems, A Johnson&Johnson Company). Mieszanina przygotowana do liczenia komórek zawierała 100 µl limfocytów zawieszonych w 0,9% NaCl oraz 400 µl płynu lizującego (Ortho Diagnostic Systems, A Johnson&Johnson Company). Zawiesinę wyizolowanych limfocytów rozcieńczano do stężenia 2 mln komórek/ml za pomocą D-MEM wzbogaconego gentamycyną (końcowe stężenie 40 µg/ml) i surowicą z dziesięciodniowych cieląt (NCS), (Gibco) o końcowym stężeniu 10%. Tak przygotowane limfocyty stanowiły materiał do założenia hodowli.

### *Założenie hodowli limfocytów*

Hodowlę prowadzono w jałowych płytkach 96-dołkowych, płaskodennych (TC plates, flat bottom), (Sarstedt). W fazie początkowej do każdego dołka dodawano po 100  $\mu$ l przygotowanej wcześniej zawiesiny limfocytów o stężeniu 2 mln komórek/ml oraz odpowiednio: A – 100  $\mu$ l fitohemaglutyniny roślinnej (PHA), (Wellcome) rozpuszczonej w D-MEM, do stężenia końcowego 10  $\mu$ g/ml (kontrola pozytywna); B – 100  $\mu$ l ekstraktu białka łubinowego, rozpuszczonego w D-MEM, do stężenia końcowego 10  $\mu$ g/ml (próba badana); C – 100  $\mu$ l D-MEM (kontrola negatywna). Tak przygotowane płytki umieszczano w inkubatorze do hodowli komórkowych (CO<sub>2</sub> Incubator), (ASSAB Medicin AB). Hodowlę prowadzono przez 48 h, przy nasyceniu powietrza 5% CO<sub>2</sub>, w temp. 37°C. Doświadczenie wykonywano trzykrotnie w każdym wariancie.

### *Cytometryczny pomiar apoptozy*

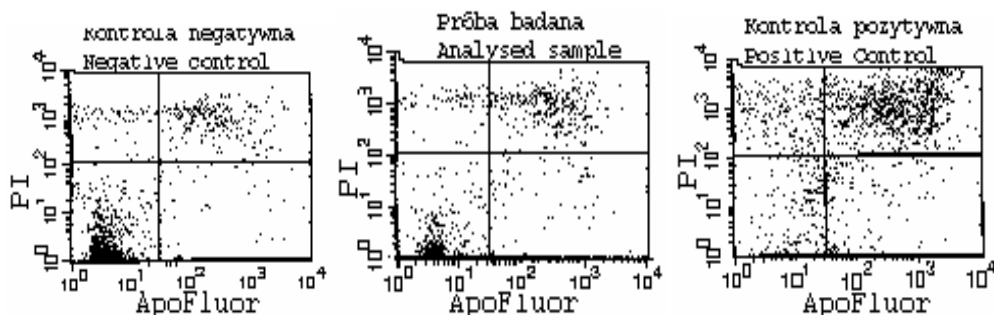
Podczas analizy cytometrycznej korzystano z zestawu do detekcji apoptozy z zastosowaniem barwienia dwukolorowego (ApoFluor<sup>R</sup> Green Apoptosis Detection Kit), (ICN Biomedicals). Po 48 h od momentu rozpoczęcia hodowli zawiesinę komórkową (po 300  $\mu$ l z każdego wariantu doświadczenia) przenoszono do sterylnych tub. Do każdej z nich dodawano po 10  $\mu$ l barwnika 30X ApoFluor Green, po czym mieszano, delikatnie obracając tuby. Wybarwianą zawiesinę komórek pozostawiano przez 1 h (bez dostępu światła) w inkubatorze do hodowli komórkowych, przy nasyceniu powietrza 5% CO<sub>2</sub>, w temp. 37°C. W celu wymieszania zawartości tub dwukrotnie przerywano okres inkubacji. Po 1 h do zawiesiny komórkowej dodawano 2 ml 1X buforu myjącego. Próby starannie mieszano, a następnie wirowano przy 400 x g przez 5 min. Supernatant usuwano, a komórki zawieszano, dokładnie rozbijając osad, w 1 ml 1X buforu myjącego i powtarzano etap płukania. Po drugim płukaniu do komórek dodawano 400  $\mu$ l 1X buforu myjącego, a następnie 2  $\mu$ l PI (jodku propidionowego) i mieszano kilkakrotnie obracając tuby. Próby pozostawiano przez 1 h bez dostępu światła w kuwecie z lodem, po czym mierzono aktywność kaspazową wybarwionych komórek z wykorzystaniem cytometru przepływowego.

### **Wyniki i dyskusja**

Wykonywane badania miały na celu scharakteryzowanie immunogennych właściwości łubinowych protein poprzez sprawdzenie ich zdolności do indukowania apoptozy ludzkich limfocytów. Zastosowana, pierwszy raz w odniesieniu do łubinu, metoda umożliwiła sprawdzenie poziomu apoptozy komórek po podaniu badanego ekstraktu białka łubinowego poprzez ocenę aktywności kaspaz.

W przeprowadzonych analizach wykazano prawie dwukrotnie wyższą, w stosunku do próby kontrolnej, aktywność kaspazową wśród limfocytów, którym

podano ekstrakt białka łubinowego (rys. 1 i 2). Stwierdzono również przeszło trzykrotnie słabszą aktywność kaspaz w komórkach poddanych działaniu łubinowych protein niż w limfocytach, którym podano fitohemaglutyninę roślinną (PHA) (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Ogólny obraz populacji limfocytów hodowlanych.

Fig. 1. Overall view of events in a lymphocyte culture.

Cytogramy:

Część dolna prawa wykresu – odsetek komórek żywych, w których zaobserwowano wzmożoną aktywność kaspaz (indukcja apoptozy); część dolna lewa wykresu – komórki żywe, niewykazujące aktywności kaspazowej;

Część górna prawa wykresu – komórki martwe (apoptyczne i nekrotyczne); część górna lewa wykresu – komórki martwe, nekrotyczne.

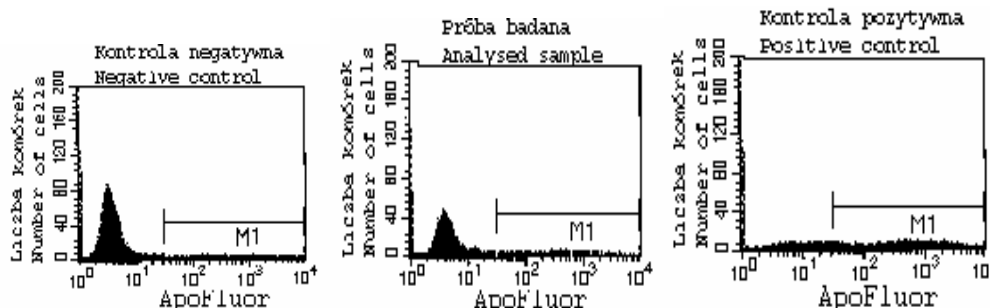
Cytograms:

LR – living, caspase-positive cells in which an increased activity of caspases was stated (induction of apoptosis); LL – living, caspase-negative cells showing no activity of caspases;

UR – dead cells (apoptotic and necrotic); UL – dead, necrotic cells.

Uzyskane wyniki pozwalają wstępnie wnioskować o zdolności białek łubinu do indukowania programowanej śmierci komórki (apoptozy) w populacji ludzkich limfocytów.

Świadczy o tym wzmożona aktywność kaspaz (enzymów szlaku apoptycznego) w komórkach, które poddano działaniu ekstraktu łubinowych protein. Aktywność tę zaobserwowano u 6,19% komórek całej populacji hodowlanej (wartość średnia z trzech pomiarów). Jest ona zdecydowanie silniejsza w stosunku do aktywności kaspaz, widocznej w populacji kontrolnej limfocytów (3,33%), choć nie tak duża jak w komórkach poddanych działaniu silnego induktora apoptozy (PHA) (22,36%).



Rys. 2. Liczba komórek w populacji hodowlanej ulegająca apoptozie.

Fig. 2. The number of apoptotic events in the lymphocyte culture undergoing apoptosis.

Histogramy:

Bramka M1 – komórki z aktywnymi kaspazami; pik przed bramką M1 – komórki niewykazujące aktywności kaspazowej.

Histograms:

Peak before the M1 region: Caspase-negative cells (they occur to the left of the M1 region); M1 Gate: caspase-positive cells (they lie within the M1 region).

Uruchomienie programowanej śmierci komórki w populacji limfocytów może być efektem pobudzenia tych komórek przez białka łubinu do nadmiernych podziałów. Zjawisko proliferacji limfocytów jest odpowiedzią tych komórek na kontakt z czynnikiem szkodliwym dla organizmu. Ma ono na celu neutralizację oraz usunięcie poza ustrój czynnika szkodliwego. Naturalnym następstwem proliferacji limfocytów jest ich apoptoza, powodująca delecję komórek, które spełniły już swoją funkcję eliminacji antygeny i stają się zbędne dla organizmu. W tym kontekście powodowanie apoptozy przez łubinowe proteiny świadczy o ich niekorzystnym wpływie na organizm człowieka.

Istnieje też duże prawdopodobieństwo, że poza wykazanim, niespecyficznym stymulowaniem apoptozy limfocytów, będącej efektem ich proliferacji, białka łubinu mogą specyficznie indukować podziały tych komórek w organizmie człowieka. Mimo, iż jednoznacznie nie udowodniono jeszcze zależności pomiędzy apoptozą a występowaniem alergii, taki mechanizm działania łubinowych protein może być jedną z przyczyn występowania objawów reakcji alergicznej u osób, które spożywały produkty zawierające dodatek łubinu [5, 7, 8, 9, 11, 14, 15] lub narażone były na inhalację pyłu z mąki łubinowej [3, 12].

Aby jednak odpowiedzieć na pytanie czy białka łubinowe mają zdolność do specyficznego stymulowania limfocytów człowieka do podziałów i w efekcie do apoptozy, niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowych testów, z udziałem większej grupy reprezentatywnej osób atopowych i nieatopowych, jako grupy kontrolnej.

Dokładne zbadanie wpływu wywieranego przez łubinowe proteiny na komórki układu immunologicznego człowieka może przyczynić się do wyeliminowania

czynników ograniczających zastosowanie preparatów białka łubinowego w żywności i żywieniu.

### Wnioski

1. Zastosowana w badaniach, mających charakter pilotażowy, metoda cytometrycznej oceny apoptozy na podstawie pomiaru aktywności kaspaz umożliwiła:
  - uzupełnienie informacji na temat oddziaływań łubinowych protein na układ immunologiczny człowieka,
  - ustalenie, że białka te mają zdolność inicjowania programowanej śmierci komórki w populacji ludzkich limfocytów, manifestowanej jednak znacznie słabiej w porównaniu z fitohemaglutyniną roślinną (PHA), powszechnie znaną jako silny induktor apoptozy.
2. Rezultaty przeprowadzonych badań dowodzą, że białka łubinu mają niespecyficzny wpływ na limfocyty człowieka.

### Literatura

- [1] Barnett D., Bonham B., Howden M.E.H.: Allergenic cross-reactions among legume foods. An in vitro study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1987, **79**, 433.
- [2] Bradford M.: A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [3] Crespo J.F., Rodriguez J., Vives R., James J.M., Reano M., Daroca P., Burbano C., Muzquiz M.: Occupational IgE-mediated allergy after exposure to lupine seed flour. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, **108**, 295-297.
- [4] Faeste C.K., Lovik M., Wiker H.G., Egaas E.: A case of peanut cross-allergy to lupine flour in a hot dog bread. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, **135**, 36-39.
- [5] Hefle S., Lemnske R.F., Bush R.K.: Adverse reaction to lupine-fortified pasta. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994, **52 Suppl 37**, 113-114.
- [6] Lampart-Szczapa E.: Łubin jako potencjalny surowiec białkowy w produkcji żywności. *Rozprawy Naukowe, zeszyt 279. Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Poznań 1998.*
- [7] Matheu V., De Barrio M., Sierra Z., Gracia-Bara M.T., Tornero P., Baeza M.L.: Lupine-induced anaphylaxis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 1999, **83**, 406-408.
- [8] Mazeyrat R., Thibault M., Asensi D., Ponvert C.: Sensitisation to lupine flour: Evaluation of risk in peanut-allergic children. Poster from the 23<sup>rd</sup> European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Amsterdam 2004.
- [9] Moneret-Vautrin D.-A., Guerin L., Kanny G., Flabbee J., Fremont S., Morisset M.: Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, **104**, 883-888.
- [10] Mooren F.C., Blomling D., Lechtermann A., Lerch M.M., Volker K.: Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J. Appl. Physiol.*, 2002, **93**, 147-153.
- [11] Novembre E., Moriondo M., Berardini R., Azzari C., Rossi M.E., Vierucci A.: Lupine allergy in a child. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, **103**, 1214-1216.
- [12] Parisot L., Aparicio C., Moneret-Vautrin D.-A., Guerin L.: Allergy to lupine flour. *Allergy*, 2001, **56**, 918-919.

- [13] Reeves R.D.: Tropical hyper-accumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil*, 2003, **249** (1), 57-65.
- [14] Romano C., Ferrara A., Tarallo S.: Allergic reaction to lupine seed (*Lupinus albus*). *Allergy*, 1997, **52 Suppl 37**, 113-114.
- [15] Tomaz E., Viseu R., Reis R., Lourenco M., Inacio F., Martins L.: Allergic sensitization to lupine seed. Poster from the 23<sup>rd</sup> European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Amsterdam 2004.

**THE CYTOMETRIC ANALYSIS OF APOPTOSIS BASED ON THE MEASURED ACTIVITY OF CASPASES AS A METHOD OF EVALUATING THE IMPACT OF PROTEINS CONTAINED IN NARROW-LEAFED LUPINE (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*, VAR. BARON) ON THE HUMAN IMMUNE SYSTEM**

S u m m a r y

Lupine seed proteins are characterized by a high nutritional value and by functionality, and, owing to these properties they are more and more frequently used in human nutrition. However, its disadvantageous impact on the cells of the man's immunological system is a factor limiting their use as a food component.

For the purpose of investigating this impact, lupine seed proteins (*L. angustifolius*, Baron variety) were analyzed, and their ability to induce apoptosis in cultured human lymphocytes was examined using a cytometric measurement method of the activity of caspases.

Lymphocytes isolated from the blood of an atopic person constituted the investigation material. The cultured lymphocytes were treated with: apoptosis inducer (phytohemagglutinin 'PHA') and an extract of the lupine seed protein, respectively. The cytometric analysis of the activity of caspases was performed 48 hours after the cell culture was set up.

It was shown that the activity of caspases in lymphocytes was higher compared to a control sample which was treated with an extract of the lupine protein. The results obtained prove that lupine proteins have a potential to induce apoptosis (i.e. an increased activity of caspases) in the cultured human lymphocytes.

**Key words:** lupine, proteins, apoptosis, caspases, lymphocytes, flow cytometry ☒



MAGDALENA KOPERA, MARCIN WOLSZAKIEWICZ, MARTA MITEK

**ZMIANY SKŁADU CHEMICZNEGO OWOCÓW WYBRANYCH  
ODMIAN GRUSZY AZJATYCKIEJ I EUROPEJSKIEJ W CZASIE  
PRZECHOWYWANIA**

Streszczenie

Celem badań było określenie podstawowego składu chemicznego owoców gruszy azjatyckiej w odniesieniu do owoców gruszy europejskiej, a także zmian zachodzących podczas ich przechowywania. Materiałem badawczym były owoce trzech odmian gruszy azjatyckich: Shinseiki, Hosui i Chojuro oraz gruszek europejskich odmiany Konferencja. Owoce pochodziły z sadu doświadczalnego Katedry Sadownictwa i PPO-SGGW. Badania w jednym sezonie przechowalniczym przeprowadzono w roku 2003. Analizy owoców wykonano bezpośrednio po zbiorze (w stadium dojrzałości zbiorczej) oraz po 1, 2 i 3 miesiącach ich przechowywaniu w chłodni zwykłej. Zakres analiz obejmował oznaczenia zawartości: suchej substancji, ekstraktu, kwasowości miareczkowej, cukrów ogółem oraz polifenoli ogółem.

Skład chemiczny gruszek azjatyckich różnił się od składu chemicznego gruszek europejskich odmiany Konferencja pod względem zawartości suchej substancji, ekstraktu i kwasowości. Wraz z wydłużaniem okresu przechowywania gruszek zawartość suchej substancji i ekstraktu pozornie rosła, prawdopodobnie na skutek procesów transpiracji, natomiast malała kwasowość. Zawartość polifenoli, odpowiedzialnych za właściwości przeciwutleniające badanych owoców gruszy azjatyckich i europejskiej, uwarunkowana była odmianowo. Największą zawartością polifenoli charakteryzowały się owoce odmiany Chojuro zaś najmniejszą odmiany Shinseiki. W okresie przechowywania początkowo stwierdzono wzrost zawartości tych związków w gruszkach, przy czym maksymalną ilość polifenoli w owocach odmiany Konferencja odnotowano po pierwszym miesiącu przechowywania, a w gruszkach azjatyckich po dwóch miesiącach. W kolejnych terminach analiz odnotowano spadek zawartości tych korzystnych zdrowotnie związków w owocach wszystkich badanych odmian.

**Słowa kluczowe:** gruszka azjatycka, gruszka europejska, skład chemiczny, przechowywanie



## Wprowadzenie

W literaturze, gruszki azjatyckie określa się nazwami: gruszka japońska, gruszka chińska lub orientalna. Istnieją także takie określenia, jak gruszka wodna, ze względu na dużą soczystość owoców oraz jabłko – gruszka, ze względu na okrągły kształt owoców. Najbardziej popularne są określenia: ‘NASHI’ – w języku japońskim oraz ‘japanese pear’, czyli gruszka japońska. W Polsce, najbardziej popularnym określeniem jest gruszka azjatycka. Te atrakcyjne owoce, choć mało jeszcze znane na naszym rynku, budzą duże zainteresowanie ze względu na walory sensoryczne: wygląd i ciekawy orzeźwiający smak [11].

Obecnie poza Azją grusze azjatyckie uprawiane są na szeroką skalę w USA, Nowej Zelandii, Australii i Chile. Liczne uprawy założono także w wielu krajach Europy (Francja, Włochy, Szwajcaria, Niemcy i Polska).

W związku z powyższym za celowe uznano określenie składu chemicznego owoców nowych odmian grusz azjatyckich oraz porównanie go ze składem gruszek europejskich, reprezentowanych przez odmianę Konferencja, a także przeprowadzenie badań przechowalniczych tych owoców.

## Materiał i metody badań

Przedmiotem badań były owoce gruszy azjatyckiej trzech odmian: Shinseiki, Hosui, Chojuro i gruszy europejskiej Konferencja, pochodzące z Sadu Doświadczalnego Katedry Sadownictwa i PPO – SGGW.

‘Shinseiki’ jest to odmiana uzyskana przez skrzyżowanie ‘Chojuro’ i ‘Nijisseiki’, charakteryzuje się dużymi owocami o okrągłym kształcie, z żółto-zieloną skórką. Miąższ owoców jest soczysty i słodki. Jest zaliczana do odmian wczesnych. Wrażliwa na zarazę ogniową.

‘Hosui’ należy do najbardziej popularnych odmian gruszy japońskiej, zajmuje blisko 21% uprawy Nashi w Japonii. Jest to odmiana uzyskana przez skrzyżowanie ‘Ri-14’ i ‘Yakumo’. Zaliczana jest do odmian o średniej porze dojrzewania. Cechuje się owocami dużymi o bardzo soczystym i słodkim miąższu. Jest odporna na czarną plamistość, ale wrażliwa na zarazę ogniową.

‘Chojuro’ to jedna z najstarszych odmian grusz azjatyckich. Jest to odmiana nieznanego pochodzenia, zaliczana do odmian średnio-późno-dojrzewających. Owoce tej odmiany kształtem przypominają jabłka, skórka zabarwiona jest na złotobrazowo. Miąższ owoców jest bardzo soczysty, słodki i smaczny. Do czasu wprowadzenia do uprawy odmiany Kosui i Hosui, stanowiły w Japonii 80% produkowanych gruszek Nashi. Odmiana jest odporna na choroby grusz z wyjątkiem zarazy ogniowej.

‘Konferencja’ należy do odmiany grusz pochodzenia angielskiego. Rozpowszechniona głównie w Europie, gdzie jest czołową odmianą handlową.

Charakteryzuje się dużym owocem o wydłużonym, wrzecionowatym kształcie. Skórka gruszek jest matowa, zielonkawo-brązowa, o rdzawych przebarwieniach. Miąższ jest żółtawo biały, bardzo słodki, soczysty, nieco aromatyczny. Owoce osiągają dojrzałość zbiorczą w końcu września lub na początku października.

Jednosezonowe badania prowadzono w roku 2003. Ze względu na różny termin dojrzwania owoców w roku 2003, odmianę Shinseiki zebrano 1 września, zaś odmianę Hosui 8 września, a odmiany Chojuro i Konferencję 15 września. Doświadczenie przechowalnicze założono w trzech powtórzeniach; powtórzenie stanowiło 10 owoców. Gruszki były składowane bezpośrednio w skrzynkach, bez dodatkowych opakowań. Owoce przechowywano w temp. 0°C, w atmosferze normalnej (chłodnia zwykła). Jakość gruszek oceniano po 1, 2, i 3 miesiącach przechowywania. Przed przystąpieniem do analiz składu chemicznego owoce przetrzymywano w temp. 20°C przez 24 godz. W każdym z terminów określano: zawartość suchej substancji [20], ekstrakt refraktometryczny [19], kwasowość ogólną metodą miareczkową [21], zawartość cukrów ogółem [22], a także polifenole ogółem [16].

Wyniki doświadczenia opracowano statystycznie przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji w układzie losowym. Ocenę istotności wpływu poszczególnych czynników przeprowadzono na podstawie testu F Fishera-Snedecora. Do porównań średnich posłużono się różnicami granicznymi obliczonymi przy użyciu testu Tuckey'a, przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Świeże owoce i warzywa zawierają składniki mineralne, witaminy, glukozytolany, karotenoidy i związki fenolowe (flawonoidy i kwasy fenolowe) oraz błonnik [7].

Głównym składnikiem owoców gruszy jest woda (ok. 85%), pozostałą część stanowi sucha substancja, która zawiera cukrowce, kwasy organiczne, związki azotowe, tłuszczowe, garbniki, barwniki, witaminy oraz sole mineralne [15].

Bezpośrednio po zbiorze średnia zawartość suchej substancji w owocach odmian: Shinseiki, Hosui, Chojuro i Konferencji wynosiła odpowiednio: 13,7; 14,1; 13,3 i 18,7% (tab. 1). Podczas przechowywania owoców zawartość suchej substancji wzrastała statystycznie istotnie, ponieważ owoce w momencie zbioru wykazują najwyższą zawartość wody, która ulega zmniejszeniu w trakcie przechowywania na skutek zachodzących procesów transpiracji [15].

Według danych literaturowych [3, 17], zawartość ekstraktu w gruszkach europejskich wynosi od 12 do 17%. Potwierdziły to wyniki uzyskane w niniejszej pracy, gdzie zawartość ekstraktu w gruszkach odmiany Konferencja bezpośrednio po zbiorze wynosiła 14,6% (tab. 2). Natomiast zawartość ekstraktu w gruszkach odmian azjatyckich była wyraźnie mniejsza i wynosiła odpowiednio, w gruszkach odmiany

Shinseiki 10,2%, Hosui 11,5% i Chojuro 11,3%. Wartości te zawierają się w zakresie podawanym przez Kajiura [9] i Crisosto [5]. Przy tym owoce odmiany Konferencja charakteryzowały się największą zawartością ekstraktu bezpośrednio po zbiorze, jak i w czasie przechowywania. W trakcie przechowywania odnotowano stały wzrost zawartości ekstraktu u wszystkich odmian, co jest konsekwencją procesów życiowych, jakie zachodzą w owocach.

Tabela 1

Zawartość suchej substancji w gruszkach zależnie od okresu przechowywania [%].  
Dry matter content in pears depending on the storage duration [%].

Odmiana Cultivar	Okres przechowywania [miesiące] Storage duration [months]			
	0	1	2	3
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Shinseiki	13,7 ± 0,29	14,4 ± 0,25	15,5 ± 0,58	15,6 ± 0,89
Hosui	14,1 ± 0,27	14,9 ± 0,38	15,0 ± 0,65	15,4 ± 0,83
Chojuro	13,3 ± 0,30	14,4 ± 0,30	15,1 ± 0,25	15,3 ± 0,58
Konferencja	18,7 ± 0,36	19,1 ± 0,63	19,1 ± 0,37	19,5 ± 0,28

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – odmiana/okres przechowywania = 0,58 / cultivar/storage duration = 0,58;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – okres przechowywania/odmiana = 0,58 / storage duration/cultivar = 0,58.

Tabela 2

Zawartość ekstraktu w gruszkach zależnie od okresu przechowywania [%].  
Soluble solids content in pears depending on the storage duration [%].

Odmiana Cultivar	Okres przechowywania [miesiące] Storage duration [months]			
	0	1	2	3
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Shinseiki	10,2 ± 0,00	11,0 ± 0,44	11,4 ± 0,36	11,9 ± 0,15
Hosui	11,5 ± 0,00	12,6 ± 0,20	12,4 ± 0,21	12,9 ± 0,17
Chojuro	11,3 ± 0,23	11,9 ± 0,60	12,1 ± 0,50	12,7 ± 0,26
Konferencja	14,6 ± 0,26	15,0 ± 0,46	15,1 ± 0,40	15,9 ± 0,10

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – odmiana/okres przechowywania = 0,66 / cultivar/storage duration = 0,66;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – okres przechowywania/odmiana = 0,66 / storage duration/cultivar = 0,66.

W gruszkach podstawowym kwasem jest kwas jabłkowy, który stanowi jeden z głównych substratów w procesie oddychania. Kwasowość ogólna w gruszkach

podczas zbioru, w przeliczeniu na kwas jabłkowy, wynosiła w przypadku odmiany Shinseiki 0,21%, Hosui 0,20%, Chojuro 0,19%, Konferencja 0,14% (tab. 3). Wykazano istotny wpływ odmiany na zawartość kwasów organicznych w owocach gruszy. Najwyższą kwasowością odznaczały się owoce odmiany Shinseiki, zaś najniższą gruszek odmiany Konferencja. We wszystkich badanych odmianach gruszek stwierdzono spadek kwasowości wraz z wydłużaniem się okresu przechowywania. Było to zapewne w dużej mierze związane z dojrzewaniem owoców podczas przechowywania. Wiadomo, bowiem powszechnie, że zawartość kwasów organicznych w owocach stopniowo zmniejsza się podczas ich dojrzewania oraz w czasie przechowywania, a szybkość tych zmian jest wyższa w pierwszych miesiącach składowania [2].

Tabela 3

Kwasowość gruszek zależnie od okresu przechowywania [% kw. jabłkowego].

Acidity of pears depending on the storage duration [% malic acid].

Odmiana Cultivar	Okres przechowywania [miesiące] Storage duration [months]			
	0	1	2	3
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Shinseiki	0,21 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Hosui	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,00
Chojuro	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,01
Konferencja	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,01

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – odmiana/okres przechowywania = 0,02 / cultivar/storage duration = 0,02;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – okres przechowywania/odmiana = 0,02 / storage duration/cultivar = 0,02.

W założonym doświadczeniu przechowalniczym obserwowano także różnice odmianowe w zawartości cukrów ogółem w badanych owocach grusz. Spośród badanych gruszek azjatyckich największą zawartością cukrów ogółem odznaczały się owoce odmiany Hosui 10,8%, przy czym była to wartość zbliżona do tej, jaką uzyskano w owocach odmiany europejskiej Konferencja 9,9% (tab. 4). Znacznie niższą zawartością cukrów ogółem charakteryzowały się owoce odmian Shinseiki i Chojuro, odpowiednio 8,4 i 7,4%. W badaniach obserwowano istotny spadek zawartości cukrów ogółem wraz z wydłużaniem się okresu przechowywania gruszek, albowiem cukry obok kwasów są podstawowymi substratami w procesie oddychania.

Właściwości prozdrowotne owoców wiążą się w dużej mierze z zawartością związków przeciwutleniających, które wspomagają naturalne mechanizmy obronne

organizmu. Zawartość związków przeciwutleniających w owocach zależy od cech genetycznych gatunku i odmiany, jednak warunki środowiskowe mogą je modyfikować. Bardzo duży wpływ mają warunki atmosferyczne (temperatura i opady) podczas wzrostu rośliny, a także warunki przechowywania owoców, które wpływają na ich stan fizjologiczny [6, 12].

Tabela 4

Zawartość cukrów ogółem w gruszkach zależnie od okresu przechowywania [%].  
Total saccharides content of pears depending on the storage duration [%].

Odmiana Cultivar	Okres przechowywania [miesiące] Storage duration [months]			
	0	1	2	3
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Shinseiki	8,4 ± 0,28	8,4 ± 0,17	8,2 ± 0,33	8,1 ± 0,58
Hosui	10,8 ± 0,16	10,6 ± 0,10	10,3 ± 0,04	9,9 ± 0,57
Chojuro	7,4 ± 0,09	7,1 ± 0,23	6,9 ± 0,13	6,8 ± 0,71
Konferencja	9,9 ± 0,35	9,6 ± 0,37	9,4 ± 0,05	9,4 ± 0,13

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – odmiana/okres przechowywania = 0,31 / cultivar/storage duration = 0,31;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – okres przechowywania/odmiana = 0,31 / storage duration/cultivar = 0,31.

W warunkach niniejszego doświadczenia stwierdzono zmiany ilościowe polifenoli ogółem w owocach zarówno pomiędzy odmianami, jak i podczas przechowywania. Największą zawartością polifenoli bezpośrednio po zbiorze charakteryzowały się owoce odmiany Chojuro – 196 mg/100 g, zaś najniższą owoce odmian Shinseiki i Konferencja, odpowiednio 101 mg/100 g i 144 mg/100 g (tab. 5). Dane literaturowe na temat zmian zawartości związków fenolowych w przechowywanych gruszkach są często sprzeczne. Kolesnik i wsp. [10] donoszą o wzroście zawartości flawonoli oraz spadku zawartości katechin w owocach podczas przechowywania. Brak zmian w zawartości kwasu chlorogenowego i flawonoidów podczas przechowywania stwierdzili natomiast m.in. Ju i wsp. [8], Coseteng i Lee [4] oraz Awad i de Jager [1]. Większość badaczy uważa jednak, że podczas przechowywania zmniejsza się zawartość związków fenolowych w owocach, a szybkość zmian może zależeć od odmiany, temperatury i składu atmosfery przechowalniczej [13, 14, 18].

W niniejszych badaniach zawartość polifenoli ogółem w pierwszym okresie wzrastała, po czym zaczęła się zmniejszać. W owocach grusz azjatyckich wzrost ten był obserwowany do drugiego miesiąca przechowywania, po czym odnotowano spadek. Wzrost ten można tłumaczyć stresem chłodowym owoców, a fakt, iż owoce

odmiany Konferencja „bronily” się krócej wyjaśnia budowa morfologiczna owoców, głównie skórki, gdzie jak wiadomo, gromadzi się przeważająca ilość związków fenolowych. Poza tym owoce w obawie przed patogenami w czasie przechowywania wytwarzają te związki jako naturalną ochronę przed psuciem.

Tabela 5

Zawartość polifenoli ogółem w gruszkach zależnie od okresu przechowywania [mg/100 g].  
Total polyphenols content of pears depending on the storage duration [mg/100 g].

Odmiana Cultivar	Okres przechowywania [miesiące] Storage duration [months]			
	0	1	2	3
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Shinseiki	101 ± 10,59	131 ± 7,26	144 ± 2,08	132 ± 10,59
Hosui	135 ± 4,58	202 ± 20,97	212 ± 17,62	184 ± 29,43
Chojuro	196 ± 1,53	213 ± 5,35	239 ± 36,98	197 ± 3,18
Konferencja	144 ± 19,20	176 ± 45,44	147 ± 13,86	136 ± 10,77

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – odmiana/okres przechowywania = 42,01 / cultivar/storage duration = 42,01;

NIR ( $\alpha = 0,05$ ) – okres przechowywania/odmiana = 42,01 / storage duration/cultivar = 42,01.

## Wnioski

1. Pod względem zawartości suchej substancji, ekstraktu i kwasowości skład chemiczny gruszek azjatyckich różni się od składu owoców odmiany Konferencja. Owoce ‘Nashi’ mają mniejszą zawartość suchej substancji i ekstraktu zaś większą kwasowość w porównaniu z gruszkami odmiany Konferencja.
2. Zawartość polifenoli odpowiedzialnych za właściwości przeciwutleniające w badanych bezpośrednio po zbiorze owocach uwarunkowana była odmianowo. Największą zawartością charakteryzują się owoce odmiany Chojuro zaś najmniejszą odmiany Shinseiki.
3. Wraz z wydłużaniem czasu przechowywania gruszek wzrasta w nich zawartość suchej substancji i ekstraktu, spada natomiast kwasowość i zawartość cukrów.
4. W gruszkach w czasie przechowywania zachodzą zmiany zawartości związków polifenolowych. Obserwowany w gruszkach azjatyckich wzrost zawartości polifenoli do drugiego miesiąca przechowywania wpływa na zwiększenie ich

wartości żywieniowej w tym czasie, w porównaniu z okresem bezpośrednio po zbiorze.

### Literatura

- [1] Awad M.A., de Jager A: Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage. *Postharvest Biol. Technol.*, 2000, **20**, 15-24.
- [2] Błaszczyk J.: Jak termin zbioru wpływa na jakość przechowywanych gruszek Konferencja. *Sad Nowoczesny*, 2001, **11**, 6-7.
- [3] Cerewitinow F.W.: *Chimia: towarowiedzenie świeżych owoców i owośczej*. T. II. Gostorgizdat. Moskwa 1949.
- [4] Coseteng M.Y., Lee C.Y.: Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.*, 1987, **52**, 985-989.
- [5] Crisosto C.H.: *Asian Pears Postharvest Quality Guidelines*. <http://postharvest.ucdavis.edu/produce/producefacts>. 1996.
- [6] Ehlenfeldt M.K., Prior R.L.: Oxygen radical and anthocyanin content among blueberry. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 2222-2227.
- [7] Elkner K.: Błonnik pokarmowy a nasze zdrowie. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1994, **4**, 20-21.
- [8] Ju Z., Yuan Y., Liu C., Zhan S., Wang M.: Relationships among simple phenol, flavonoid and anthocyanin in apple fruit peel at harvest and scald susceptibility. *Postharvest Biol. Technol.*, 1996, **8**, 83-93.
- [9] Kajiura I.: Nashi ( Japanese Pear) production in Japan. *Chronica Horticulturae*, 1992, **32(4)**, 57-58.
- [10] Kolesnik A., Elizarova L.G., Starodubsteva T.V., Afanasyeva V.S., Erokhina T.S.: Changes in polyphenols during storage of fruits and vegetables. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 1977, **13**, 333-339.
- [11] Kopera M., Pitera E.: Gruszki azjatyckie pomysł na zdrowe odżywianie. *Sad Nowoczesny*, 2004, **7**, 24-25.
- [12] Krupa T. Tomala K.: Zmiany ilościowe związków przeciwutleniających w jagodach borówki wysokiej 'Bluecrop' podczas ich przechowywania. *Zesz. Nauk. ISiK*, 2004, **12**, 237-243.
- [13] Mareczek A., Leja M., Ben J.: Zawartość związków fenolowych i aktywność antyoksydacyjna w skórce przechowywanych jabłek. *Mat XXXIX Ogólnopol. Nauk. Konf. Sadow. „Doskonalenie produkcji owoców przy zachowaniu środowiska naturalnego przyjaznego człowiekowi”*, 29 sierpnia, Skierniewice, 2000, s. 174-175.
- [14] Mosel H.D., Herrmann K.: Changes in catechins and hydroxycinnamic acid derivatives during development of apples and pears. *J. Sci. Food Agric.*, 1974, **25**, 251-256.
- [15] Ostrowski W., Lange E.: *Przechowalnictwo owoców*. PWRiL. Warszawa 1992.
- [16] Peri C., Pompei G.: An assay of different phenolic fractions in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1971, **22/2**, 55.
- [17] Pijanowski E., Mrożewski S., Horubała A., Jarczyk A.: *Technologia produktów owocowych i warzywnych*. t.I. PWRiL. Warszawa 1973.
- [18] Piretti M.V., Gallerani G., Pratella G.C.: Polyphenol fate and superficial scald In apple. *Postharvest Biol. Technol.*, 1994, **4**, 213-224.
- [19] PN-90/A-75101/02. *Przetwory owocowe i warzywno. Oznaczenie zawartości ekstraktu ogólnego*.
- [20] PN-90/A-75101/03. *Przetwory owocowe i warzywno. Oznaczenie zawartości suchej masy metoda wagową*.
- [21] PN-90/A-75101/04. *Przetwory owocowe i warzywno. Oznaczenie kwasowości ogólnej*.



[22] PN-90/A-75101/07. Przetwory owocowe i warzywne. Oznaczenie zawartości cukrów i ekstraktu bezcukrowego.

### CHANGES IN THE CHEMICAL CONTENT OF FRUIT IN THE SELECTED CULTIVARS OF ASIAN AND EUROPEAN PEARS WHILE STORING

#### S u m m a r y

The objective of the paper was to assess the basic chemical composition of Asian pear fruits with reference to the European pear fruits, as well as to evaluate changes occurring while storing them. Fruits of three cultivars of the Asian pears: Shinseiki, Hosui, and Chojuro, as well as fruits of the European Konferencja pear cultivar were analyzed. The fruits under investigation originated from the experimental orchard owned by the Department of Pomology and Basic Natural Science in Horticulture – SGGW. The investigation was conducted in the year 2003. Immediately upon the harvest, the fruits were analyzed (they were at a stage of the harvest maturity), and, again, after the 1, 2, and 3 months of having been stored in a common refrigerator.

Under the scope of this analysis, the following parameters were determined: dry matter, soluble solids, titration acidity, total saccharides, and total phenolics.

The chemical composition of the Asian pears differed from the chemical composition of the European Konferencja pear cultivar in the dry matter content, extract, and acidity. When the period of storing pears was prolonged, the content of dry matter and extract seemingly increased, probably owing to the transpiration processes occurring; however, the acidity level decreased. The content of polyphenols, responsible for antioxidant properties of the Asian and European pear fruits investigated, depended on the type of pear cultivar. The highest content of polyphenols was stated in the Chojuro fruits whereas the lowest content – in the Shinseiki cultivar. During the storage period, it was stated that at the beginning of storing, the content of polyphenols in pears increased; the maximal content of polyphenols was determined in the Konferencja fruits after the first month of storing them, and in the Asian pears: after the two months. As for the ensuing analyses performed on the dates as scheduled, it was stated that the content of these particular fruit compounds, appearing beneficial for health, decreased in all the fruits analysed.

**Key words:** Asian pear, European pear, chemical contents, storing ☒



DARIUSZ KOWALCZYK, BARBARA BARANIAK

## WPŁYW CHEMICZNEJ MODYFIKACJI I METODY KOAGULACJI BIAŁEK NASION SOCZEWICY I WYKI NA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWIUTLENIAJĄCE OTRZYMANÝCH HYDROLIZATÓW

### Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu acetylacji na właściwości przeciwutleniające preparatów hydrolizowanych białek roślinnych pochodzących z dwóch źródeł botanicznych, różniących się dodatkowo sposobem koagulacji.

Białka nasion soczewicy i wyki poddano chemicznej modyfikacji za pomocą bezwodnika kwasu octowego, a następnie wytrącono z zawiesiny koloidalnej, stosując jako czynniki koagulujące: kwas solny, oraz polielektrolity Magnafloc LT22S (kationowy) i Magnafloc LT27 (anionowy). Uzyskane preparaty białkowe hydrolizowano przy użyciu trypsyny i liofilizowano. Z hydrolizatów ekstrahowano wolne aminokwasy oraz peptydy, a następnie metodą neutralizacji trwałych rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH<sup>·</sup>) określono ich aktywność przeciwutleniającą.

Wykazano, że produkty hydrolizy białek analizowanych nasion roślin strączkowych charakteryzują się dobrą zdolnością neutralizacji rodnika DPPH<sup>·</sup>. Zastosowana modyfikacja, jak i metody wytrącania białek, w niewielkim stopniu wpłynęły na badane właściwości. Efekt przeciwutleniający wyrażony jako procent inhibicji inaktywowanych rodników wyniósł 59,7 i 53,4%, odpowiednio dla hydrolizatów białek wyki i soczewicy, niepoddanych chemicznej modyfikacji (kontrolnych), koagulowanych wyłącznie kwasem solnym. Hydrolizaty białka acetylowanego wykazały maksymalnie o 4% (soczewica) i 3% (wyka) wyższą zdolność neutralizacji wolnych rodników w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Użycie wielkocząsteczkowych polielektrolitów jako czynników flokulacyjno-koagulujących również wpłynęło na kilkuprocentowy wzrost badanych właściwości, przy czym aglomeracja białka z udziałem flokulanta LT-22S spowodowała większy wzrost aktywności przeciwutleniającej aniżeli z flokulantem LT-27. Głównymi czynnikami determinującymi zdolność neutralizowania rodnika DPPH<sup>·</sup> były gatunek surowca roślinnego, z którego otrzymano preparat białkowy, a także czas reakcji z rodnikami.

**Słowa kluczowe:** hydrolizaty białek nasion soczewicy i wyki, właściwości przeciwutleniające, acetylacja, polielektrolity

### Wprowadzenie

Jednym ze skutecznych sposobów ochrony żywności przed utlenianiem jest dodatek przeciwutleniaczy [2]. W technologii żywności często wykorzystywane są substancje o strukturze fenolowej [24]. Tymczasem właściwości przeciwutleniające mają również związki aminowe, jak: aminokwasy, naturalne peptydy [27] oraz białka i

ich hydrolizaty [18, 19, 23, 26]. Hydrolizaty białkowe są powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym jako stymulatory smakowo-zapachowe, dodatki zwiększające wartość odżywczą oraz polepszające właściwości teksturalne produktów [12]. Pomimo udokumentowanego działania przeciwutleniającego hydrolizaty nie są prawnie uznane za przeciwutleniacze. Można jednak przypuszczać, że pełnią taką funkcję w produktach z ich udziałem, co potwierdzają badania przeprowadzone na modelowej żywności [18, 19]. Analizowanie przydatności różnorodnych surowców białkowych oraz modyfikacja procesu pozyskiwania hydrolizatów stanowią kierunki badań mające na celu zwiększenie aktywności tych potencjalnych przeciwutleniaczy. Dotychczasowe doniesienia w niewielkim stopniu dotyczą możliwości zmiany potencjału przeciwutleniającego na etapie preparacji białka, dlatego też zagadnienie to stanowi przedmiot niniejszej pracy.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu acetylacji na aktywność przeciwutleniającą preparatów hydrolizowanych białek nasion soczewicy i wyki, różniących się dodatkowo sposobem koagulacji.

### **Materiał i metody badań**

Surowcem wyjściowym były rozdrobnione na mąkę nasiona soczewicy (odm. Anita) i wyki (odm. Kwarta), z których na drodze alkalicznej ekstrakcji (pH~9,2), a następnie koagulacji kwasowej oraz flokulacyjno-kwasowej otrzymano preparaty białkowe. W obydwu metodach koagulacji precypitację białek prowadzono 2M HCl, uzyskując w ekstraktach z mąki soczewicy pH 3,6, a wyki pH 4,0. W przypadku koagulacji flokulacyjno-kwasowej białka dodatkowo aglomerowano poprzez zastosowanie flokulantów. Wykorzystano w tym celu polielektrolity Magnafloc LT-22S (kationowy) i Magnafloc LT-27 (anionowy), które wprowadzano w ilości 30 mg/dm<sup>3</sup> ekstraktu, przed obniżeniem pH. Roztwory flokulantów przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta (Ciba Specialty Chemicals Corporation).

Preparaty białek chemicznie modyfikowanych uzyskano acetylując białka w czasie ich ekstrakcji. Proces prowadzono poprzez dodanie bezwodnika kwasu octowego w ilości 0,2 cm<sup>3</sup> na 1 g białka zawartego w mące. Modyfikacja trwała 1 godz. w temp. 20°C, przy pH 7,5–8,0. Z otrzymanych preparatów przygotowano hydrolizaty. Białka hydrolizowano trypsyną (1240 j./mg, Sigma T-4799; stosunek enzym/substrat 1: 850) przez 3 godz., w temp. 37°C i pH = 7,5. Po odwirowaniu nierozpuszczalnej frakcji od produktów hydrolizy uzyskany supernatant poddawano liofilizacji. Wolne aminokwasy i peptydy ekstrahowano z liofilizatu 1-procentowym kwasem trichlorooctowym. W ekstraktach oznaczano właściwości przeciwutleniające metodą neutralizacji trwałych rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH<sup>•</sup>) wg zmodyfikowanej procedury Brand-Williamsa i wsp. [8]. Pomiary absorbancji (515 nm, Lambda 40 UV-Vis, Perkin-Elmer) wykonywano co 30 min przez 5 godz. Aktywność przeciwutleniającą, wyrażoną jako % inhibicji, obliczano z następującego równania:

$$\text{Inhibicja [\%]} = [(A_k - A_{p(t)})/A_k] \times 100$$

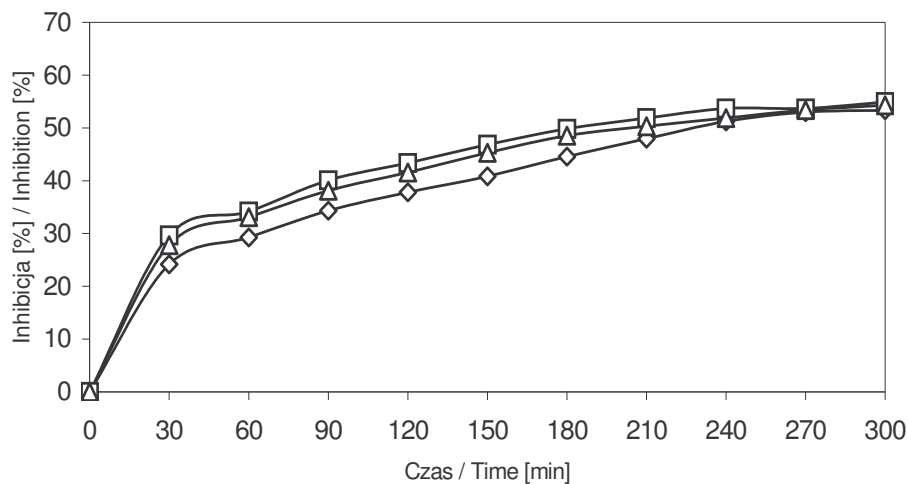
gdzie:  $A_k$  – absorbancja próbki kontrolnej,  $A_{p(t)}$  – absorbancja próbki z badanym ekstraktem, zmierzona w czasie  $t$ .

Oznaczenia aktywności przeciwutleniającej wykonano w trzech powtórzeniach, a uzyskane wyniki uśredniono.

### Wyniki i dyskusja

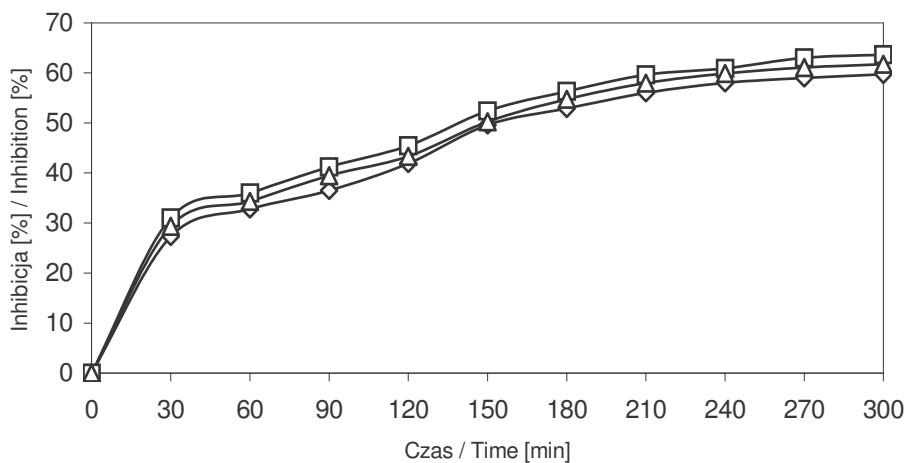
Przebieg neutralizacji rodników DPPH $\cdot$  przez produkty hydrolizy białka nasion soczewicy i wyki przedstawiono na rys. 1. i 2. Wszystkie analizowane hydrolizaty wykazywały wzrost zdolności inaktywowania DPPH $\cdot$  wraz z wydłużaniem czasu reakcji. Największy przyrost inhibicji zaobserwowano po pierwszych 30 min inkubacji, natomiast stabilizacja inhibicji nastąpiła po ok. 5 godz. Po tym czasie efekt przeciwutleniający hydrolizatów białek wyki i soczewicy, koagulowanych wyłącznie kwasem solnym, wyniósł odpowiednio 59,7 i 53,4% (rys. 3). Uzyskany rezultat świadczy o obecności w hydrolizatach substancji, które są donorami atomu wodoru [16]. Mają one zatem potencjalną zdolność przekształcania rodników do bardziej stabilnych produktów, a tym samym przerywania łańcuchowej reakcji utleniania.

Możliwość reagowania produktów hydrolizy białka z wolnymi rodnikami potwierdzają badania wielu autorów [9, 10,14, 21, 26], chociaż wartości liczbowe efektów przeciwutleniających trudno jest porównywać, gdyż różnicuje je zarówno rodzaj analizowanego surowca, jak i zastosowane metody analityczne. Wykorzystując metodę z DPPH $\cdot$  właściwości takie wykazali m.in. Wu i wsp. [26], badając hydrolizat białka makreli. Stwierdzili oni zdolność neutralizowania rodników DPPH $\cdot$  przez ekstrakt zawierający mieszaninę aminokwasów i peptydów o masie cząsteczkowej 1400 Da. Jao i Ko [14], stosując zróżnicowany czas proteolizy, uzyskali hydrolizat z białkowych odpadów tuńczyka, który wykazał zdolność inaktywacji rodników DPPH $\cdot$  na poziomie 82%, po 30 min reakcji. Suetsuna i wsp. [21] wyizolowali z hydrolizatu kazeiny mleka peptyd o sekwencji aminokwasów Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu wykazujący zdolność wiązania wolnych rodników zarówno w teście z DPPH $\cdot$ , jaki i z naturalnie występującymi rodnikami:  $^1O_2\cdot$  i  $\cdot OH$ . Z kolei Chen i wsp. [9] poddali ocenie syntetycznie otrzymane peptydy, bazujące na sekwencji naturalnego peptydu Leu-Leu-Pro-His-His, wyodrębnionego z hydrolizatu białka soi. Peptydy te w niewielkim stopniu inaktywowały wolne rodniki DPPH $\cdot$  i  $^1O_2\cdot$  pomimo, że wykazały dobrą aktywność przeciwutleniającą wyrażającą się zahamowaniem utleniania kwasu linolowego i chelatowaniem jonów  $Cu^{+2}$  i  $Zn^{+2}$ . Potwierdziło to, że peptydy działają nie tylko jako przeciwutleniacze pierwszorzędowe, ale za ich właściwości przeciwutleniające odpowiedzialne są również inne mechanizmy.



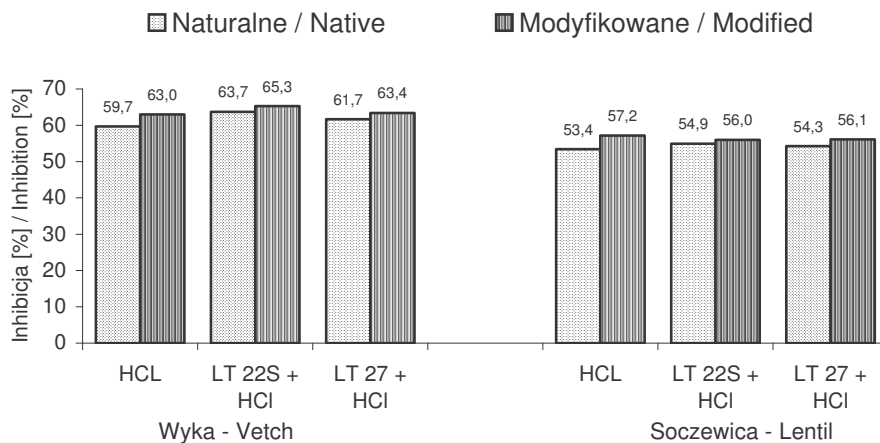
Rys. 1. Przebieg neutralizacji rodników DPPH<sup>•</sup> przez produkty hydrolizy białka wydzielonego z nasion soczewicy, po koagulacji różnymi metodami: HCl (◇), Magnafloc LT 22S + HCl (□), Magnafloc LT 27 + HCl (△).

Fig. 1. The course of DPPH<sup>•</sup> radicals scavenged by protein hydrolysates produced from lentil seeds, after the coagulation performed using various methods: HCl (◇), Magnafloc LT 22S + HCl (□), Magnafloc LT 27 + HCl (△).



Rys. 2. Przebieg neutralizacji rodników DPPH<sup>•</sup> przez produkty hydrolizy białka wydzielonego z nasion wyki, po koagulacji różnymi metodami: HCl (◇), Magnafloc LT 22S + HCl (□), Magnafloc LT 27 + HCl (△).

Fig. 2. The course of DPPH<sup>•</sup> radical scavenged by protein hydrolysates produced from vetch seeds, after the coagulation performed using various methods: HCl (◇), Magnafloc LT 22S + HCl (□), Magnafloc LT 27 + HCl (△).



Rys. 3. Aktywność przeciwutleniająca produktów hydrolizy białek naturalnych i chemicznie modyfikowanych, koagulowanych różnymi metodami, po 5 godz. inkubacji z DPPH<sup>·</sup>

Fig. 3. The antioxidant activity of native, hydrolyzed proteins and chemically modified proteins that were precipitated using various methods, 5 h after the incubation with DPPH<sup>·</sup>

Udowodniono, że metoda użyta do koagulacji białka różnicuje chemiczny skład i właściwości funkcjonalne preparatów białkowych [6, 11]. Wyniki niniejszej pracy wskazują, że sposób wytrącania białek decyduje również o ich potencjale przeciwutleniającym, co już zostało udokumentowane we wcześniejszych badaniach [3]. W prezentowanej pracy zarówno w przypadku hydrolizatów białka nasion soczewicy, jak i wyki, wykorzystanie polielektrolitów Magnafloc, jako czynników współtrącających, spowodowało nieznaczny przyrost zdolności neutralizowania rodników DPPH<sup>·</sup>. Koagulacja z udziałem flokulanta LT-22S dała większy wzrost właściwości przeciwutleniającej aniżeli z flokulantem LT-27. Różnice w aktywności przeciwutleniającej produktów hydrolizy białka wytrąconego różnymi metodami należy przypuszczalnie wiązać z faktem, że czynniki zastosowane do koagulacji różnicują skład frakcji białkowych. O efekcie takim informowali Baraniak i wsp. [4]. Również profil aminokwasowy uzależniony jest od metod stosowanych zarówno w procesie ekstrakcji, jak i koagulacji preparatów białkowych [5, 11, 17, 20]. Uważa się, że udział poszczególnych aminokwasów, a także ich kolejność, znacząco wpływa na przeciwutleniającą efektywność peptydów. Szczególną rolę przypisuje się obecności histydyny [9, 10], która została rozpoznana jako najefektywniejszy z aminokwasów neutralizujących 1O<sub>2</sub> [25].

Zastosowana w niniejszej pracy acylacja białka przy użyciu bezwodnika kwasu octowego (acetylacja) jest jedną z metod kształtowania właściwości funkcjonalnych białek [4, 13, 15]. Acylacja poprzez zmiany sił elektrostatycznego przyciągania i odpychania łańcuchów polipeptydowych powoduje zmiany konformacji cząsteczek białka [7]. Jak wskazuje Achouri i Zhang [1], wpływa to na podatność białka na hydrolizę i tym samym ilościowe oraz jakościowe różnice hydrolizatów. Faktem tym

można tłumaczyć uzyskaną wyższą zdolność neutralizacji rodników DPPH<sup>·</sup> przez produkty hydrolizy białka modyfikowanego w porównaniu z próbkami niemodyfikowanymi (kontrolnymi) (rys. 3). Zmiany konformacyjne mogą dotyczyć także acetylowanych peptydów. Pomimo, że zależność właściwości przeciwutleniających od trójwymiarowej struktury peptydów nie była określana, taką możliwość rozważali Chen i wsp. [10]. Badacze zasugerowali, że różne aktywności analizowanych przez nich syntetycznych peptydów zawierających histydyne mogły być spowodowane przestrzennie ułatwionym lub utrudnionym dostępem do pierścienia imidazolowego tego aminokwasu. Znaczne zróżnicowanie aktywności przeciwutleniającej dwóch syntetycznie uzyskanych tripeptydów, z których jeden zawierał L-histydyne, a drugi D-histydyne wykazało wpływ konfiguracji przestrzennej na testowane właściwości [10].

Wyniki zaprezentowanej pracy i cytowanych autorów świadczą o różnorodności czynników, które decydują o zdolnościach przeciwutleniających otrzymywanych hydrolizatów białkowych, a więc o ich technologicznym zastosowaniu oraz potencjalnym oddziaływaniu na organizm człowieka. Niektóre bowiem z aktywnych dipeptydów, wytworzonych podczas hydrolizy w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, mogą być absorbowane w przewodzie pokarmowym przez dipeptydowy transporter jelitowy i wchłaniane w nienaruszonej postaci [22]. A zatem mogą one przyczyniać się do zwiększenia fizjologicznej obrony organizmu w walce ze stresem oksydacyjnym.

### **Wnioski**

1. Metoda wytrącania preparatów, podobnie jak acetylacja białek nasion soczewicy i wyki, w niewielkim stopniu zwiększa właściwości przeciwutleniające ich hydrolizatów.
2. Głównym czynnikiem różnicującym zdolność neutralizowania rodników DPPH<sup>·</sup> jest gatunek surowca, z którego otrzymano preparat białkowy.
3. Zdolność neutralizowania rodnika DPPH<sup>·</sup> przez produkty hydrolizy analizowanych białek wzrasta wraz z wydłużaniem czasu reakcji, osiągając maksimum po 5 godz. inkubacji. Wysoki przyrost aktywności przeciwutleniającej, zaobserwowany po pierwszych 30 min reakcji, świadczy o obecności w hydrolizatach związków charakteryzujących się dobrą skutecznością przeciwutleniającą.

*Pracę wykonano w ramach PBZ/KBN/021/P06/99 finansowanego przez KBN w latach 2001-2004.*

### **Literatura**

- [1] Achouri A., Zhang W.: Effect of succinylation on the physicochemical properties of soy protein hydrolysate. *Food Res. Inter.*, 2001, **34**, 507-514.
- [2] Ball S.: *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*. Oficyna Wyd. Medyk. Warszawa 2001.
- [3] Baraniak B., Karaś M.: Antioxidative properties of chloroplast concentrates obtained by various methods from lucerne juice. *J. Anim. Feed Sci.*, 2000, **9**, 397-405.
- [4] Baraniak B., Niezabitowska M., Pielecki J., Wójcik W.: Evaluation of usefulness of Magnafloc M-22S flocculant in the process of obtaining protein concentrates from peas. *Food Chem.*, 2004, **85**, 251-257.
- [5] Baraniak B., Niezabitowska M., Porzucek H.: Zawartość białka ogółem, inhibitorów trypsyny i stachiozy w preparatach białkowych uzyskiwanych z mąki grochu za pomocą różnych metod koagulacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (40), 87-97.
- [6] Baraniak B.: Skład chemiczny i właściwości funkcjonalne koncentratów białkowych otrzymanych z soku liści słonecznika. *Rocz. Nauk Rol.*, 1992, **B-108** (1/2), 103-112.
- [7] Belitz H.D., Grosch W.: *Food Chemistry*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg 1999.
- [8] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [9] Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K.: Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 49-53.
- [10] Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K.: Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2619-2623.
- [11] Fernández-Qurrtela A., Macarulla M.T., Del Barrio A.S., Martínez J.A.: Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plants Foods Human Nutr.*, 1997, **51**, 331-342.
- [12] Flaczyk E.: Zalety technologiczne i żywieniowe hydrolizatów białkowych. *Cz.2. Przem. Spoż.*, 1997, **51** (4), 43-45.
- [13] Franzen L.K., Kinsella J.E.: Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1976, **24**, 788-795.
- [14] Jao C.L., Ko W.C.: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Sci.*, 2002, **68**, 430-435.
- [15] Kabirullah M., Wills R.B.H.: Functional properties of acetylated and succinylated sunflower protein isolate. *J. Food Technol.*, 1982, **17**, 235-249.
- [16] Molyneux P.: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2004, **26** (2), 211-219.
- [17] Mwasaru M.A., Muhammad K., Bakar J., Che Man Y.B.: Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chem.*, 1999, **67**, 435-443.
- [18] Peña-Ramos E.A., Xiong Y.L.: Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Sci.*, 2003, **64**, 259-263.
- [19] Sakanaka S., Tachibana Y., Ishihara N., Juneja L.R.: Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chem.*, 2004, **86**, 99-103.
- [20] Soetrisno U.S.S., Holmes Z.A.: Protein yields and characteristics from acid and salt coagulations yellow pea (*Pisum sativum* L. *Miranda*) flour extractions. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 970-974.
- [21] Suetsuna K., Ukeda H., Ochi H.: Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.*, 2000, **11**, 128-131.



- [22] Thwaites D.T., Hirst B.H., Simons N.L.: Direct assessment of dipeptide/H<sup>+</sup> symport in intact human intestinal (Caco-2) epithelium: A novel method utilising continuous intra-cellular pH measurement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **194**, 432-438.
- [23] Tong L. M., Sasaki S., McClements D. J., Decker E. A.: Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *J. Food Sci.*, 2000, **65**, 1325-1329.
- [24] Uchman W. (red): *Substancje dodatkowe w przetwórstwie mięsa*. Wyd. AR. Poznań 2001.
- [25] Wade A.M., Tucker H.N.: Antioxidant characteristics of L-histidine. *J. Nutr. Biochem.*, 1998, **9**, 308-315.
- [26] Wu H.C., Chen H.M., Shiau C.Y.: Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Inter.*, 2003, **36**, 949-957.
- [27] Wu H.C., Shiay C.Y., Chen H.M., Chiou T.K. Antioxidant activities of carnosine, anserine and some free amino acids and their synergistic effects in combination. *J. Food Drug Analysis*, 2003, **11**, 148-153.

#### THE EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATION OF LENTILS AND VETCH SEEDS PROTEINS AND OF A METHOD OF THEIR COAGULATION ON ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF HYDROLYSATES OBTAINED

##### S u m m a r y

The purpose of this study was to determine the effect of acetylation on the antioxidant activity of preparations of hydrolyzed plant proteins originating from two botanical sources; additionally, the preparations investigated differ in the method of their coagulation. Lentil and vetch seeds proteins were chemically modified with acetic anhydride, and precipitated using various coagulation agents such as: hydrochloric acid and polyelectrolytes (a cationic 'Magnafloc LT-22S' and an anionic 'Magnafloc LT-27'). The protein preparations produced were hydrolyzed with trypsin, and lyophilised during a process of enzymatic hydrolysis. From the hydrolysates, free amino acids and peptides were extracted, and, next, their antioxidant activity was determined using a method of scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals.

The study showed that the hydrolysis products of proteins contained in the leguminous plants under analysis are characterized by a good ability to quench a DPPH radical. Both the modification performed and the methods of proteins coagulation impacted, to a very small degree, the properties under investigated. The anti-oxidative effect expressed as a per cent inhibition rate of inactivated radicals was 59.7 and 53.4% for the hydrolysates of vetch and lentil proteins, respectively, which were not treated chemically (control hydrolysates) and coagulated using only the hydrochloric acid. If compared to control samples, the hydrolysates obtained from acetylated proteins showed a higher ability to scavenge free radicals: as for lentils, this ability was by maximum 4% higher, and as for vetch – by 3% at the most. When high-molecular polyelectrolytes were applied as flocculation-coagulation agents, the properties under investigations increased by several per cent, and the proteins agglomeration, containing a flocculant 'Magnafloc LT-22S', caused a higher rise in the antioxidative activity compared to the effect achieved with the flocculant 'Magnafloc LT-27'. The key factors determining the scavenging effect of the DPPH radical were: type of the plant species from which the protein preparation was produced, and, the time of reaction with radicals.

**Key words:** protein hydrolysates of lentil and vetch seeds, antioxidant activity, acetylation, polyelectrolytes ☒



MAŁGORZATA KOWALSKA, JOANNA BRYŚ, ANNA ŻBIKOWSKA,  
BOLESŁAW KOWALSKI

## **PRZEESTRYFIKOWANIE MIESZANIN FRAKCJI ŁOJU WOŁOWEGO I OLEJU RZEPAKOWEGO**

### **Streszczenie**

Łój wołowy jest produktem ubocznym przemysłu mięsnego. Jest on wykorzystywany w wielu dziedzinach, jednak w przemyśle spożywczym ze względu na swoje właściwości fizyczne ma ograniczone zastosowanie. Potencjalną możliwością wykorzystania łożu wołowego jest jego frakcjonowanie i przeestryfikowanie.

Celem pracy było określenie wpływu reakcji przeestryfikowania chemicznego oraz enzymatycznego mieszanin frakcji łożu wołowego i oleju rzepakowego o składzie 3:2 na wybrane właściwości tych mieszanin. Przeestryfikowanie w cząsteczkach triacylogliceroli prowadzono chemicznie, w obecności metanolanu sodu, oraz enzymatycznie, stosując dwa preparaty: Novozym 435 (preparat niespecyficzny w stosunku do pozycji wiązań estrowych) i Lipozyme IM (preparat specyficzny w stosunku do wiązań estrowych w pozycji *sn*-1,3). W mieszaninach fizycznych i produktach ich przeestryfikowania oznaczono: temperaturę mięknięcia, zawartość fazy stałej, liczbę kwasową, zawartość składników polarnych, a także określono skład i rozkład (*sn*-1,3 i *sn*-2) kwasów tłuszczowych.

Stwierdzono, że po procesie przeestryfikowania takie parametry, jak liczba kwasowa i zawartość składników polarnych wzrosły. Natomiast temperatura mięknięcia i zawartość fazy stałej w mieszaninach zawierających stearynę i olej rzepakowy zmniejszyły się, a w mieszaninach oleiny i oleju rzepakowego wzrosły. Skład kwasów tłuszczowych pozostał niezmienny, natomiast zaobserwowano zmiany w rozkładzie kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn* - 1,2,3 po przeestryfikowaniu chemicznym i katalizowanym preparatem Novozym 435. Skład kwasów tłuszczowych w pozycji *sn*-2 po przeestryfikowaniu katalizowanym preparatem Lipozyme IM pozostał niezmienny.

**Słowa kluczowe:** frakcjonowanie, przeestryfikowanie, łój wołowy, olej rzepakowy, oleina, stearyna

### **Wprowadzenie**

Produkcja łożu wołowego w Polsce wynosi około 120 tys. ton, a jego wykorzystanie w przemyśle spożywczym jest znikome. Łój wołowy jest źródłem nasyconych kwasów tłuszczowych: palmitynowego i stearynowego. Charakteryzuje się

---

*Dr inż. M. Kowalska, Wydz. Materiałoznawstwa i Technologii Obuwia, Politechnika Radomska, ul. B. Chrobrego 31, 26-600 Radom, mgr inż. J. Bryś, dr inż. A. Żbikowska, dr hab. B. Kowalski, prof. SGGW, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa*

składem triacylogliceroli, które nadają mu takie właściwości, jak np: wysoka temperatura topnienia, wysoka stabilność oksydacyjna. W przemyśle spożywczym łój może być wykorzystywany jako składnik tłuszczów smażalniczych czy piekarskich, nadając ciastu odpowiednią kruchość [1]. Poszerzeniem wykorzystania łożu wołowego w celach spożywczych może być m.in. jego frakcjonowanie (stearyna i oleina) [3, 7, 13, 20], a także przeestryfikowanie z olejami roślinnymi [9, 14-18, 26-27].

Każda z technik oferuje określone korzyści, jednak przeestryfikowanie stwarza największe możliwości w uzyskaniu z góry założonej struktury lipidów [8, 9]. Metoda ta nie powoduje bowiem zmian w budowie kwasów tłuszczowych i dzięki temu cenne biologicznie, aktywne kwasy tłuszczowe pozostają nienaruszone [28]. Wśród najważniejszych zastosowań przeestryfikowania należy wymienić otrzymywanie tłuszczów plastycznych niezawierających izomerów trans (w przeciwieństwie do uwodornienia), otrzymywanie niedrogich substytutów tłuszczów cukierniczych, jak również otrzymywanie emulgatorów żywności.

Przeestryfikowanie stwarza możliwości uzyskania tłuszczów nie tylko o specyficznym składzie kwasów tłuszczowych, ale również o specyficznym ich rozmieszczeniu wewnątrz cząsteczek triacylogliceroli [1]. Reakcja ta pozwala zatem na otrzymanie tłuszczów o wcześniej zaprogramowanych właściwościach fizycznych i chemicznych [9].

Celem pracy było określenie wpływu reakcji przeestryfikowania chemicznego (prowadzonego w obecności metanolanu sodu) i enzymatycznego (prowadzonego w obecności preparatu Lipozyme IM lub preparatu Novozym 435) mieszanin frakcji łożu wołowego i oleju rzepakowego o składzie 3:2 na wybrane właściwości tych mieszanin.

## **Materiał i metody badań**

### *Materiał badawczy*

Materiał badawczy stanowiły mieszaniny frakcji łożu wołowego (stearyny i oleiny) oraz oleju rzepakowego.

Łój wołowy – surowiec do otrzymywania stearyny i oleiny pochodził z uboju gospodarczego z okolic Radomia. Charakteryzował się on liczbą kwasową w granicach od 0,5 do 1 mg KOH/g. Zwracano szczególną uwagę na wartość początkową liczby kwasowej, ponieważ kolejnym procesem, któremu poddawany był łój, był proces bielenia.

Olej rzepakowy pochodził z Warszawskich Zakładów Tłuszczowych.

Katalizatory użyte w reakcji przeestryfikowania to:

- metanolan sodu (firmy Merck – Niemcy),
- Lipozyme IM [11] – preparat enzymatyczny (firmy Novozymes – Dania). Jest to preparat zawierający enzym lipolityczny otrzymywany z *Mucor miehei*. Enzym ten

jest lipazą specyficzną w stosunku do wiązań estrowych w pozycji *sn*-1,3 cząsteczek triacylogliceroli,

- Novozym 435 [12] – preparat enzymatyczny firmy Novozymes – Dania. Jest to preparat zawierający enzym lipolityczny otrzymywany ze szczepu grzybów *Candida antarctica* tzn. lipazę niespecyficzną względem wiązań estrowych w triacyloglicerolach.

Zawartość wody w preparacie Lipozyme IM podczas przeestryfikowania wynosiła 4 i 10%, a w preparacie Novozym 435 2 i 10%.

Pierwszym procesem, któremu został poddany surowy łój wołowy, był proces bielenia. Łój wołowy ogrzewano do temp. 80°C, a następnie dodawano ziemię bielącą w ilości 2%, w stosunku do masy wybielanego łożu. Wybielanie wykonywano w ciągu 1 h, ogrzewając w 80°C mieszaninę tłuszczu z adsorbentem. Po zakończeniu procesu użytą ziemię bielącą oddzielano od łożu, stosując filtrację na gorąco.

#### *Fracjonowanie*

Kolejnym etapem był proces frakcjonowania. Łój wołowy mieszano z acetonem w stosunku 1 : 6. Mieszaninę ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez około 30–45 min, a następnie pozostawiano na noc. Następnego dnia odsączano pod zmniejszonym ciśnieniem kryształki stearyny i pozostawiano je na 1–2 dni, aby aceton ostatecznie wyparował. Po odsączeniu stearyny z przesączu oddestylowywano aceton uzyskując frakcję niskotopliwą (oleinę). Wydajność tak przeprowadzonego procesu krystalizacji wynosiła: stearyna: ~20%, oleina: ~80%. Temp. mięknięcia stearyny wynosiła ~55°C, oleiny ~25°C.

W badaniach użyto mieszanin sporządzonych z frakcji łożu wołowego – stearyny (S), bądź oleiny (O) i oleju rzepakowego (RSO) o składzie 3:2 (m/m).

#### *Przeestryfikowanie chemiczne*

W procesie przeestryfikowania chemicznego stosowano metanolan sodu. Ilość katalizatora dodawanego do układu reakcyjnego wynosiła 0,6% w stosunku do masy tłuszczu. Reakcje przeestryfikowania prowadzono w temp. 90°C. Czas trwania reakcji wynosił 2 h.

#### *Przeestryfikowanie enzymatyczne*

W procesie przeestryfikowania enzymatycznego zawartość katalizatora wynosiła 8% w stosunku do masy tłuszczu. Czas trwania procesu katalizowanego preparatem Novozym 435 wynosił 4 h, a temp. 80°C. Podczas przeestryfikowania katalizowanego preparatem Lipozyme IM czas reakcji wynosił 8 h, a temp. 60°C. Jeżeli programowana w układzie reakcyjnym ilość wody miała wynosić 10%, wtedy równoległe z dodatkiem

katalizatora następowało dodawanie odpowiedniej ilości wody destylowanej. Reakcje przerywano przez odfiltrowanie enzymu od przeestryfikowanego tłuszczu.

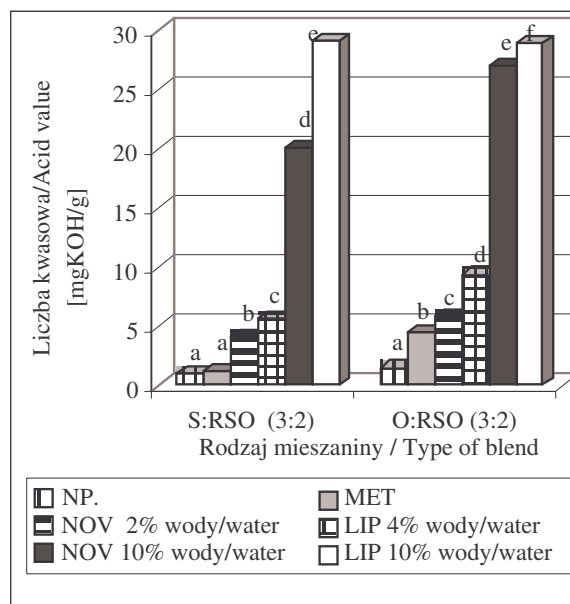
### *Metody badań*

W mieszaninach fizycznych oraz w tłuszczach będących produktami reakcji przeestryfikowania oznaczano liczbę kwasową wg Polskiej Normy [22], sumę zawartości frakcji niepełnych acylogliceroli (MAG, DAG) i wolnych kwasów tłuszczowych, czyli frakcję polarną oraz udział triacylogliceroli (TAG) techniką chromatografii kolumnowej [21], a także punkt topnienia – metodą kapilary otwartej [23] i zawartość fazy stałej metodą magnetycznego pulsacyjnego rezonansu jądrowego [24]. Oznaczano także skład [25] i rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 triacylogliceroli. Strukturę triacylogliceroli określano na podstawie informacji literaturowych [2, 4-6]. Metoda polega na selektywnej enzymatycznej hydrolizie triacylogliceroli.

Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu komputerowego Statgraphics plus 4.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy średnimi wykonano stosując test Tukey'a HSD, przy  $p < 0,05$  gdzie  $n = 3$ .

### **Wyniki i dyskusja**

W wyniku przeestryfikowania zarówno chemicznego, jak i enzymatycznego stwierdzono wzrost liczby kwasowej produktów w stosunku do mieszanin fizycznych. O podobnych spostrzeżeniach informuje Ledóchowska [17, 18]. W procesie przeestryfikowania tłuszczów zachodzą jednocześnie dwie reakcje: częściowa hydroliza triacylogliceroli i ponowna reestryfikacja niepełnych acylogliceroli. Na rys. 1. przedstawiono wartości liczby kwasowej przed i po przeestryfikowaniu mieszanin (S:RSO, 3:2) i (O:RSO, 3:2). Po przeestryfikowaniu chemicznym wzrost liczb kwasowych jest najmniejszy i najbliższy liczbom kwasowym uzyskanym podczas przeestryfikowania enzymatycznego, prowadzonego w obecności preparatu Novozym 435, zawierającego 2% wody. Zaobserwowano również większą liczbę kwasową mieszanin przeestryfikowanych z użyciem preparatu Lipozyme IM. Większe liczby kwasowe uzyskane podczas przeestryfikowania badanych mieszanin przy użyciu preparatu Lipozyme IM niż przy użyciu preparatu Novozym 435 wynikają także z ilości wody zawartej w preparatach, odpowiednio 4 i 2%. Stwierdzono także, że liczby kwasowe mieszaniny S:RSO niemodyfikowanej i mieszaniny przeestryfikowanej w obecności metanolanu nie różnią się statystycznie istotnie przy  $p < 0,05$ .



S : RSO i O : RSO - NIR/LSD = 0,27

Rys. 1. Liczba kwasowa mieszanin S : RSO (3:2) i O : RSO (3:2) przed oraz po przeestryfikowaniu chemicznym i enzymatycznym, [mg KOH/g].

Fig. 1. Acid value [in mg KOH/g] of mixtures S : RSO (3:2) and O : RSO (3:2) before and after the chemical and enzymatic interesterification.

Objaśnienia: / Explanatory notes:

NP. – mieszanina fizyczna / physical mixture;

MET – przeestryfikowanie chemiczne / chemical interesterification;

NOV 2% wody – przeestryfikowanie katalizowane preparatem Novozym 435 zawierającym 2% wody w preparacie / interesterification catalyzed by a Novozym 435 preparation containing 2% water in the preparation

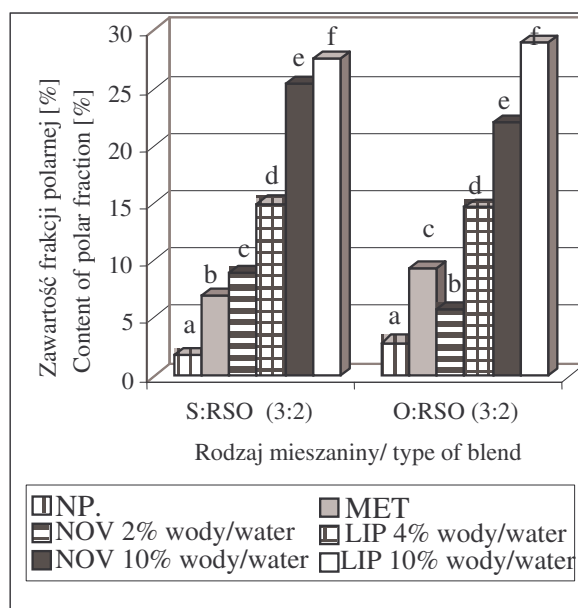
NOV 10% wody – przeestryfikowanie katalizowane preparatem Novozym 435 zawierającym 10% wody w preparacie / interesterification catalyzed by a Novozym 435 preparation containing 10% water in the preparation

LIP 4% wody – przeestryfikowanie katalizowane preparatem Lipozyme IM zawierającym 4% wody w preparacie / interesterification catalyzed by a Lipozyme IM preparation containing 4% water in the preparation

LIP 10% wody – przeestryfikowanie katalizowane preparatem Lipozyme IM zawierającym 10% wody w preparacie / interesterification catalyzed by a Lipozyme IM preparation containing 10% water in the preparation

Znacznie większą liczbą kwasową charakteryzowały się mieszaniny otrzymane w reakcjach katalizowanych preparatami enzymatycznymi o 10-procentowej zawartości wody w preparacie. Wartości te kilkakrotnie przewyższają liczbę kwasową mieszaniny fizycznej.

Przeestryfikowanie spowodowało pojawienie się, obok wolnych kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli, dodatkowych produktów: monoacylogliceroli i diacylogliceroli [15] tworzących tzw. frakcje polarne (rys. 2). Największy wzrost zawartości frakcji polarnej otrzymano po procesie przeestryfikowania w obecności preparatu Lipozyme IM (jeśli nie bierze się pod uwagę przeestryfikowań prowadzonych w obecności uwodnionych preparatów enzymatycznych).



S : RSO - NIR/LSD = 0,51

O : RSO - NIR/LSD = 0,41

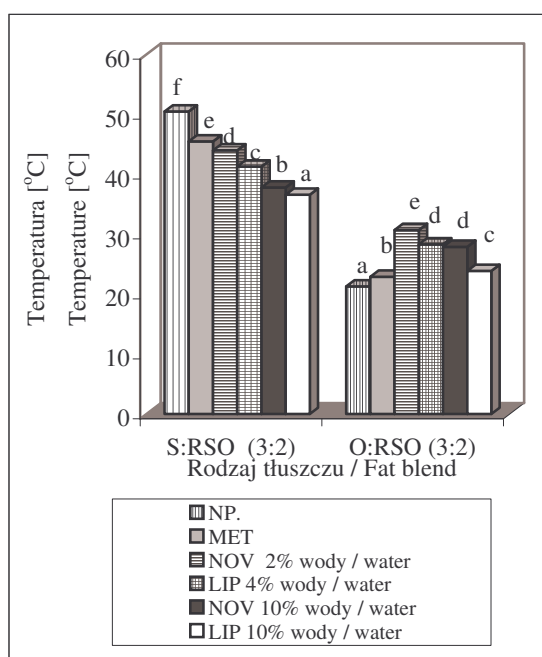
Rys. 2. Zawartość składników polarnych mieszanin S:RSO (3:2) i O:RSO (3:2) przed oraz po przeestryfikowaniu chemicznym i enzymatycznym.

Fig. 2. The content of a polar fraction in the mixtures S:RSO (3:2) and O:RSO (3:2) before and after the chemical and enzymatic interesterification.

Objaśnienia jak na rys. 1. / Explanatory notes are the same as in Fig 1.

Zawartość (MAG, DAG, WKT) mieszanki oleiny i oleju rzepakowego wzrosła z 2,9 do 14,7%, natomiast stearyny i oleju rzepakowego z 1,8 do 15%. Najwięcej frakcji nie triacyloglicerolowej zawierały tłuszcze przeestryfikowane w obecności katalizatorów enzymatycznych o zawartości wody 10% w preparacie. Zawartość frakcji polarnej wyniosła ponad 20% w obu mieszaninach podczas przeestryfikowania z preparatem Novozym 435. W wyniku przeestryfikowania katalizowanego preparatem Lipozyme IM wartości frakcji polarnej sięgały około 28%.

Zaobserwowano obniżenie (w odniesieniu do mieszaniny fizycznej) temperatury mięknięcia oraz zawartości fazy stałej wszystkich tłuszczów uzyskanych po przeestryfikowaniu, a zawierających w swoim składzie stearynę [19, 28]. Analizując rodzaj katalizatora należy stwierdzić, że najbardziej zmieniła się konsystencja mieszaniny po reakcji przeestryfikowania w obecności preparatu Lipozyme IM zawierającego 10% wody w preparacie, natomiast najmniejszy efekt modyfikacji uzyskano stosując pozytywnie niespecyficzny preparat enzymatyczny – Novozym 435 jako katalizator przy 2-procentowej zawartości wody w preparacie oraz metanolan sodu (rys. 3 i 4).



S : RSO - NIR/LSD = 0,85;

O : RSO - NIR/LSD = 0,84

Rys. 3. Temperatura mięknięcia mieszanin S:RSO (3:2) i O:RSO (3:2) przed oraz po przeestryfikowaniu chemicznym i enzymatycznym

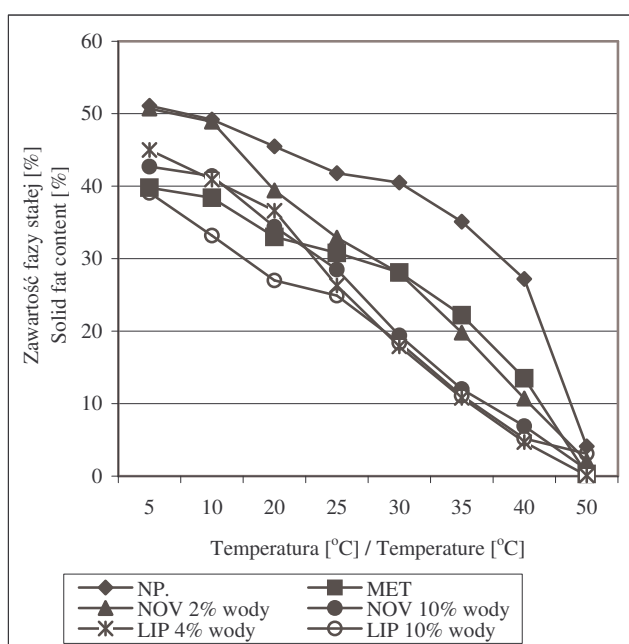
Fig. 3. Slip melting point of mixtures S:RSO (3:2) and O:RSO (3:2) before and after the chemical and enzymatic interesterification

Objaśnienia jak na rys. 1. / Explanatory notes are the same as in Fig 1.

Odmierna sytuacja wystąpiła podczas modyfikacji mieszaniny zawierających oleinę (rys. 3 i 5) [3]. Temperatura podczas przeestryfikowania wrosła średnio od 1,6 do 10°C i nastąpiło utwardzenie tłuszczu [13]. Analiza statystyczna wykazała, że wartości temperatury mięknięcia mieszaniny O:RSO przeestryfikowanej w obecności preparatu Novozym 435 przy zawartości 10% wody w preparacie i w obecności

preparatu Lipozyme IM przy zawartości 4% wody, nie różnią się znacząco statystycznie (rys. 3).

Zakres wzrostu zawartości fazy stałej, po procesie przeestryfikowania chemicznego oraz enzymatycznego mieszaniny oleiny i oleju rzepakowego, w stosunku do mieszaniny fizycznej, we wszystkich rodzajach tłuszczów wyniósł od 2 do 12%, uwzględniając początkową temperaturę pomiaru (5–30°C). W wyższej temperaturze wartości SFC wynosiły zero lub były bliskie tej wartości. Jest to związane z rodzajem i ilością występujących kwasów tłuszczowych, które determinują fizyczne właściwości tłuszczu [3].



Rys. 4. Zawartość fazy stałej mieszaniny stearyny i oleju rzepakowego (3:2) przed oraz po przeestryfikowaniu chemicznym i enzymatycznym.

Fig. 4. The solid fat content in the mixture consisting of stearin and rapeseed oil (in proportion 3:2) before and after the chemical and enzymatic interesterification.

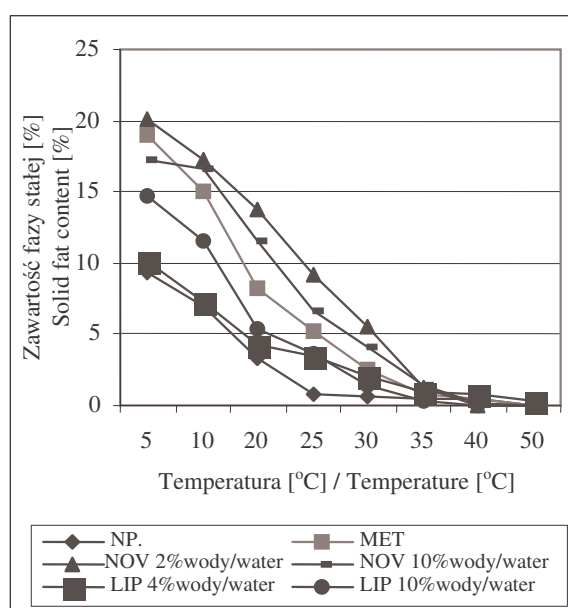
Objaśnienia jak na rys. 1. / Explanatory notes are the same as in Fig 1.

Uwzględniając rodzaj katalizatora reakcji stwierdzono, że największe zawartości fazy stałej w funkcji temperatury otrzymano po przeestryfikowaniu enzymatycznym w obecności preparatu Novozym 435 przy zawartości wody 2% w preparacie, natomiast najmniejsze zmiany otrzymano po wprowadzeniu preparatu Lipozyme IM (4% wody w preparacie).

W pracy określono również strukturę triacylogliceroli (TAG). Analizom poddano matryce triacyloglicerolowe, wyodrębnione z mieszanin fizycznych i produktów przeestryfikowania. Opracowane wyniki zamieszczono w tab. 1–8.



Wyniki uzyskane w oznaczeniach rozmieszczenia kwasów tłuszczowych pomiędzy pozycje w triacyloglicerolach, dotyczące przeestryfikowania chemicznego, dowodzą, że metanolan sodu wykazywał aktywność katalityczną względem wiązań estrowych we wszystkich trzech pozycjach triacylogliceroli [16, 17]. W wyniku tego uzyskano produkt zrandomizowany (tab. 2 i 6). Novozym 435 wykazywał tendencję do randomizacji względem wiązań estrowych triacylogliceroli (tab. 3 i 7). Przeestryfikowanie katalizowane preparatem Lipozyme IM zachodziło w obrębie pozycji *sn* – 1,3 triacylogliceroli (tab. 4 i 8).



Rys. 5. Zawartość fazy stałej mieszaniny oleiny i oleju rzepakowego (3:2) przed oraz po przeestryfikowaniu chemicznym i enzymatycznym.

Fig. 5. The solid fat content in a mixture consisting of olein and rapeseed oil (in proportion 3:2) before and after the chemical and enzymatic interesterification.

Objaśnienia jak na rys. 1. / Explanatory notes are the same as in Fig 1.

Tabela 1

Skład kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 TAG mieszaniny O : RSO (3:2) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów w pozycji *sn*-2 przed przeestryfikowaniem.

The composition of fatty acids in the *sn*-1,3 and *sn*-2 positions, in the TAG (triacylglycerols) obtained from O:RSO (3:2), and the per cent distribution of individual acids in the *sn*-2 position prior to the interesterification.

Rodzaj kwasu tłuszczowego Type of fatty acid	Skład kwasów tłuszczowych w TAG [%] Total fatty acids in TAG [%]	Skład kw. tłuszcz. [%] w pozycjach Fatty acid distribution [%] in the position		Udział danego kwasu tłuszcz. w pozycji <i>sn</i> -2 [%] A given fatty acid distribution [%] in the <i>sn</i> -2 position
		<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	
14:0	1,8	2,3	1,6	42,6
16:0	17,6	13,1	19,9	24,8
16:1 cis 9	1,5	1,5	1,6	35,6
17:0	1,0	0,5	1,3	16,7
18:0	12,4	8,6	14,3	23,1
18:1 trans 9	1,4	0,7	1,8	16,7
18:1 cis 9	43,8	44,9	43,3	34,2
18:2 all cis	8,5	13,7	5,9	53,7
18:3 all cis	4,0	7,1	2,5	59,2
20:1	0,9	0,3	1,2	11,1
22:1	0,3	0,1	0,4	11,1

Tabela 2

Skład kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 TAG mieszaniny O : RSO (3:2) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów w pozycji *sn*-2 po przeestryfikowaniu chemicznym.

The composition of fatty acids in the *sn*-2 and *sn*-1,3 positions, in the TAG (triacylglycerols) obtained from a blend O:RSO (3:2), and the per cent distribution of individual acids in the *sn*-2 position after the chemical interesterification performed.

Rodzaj kwasu tłuszczowego Type of fatty acid	Skład kwasów tłuszczowych w TAG [%] Total fatty acids in TAG [%]	Skład kw. tłuszcz. [%] w pozycjach Fatty acid distribution [%] in the position		Udział danego kwasu tłuszcz. w pozycji <i>sn</i> -2 [%] A given fatty acid distribution [%] in the <i>sn</i> -2 position
		<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	
14:0	1,8	1,9	1,8	35,2
16:0	17,6	17,3	17,8	32,8
16:1 cis 9	1,5	1,5	1,5	33,3
17:0	1,0	0,9	1,1	30,0
18:0	12,4	12,3	12,5	33,1
18:1 trans 9	1,4	1,2	1,5	28,6

c.d. Tab. 2

18:1 cis 9	43,8	43,8	43,8	33,3
18:2 all cis	8,5	8,9	8,3	34,9
18:3 all cis	4,0	4,2	3,9	35,0
20:1	0,9	0,7	0,9	25,9
22:1	0,3	0,3	0,3	33,3

Tabela 3

Skład kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 TAG mieszaniny O : RSO (3:2) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów w pozycji *sn*-2 po przeestryfikowaniu enzymatycznym prowadzonym w obecności preparatu Novozym 435, zawierającego 2% wody w preparacie.

The composition of fatty acids in the *sn*-1,3 and *sn*-2 positions, in the TAG (triacylglycerols) obtained from a blend O:RSO (3-2), and the per cent distribution of individual acids in the *sn*-2 position after the enzymatic interesterification performed with a Novozym 435 preparation (containing 2% water).

Rodzaj kwasu tłuszczowego Type of fatty acid	Skład kwasów tłuszczowych w TAG [%] Total fatty acids in TAG [%]	Skład kw. tłuszcz. [%] w pozycjach Fatty acid distribution [%] in the position		Udział danego kwasu tłuszcz. w pozycji <i>sn</i> -2 [%] A given fatty acid distribution [%] in the <i>sn</i> - 2 position
		<i>sn</i> -2 % in <i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3 % in <i>sn</i> -1,3	
14:0	1,8	2,0	1,7	37,0
16:0	17,6	16,5	18,2	31,3
16:1 cis 9	1,5	1,5	1,5	33,3
17:0	1,0	0,8	1,1	26,7
18:0	12,4	11,5	12,9	30,9
18:1 trans 9	1,4	1,0	1,6	23,8
18:1 cis 9	43,8	44,4	43,5	33,8
18:2 all cis	8,5	9,2	8,2	36,1
18:3 all cis	4,0	4,5	3,8	37,5
20:1	0,9	0,6	1,1	22,2
22:1	0,3	0,2	0,4	22,2

Tabela 4

Skład kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 TAG mieszaniny O : RSO (3:2) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów w pozycji *sn*-2 po przeestryfikowaniu enzymatycznym prowadzonym w obecności preparatu Lipozyme IM, zawierającego 4% wody w preparacie.

The composition of fatty acids in the *sn*-1.3 and *sn*-2 positions, in the TAG (triacylglycerols) obtained from a blend O:RSO (3-2), and the per cent distribution of individual acids in the *sn*-2 position after the enzymatic interesterification performed with a Lipozyme IM preparation (containing 4% water).

Rodzaj kwasu tłuszczowego Type of fatty acid	Skład kwasów tłuszczowych w TAG [%] Total fatty acids in TAG [%]	Skład kw. tłuszcz. [%] w pozycjach Fatty acid distribution [%] in the position		Udział danego kwasu tłuszcz. w pozycji <i>sn</i> -2 [%] A given fatty acid distribution in the <i>sn</i> -2 position
		<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	
14:0	1,8	2,1	1,7	38,9
16:0	17,6	13,3	19,8	25,2
16:1 cis 9	1,5	1,6	1,5	35,6
17:0	1,0	0,6	1,2	20,0
18:0	12,4	8,4	14,4	22,6
18:1 trans 9	1,4	0,8	1,7	19,0
18:1 cis 9	43,8	44,5	43,5	33,9
18:2 all cis	8,5	14,0	5,8	54,9
18:3 all cis	4,0	7,2	2,4	60,0
20:1	0,9	0,4	1,2	14,8
22:1	0,3	0,1	0,4	11,1

Tabela 5

Skład kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 TAG mieszaniny S : RSO (3:2) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów w pozycji *sn*-2 przed przeestryfikowaniem.

The composition of fatty acids in the *sn*-1.3 and *sn*-2 positions, in the TAG (triacylglycerols) obtained from a blend S:RSO (3-2), and the per cent distribution of individual acids in the *sn*-2 position prior to the interesterification.

Rodzaj kwasu tłuszczowego Type of fatty acid	Skład kwasów tłuszczowych w TAG [%] Total fatty acids in TAG [%]	Skład kw. tłuszcz. [%] w pozycjach Fatty acid distribution [%] in the position		Udział danego kwasu tłuszcz. w pozycji <i>sn</i> -2 [%] A given fatty acid distribution in the <i>sn</i> -2 position
		<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	
14:0	2,2	3,7	1,5	56,1
16:0	22,4	18,5	24,3	27,5
16:1 cis 9	0,8	0,7	0,8	29,2
17:0	1,5	1,2	1,7	26,7

c.d. Tab. 5

18:0	21,2	17,6	23,0	27,7
18:1 trans 9	1,1	0,5	1,4	15,2
18:1 cis 9	32,0	30,5	32,8	31,8
18:2 all cis	8,2	13,0	5,8	52,8
18:3 all cis	3,6	6,0	2,4	55,6
20:1	0,8	0,2	1,1	8,3
22:1	0,3	0,1	0,4	11,1

Tabela 6

Skład kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 TAG mieszaniny S : RSO (3:2) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów w pozycji *sn*-2 po przeestryfikowaniu chemicznym.

The composition of fatty acids in the *sn*-1.3 and *sn*-2 positions, in the TAG (triacylglycerols) obtained from a blend S:RSO (3-2), and the per cent distribution of individual acids in the *sn*-2 position after the chemical interesterification.

Rodzaj kwasu tłuszczowego Type of fatty acid	Skład kwasów tłuszczowych w TAG [%] Total fatty acids in TAG [%]	Skład kw. tłuszcz. [%] w pozycjach Fatty acid distribution [%] in the position		Udział danego kwasu tłuszcz. w pozycji <i>sn</i> -2 [%] A given fatty acid distribution in the <i>sn</i> -2 position
		<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	
14:0	2,2	2,5	2,1	37,8
16:0	22,4	22,4	22,4	33,3
16:1 cis 9	0,8	0,8	0,8	33,3
17:0	1,5	1,5	1,5	33,3
18:0	21,2	21,0	21,3	33,0
18:1 trans 9	1,1	1,0	1,2	30,3
18:1 cis 9	32,0	32,0	32,0	33,3
18:2 all cis	8,2	8,7	8,0	35,4
18:3 all cis	3,6	4,0	3,4	37,0
20:1	0,8	0,6	0,9	25,0
22:1	0,3	0,2	0,3	22,2

Tabela 7

Skład kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 TAG mieszaniny S : RSO (3:2) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów w pozycji *sn*-2 po przeestryfikowaniu enzymatycznym prowadzonym w obecności preparatu Novozym 435, zawierającego 2% wody w preparacie.

The composition of fatty acids in the *sn*-1,3 and *sn*-2 positions, in the TAG (triacylglycerols) obtained from a blend S:RSO (3-2), and the per cent distribution of individual acids in the *sn*-2 position after enzymatic interesterification performed with a preparation Novozym 435 (containing 2% water).

Rodzaj kwasu tłuszczowego Type of fatty acid	Skład kwasów tłuszczowych w TAG [%] Total fatty acids in TAG [%]	Skład kw. tłuszcz. [%] w pozycjach Fatty acid distribution [%] in the position		Udział danego kwasu tłuszcz. w pozycji <i>sn</i> -2 [%] A given fatty acid distribution in the <i>sn</i> -2 position
		<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	
14:0	2,2	2,6	2,0	39,4
16:0	22,4	22,0	22,6	32,7
16:1 cis 9	0,8	0,8	0,8	33,3
17:0	1,5	1,4	1,6	31,1
18:0	21,2	17,9	22,9	28,1
18:1 trans 9	1,1	0,8	1,3	24,2
18:1 cis 9	32,0	32,0	32,0	33,3
18:2 all cis	8,2	9,3	7,7	37,8
18:3 all cis	3,6	4,3	3,3	39,8
20:1	0,8	0,5	1,0	20,8
22:1	0,3	0,2	0,3	22,2

Tabela 8

Skład kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 i *sn*-2 TAG mieszaniny S:RSO (3:2) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów w pozycji *sn*-2 po przeestryfikowaniu enzymatycznym prowadzonym w obecności preparatu Lipozyme IM, zawierającego 4% wody w preparacie.

The composition of fatty acids in the *sn*-1,3 and *sn*-2 positions, in the TAG (triacylglycerols) obtained from a blend S:RSO (3-2), and the per cent distribution of individual acids in the *sn*-2 position after enzymatic interesterification performed with a preparation Lipozyme IM (containing 4% water).

Rodzaj kwasu tłuszczowego Type of fatty acid	Skład kwasów tłuszczowych w TAG [%] Total fatty acids in TAG [%]	Skład kw. tłuszcz. [%] w pozycjach Fatty acid distribution [%] in the position		Udział danego kwasu tłuszcz. w pozycji <i>sn</i> -2 [%] A given fatty acid distribution in the <i>sn</i> -2 position
		<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	
14:0	2,2	3,5	1,6	53,0
16:0	22,4	18,6	24,3	27,7
16:1 cis 9	0,8	0,7	1,7	29,2

c.d. Tab. 8

17:0	1,5	1,3	3,2	28,9
18:0	21,2	17,4	23,1	27,4
18:1 trans 9	1,1	0,5	1,4	15,2
18:1 cis 9	32,0	30,3	32,9	31,6
18:2 all cis	8,2	12,8	5,9	52,0
18:3 all cis	3,6	5,8	2,5	53,7
20:1	0,8	0,3	1,1	12,5
22:1	0,3	0,1	0,4	11,1

### Wnioski

1. W wyniku procesów przeestryfikowania mieszanin zawierających stearynę lub oleinę i olej rzepakowy 3 : 2 (m/m) zanotowano wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych oraz niepełnych acylogliceroli (MAG, DAG) w stosunku do ich zawartości w tłuszczach niepoddanych modyfikacji.
2. W porównaniu z mieszaninami wyjściowymi przeestryfikowanie spowodowało obniżenie temperatury mięknięcia i zmniejszenie zawartości fazy stałej w układzie zawierającym stearynę i olej rzepakowy, natomiast w układzie zawierającym oleinę i olej roślinny przeestryfikowanie spowodowało wzrost obu wymienionych parametrów.
3. Wyniki uzyskane w oznaczeniach rozmieszczenia kwasów tłuszczowych pomiędzy pozycje w triacyloglicerolach, dotyczące przeestryfikowania chemicznego, dowodzą, że produkty przeestryfikowania katalizowanego metanolanem sodu charakteryzowały się statystycznym rozkładem kwasów tłuszczowych w cząsteczkach triacylogliceroli, modyfikowane w obecności preparatu Novozym 435 były bliskie statystycznemu rozmieszczeniu kwasów tłuszczowych w cząsteczkach TAG, zaś produkty uzyskane w drodze modyfikacji enzymatycznej prowadzonej w obecności preparatu Lipozyme IM powstały w drodze przegrupowania kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 triacylogliceroli.
4. Uzyskane rezultaty upoważniają do stwierdzenia, że można zaprogramować właściwości fizyczne i chemiczne tłuszczów z udziałem łożu wołowego i oleju rzepakowego, dobierając odpowiednio parametry prowadzenia reakcji przeestryfikowania czyli temperaturę, czas trwania reakcji, skład mieszaniny fizycznej lub rodzaj katalizatora.

### Literatura

- [1] Al-Rashood K. A., Abou-Shaabab R. R. A., Abdel-Moety E. M., Rauf A.: Compositional and thermal characterization of genuine and randomized lard: a comparative study. J. Am. Oil Chem. Soc., 1996, **73**, 303-309.

- [2] Angers P, Arul O.: A simple method for regiospecific analysis of triacylglycerols by gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, **76** (4), 481-484.
- [3] Bhattacharyya S., Bhattacharyya D. K., De B. K.: Modification of tallow fractions in the preparation of edible fat products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, **102**, 323-328.
- [4] Boukhchina S., Gresti J., Kallel H., Bezard J.: Stereospecific analysis of TAG from sunflower seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2000, **80** (1), 5-8.
- [5] Brockerhoff H.: A stereospecific analysis of triglycerides. *J. Lipid Res.*, 1965, **6**, 10-15.
- [6] Drozdowski B.: Wpływ budowy glicerydów i występujących w nich kwasów tłuszczowych na mechanizm hydrolizy enzymatycznej. *Zesz. Nauk. Politechniki Gdańskiej. Chemia*, 1974, **25**, 3-86.
- [7] Grompone A.: Physicochemical properties of fractionated beef tallows. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1989, **66**, 253-255.
- [8] Gruczyńska E., Kowalska M., Tarnowska K., Kowalski B.: Właściwości przeestryfikowanych mieszanin olejów roślinnych i triacylogliceroli łoju wołowego. *Mat. IX Międzyn. Konf. Nauk., Kowno 2001*, s. 126-133.
- [9] Gruczyńska E., Maciaszek K.: Przeestryfikowanie jako metoda modyfikacji właściwości lipidów. *Żywność, Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **3** (24) Supl., 31-38.
- [10] Gunstone F.G.: *Lipid Science and Lipid Commerce*, ARKIVOC 2002, III 143-148, ISSN 1424-637, ARKAT, <http://www.arkat-usa.org/ark/journal/2002>.
- [11] Informacja handlowa B 347c-GB 500, March 1997, Novo Nordisk A/S.
- [12] Informacja handlowa B 606c-GB 500, March 1997, HSV Novo Nordisk A/S.
- [13] Kowalska M., Gruczyńska E., Bekas W., Dziurosz J., Kowalski B.: Właściwości chemiczne i fizyczne przeestryfikowanych mieszanin oleiny łoju wołowego i olejów roślinnych, *Mat. XXXIII Sesji Nauk. KTiChŻ PAN. P-II-25*, Lublin 2002, s.177.
- [14] Ledóchowska E., Datta I.: Enzymatyczne i chemiczne przeestryfikowanie mieszaniny oleju rzepakowego i stearyny palmowej. *Tłuszcze Jadalne*, 1995, **30**, 169-183.
- [15] Ledóchowska E., Datta I.: Optimization of enzymatic inter-esterification of fats to increase the content of triacylglycerols in the reaction product. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1998, **7** (48), 683-691.
- [16] Ledóchowska E., Wilczyńska E.: Comparison of the oxidative stability of chemically and enzymatically interesterified fats. *Fett / Lipid*, 1998, **100**, 343-348.
- [17] Ledóchowska E.: Wybrane aspekty enzymatycznego przeestryfikowania triacylogliceroli. *Wyd. Nauk. Politechniki Gdańskiej*, Gdańsk 1999, s. 1-81.
- [18] Ledóchowska E.: Zastosowanie enzymatycznego przeestryfikowania do modyfikacji tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, 1995, **30** (2), 43-47.
- [19] Marangoni A. G., Rousseau D.: The influence of chemical interesterification on the physicochemical properties of complex fat systems. I–Melting and crystallization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998, **75**, 1265-1271.
- [20] Parmentier M.: Fractionation of fats – a dossier. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, **102** (3), 233.
- [21] PN–EN ISO 8420: 2004. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości związków polarnych.
- [22] PN ISO 660: 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby kwasowej i kwasowości.
- [23] PN ISO 6321: 1991. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie punktu topnienia w kapilarze otwartej (punkt płynięcia).
- [24] PN–EN ISO 8292: 1995. Oznaczanie zawartości fazy stałej. Metoda pulsacyjnego magnetycznego rezonansu jądrowego.
- [25] PN ISO 5509: 1995. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych.



- [26] Rodriguez A., Castro E., Salinas M.C, Lopez R., Miranda M., Rosales V.P.: Interesterification of tallow and sunflower oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 2001, **78**, 431-436.
- [27] Rozenaal A.: Interesterification of oils and fats. Inform, 1992, **3**, 1232-1237.
- [28] Schmidt Š., Hurtová S., Zemanovič J., Sekretár S., Šimon P., Ainsworth P.: Preparation of modified fats from vegetable oil and fully hydrogenated vegetable oil by randomization with alkali catalysts. Food Chem., 1996, **55**, 343-348.

### THE INTERESTERIFICATION OF BLENDS MADE OF BEEF TALLOW AND RAPESEED OIL FRACTIONS

#### Summary

Beef tallow is one of the most important by-products of the meat industry. It is used in many different production branches and ranges. However, its application in the food industry is limited by its very specific physical properties. In order to make beef tallow potentially suitable and applicable in the food industry, it should be fractionated and interesterified.

The objective of this study was to determine the impact of chemical and enzymatic interesterification reactions performed using the fractions of beef tallow and rapeseed oils (their content proportion being 3:2) on some selected properties of their blends.

Triacylglycerol molecules were interesterified both chemically, using sodium methoxide, and enzymatically using two preparations: Novozym 435 (non-specific in relation to the position of ester bonds) and Lipozyme IM (a preparation appearing specific in relation to ester bonds in the *sn* – 1,3 position). The following parameters were analyzed both in the physical blends and in their products after the interesterification performed: slip melting point; solid fat content; acid value; polar fractions; and, additionally, the composition and distribution of total fatty acids (*sn*-1,3 and *sn*-2).

It was stated that, after the interesterification, the parameters: acid value and content of polar fractions increased. On the other hand, the value of slip melting point and the content of solid phase in the blends containing stearin and rapeseed oil were lower compared to non-esterified blends. The content of fatty acids remained unchanged, however, changes were stated in the distribution of fatty acids, namely, in the positions *sn*-1,2,3 after the chemical esterification and the catalytic esterification with the Novozym 435 preparation applied. The content of total fatty acids in the *sn*-2 position remained the same (unchanged) after the interesterification performed with the Lipozyme IM preparation.

**Key words:** fractionation, interesterification, beef tallow, rapeseed oil, olein, stearin 

EWELINA KRÓL, MARIA SOBIECH, ZBIGNIEW KREJPCIO

**OCENA SPOŻYCIA SKŁADNIKÓW MINERALNYCH  
W CAŁODZIENNYCH RACJACH POKARMOWYCH WYBRANEJ  
GRUPY WEGETARIAN I NIEWEGETARIAN**

**Streszczenie**

W ostatnich latach obserwuje się w Polsce wzrost zainteresowania alternatywnymi sposobami żywienia, zwłaszcza wegetarianizmem. Jeśli dieta wegetariańska jest dobrze zbilansowana, to dostarcza wszystkich składników odżywczych. W przeciwnym przypadku mogą wystąpić niedobory niektórych składników pokarmowych, w szczególności składników mineralnych i witamin.

W niniejszej pracy oszacowano spożycie składników mineralnych w całodziennych racjach pokarmowych (CRP) wegetarian i grupy kontrolnej.

Dane dotyczące sposobu żywienia się obu grup zebrano wykorzystując metodę wywiadu 24-godzinnego. Na podstawie uzyskanych wyników oszacowano wartość odżywczą całodziennych racji pokarmowych oraz określono, w jakim stopniu pokrywają one zalecaną normę wyżywienia na poszczególne składniki. Stwierdzono, że w porównaniu z grupą kontrolną, całodziennie racje pokarmowe wegetarian dostarczyły istotnie więcej fosforu, żelaza i magnezu, przekraczając nawet w tym zakresie zalecane normy. W CPR wegetarian więcej było także miedzi, lecz analizowane diety nie pokrywały w pełni dziennego zapotrzebowania na ten mikroelement. Natomiast podaż wapnia i cynku, porównywalna w obu grupach, była zbyt niska i nie zaspakajala w całości normy zalecanej dla wieku i płci.

**Słowa kluczowe:** wegetarianie, niewegetarianie, całodziennie racje pokarmowe, składniki mineralne

**Wprowadzenie**

W ostatnich latach, zarówno w Polsce, jak i w innych krajach, nastąpił wzrost zainteresowania alternatywnymi sposobami żywienia, w tym wegetarianizmem. Klasyczny wegetarianizm to sposób odżywiania się wyłącznie produktami roślinnymi. Istnieją także odmiany łagodne tego sposobu odżywiania się dopuszczające uzupełnienie pokarmów produktami mlecznymi (laktowegetarianizm), jajami (laktoowowegetarianizm), a nawet rybami czy drobiem (semiwegetarianizm) [5].

---

*Mgr inż. E. Król, mgr inż. M. Sobiech, dr hab. Z. Krejpcio Katedra Higieny Żywienia Człowieka, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, e-mail: ekrol@au.poznan.pl*

W wielu krajach wegetarianizm na podłożu kulturowe bądź religijne, w Polsce wybór tej diety wynika w dużym stopniu z przekonań ekologicznych, uwarunkowań ekonomicznych oraz z oczekiwania pozytywnego oddziaływania diety roślinnej na organizm. Liczne badania naukowe wykazały, że wegetarianie charakteryzują się na ogół mniejszą zapadalnością na choroby cywilizacyjne, w tym na cukrzycę, otyłość, nadciśnienie, osteoporozę, nowotwory oraz choroby serca [5, 8, 9].

Należy zaznaczyć, że na zdrowie wegetarian korzystnie wpływają również czynniki pozażywieniowe, gdyż zazwyczaj prowadzą oni bardziej higieniczny tryb życia, dbają o kulturę fizyczną, nie palą papierosów i nie nadużywają alkoholu, co wynika z większej profilaktyki zdrowotnej [5]. Z drugiej strony udowodniono, że dieta wegetariańska może dostarczać zbyt małych ilości niektórych składników odżywczych, takich jak: białko, żelazo, cynk, wapń, witaminy B<sub>12</sub> i A oraz n-3 kwasy tłuszczowe [1, 2, 4, 5, 6, 7].

Celem niniejszej pracy była ocena spożycia składników mineralnych przez osoby stosujące dietę wegetariańską w porównaniu z grupą kontrolną, którą stanowiły osoby odżywiające się tradycyjnie.

### **Materiał i metody badań**

Badania przeprowadzono na dwóch grupach studentów: 15 wegetarian i 15 osób odżywiających się w sposób tradycyjny. Średnia wieku wegetarian wynosiła ok. 23 lata, natomiast grupy kontrolnej ok. 24 lata. W grupie badanych wegetarian było: 8 laktoowegetarian, 5 semiwegetarian oraz 2 laktowegetarian. Ocenę sposobu żywienia się przeprowadzono w okresie jesienno-zimowym metodą wywiadu 24-godzinnego w 3 powtórzeniach, z wykorzystaniem „Albumu porcji produktów i potraw” [10]. Wartość odżywczą całodziennych racji pokarmowych (CRP) obliczano za pomocą programu Dietetyk 2001, a uzyskane wyniki porównano z normami żywienia zalecanymi dla osób o odpowiedniej grupie wiekowej i płci [12].

Zmiany w spożyciu składników mineralnych zweryfikowano testem t-Studenta, przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ , wykorzystując program komputerowy Excel (5.0).

### **Wyniki i dyskusja**

Stosowanie diety wegetariańskiej może potencjalnie wpłynąć na ryzyko wystąpienia niedoborów niektórych pierwiastków. W tab. 1 przedstawiono średnie dzienne spożycie niektórych składników mineralnych w grupie wegetarian i osób odżywiających się tradycyjnie. Podaż składników mineralnych porównano z obowiązującymi normami żywieniowymi, a realizację tych norm przedstawiono na rys. 1.

Stwierdzono, że średnie spożycie sodu w diecie było wysokie i wynosiło w grupie wegetarian 1477 mg/dzień, a w grupie kontrolnej 1892 mg/dzień, co stanowiło odpowiednio 250 i 300% zalecanej normy.

Średnia podaż potasu w diecie wegetarian wynosiła 3137 mg/dzień, a w grupie kontrolnej 2819 mg/dzień. Pobranie tego pierwiastka z diety w obu grupach nie pokrywało całkowicie dziennego zapotrzebowania, które ustalono dla obu płci na poziomie 3500 mg/dzień [12].

Przeciętny stosunek Na/K w analizowanych dietach był zbyt niski i wynosił w grupie wegetarian oraz niewegetarian odpowiednio 0,53 i 0,71.

Tabela 1

Podaż składników mineralnych z diety wegetariańskiej i tradycyjną.  
The intake of minerals in food rations of vegetarians vs. non-vegetarians.

Składnik mineralny Mineral	Jednostka Unit	Grupa wegetarian Group of vegetarians $\bar{x} \pm SD$	Grupa kontrolna Control group $\bar{x} \pm SD$	test t-Studenta t-Student test
Sód / Sodium	mg	1477 ± 714	1892 ± 888	N.I.
Potas / Potassium	mg	3137 ± 936	2819 ± 951	N.I.
Wapń / Calcium	mg	911 ± 400	801 ± 398	N.I.
Fosfor / Phosphorous	mg	1519 ± 411	1174 ± 410	p<0,05
Magnez / Magnesium	mg	430 ± 123	278 ± 98	p<0,001
Żelazo / Iron	mg	23 ± 11	12 ± 3	p<0,005
Cynk / Zinc	mg	13 ± 8	10 ± 4	N.I.
Miedź / Copper	mg	1,85 ± 1,04	1,09 ± 0,48	p<0,05
Na / K	-	0,53 ± 0,28	0,71 ± 0,24	N.I.
Ca / P	-	0,61 ± 0,21	0,69 ± 0,22	N.I.

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

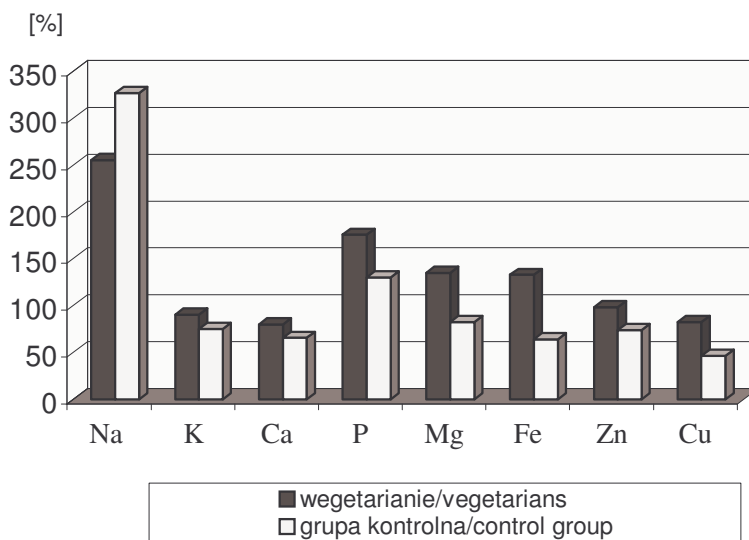
N.I. – brak statystycznie istotnych różnic / no statistically significant differences occur

Mimo tego, że dieta wegetariańska zawierała więcej wapnia, średnio 911 mg/dzień w porównaniu z dietą grupy kontrolnej – średnio 801 mg/dzień, spożycie tego pierwiastka w obu grupach było zbyt niskie. Żadna z diet nie pokrywała całkowicie zapotrzebowania na ten pierwiastek, a realizacja zalecanych norm żywienia wynosiła odpowiednio 66% wśród osób odżywiających się tradycyjnie oraz 87% wśród wegetarian. Fakt ten uznać należy za niepokojący, gdyż niedobory wapnia w diecie mogą wpływać niekorzystnie na rozwój układu kostnego i zwiększyć ryzyko zmian osteoporetycznych w wieku późniejszym.

Racje pokarmowe wegetarian zawierały znacznie większe ilości fosforu, średnio 1519 mg/dzień w porównaniu z grupą kontrolną, średnio 1174 mg/dzień. Podaż tego składnika przekroczyła zalecaną dla wieku i płci normę, w grupie wegetarian i niewegetarian odpowiednio o 76 i 30%.

Optymalny stosunek molowy Ca:P powinien wynosić 1:1, a w przeliczeniu na jednostki wagowe 1,3:1. Analiza wykazała, że stosunek molowy Ca:P był

nieprawidłowy zarówno w diecie wegetarian, jak i tradycyjnej i wynosił średnio: 1:1,67 oraz w grupie kontrolnej 1:1,47. Wynika to przede wszystkim z nadmiernego spożycia fosforu, co jest skutkiem spożywania dużych ilości produktów zbożowych obfitujących w ten składnik, a zarazem zbyt niskiego spożycia produktów bogatych w wapń (mleko i jego przetwory).



Rys. 1. Odsetek realizacji norm dziennego spożycia składników mineralnych w dietach wegetarian i niewegetarian

Fig. 1. Percentage rate of the realized daily intakes of minerals as recommended by a relevant standard, in the vegetarian and non-vegetarian diets

Średnia podaż magnezu w racjach pokarmowych wegetarian wynosiła 430 mg/dzień (135% normy) i była znacznie większa w porównaniu z ilością tego pierwiastka w diecie tradycyjnej, która wynosiła średnio 278 mg/dzień i pokrywała zapotrzebowanie organizmu na ten pierwiastek w 82%.

Zadawalające są natomiast wyniki podaży żelaza w CRP w grupie wegetarian, która wynosiła średnio 23 mg/dzień (133% normy) i było istotnie większe ( $p < 0,005$ ) niż w grupie kontrolnej – 12 mg/dzień (64% normy). Jednak należy zaznaczyć, że choć w dietach wegetariańskich podaż tego pierwiastka w porównaniu z grupą kontrolną była istotnie wyższa to ogólnie wiadomo, że żelazo z produktów roślinnych (niehemowe) jest trudniej przyswajalne niż pochodzące z produktów zwierzęcych (żelazo hemowe).

Średnie spożycie cynku w dietach: wegetariańskiej i tradycyjnej nie różniło się znacznie i wynosiło odpowiednio 13 mg/dzień i 10 mg/dzień. Jednak żadna z diet nie pokrywała całkowicie zapotrzebowania organizmu na ten pierwiastek, a norma została zrealizowana w 94% w diecie wegetariańskiej oraz w 74% w diecie tradycyjnej.

Miedź jest pierwiastkiem, który wchodzi w skład wielu enzymów niezbędnych w procesach metabolicznych oraz bierze udział w wytwarzaniu tkanki kostnej i łącznej.

Pobranie miedzi w diecie wegetariańskiej wynosiło średnio 1,85 mg/dzień i było znacznie większe w porównaniu z dietą tradycyjną, która dostarczała średnio 1,09 mg/dzień. Analizowane diety nie pokrywały jednak dziennego zapotrzebowania w pełni na ten mikroelement, bowiem jego podaż w diecie wegetariańskiej i tradycyjnej stanowiła odpowiednio 83 i 47% normy.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że podaż składników mineralnych w diecie wegetariańskiej była wystarczająca, z wyjątkiem wapnia, co wskazuje, że dostarczała ona odpowiednich ilości tych składników.

Podsumowując, należy podkreślić, że z wyjątkiem sodu, osoby stosujące dietę wegetariańską pobierały z dietą większe ilości makro- i mikroskładników w porównaniu z grupą odżywiającą się w sposób tradycyjny.

W badaniach przeprowadzonych przez Człapkę-Matyasik i wsp. [3] stwierdzono, że dieta wegetariańska w porównaniu z dietą tradycyjną dostarczała istotnie większych ilości wapnia i magnezu oraz istotnie mniej sodu. Podaż pozostałych pierwiastków tj. potasu, fosforu, żelaza i cynku w obu grupach nie różniła się znacznie. Traczyk i Ziemiański [11] stwierdzili podobnie większe pobranie żelaza wraz z dietą wegetariańską w porównaniu z grupą kontrolną, którą stanowiły osoby odżywiające się w sposób tradycyjny. Ponadto wykazano, że racje pokarmowe wegetarian i grupy kontrolnej, podobnie jak w niniejszej pracy, nie pokrywają całodziennego zapotrzebowania na wapń.

Z analizy danych, uzyskanych w trakcie przeprowadzania wywiadu 24-godzinnego, wynika, że zarówno wegetarianie, jak i osoby z grupy kontrolnej, uzupełniały dietę suplementami mineralnymi. W tab. 2. przedstawiono udział suplementów w pokryciu całodziennego zapotrzebowania na niektóre makro- i mikroelementy.

W grupie wegetarian zażywanie suplementów deklarowało 7 osób (47%) tj. 5 kobiet i 2 mężczyzn, natomiast w grupie kontrolnej 4 osoby (27%), przy czym były to tylko kobiety. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że w grupie wegetarian suplementy wносиły do całodziennego zapotrzebowania następujące ilości składników mineralnych w odniesieniu do ilości całkowitej: Ca – 3%, Fe – 35%, Zn – 15%, Cu – 9%. Pobranie fosforu z suplementami było niewielkie i wynosiło zaledwie 0,3%, natomiast zażywane suplementy nie miały udziału w całkowitej podaży magnezu.

W grupie kontrolnej natomiast udział preparatów farmaceutycznych w pokryciu zapotrzebowania na składniki mineralne przedstawiał się następująco: Ca – 5%, Mg – 3%, Fe – 8%, Zn – 10%, Cu – 4%. Udział fosforu wniesionego wraz z suplementami, podobnie jak w grupie wegetarian, był niewielki i wyniósł 0,3% tego pierwiastka.

Tabela 2

Udział suplementów w podaży składników mineralnych w całodziennych racjach pokarmowych grupy wegetarian i grupy kontrolnej

Supplements contribution in the quantities of minerals supplied by the daily food rations of the vegetarian and non-vegetarian groups

Składnik mineralny Mineral	Udział suplementów w całodziennym racji pokarmowej [%] Supplements contribution in the daily food rations [%]	
	Grupa wegetarian Group of vegetarian	Grupa kontrolna Control group
Wapń / Calcium	3	5
Fosfor / Phosphorous	0,3	0,3
Magnez / Magnesium	0	3
Żelazo / Iron	35	8
Cynk / Zinc	15	10
Miedź / Copper	9	4

Podsumowując, należy stwierdzić, że osoby stosujące dietę wegetariańską mają na ogół dobrą znajomość zasad prawidłowego żywienia i są świadome ewentualnych niedoborów mikroelementów, związanych ze stosowaniem alternatywnych sposobów odżywiania. Świadczy o tym przede wszystkim większy udział suplementów w pokryciu dziennego zapotrzebowania na składniki mineralne, w porównaniu z osobami odżywiającymi się w sposób tradycyjny.

### Wnioski

1. Pobranie sodu z diety wegetariańskiej było mniejsze w porównaniu z grupą kontrolną.
2. Podaż wapnia i cynku w dietach wegetariańskiej i tradycyjnej była stosunkowo mała i nie zaspakajała w całości zalecanej dla wieku i płci normy.
3. Ilość żelaza i magnezu dostarczonego wraz z dietą wegetariańską w porównaniu z grupą kontrolną była wysoka, co uznać należy za korzystne.
4. Podaż miedzi w diecie wegetarian była istotnie większa w porównaniu z grupą kontrolną.
5. Spośród osób stosujących dietę wegetariańską 47% zażywało suplementy mineralne, które w 35% zaspakajały zapotrzebowanie na żelazo, a w 15% na cynk.
6. W grupie odżywiającej się tradycyjnie 27% badanych stosowało suplementy mineralne, które w 8% pokrywały dzienne zapotrzebowanie na żelazo, a w 10% na cynk.

### Literatura

- [1] Alexander D., Ball M.J., Mann J.: Nutrient intake and haematological status of vegetarians and age-sex matched omniveres. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1994, **48**, **8**, 538-546.
- [2] Ball M.J., Ackland M.L.: Zinc intake and status in Australian vegetarians. *Br.J.Nutr.*, 2000, **83**, **1**, 27-33.
- [3] Człapka-Matyasik M., Jeszka J., Bajerska-Jarzębowska J.: Analiza sposobu żywienia i parametrów antropometrycznych kobiet stosujących łagodne odmiany jarstwa. *Żyw. Człow. Metab.*, 2003, **30**, 272-277.
- [4] Freeland-Graves J.H., Bodzy P.W., Epprihth M.A.: Zinc status of vegetarians. *Am. Diet. Assoc.*, 1980, **77**, **6**, 655-661.



- [5] Gawęcki J., Hryniewiecki L. (red.): *Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 2003.
- [6] Huang Y.C., Lin W.J., Cheng C.H., Su K.H.: Nutrient intakes and iron status of healthy young vegetarians and non-vegetarians. *Nutrition. Res.*, 1999, **19**, **5**, 663-674.
- [7] Larsson C.L., Johansson G.K.: Dietary intake and nutritional status of young vegans and omnivores in Sweden. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, **76**, **1**, 100-106.
- [8] Leitzmann C.: Vegetarian diets: what are the advantages? *Forum Nutr.*, 2005, **57**, 147-156.
- [9] Sobate J.: The contribution of vegetarian diets to human health, *Forum Nutr.*, 2003, **56**, 218-220.
- [10] Szponar L., Wolnicka K., Rychlik E.: *Album fotografii produktów i potraw*. Prace IŻŻ. Warszawa 2000.
- [11] Traczyk I., Ziemiański Ś.: Porównanie wartości odżywczej racji pokarmowych vegetarian i osób żywiących się tradycyjnie. *Żyw. Człow. Metab.*, 2000, **27**, 55-69.
- [12] Ziemiański Ś. (red.): *Normy żywienia człowieka. Podstawy fizjologiczne*. Wyd. Lek. PZWL. Warszawa 2001.

#### EVALUATION OF THE DIETARY INTAKE OF MINERALS IN THE DAILY FOOD RATIONS OF VEGETARIANS AND NON-VEGETARIANS

##### S u m m a r y

For several years, in Poland, the interest in alternative methods of nutrition, particularly in vegetarianism, has been increasing. A vegetarian diet supplies all the necessary nutrients provided it is well balanced, otherwise some nutrient deficiencies can occur, especially a mineral and vitamin deficiency.

In this paper, the dietary intake of minerals in the daily food rations (DFR) of vegetarians and non-vegetarians was evaluated. The data on the dietary habits and methods of the two groups studied were compiled using a 24 h dietary recall. On the basis of the results obtained, a nutritive value (level) of daily food rations was assessed, and it was determined to what degree the rations studied covered the recommended food intake standards with respect to individual nutrients. It was found that the daily food rations of vegetarians contained significantly higher phosphorus, iron, and magnesium quantities than the diets of non-vegetarians, and even more: the contents of these minerals exceeded the recommended standards. The vegetarian DFRs also contained more copper, however, the diets analyzed did not fully cover the daily demand for this microelement. The calcium and zinc intake levels were comparable in the two groups tested, but they were too low, and, thus, the intake of these two microelements did not meet the 100% requirements as recommended by the standard for a given age and sex group.

**Key words:** vegetarians, non-vegetarians, daily food rations, minerals ☒



URSZULA KRUPA, MARIA SORAL-ŚMIETANA

**WPLYW CZYNNIKÓW FIZYCZNYCH NA DOSTĘPNOŚĆ  
ENZYMATYCZNĄ *IN VITRO* BIAŁEK NASION FASOLI  
(*PHASEOLUS SP.*)**

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu czynników fizycznych zastosowanych podczas wodno-ciepłych procesów autoklawowania i mikrofalowania na zakres enzymatycznego trawienia *in vitro* białek wyodrębnionych z nasion dwóch polskich gatunków fasoli: fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*) odm. Aura i fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus*) odm. Eureka.

Analiza strawności *in vitro* preparatów białkowych przeprowadzona w środowisku symulującym fizjologiczne warunki trawienia białek w dwunastnicy wykazała, że temperatura i ciśnienie zastosowane w procesie autoklawowania powodowały znaczącą poprawę strawności badanych białek nasion fasoli. Natomiast po procesie mikrofalowania, po 10 min proteolizy, strawność preparatów białkowych była mniejsza niż preparatów białek z nasion niepoddanych obróbce hydrotermicznej. Na podstawie obrazu separacji żelowej SDS-PAGE białek wyodrębnionych z nasion przed obróbką wodno-cieplną stwierdzono dominujący udział frakcji o masie ok.  $49\text{--}45 \cdot 10^3$  Da, uznanej za faseolinę, charakteryzującej się znaczną stabilnością termiczną. Czynniki fizyczne w obydwu zastosowanych procesach powodowały zmiany zawartości frakcji białkowych, szczególnie widoczne w przypadku preparatu EA. Wyniki separacji SDS-PAGE uzupełniły analizę strawności *in vitro* i wykazały szczególny wpływ procesu autoklawowania nasion na wyizolowane z nich białka, widoczny na obrazie rozdziału.

**Słowa kluczowe:** nasiona fasoli, preparaty białkowe, procesy hydrotermiczne, strawność

## Wprowadzenie

Wartość odżywcza białek jest determinowana przez ich strawność, skład aminokwasowy oraz biodostępność poszczególnych aminokwasów [9]. Nasiona roślin strączkowych są bogatym źródłem białka pokarmowego, którego zawartość jest 2-krotnie wyższa w porównaniu z nasionami zbóż [38]. Białka nasion fasoli cechuje wysoka zawartość Lys, dlatego jako składnik diety mogą być uznane za uzupełniające

---

Mgr inż. U. Krupa, prof. dr hab. M. Soral-Śmietana, Zakład Funkcjonalnych Właściwości Żywności,  
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn,  
e-mail: Urszula.Krupa@pan.olsztyn.pl

w stosunku do białek zbożowych. Pomimo licznych zalet, białka roślin strączkowych uznawane są za mniej wartościowe w porównaniu z białkami zwierzęcymi. Przyczyną ich obniżonej wartości odżywczej jest mniejsza wrażliwość na proteolizę *in vivo* w porównaniu z białkami zwierzęcymi, mała zawartość aminokwasów siarkowych (Met i Cys), zwarta struktura utrudniająca dostęp enzymom proteolitycznym oraz obecność niebiałkowych substancji (DF, taniny, fityniany) i/lub antyfizjologicznych białek (inhibitory proteaz, lektyny), których występowanie może w znacznym stopniu utrudniać ich trawienie [9].

Naukowcy są zgodni co do faktu, że antyodżywcze białka oraz substancje ograniczające hydrolizę (taniny, fityniany) mogą być dezaktywowane poprzez zastosowanie obróbki termicznej [5, 7], jednak stanowisko wobec wpływu czynników fizycznych na zmiany strukturalne białek, oddziałujące na zmiany ich strawności nie jest jednoznaczne.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu czynników fizycznych (temperatury, ciśnienia, mikrofal, środowiska nadmiaru wody) zastosowanych podczas obróbki wodno-ciepłej na dostępność enzymatyczną białek wyodrębnionych z nasion fasoli.

### **Materiał i metody badań**

Materiałem badawczym były białka wyizolowane z nasion dwóch polskich gatunków fasoli: fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*) odm. Aura i fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus*) odm. Eureka. Nasiona obu odmian w środowisku nadmiaru wody (w stosunku 3:1 v/m) poddawano procesom autoklawowania (101 kPa/ 121°C/16 min) i mikrofalowania (650 W/30 min). Nasiona po procesach liofilizowano, a następnie rozdrabniano, uzyskując 100% frakcji o cząstkach  $\leq 0,4$  mm. Do oznaczenia poszczególnych preparatów wprowadzono symbole literowe:

- AN, EN – preparaty białkowe z suchych, obłuszczonych nasion fasoli odmian Aura i Eureka,
- AA, EA – preparaty białkowe z całych, autoklawowanych nasion fasoli odmian Aura i Eureka,
- AM, EM – preparaty białkowe z całych, mikrofalowanych nasion fasoli odmian Aura i Eureka.

### *Izolowanie białek*

Do wyodrębnienia białek zastosowano metodę Fana i Sosulskiego [13]. Preparaty białkowe ekstrahowano roztworem NaOH o pH 9,2. Wytrącano je z ekstraktu w punkcie najmniejszej rozpuszczalności (pH 4,3). Zawiesinę preparatów białkowych

dializowano przez 48 godz. w temp. 4°C w obecności wody destylowanej, a następnie liofilizowano.

Skład chemiczny badanego materiału określano, stosując standardowe metody analityczne i oznaczano: wilgotność [32], zawartość skrobi ogółem [3] z wcześniejszą ekstrakcją sacharydów w 70% metanolu, zawartość popiołu całkowitego [4, 31] oraz zawartość białka ogółem metodą Kjeldahla [4, 30].

Na podstawie przeprowadzonego rozdzielania elektroforetycznego na żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE [22] określano masy cząsteczkowe frakcji białkowych. Rozdział prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym przy stałym natężeniu prądu 25 mA/1,5 godz. Do określenia mas cząsteczkowych frakcji białek użyto następujących wzorców:  $66 \cdot 10^3$  Da – albumina;  $45 \cdot 10^3$  Da – owoalbumina;  $36 \cdot 10^3$  Da – dehydrogenaza 3-fosfogliceroaldehydu;  $29 \cdot 10^3$  Da – anhydraza węglowa;  $24 \cdot 10^3$  Da – trypsynogen;  $20,1 \cdot 10^3$  Da – inhibitor trypsyny;  $14,2 \cdot 10^3$  Da –  $\alpha$ -laktoalbumina;  $6,5 \cdot 10^3$  Da – aprotynina. Zastosowane odczynniki pochodziły z firmy SIGMA.

Strawność *in vitro* wyodrębnionych białek oznaczano metodą wieloenzymatyczną Hsu i wsp. [16]. Stosowano następujące enzymy: trypsynę 16,600 jednostek/mg białka (SIGMA T-0303), chymotrypsynę 76 jednostek/mg białka (SIGMA C-4129) oraz peptydazę 0,102 jednostek/g białka (SIGMA P-7500). Roztwór białka (50 ml; 6,25 mg białka/ml) umieszczano w łaźni wodnej o temp. 37°C i mieszając, doprowadzano do pH 8. Dodawano 5 ml roztworu mieszaniny enzymatycznej (pH 8). Spadek pH obserwowano w ciągu 10-minutowej proteolizy preparatów białkowych. Strawność *in vitro* obliczano z równania [16]:

$$y = 201,464 - 18,103 \times A$$

y – strawność *in vitro*, [%],

A – pH próbki po 10 min.

## Wyniki i dyskusja

### *Skład chemiczny nasion fasoli i preparatów białkowych*

Skład chemiczny nasion fasoli analizowano w rozdrobnionym materiale przed obróbką wodno-cieplną w porównaniu z materiałem uzyskanym po hydrotermicznych procesach autoklawowania i mikrofalowania (tab. 1). Zawartość skrobi ogółem w nasionach dwóch badanych odmian fasoli Aura i Eureka przed procesami hydrotermicznymi była zbliżona i w całych nasionach wynosiła ponad 48% s.m. Porównując uzyskane wyniki z danymi tabelarycznymi [21], informującymi o zawartości skrobi w nasionach fasoli na poziomie 40,8% s.m., stwierdzono, że badane w tej pracy odmiany fasoli są bogatszym źródłem skrobi, co może być związane z długością okresów nawilżenia i nasłonecznienia podczas rozwoju i dojrzewania nasion. Zastosowane

procesy wodno-ciepne autoklawowania i mikrofalowania nie spowodowały znaczących zmian zawartości tego biopolimeru w nasionach badanych odmian fasoli. Jedynie w przypadku nasion odmiany Eureka poddanych procesowi mikrofalowania obserwowano spadek zawartości skrobi ogółem, co można uznać za skutek depolimeryzacji cząsteczki i/lub wytworzenia porcji dekstryn lub cukrów łatwo ekstrahujących się w postępowaniu metodycznym przed analizą skrobi.

Tabela 1

Skład chemiczny nasion fasoli.

Chemical composition of the bean seeds.

Skład chemiczny Chemical composition	'AURA'			'EUREKA'		
	Całe nasiona Whole seeds	Nasiona autoklawowane Autoclaved seeds	Nasiona mikrofalowane Microwaved seeds	Całe nasiona Whole seeds	Nasiona autoklawowane Autoclaved seeds	Nasiona mikrofalowane Microwaved seeds
Wilgotność Moisture [%]	10,83 ± 0,22	-	-	12,67 ± 0,09	-	-
Zawartość skrobi ogółem Total starch content [% s.m./% d.m.]	48,47 ± 1,86	45,55 ± 1,44	46,60 ± 2,72	48,10 ± 2,13	48,21 ± 0,75	39,41 ± 2,61
Zawartość białka ogółem Content of total proteins [% s.m./% d.m.]	28,11 ± 0,35	26,19 ± 0,66	26,50 ± 1,59	22,01 ± 2,07	22,11 ± 1,41	23,39 ± 0,36
Zawartość popiołu Ash content [% s.m./% d.m.]	3,84 ± 0,02	3,76 ± 0,02	3,53 ± 0,11	3,91 ± 0,03	3,20 ± 0,10	3,67 ± 0,06

Analiza zawartości białka ogółem wskazuje na znaczące różnice pomiędzy badanymi odmianami fasoli. Nasiona odmiany Eureka charakteryzowały się mniejszą o ok. 6% zawartością białka (tab. 1). Uzyskane wyniki, w odniesieniu do wcześniejszych dotyczących tych samych odmian fasoli, potwierdzają, że zawartość białka jest cechą gatunkową oraz sugerują jej zależność od wielkości i budowy morfologicznej nasion [20]. Znaczący wpływ na skład chemiczny nasion fasoli, poza właściwościami fizjologicznymi, mają warunki glebowo-klimatyczne w okresie wegetacji [1]. Zawartość białka w nasionach odm. Aura pochodzących ze zbiorów 2003 r. była znacznie większa niż uzyskano w poprzednim sezonie wegetacyjnym [20]. Pozwala to przypuszczać, że obok odmiany, ważnym czynnikiem decydującym o składnikach

chemicznych mających strukturę polimeru są warunki klimatyczne. Zastosowane w doświadczeniu dwa procesy obróbki wodno-ciepłej nasion spowodowały zmiany zawartości białka ogółem, wskazując na zróżnicowaną tendencję w obu odmianach.

Średnia zawartość związków mineralnych w nasionach analizowanych odmian fasoli wynosiła ok. 4% s.m. (tab.1) i była zbliżona do danych literaturowych (3,0–3,9% s.m.) dotyczących nasion fasoli [18, 20, 21, 36]. Na skutek zastosowanych zabiegów wodno-ciepłych zaobserwowano nieznaczną tendencję zmniejszania ilości związków mineralnych ogółem, analizowanych jako zawartość popiołu.

Ze względu na wysoką zawartość białka w preparatach wyodrębnionych z suchych nasion fasoli odmian Aura – 98,99% s.m. i Eureka – 99,56% s.m., można je nazwać izolatami. Podobnie Pilosof i wsp. [29] oraz Sathe i Salunkhe [35], stosując metodę wytrącania w punkcie najmniejszej rozpuszczalności, uzyskali preparaty białkowe o wysokiej zawartości białka 81,1–91%. Zastosowane procesy hydrotermiczne wpływały na ogólną zawartość białka w całych nasionach (tab. 1), spowodowały również zmiany w strukturze liścieni, skutkiem czego były zmiany w strukturze matrycy białkowej nasion utrudniające izolacje. Preparaty białkowe uzyskane z nasion obu odmian fasoli poddanych autoklawowaniu zawierały odpowiednio 60,38 (AA) i 56,60% s.m. (EA) białka ogółem. Proces mikrofalowania spowodował zmniejszenie zawartości białka ogółem, zarówno w przypadku odm. Aura (ok. 25%), jak i odm. Eureka (ok. 40%) (tab. 1).

#### *Strawność in vitro preparatów białek fasoli*

Strawności preparatów białkowych, wyizolowanych z obłuszczonych, suchych (AN, EN) oraz nieobłuszczonych lecz poddanych procesom autoklawowania (AA i EA) i mikrofalowania (AM i EM) nasion obu odmian fasoli po 10 min hydrolizy przedstawiono w tab. 2. Strawność *in vitro* oznaczano stosując metodę wieloenzymatyczną, w której wykorzystano mieszaninę trzech enzymów o aktywności proteolitycznej: trypsynę, chymotrypsynę oraz peptydazę.

Strawność preparatów białkowych uzyskanych z suchych nasion fasoli przed obróbką wodno-cieplną wynosiła 80,54% (AN) i 81,36% (EN). Uzyskane wyniki są porównywalne ze strawnością białek amorficznych wyizolowanych z nasion polskich odmian fasoli niepoddawanych obróbce termicznej [27]. Jednak według licznych autorów strawność *in vitro* białek nasion fasoli jest niewielka i waha się w przedziale 62–72% [6, 14]. Alonso i wsp. [2] oraz Deshpande i wsp. [11] podają, że obłuszczenie nasion fasoli ma wpływ na strawność *in vitro* wyizolowanych z nich białek, a różnice w strawności pomiędzy białkami wyizolowanymi z nasion obłuszczonych i całych, wynoszą ok. 5%. Okrywa nasienna fasoli stanowi ok. 10% masy nasion [37].

Kwasy fenolowe oraz inhibitory trypsyny, chymotrypsyny i  $\alpha$ -amylazy są głównie zlokalizowane w liścieniach [24], natomiast taniny i polifenole znajdują się w okrywie

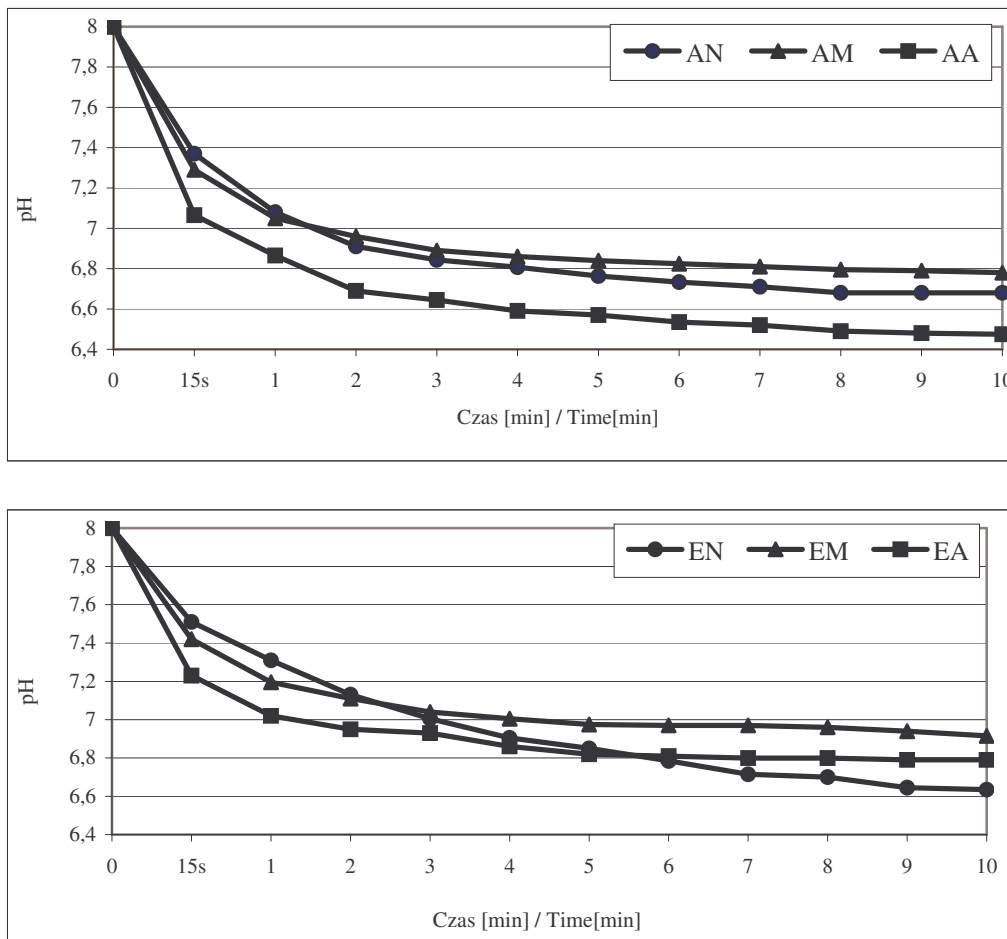
nasiennej [8]. Związki te wchodząc w reakcje z białkami tworzą kompleksy, skutkiem czego jest obniżona rozpuszczalność oraz mniejsza wrażliwość powstałych kompleksów na działanie enzymów proteolitycznych [34]. Usunięcie łupiny nasiennej może zatem spowodować pozorne zmniejszenie zawartości tych antyodżywczych substancji, przypadających na jednostkę masy materiału powodując wzrost strawności białek.

Tabela 2

Strawność preparatów białkowych *in vitro*.  
The *in vitro* digestibility of protein preparations.

Odmiana Variety	Preparaty białkowe Protein preparations	Strawność <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> digestibility [%]
AURA	AN	80,54±1,66
	AA	84,25±0,38
	AM	78,81±0,13
EUREKA	EN	81,36±1,43
	EA	85,87±0,38
	EM	76,28±0,89

Zastosowane procesy wodno-cieplne, którym poddano całe nasiona obu odmian fasoli, odmiennie wpłynęły na zmiany strawności preparatów białkowych. W porównaniu z preparatami białek przed procesami (AN i EN), strawność preparatów uzyskanych z nasion poddanych autoklawowaniu była większa i wynosiła 84,25 (AA) i 85,87% (EA). Klepacka i wsp. [19], analizując strawność białek nasion roślin strączkowych, stwierdzili poprawę strawności białek fasoli pod wpływem wysokiego ciśnienia i temperatury. Wynika to prawdopodobnie z wpływu zastosowanych czynników fizycznych na strukturę faseoliny, głównej frakcji białkowej nasion fasoli, której łańcuch polipeptydowy mógł ulec częściowemu rozfałdowaniu, eksponując wiązania Lys-Arg podatne na działanie trypsyny [12, 26]. Z drugiej zaś strony poprawa strawności preparatów białkowych może być wywołana częściową redukcją tanin, polifenoli, kw. fenolowych, towarzyszących białkom nasion fasoli [2, 7] bądź termiczną eliminacją inhibitorów proteaz, czynników hamujących proteolizę [5, 39]. Również Habiba [15] stwierdził dodatni wpływ procesu autoklawowania na strawność białek grochu. Działaniu enzymów proteolitycznych w niniejszych badaniach towarzyszyło obniżanie wartości pH, obserwowane ze znacznie większą intensywnością szczególnie wyraźnie w preparatach białek autoklawowanych AA i EA (rys. 1).



Rys. 1. Zmiany pH preparatów białkowych podczas 10-minutowej proteolizy.

Fig. 1. Changes in the pH value of protein preparations during a 10 minute proteolysis process.

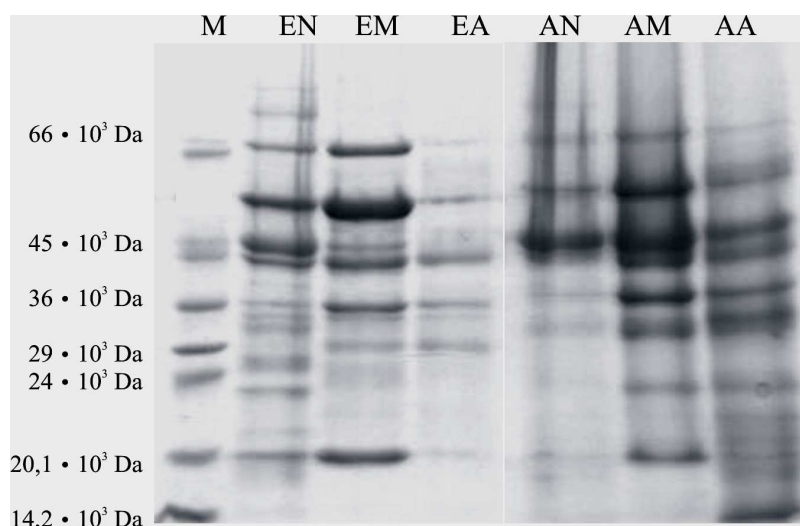
W wyniku procesu mikrofalowania, któremu poddano nasiona obu odmian fasoli, wyodrębnione z nich białka poddane 10-minutowej proteolizy cechowały się mniejszą strawnością w porównaniu z białkami uzyskanymi z nasion przed obróbką wodno-ciepłą (AN i EN). Ogrzewanie białek fasoli w środowisku wodnym może spowodować częściowe rozfałdowanie łańcucha ich trzeciorzędowej struktury, a następnie wywołać szybką agregację, tworząc strukturę kłębką, utrudniającą dostęp enzymom proteolitycznym [10]. Do podobnych wniosków doszli Lanfer-Marquez i Lajolo [23], analizując wpływ mikrofalowania na strawność białek. Badacze ci stwierdzili, że w wyniku tego procesu może wystąpić zmniejszenie strawności na skutek tworzenia się wiązań sieciujących białka. Można też sugerować, że w wyniku



promieniowania mikrofalowego efekt denaturujący i/lub kompleksujący struktury białek jest silny i uniemożliwia dostęp do wiązań Lys-Arg, specyficznych dla aktywności hydrolitycznej trypsyny [12].

#### *Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE preparatów białek*

Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE białek wyizolowanych z suchych nasion fasoli odmian Aura i Eureka (AN i EN) oraz po procesie autoklawowania (AA, EA) i mikrofalowania (AM i EM) przedstawiono na rys. 2. W białkach wyodrębnionych z nasion dwóch badanych odmian fasoli stwierdzono obecność frakcji wielkocząsteczkowych o masie w zakresie  $75\text{--}65 \cdot 10^3$  Da. Wskutek zastosowanych jednostkowych procesów hydrotermicznych frakcje te uległy znacznej degradacji i fragmentacji, a migrując w polu elektrycznym spowodowały widoczne zwiększenie ilości frakcji  $59 \cdot 10^3$  Da, obserwowane szczególnie w preparatach białek z nasion poddanych mikrofalowaniu EM i AM (rys. 3).



Rys. 2. Elektroforetyczny rozdział białek wyodrębnionych z nasion fasoli odm. Aura i Eureka przed obróbką hydrotermiczną (AN, EN) oraz po procesie autoklawowania (AA, EA) i mikrofalowania (AM, EM); M–wzorzec.

Fig. 2. SDS-PAGE electrophoresis of protein preparations isolated from two native bean seeds varieties Aura and Eureka (AN, EN) and from bean seeds after they had been autoclaved (AA, EA) and cooked in a microwave (AM, EM); M–markers.

Analizując obraz rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE preparatów białek z nasion suchych, niepoddanych obróbce hydrotermicznej (AN i EN), stwierdzono znaczący udział frakcji o masie ok.  $49 \cdot 10^3\text{--}45 \cdot 10^3$  Da. Na podstawie danych literaturowych [28, 33] frakcję tę uznano za faseolinę, główną frakcję białek



zapasowych dojrzałych nasion fasoli. W alkalicznym pH faseolina (glikoproteid II; G1) jest trimeryczną cząsteczką, zbudowaną z trzech podjednostek ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), o masach cząsteczkowych, odpowiednio  $53 \cdot 10^3$ – $51 \cdot 10^3$ ,  $48 \cdot 10^3$ – $47 \cdot 10^3$  i  $46 \cdot 10^3$ – $43 \cdot 10^3$  Da [12]. Deshpande i Damodaran [12] wskazali, że faseolina charakteryzuje się znaczną stabilnością termiczną. Zastosowane w tych badaniach procesy autoklawowania i mikrofalowania spowodowały niewielkie zmiany zawartości tej frakcji (EM, AM i AA). Jedynie w preparacie EA uzyskanym z autoklawowanych nasion odmiany Eureka odnotowano zmniejszenie udziału tej frakcji, wywołane prawdopodobnie wpływem wysokiej temperatury i ciśnienia. Obecna w znacznych ilościach, w analizowanych przez Piecyk nasionach fasoli, frakcja  $38 \cdot 10^3$  Da [28] uznawana za glikoproteid I (G2) [17, 25, 28], w preparatach białek uzyskanych w tym doświadczeniu z obu analizowanych odmian fasoli niepoddanych procesom hydrotermicznym, występowała jedynie w niewielkiej ilości. Obserwowano natomiast wzrost zawartości tej frakcji pod wpływem zastosowanych czynników fizycznych w procesach wodno-cieplnych, szczególnie widoczny w preparatach autoklawowanych (EA i AA). Na elektroforegramie białek z nasion badanych odmian fasoli poddanych mikrofalowaniu obserwowano obecność niskocząsteczkowej frakcji ok.  $21 \cdot 10^3$  Da, odpowiadającej masie molekularnej inhibitora trypsyny. Informacje literaturowe wskazują, że produkty degradacji faseoliny, powstające w wyniku ekspozycji na działanie trypsyny, migrując na żelu osiągają obszar odpowiadający produktom degradacji faseoliny o masie ok.  $28 \cdot 10^3$ – $22 \cdot 10^3$  Da [12]. Widoczna na elektroforegramie znaczna degradacja, fragmentacja oraz częściowy zanik niektórych frakcji białek prowadzi do wniosku, że oba procesy, a zwłaszcza wysoka temperatura i ciśnienie zastosowane podczas autoklawowania, wywołują widoczne zmiany profilu białek nasion fasoli odmian Aura i Eureka potwierdzone obrazem rozdziału elektroforetycznego.

## Wnioski

1. Badane gatunki nasion fasoli są zasobnym źródłem białka, a zastosowane procesy obróbki wodno-cieplnej (autoklawowanie i mikrofalowanie) powodują zmiany jego zawartości o zróżnicowanej tendencji w obu odmianach. Zastosowana metoda wyodrębniania białek pozwala uzyskać z suchych nasion fasoli preparaty o stężeniu izolatów, a po procesach hydrotermicznych odpowiadające koncentratom białkowym.
2. Spośród zastosowanych jednostkowych zabiegów wodno-cieplnych proces autoklawowania pozytywnie wpływa na strawność preparatów białkowych *in vitro*, w odróżnieniu od oddziaływania promieniowania mikrofalowego. Czynniki fizyczne (wysoka temperatura i ciśnienie), którym poddano całe nasiona obu

- odmian fasoli, powodują zmiany w strukturze liścieni, a skutkiem jest ułatwiony dostęp enzymów hydrolitycznych do białek.
3. Porównując elektroforegramy białek wyizolowanych z nasion, przed i po zabiegach hydrotermicznych, stwierdzono znaczący wpływ zastosowanej obróbki na obraz separacji żelowej białek. Odnotowano fragmentację oraz degradację niektórych frakcji białkowych, a obraz SDS-PAGE wspiera wyniki analizy strawności *in vitro* oraz potwierdza dodatni wpływ procesu autoklawowania nasion na poprawę strawności białek nasion fasoli.

### Literatura

- [1] Acosta G.: Effect of sowing date on the growth and seed yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in highland environments. *Field-Crops-Research*, 1996, **49**, 1-10.
- [2] Alonso R., Aguirre A., Marzo F.: Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem.*, 2000, **68**, 159-165.
- [3] AOAC. 1975. Official Methods of Analysis. 12<sup>th</sup> ed., Washington, USA.
- [4] AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed., Arlington, Virginia.
- [5] Armour J.C., Perera R.L.C., Buchan W.C., Grant G.: Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat treatment. *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **78**, 225-231.
- [6] Barampama Z., Simard R.E.: Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chem.*, 1993, **47**, **2**, 159-167.
- [7] Bishnoi S., Khetarpaul N., Yadav R.K.: Effect of domestic processing and cooking methods on phytic acid and polyphenol content of pea cultivars (*Pisum sativum*). *Plant Foods Hum. Nutr.*, 1994, **45**, 381-388.
- [8] Bressani R., Elias L.G., The nutritional role of polyphenols in beans. In J.H. Hulshof, Polyphenols in cereals and legumes. Canada, IDRC, 1980.
- [9] Carbonaro M., Grant G., Cappelloni M., Pusztai A.: Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 742-749.
- [10] Chang K. C., Satterlee L.: Isolation and characterisation of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, 1981, **46**, 1368-1373.
- [11] Deshpande S.S., Sathe S.K., Salunkhe D.K., Comforth D.P.: Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, 1982, **47**, 1846-1850.
- [12] Deshpande S.S., Damodaran S.: Heat-induced conformational changes in phaseolin and its relation to proteolysis. *Bioch. Biophys. Acta*, 1989, **998**, 179-188.
- [13] Fan T. Y., Sosulski F.W.: Dispersibility and isolation of proteins from legume flours. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1974, **7**, **4**, 256-260.
- [14] Guzman-Maldonado S.H., Acosta-Gallegos J., Paredes-Lopez O.: Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1874-1881.
- [15] Habiba R.A.: Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility and hcl-extractibility of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chem.*, 2001, **77**, 187-192.

- [16] Hsu H.W., Vavak D. L., Saterlee L. D., Miller G. A.: A Mulitenzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.*, 1977, **42**, 1269-1273.
- [17] Ishino K., Ortega M.L.D.: Functionation and characterization of major reserve proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, 1975, **23**, 529-533.
- [18] Jasińska Z., Kotecki A.: Rośliny strączkowe. PWN. Warszawa 1990.
- [19] Klepacka M., Porzucek H., Piecyk, M., Sałański P.: Effects of high pressure on solubility and digestibility of legume proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1997, **6/47**, **2**, 41-49.
- [20] Krupa U., Soral-Śmietana M.: Nasiona fasoli – źródłem odżywczych i nieodżywczych makroskładników. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2003, **2 (35) Supl.**, 99-108.
- [21] Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K.: Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych. IŻŻ, Warszawa 1998, s. 367-368.
- [22] Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. 4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [23] Lanfer-Marqez U.S.L., Lajolo F.M.: *In Vivo* Digestibility of Beans (*Phaseolus vulgaris*) Proteins: the role of endogenous protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1211-1215.
- [24] Lott J.N.A., Buttrose M.K.: Globoild in protein bodies of legume seeds cotyledons. *Austral. J. Plant Physiol.*, 1978, **5**, 89-95.
- [25] McLester R.C., Hall T.C., Sun S.M., Bliss A.: Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. *Phytochemistry*, 1973, **2**, 85-90.
- [26] Nielsen S.S.: Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteases. A review. *Cereal Chem.*, 1988, **65**, 435-442.
- [27] Piecyk M., Worobiej E., Klepacka M.: *In vitro* digestibility of crystalline proteins from beans (*Phaseolus vulgaris*). *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2000, **9/50**, **2**, 29-33.
- [28] Piecyk M.: Właściwości strukturalne i funkcjonalne białek krystalicznych otrzymanych z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*). Praca doktorska. Wyd. SGGW. Warszawa 2001.
- [29] Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B., Chirife J., Bouquet R.: Effect of heat treatment on sorption isotherms and solubility of flour and protein isolated from bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, 1982, **47**, 1288-1290.
- [30] PN- EN ISO 3188: 1994. Skrobia i produkty pochodne. Oznaczanie zawartości azotu metoda Kjeldahla. Metoda miareczkowa.
- [31] PN- EN ISO 3593: 1994. Skrobia. Oznaczanie popiołu.
- [32] PN- EN ISO 1666: 1999. Skrobia. Oznaczanie wilgotności. Metoda suszarkowa.
- [33] Pusztai A., Steward J.C.: Molecular size, subunit structure and microheterogeneity of glycoprotein ii from the seeds of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1980, **623**, 418-428.
- [34] Reddy N.R., Pierson M.D., Sathe S.K., Salunkhe D.K.: Dry beans tannins: a review of nutritional implications. *J. Americ. Oil Chem. Soc.*, 1985, **62**, 541-549.
- [35] Sathe S.K., Salunkhe D.K.: Studies on trypsin and chemotrypsin inhibitory activities, hemagglutinating activity and sugar in the great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.*, 1981, **46**, 1910-1913.
- [36] Sikorki Z., Drozdowski B., Samotus B., Pałasiński M.: *Chemia żywności*. PWN. Warszawa 1988.
- [37] Soral-Śmietana M., Krupa U., Markiewicz K.: White bean varieties – a source of elements, dietary fibre and resistant starch. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2002, **11/52**, SI 1, 17-24.
- [38] Szyrmer J.: Rośliny strączkowe źródłem białka roślinnego. *Nowe Rolnictwo*, 1986, **35**, 1/2: 5-7.
- [39] Vijayakumari K., Siddhuraju P., Janardhanan K.: Effect of various water or hydrothermal treatments on certain antinutritional compounds in the seeds of the tribal pulse (*Dolichos lablab* var. *vulgaris* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* 1995, **48**, 17-29.

**THE IMPACT OF PHYSICAL FACTORS ON THE *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF PROTEINS  
FROM BEAN SEEDS (*PHASEOLUS SP.*)**

**S u m m a r y**

The objective of this paper was to determine the impact of physical factors on the digestibility of proteins isolated from two Polish bean seed species: *Phaseolus vulgaris* var. Aura and *Phaseolus coccineus* var. Eureka. The two physical factors were applied during the two hydrothermal treatment processes: autoclaving and microwave cooking. The analysis of the *in vitro* digestibility of protein preparations, carried out in an environment simulating physiological conditions of proteins digestion in duodenum, showed that temperature and pressure applied during the autoclave cooking significantly improved the digestibility of protein preparations. Contrary to the microwave treatment, after a 10 minute proteolysis completed, the digestibility of protein preparations was lower than the digestibility of protein preparations from bean seeds that had not been thermally treated. On the basis of the SDS-PAGE electrophoresis separation of proteins isolated from native bean seeds prior to the hydro-thermal treatment, it was stated that a fraction showing a mass from 49 to 45 x 10<sup>3</sup> kDa was predominant; this fraction was identified as a phaseolin which was characterised by a significant thermal stability. In the two processes applied, the physical factors caused changes in the content of protein fractions, in particular in the EA protein preparation. Results of the SDS-PAGE protein separation made the analysis of the *in vitro* digestibility more complete; they proved that the autoclaving process of bean seeds specifically affected proteins isolated from them; this impact was clearly visible on the presentation of the SDS-PAGE separation.

**Key words:** bean seeds, protein preparations, hydrothermal treatment, digestibility ☒

KATARZYNA KYCIA

## **WYKORZYSTANIE WSZYSTKICH BIAŁEK MLEKA DO PRODUKCJI SERA TOPIONEGO**

### **Streszczenie**

W tradycyjnych metodach wyrobu serów przeznaczonych do produkcji serów topionych stosuje się podpuszczkową lub kwasową koagulację białek mleka, w czasie której cenne białka serwatkowe usuwane są wraz z serwatką. Wprowadzenie wszystkich białek mleka do serów topionych możliwe jest między innymi dzięki użyciu do ich produkcji surowców uzyskanych z mleka zagęszczonego metodą ultrafiltracji. W pracy badano możliwość wykorzystania tzw. sera jogurtowego, otrzymanego z retentatu UF białek mleka jako surowca przydatnego do produkcji sera topionego.

Preparat wszystkich białek mleka, tzw. ser jogurtowy, otrzymywano z mleka spożywczego pasteryzowanego o zawartości 3,2% tłuszczu, które poddawano około 5-krotnej koncentracji w module do ultrafiltracji. Uzyskany retentat po pasteryzacji (72°C/15 s) schładzano do temp. 46±2°C, mieszano z dodatkiem zakwasu bakterii jogurtowych i po zapakowaniu w termozgrzewalne woreczki foliowe inkubowano w temp. 44 ±2°C do momentu osiągnięcia pH 5,0–5,2, po czym schładzano do temperatury 6°C. Wytworzony w ten sposób ser jogurtowy przeznaczono do produkcji serów topionych normalizowanych do 55% zawartości wody oraz 55% zawartości tłuszczu w suchej masie sera. Do produkcji serów topionych użyto: ser jogurtowy, sery podpuszczkowe typu Gouda (dojrzały i młody), masło, wodę, topnik Joha PL i sól. Ser jogurtowy dodawano do mieszanki do topienia w takich ilościach, by jego udział w stosunku do użytych surowców serowych wynosił w niej: 0, 10, 30, 50, 70 i 100%.

Stwierdzono, że ser jogurtowy stanowi wysokiej jakości surowiec przydatny do produkcji sera topionego typu smarowego, gdy jego udział wśród surowców serowych mieszanki do topienia nie przekracza 30%. Większy dodatek sera jogurtowego powodował złagodzenie cech smakowo-zapachowych typowych dla produktu otrzymanego z dojrzałego sera podpuszczkowego. Jednak wraz ze wzrastającym udziałem sera jogurtowego zanotowano zmniejszenie pH masy serowej oraz wzrost jej twardości i lepkości pozornej. Wykazano, że ser jogurtowy może zastępować ser niedojrzały podpuszczkowy, gdyż ma tę zaletę, że zawiera wszystkie białka mleka.

**Słowa kluczowe:** ultrafiltracja, ser jogurtowy, ser topiony

### **Wprowadzenie**

Podstawowym surowcem do produkcji serów topionych są sery podpuszczkowe. Przy produkcji serów podpuszczkowych odzyskuje się z mleka prawie wyłącznie

kazeinę, natomiast najcenniejsze pod względem wartości biologicznej białka serwatkowe przechodzą do serwatki łącznie z częścią  $\kappa$ -kazeiny. Istnieje w związku z tym zainteresowanie technologiami, które umożliwiają odzyskanie z mleka wszystkich białek w formie masy białkowo-tłuszczowej przydatnej do produkcji sera topionego.

Wprowadzenie wszystkich białek mleka do serów topionych możliwe jest między innymi dzięki użyciu do ich produkcji surowców uzyskanych z mleka zagęszczonego metodą ultrafiltracji. W czasie koncentracji składników mleka metodą ultrafiltracji „zagęszczeniu” ulegają bowiem kuleczki tłuszczowe oraz wszystkie białka mleka (tj.: kazeina o masie cząsteczkowej równej 20 000–24 000 Da oraz białka serwatkowe np.:  $\beta$ -laktoglobulina i  $\alpha$ -laktoalbumina o masach cząsteczkowych odpowiednio 18 363 Da i 14 175 Da), podczas gdy część wody, laktozy i soli mineralnych przechodzi przez membranę w formie permeatu. Frakcja zatrzymana przez membranę, zwana retentatem, zawiera skoncentrowane białka mleka, tłuszcz, część laktozy i soli mineralnych [5, 13]. Liczne badania potwierdzają, że odpowiednio utrwalony retentat może stanowić bardzo wartościowy surowiec do produkcji serów topionych [2, 6, 7, 8, 9, 15].

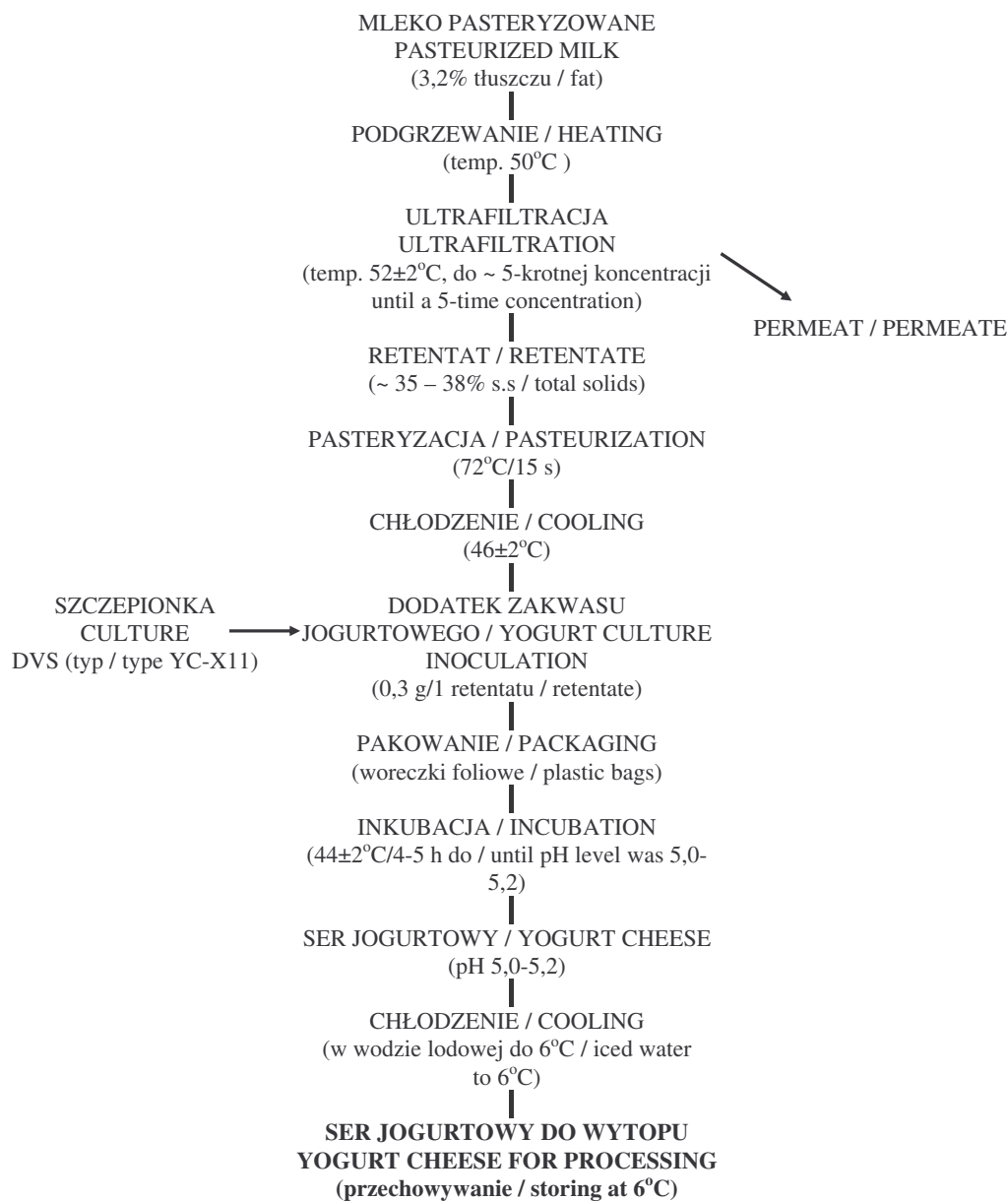
Celem pracy było opracowanie technologii tzw. sera jogurtowego z retentatu UF białek mleka przydatnego do produkcji sera topionego.

### **Materiał i metody badań**

Zakres pracy obejmował następujące etapy:

*Opracowanie technologii wyrobu sera jogurtowego (rys. 1).*

Surowiec do produkcji sera jogurtowego stanowiło mleko spożywcze pasteryzowane o zawartości tłuszczu około 3,2%, podgrzane do temp. 50°C i poddane zagęszczaniu w module ultrafiltracyjnym w temp. 52±2°C, przy średniej różnicy ciśnienia transmembranowego równej 1,35 bara. Ultrafiltrację prowadzono do momentu odczerpania takiej ilości permeatu, aby uzyskać około 5-krotny stopień zagęszczenia mleka w stosunku do surowca wejściowego. Uzyskany retentat poddawano następnie pasteryzacji (75°C/15 s), po czym schładzano w wodzie lodowej do temp. 46±2°C, przy której dodawano zakwas w postaci liofilizowanej kultury jogurtowej YC-X11 zawierającej bakterie jogurtowe (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*). Wielkość dodatku szczepionki wynosiła 0,3 g/l retentatu. Tak zaszczepiony retentat pakowano w termozgrzewalne woreczki foliowe i inkubowano w cieplarni w temp. 44 ±2°C do momentu uzyskania pH 5,0–5,2, po czym chłodzono w wodzie lodowej do temp. 6°C i przechowywano w tej temperaturze do momentu przeznaczenia do produkcji sera topionego.



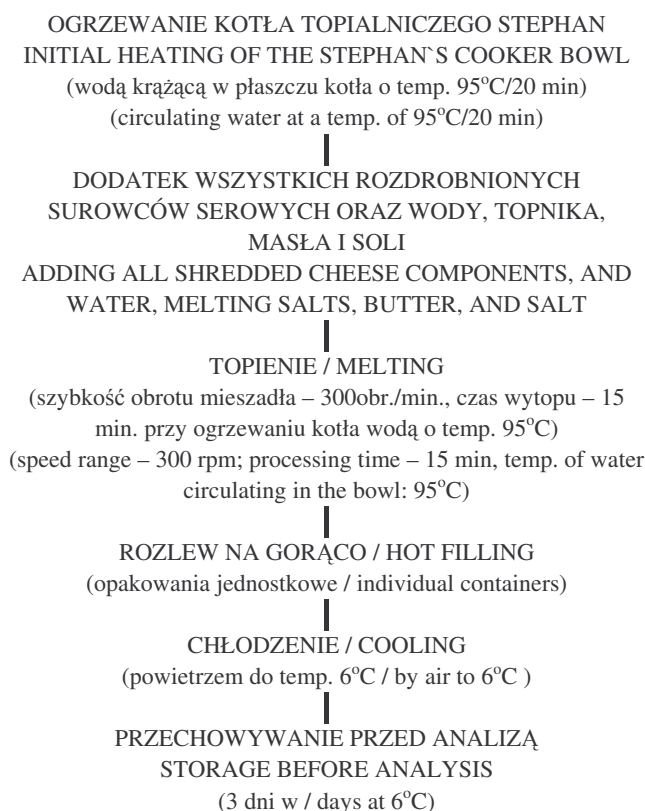
Rys. 1. Schemat produkcji sera jogurtowego.

Fig. 1. Flow diagram illustrating a method of producing yoghurt cheese.

*Wykorzystanie sera jogurtowego do produkcji sera topionego*

Do produkcji sera topionego użyto następujących surowców: ser jogurtowy, ser dojrzwały typu Gouda, ser młody typu Gouda, masło Extra, woda, topnik podstawowy

Joha PL oraz sól kuchenną. Ser jogurtowy stosowany był do produkcji sera topionego w takich ilościach, by jego udział w stosunku do użytych surowców serowych wynosił w mieszance: 0, 10, 30, 50, 70 i 100%.



Rys. 2. Schemat przebiegu procesu wyrobu serów topionych.

Fig. 2. Generalized scheme illustrating the different stages for the manufacture of processed cheese.

Proporcje użytych do topienia surowców serowych w poszczególnych wariantach doświadczalnych serów topionych przedstawiono w tab. 1.

Założono, że gotowy produkt powinien charakteryzować się dobrą smarownością i z tego względu za wariant kontrolny uznano ser topiony wykazujący taką właściwość. Zawierał on wyłącznie 30% młodego sera typu Gouda i 70% sera dojrzałego tego samego typu. Dodatek topnika we wszystkich wariantach wynosił 3% w stosunku do masy serów użytych do topienia, a NaCl – 1% w stosunku do udziału sera jogurtowego w składzie masy serowej. Skład mieszanki do topienia znormalizowano (odpowiednim dodatkiem wody i masła), tak by uzyskać sery topione zawierające 55% wody oraz 55% tłuszczu w suchej substancji. Topienie przeprowadzano w kociołku



laboratoryjnym typu Stephan UMC 5 electronic (rys. 2), stosując następujące parametry: czas topienia równy 15 min, temp. topienia 80°C, szybkość mieszadła – 300 obr./min.

Tabela 1

Warianty doświadczalnych serów topionych wyprodukowanych z różnym udziałem surowców serowych.  
Selection of experimental processed chesses produced using various amounts of cheese components.

L.p. No.	Surowce serowe Cheese ingredients	Udział surowców serowych w poszczególnych wariantach (W) doświadczalnych serów topionych [%] Proportion rates of cheese ingredients contained in experimental selections of individual processed chesses [%]					
		W0	W10	W30	W50	W70	W100
1	Ser jogurtowy Yogurt cheese	0	10	30	50	70	100
2	Ser podpuszczkowy dojrzały Mature rennet cheese	70	70	70	50	30	0
3	Ser podpuszczkowy młody Young rennet cheese	30	20	0	0	0	0

Badania obejmowały podstawową analizę fizykochemiczną stosowanych do wytopu serów podpuszczkowych typu Gouda, sera jogurtowego oraz wyprodukowanych serów topionych. We wszystkich surowcach serowych oznaczano pH oraz kwasowość miareczkową ( $^{\circ}\text{SH}$ ), a także zawartość wody, tłuszczu, białka ogółem (N $\cdot$ 6,38), azotu kazeinowego oraz azotu rozpuszczalnego przy pH 4,6 według metod zawartych w odpowiednich normach [14]. Ponadto sery topione poddawano ocenie sensorycznej (barwa, smak, zapach, konsystencja) oraz określano ich twardość metodą penetrometryczną w temp. 20°C i lepkość pozorną w temp. 60°C. Pomiaru twardości dokonywano za pomocą penetrometru Labor, mierząc głębokość penetracji trzpienia [ $\text{mm}\cdot 10^{-1}$ ] w próbkach sera rozlanych bezpośrednio po wytopie do jednakowych naczynek. Przed pomiarem próbki w naczynkach stabilizowano 24 godz. w temp. 20°C. Lepkość pozorną upłynnionych próbek sera mierzono za pomocą wiskozymetru Rheotest 2, typ RV2 oraz Brookfield DV II.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki są średnimi uzyskanymi z 5 serii doświadczalnych (n = 5) obejmujących za każdym razem wyprodukowanie sera jogurtowego, a następnie jego użycie jako surowca do wyrobu wszystkich wariantów sera topionego. Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji dla n = 5 przy  $\alpha = 0,05$ , przy użyciu programu statystycznego Statgraphics Plus w wersji 4,1.

## Wyniki i dyskusja

Wyniki podstawowej analizy fizykochemicznej serów jogurtowych otrzymanych z mleka zagęszczonego metodą ultrafiltracji w kolejnych 5 seriach doświadczalnych przedstawiono w tab. 2. Wszystkie wyprodukowane sery jogurtowe charakteryzowały się bardzo dobrymi cechami sensorycznymi, to jest łagodnym jogurtowym smakiem i zapachem oraz kremowo-śmietankową barwą. Otrzymany z silnie zagęszczonego mleka skrzep kwasowy miał zwięzłą strukturę i w żadnym przypadku nie zaobserwowano podcieku serwatki. Kwasowość czynna i miareczkowa skrzepów zawierała się w granicach odpowiednio pH = 5,10–5,22 oraz 56,50–58,40°SH.

Tabela 2

Wyniki analizy fizykochemicznej serów jogurtowych wyprodukowanych z mleka zagęszczonego metodą ultrafiltracji.

Results of the physical and chemical analysis of yogurt cheeses made from milk concentrated by an UF method.

L.p. No.	Badana cecha Feature	Seria produkcyjna sera jogurtowego Production series of a yogurt cheese					$\bar{X}_{(I-V)}$
		I	II	III	IV	V	
1.	Sucha substancja / Dry matter [%]	37,00	37,54	36,05	38,50	35,95	37,01
2.	Woda / Water [%]	63,00	62,46	68,95	61,50	64,05	63,99
3.	Tłuszcz / Fat [%]	16,50	16,75	16,75	17,00	17,00	16,80
4.	Tłuszcz w suchej substancji Fat in dry matter [%]	44,59	44,62	46,60	44,16	47,29	45,45
5.	Białko ogółem / Total protein [N·6,38]	16,50	16,28	14,15	17,09	15,03	15,81
6.	N kazeinowy / Casein nitrogen [% N ogółem / %]	92,38	92,63	93,30	94,24	92,29	92,97
7.	N rozpuszczalny przy pH 4,6 Soluble nitrogen at pH 4,6 [% N ogółem / % Total N]	7,62	7,37	6,70	5,76	7,71	7,03
8.	pH	5,15	5,10	5,20	5,22	5,20	5,17
9.	Kwasowość miareczkowa Titration acidity [°SH]	56,50	58,40	58,00	54,00	58,30	57,04

Zawartość suchej substancji w otrzymanych serach jogurtowych mieściła się w zakresie 35,95–38,50% i średnio wynosiła 37,01%, podczas gdy zawartość tłuszczu ogółem wynosiła średnio 16,80%. Największy stopień koncentracji białek mleka (17,09%) stwierdzono w serze wyprodukowanym z mleka zagęszczonego

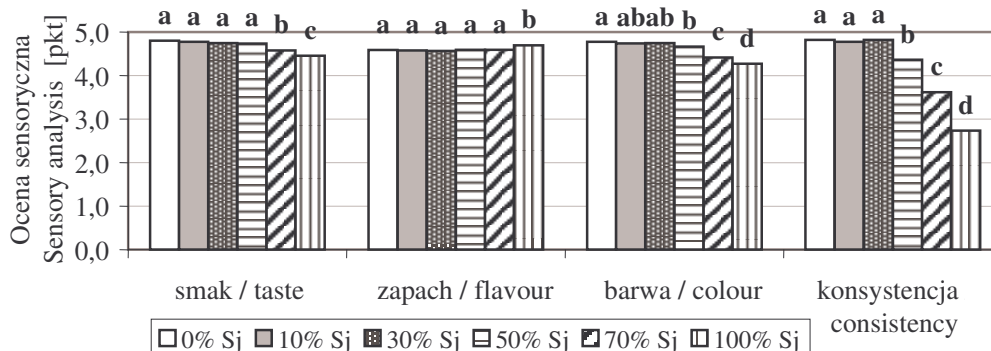
w największym stopniu. Sery jogurtowe charakteryzowały się wysoką zawartością form azotu kazeinowego (średnio 92,97% N ogółem) i stosunkowo niską zawartością form azotu rozpuszczalnego przy pH 4,6 (średnio 7,03% N ogółem).

Zawartość substancji azotowych ogółem w przeliczeniu na białko ogółem [N·6,38] w permeatach odczerpanych w procesie zagęszczania mleka wynosiła średnio 0,2% (dane niezamieszczone), a więc była zbliżona do zawartości azotu niebiałkowego w mleku. Świadczy to o niemalże całkowitym zatrzymaniu w retencji wszystkich białek mleka, w tym białek serwatkowych. Użycie sera jogurtowego jako surowca do topienia umożliwia wprowadzenie tych białek do sera topionego. Określając przydatność sera jogurtowego jako surowca do wyrobu sera topionego stopniowo zastępowano nim tradycyjnie używane do topienia sery podpuszczkowe. Podjęto tym samym próbę określenia wpływu dodatku tego nowego surowca na ocenę sensoryczną, wybrane cechy tekstury oraz skład fizykochemiczny serów topionych.

W trakcie topienia nie stwierdzono różnic w przebiegu tego procesu w wariantach z różnym udziałem sera jogurtowego. Ser jogurtowy w czasie obróbki termicznej i mieszania z łatwością łączył się z pozostałymi surowcami, tworząc gładką i homogenną emulsję. W czasie schładzania emulsja ta przyjmowała postać stabilnego żelu, podobnie do wariantu kontrolnego.

W ocenie sensorycznej (rys. 3) wykazano jednak istotne statystycznie różnice w obrębie ocenianych wyróżników: barwy, smaku, zapachu i konsystencji serów topionych w zależności od udziału sera jogurtowego w gotowym produkcie.

Sery topione otrzymane z 10, 30 i 50% dodatkiem sera jogurtowego nie różniły się statystycznie istotnie od produktu kontrolnego (bez udziału sera jogurtowego) pod względem smaku. Zwiększenie dodatku sera jogurtowego do 70 i 100% spowodowało istotne pogorszenie się smaku. Fakt ten prawdopodobnie związany jest z wprowadzeniem do mieszanki do topienia zbyt dużej ilości surowca niepoddanego dojrzewaniu, a więc niemającego odpowiedniego udziału białek rozpuszczalnych i typowych dla serów dojrzewających cech smakowych. Masa serowa niedojrzała, zawierająca białko w formie nierozpuszczalnej pozbawiona jest smaku [3]. Z kolei bardzo przyjemny, lecz łagodny smak samego sera jogurtowego może w trakcie topienia w temp. 80°C zanikać na skutek ulatniania się składników aromatu (aldehyd octowy, diacetyl), przyczyniając się do braku w gotowym produkcie cech smakowo-zapachowych typowych dla jogurtu. Badania prowadzone nad możliwością wykorzystania retentatów UF jako surowców do produkcji serów topionych potwierdzają konieczność zastosowania odpowiedniego dodatku sera dojrzalego w celu nadania pożądanых cech tekstury i walorów smakowych produktom gotowym [9, 6, 15]. Właściwe cechy i smak można również osiągnąć używając do wytopu retentaty UF poddane dojrzewaniu, bądź też stosując dodatek sera modyfikowanego enzymatycznie (z ang. EMC – enzyme modified cheese) o dużej intensywności smaku [1, 2, 12, 17, 18].



Rys. 3. Wpływ różnych dodatków sera jogurtowego (Sj) na wyniki oceny sensorycznej serów topionych. Różne litery (a–d) w obrębie danego wyróżnika oznaczają statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami średnimi wariantów o różnym dodatku sera jogurtowego ( $\alpha = 0,05$ ,  $n = 5$ ).

Fig. 3. The effect of various yogurt cheese types added (Sj) on the results of sensory analysis of processed cheeses. Different letters (a–d) within the given feature indicate statistically significant differences between mean values among the experimental selections of the yoghurt cheese added ( $\alpha = 0,05$ ,  $n = 5$ ).

Brak natomiast typowego zapachu sera dojrzalego w wariancie z wyłącznym udziałem sera jogurtowego został uznany przez oceniających jako cecha pozytywna. Zwiększenie dodatku sera jogurtowego w sposób istotny obniżało noty za barwę serów topionych (wraz ze wzrostem udziału sera jogurtowego gotowy produkt miał barwę jaśniejszą i zmieniającą się w kierunku mniej żółtej). Udział 50, 70 i 100% sera jogurtowego w masie serowej statystycznie istotnie obniżał noty za konsystencję gotowego wyrobu, bowiem produkt był wówczas odbierany jako bardziej twardy i mniej smarowny. Nadmierna twardość serów topionych spowodowana jest między innymi zbyt wysokim udziałem w mieszance do topienia surowców niedojrzałych, zawierających białko w formie nierozpuszczalnej.

W tab. 3. przedstawiono wyniki analizy fizykochemicznej serów topionych wyprodukowanych z różnym udziałem sera jogurtowego. Zawartość wody w poszczególnych wariantach serów topionych była na zbliżonym poziomie (53,94–54,67%), co świadczy o dobrej normalizacji zawartości tego składnika w produktach. Pomiędzy poszczególnymi wariantami nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości tłuszczu w suchej masie serów. Stwierdzono natomiast statystycznie istotny wpływ rosnącego udziału sera jogurtowego na zmniejszenie zawartości białka w serach topionych. Największą zawartością tego składnika charakteryzował się wariant kontrolny wyprodukowany wyłącznie z serów podpuszczkowych, podczas gdy najmniejszą wariant otrzymany wyłącznie z użyciem sera jogurtowego. Fakt ten powodowany był zamianą surowców wysokobiałkowych w recepturze (sery

podpuszczkowe zawierały średnio 28% białka ogółem) na surowiec o niemalże dwukrotnie mniejszej zawartości tego składnika.

Tabela 3

Wyniki analizy fizykochemicznej serów topionych wyprodukowanych z udziałem sera jogurtowego (n = 5).  
Results of the physical and chemical analysis of processed cheeses made using yoghurt cheese (n = 5).

Lp. No.	Badana cecha / Feature	Dodatek sera jogurtowego / Yogurt cheese addition [%]					
		0	10	30	50	70	100
1	Sucha substancja / Dry matter [%]	46,01a	46,10a	45,99a	46,06a	46,14a	45,33b
2	Woda / Water [%]	53,99a	53,90a	54,01a	53,94a	53,86a	54,67b
3	Tłuszcz / Fat [%]	25,00ab	25,00ab	25,05	25,05a	24,85ab	24,75b
4	Tłuszcz w suchej substancji Fat in dry matter [%]	54,34a	54,24a	54,47a	54,39a	53,87a	54,60a
5	Białko ogółem / Total protein [N·6,38]	16,40a	16,23a	15,78ab	15,25bc	14,75c	13,16d
6	Białko w suchej substancji Protein in dry matter [%]	35,65a	35,21a	34,32ab	33,11bc	31,98c	29,02d
7	N kazeinowy / Casein nitrogen [%] N ogółem / % Total N	85,43a	85,89a	85,71ab	85,28bc	86,85c	87,54d
8	N rozpuszczalny przy pH 4,6 Soluble nitrogen at pH 4,6 [%] N ogółem / % Total N	14,57a	14,11ab	14,29a	14,72a	13,15bc	12,46c
9	pH	5,78a	5,77a	5,76a	5,71b	5,66c	5,55d
10	Kwasowość miareczkowa Titration acidity [°SH]	40,64a	41,08ab	41,84b	43,76c	45,64d	47,88e

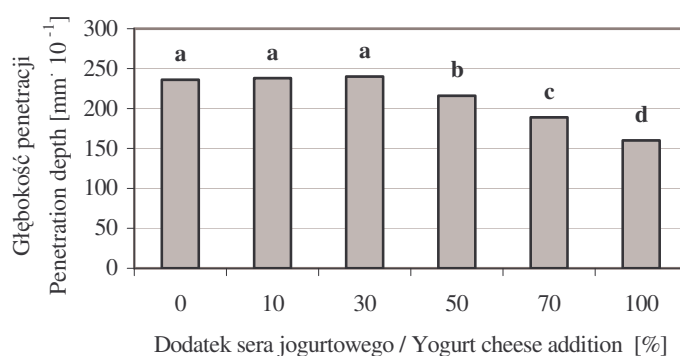
Objaśnienia: / Explanatory notes:

a-e – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w wierszu nie różnią statystycznie istotnie / the mean values denoted by the same letters in each row are not significantly different ( $\alpha=0,05$ ;  $n=5$ )

Dokładnie taką samą zależność stwierdzono pod względem zawartości białka w suchej substancji tych serów. Zwiększony udział sera jogurtowego w składzie produktu prowadził również do zmniejszenia zawartości form azotu rozpuszczalnego przy pH 4,6. Ser jogurtowy zawierał bowiem większość białka w formie nierozpuszczalnej i jego dodatek powodował zmniejszenie zawartości tej formy azotu.

Zwiększenie udziału sera jogurtowego w mieszance do topienia powyżej 30% powodowało statystycznie istotne obniżenie pH gotowego produktu. Wynika to z faktu, że ser jogurtowy użyty w doświadczeniach miał pH średnio 5,17, zaś pH sera podpuszczkowego dojrzałego było znacznie wyższe i średnio wynosiło 5,7. Zakres właściwego pH serów topionych jest stosunkowo wąski i wynosi 5,2–6,5 [4]. Zmiany w zakresie kwasowości czynnej serów topionych wpływają na konfigurację i

rozpuszczalność białka, a więc te jego cechy, które w sposób bezpośredni decydują o emulgowaniu, peptyzacji i mechanizmie tworzenia żelu [11]. Odpowiednio dobrana kwasowość całej masy serowej jest czynnikiem bardzo ważnym przy uzyskaniu pożądanych cech tekstury. Przy pH bliskim punktowi izoelektrycznemu kazeiny ser topiony charakteryzuje się dużą twardością i kruchością, podczas gdy przy pH zbliżonym do 6,5 jest on miękki i smarowny [16].

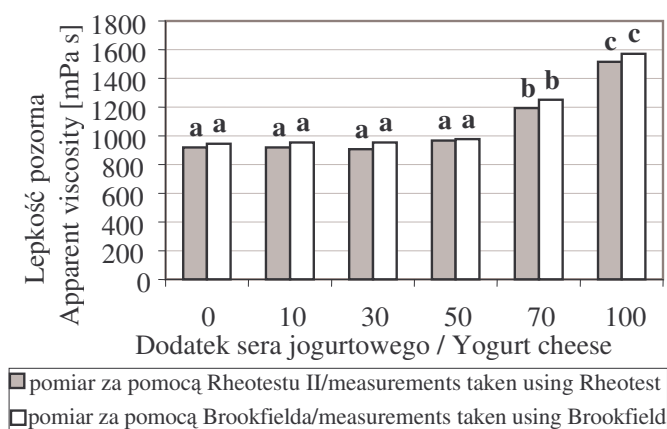


- Rys 4. Wpływ dodatku sera jogurtowego na głębokość penetracji serów topionych. Pomiar w temp. 20°C przy użyciu penetrometru Labor. Różne litery (a-d) oznaczają statystycznie istotne różnice między średnimi wartościami głębokości penetracji uzyskanymi z wariantów o różnym dodatku sera jogurtowego ( $\alpha=0,05$  i  $n=5$ )
- Fig. 4. The effect of yogurt cheese added on the penetration depth of processed cheeses. The measurement was taken at a temperature of 20°C, using a Labor penetrometer. Different letters (a-d) mean statistically significant differences among mean values of penetration depths measured in the selections of cheeses containing various amounts of yoghurt cheese added ( $\alpha=0,05$ ;  $n=5$ )

Obserwowany w niniejszej pracy spadek pH serów topionych, następujący wraz ze wzrostem udziału sera jogurtowego w składzie recepturowym, mógł być przyczyną uzyskania niższych not w ocenie konsystencji serów topionych z 50, 70 i 100% jego dodatkiem. Te warianty sera zostały przez oceniających uznane za bardziej twarde i mniej smarowne. Większa twardość serów topionych z ponad 30% udziałem sera jogurtowego została potwierdzona w teście penetracji (rys. 4). Głębokość penetracji trzpienia malała statystycznie istotnie ( $\alpha=0,05$ ) wraz ze zwiększającym się (powyżej 30%) udziałem sera jogurtowego w produkcie.

Z kolei brak statystycznie istotnych różnic twardości pomiędzy wariantami z: 0, 10 i 30% udziałem sera jogurtowego może stwarzać możliwość wykorzystania tego sera jako dobrego zamiennika sera młodego podpuszczkowego używanego tradycyjnie do topienia. Niepoddany dojrzewaniu ser jogurtowy zawiera białko w formie niezhydrolizowanej i podobnie jak młody ser podpuszczkowy może wpływać na wzrost twardości serów topionych. Wiadomo, że krótkie peptydy pochodzące z bardzo dojrzałego sera podpuszczkowego mają znacznie mniejsze szanse niż długie łańcuchy

białkowe typowe dla sera młodego, do wzajemnego oddziaływania między sobą i tworzenia stabilnego szkieletu białkowego. Z tego względu z sera dojrzałego otrzymuje się ser topiony o mniejszej twardości. Nadaje się on najlepiej do wyrobu serów typu smarowego [4, 16].



Rys. 5. Wpływ różnych dodatków sera jogurtowego na wartość lepkości pozornej serów topionych. Różne litery (a–d) w obrębie stosowanego do pomiaru instrumentu (Rehotestu lub Brookfielda) oznaczają statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami średnimi lepkości wariantów o różnym dodatku sera jogurtowego ( $\alpha = 0,05$ ;  $n = 5$ ).

Fig. 5. The effect of yogurt cheese added on the apparent viscosity of processed cheeses. Different letters (a–d) within the instrument (Rehotest or Brookfield) applied to take measurements mean statistically significant differences among mean values of the apparent viscosity depths measured in the selections of cheeses containing various amounts of yoghurt cheese added ( $\alpha=0,05$ ;  $n = 5$ ).

Wyniki lepkości pozornej serów topionych przeprowadzone w temp. 60°C za pomocą dwóch różnych wiskozymetrów (Rheotestu i Brookfielda) wykazały brak statystycznie istotnych różnic między wariantami z: 0, 10, 30 i 50% dodatkiem sera jogurtowego (rys. 5). Większy udział sera jogurtowego statystycznie istotnie wpływał na wzrost lepkości pozornej badanych serów topionych. Lee i Klostermeyer [10] stwierdzili, że twardość i lepkość modelowych systemów serów topionych malała wraz ze wzrostem pH stopionej masy serowej. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają tę zależność. Wyższa lepkość i twardość serów z 70 oraz 100% dodatkiem sera jogurtowego może wynikać z niższego pH masy serowej, jak i z większego udziału w tych serach długich łańcuchów białkowych typowych dla sera niepoddanego dojrzewaniu.

## Wnioski

1. Tak zwany ser jogurtowy otrzymany w wyniku biologicznego ukwaszania retentatu UF zawierającego wszystkie białka mleka może być z powodzeniem wykorzystany jako wartościowy surowiec do produkcji sera topionego o



- smarownej konsystencji, przy czym jego udział wśród surowców serowych mieszanki do topienia nie powinien przekraczać 30%.
2. Duży dodatek sera jogurtowego do mieszanki przeznaczonej do topienia powoduje złagodzenie smaku i zapachu typowego dla serów dojrziałych, co stwarza możliwość wykorzystania go do wytopu razem z przejrzalymi serami podpuszczkowymi, charakteryzującymi się zbyt intensywnym smakiem i zapachem.
  3. Użycie sera jogurtowego do topienia pozwala regulować konsystencję sera, która w przypadku serów przejrziałych o wysokim pH może być zbyt miękka. Ser jogurtowy może pod tym względem zastępować ser młody podpuszczkowy, ma jednak nad nim tę przewagę, że zawiera wszystkie białka mleka.
  4. Udział sera jogurtowego w zakresie od 0 do 30% w serze topionym nie miał istotnego wpływu na twardość, wyróżniki oceny sensorycznej (smak, zapach, barwę i konsystencję) oraz lepkość pozorną gotowych wyrobów. Większy dodatek (50, 70 i 100%) powodował spadek pH, wzrost twardości oraz pogorszenie się barwy i konsystencji tych produktów. W serach topionych z 70 i 100-procentowym udziałem sera jogurtowego stwierdzono również wzrost lepkości pozornej w temp. 60°C.

*Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych jako część projektu badawczego nr 3 PO6T 065 25.*

### Literatura

- [1] Acharya M.R., Mistry V.V.: Comparison of effect of vacuum condensed and ultrafiltered milk on pasteurized process cheese. *J. Dairy Sci.*, 2002, **85 Suppl. 1**, 90.
- [2] Aly M.E., Abdel-Baky A.A., Farahat S.M.: Quality of processed cheese spread made using ultrafiltered retentates treated with some ripening agents. *Int. Dairy J.*, 1995, **5 (2)**, 191-209.
- [3] Burrington K.J.: Understanding process cheese. *Food Product Design*. 2000. [www.foodproductdesign.com](http://www.foodproductdesign.com).
- [4] Chambre M., Daurelles J.: Processed cheese. In: *Cheesemaking: from science to quality assurance* – red. A. Eck i J.C. Gillis. Lavoisier Publishing Inc., 2000, pp. 641-657.
- [5] Cheryan M. (red.): *Ultrafiltration handbook*. Technomic Publishing Company Inc., 1986. pp. 1-25 i 235-245.
- [6] Ernstrom C.A., Sutherland B.J., Jameson G.W.: Cheese base for processing. A high yield product from whole milk by ultrafiltration. *J. Dairy Sci.*, 1980, **63 (2)**, 228-234.
- [7] Han X.O., Spradlin J.E.: Incorporation of whey into process cheese. U.S. Patent, 2001, No. 6,270,814 B1.
- [8] Jameson G.W., Sutherland B.J.: Process of making cheese by fermenting concentrated milk. U.S. Patent, 1994, No. 5,356,640.
- [9] Kumar V., Kosikowski F.V.: Process cheese manufactured from ultrafiltered retentates with and without enzymes. *J. Dairy Sci.*, 1977, **60 Suppl. 1**, 40.



- [10] Lee S.K., Klostermeyer, H.: The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 2001, **34**, 288-292.
- [11] Marchesseau S., Gastaldi E., Lagaude A., Cuq J.L.: Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80 (8)**, 1483-1489.
- [12] Moran J.W., Trecker G.W., Monckton S.P.: Continuous manufacture of process cheese. U.S. Patent, 2001, No. 6,183,805 B1.
- [13] Oakenfull D., Pearce J., Burley R.W.: Protein gelation. In: *Food proteins and their applications* – ed.. S. Damodaran i A. Paraf. Marcel Dekker Inc., 1997, pp. 111-142.
- [14] PN-73/A-86232. Mleko i przetwory mleczarskie. Sery. Metody badań.
- [15] Rubin J., Bjerre P.: Process for preparing cheese-base. U.S. Patent, 1983, No. 4,401,679.
- [16] Shimp L.A.: Process cheese principles. *Food Technology*, 1985, **39 (5)**, 63-70.
- [17] Simbuerger S., Wolfschoon A.F., Kempter K., Rose M., Marder U.: Acidified ultrafiltration concentrates as raw material for the production of processed cheese. European Patent Application, 1997, No. EP 0 755 630 A1.
- [18] Tamime A.Y., Younis M.F., Davies G.: Production of processed cheese using Cheddar cheese and cheese base 2. Production of a cheese base from skim milk powder. *Milchwissenschaft*, 1991, **46 (8)**, 495-499.

## UTILIZING ALL MILK PROTEINS TO MANUFACTURE PROCESSED CHEESE

### S u m m a r y

The processes of rennet or acid coagulation of milk proteins are used while conventionally manufacturing cheeses, which are, as next, utilized in the production of processed cheeses. During those coagulation processes, valuable rennet proteins are removed since they are contained in whey being removed. One of the possibilities to include all milk proteins into processed cheeses is to use products obtained directly from milk concentrated by an ultra-filtration method. In this paper, it was investigated a possibility to use a specific yoghurt cheese, produced from an UF milk protein retentate, as a cheese base when manufacturing processed cheeses.

A milk protein preparation (containing all milk proteins), i.e. the yoghurt cheese, was produced from a concentrated, 3.2% fatty milk; this milk was 5 times concentrated in a special ultrafiltration module. The retentate was pasteurized (72°C/15s), cooled to a temperature of  $46 \pm 2^\circ\text{C}$ , mixed with the yoghurt bacteria culture inoculated, and packed in thermowelded plastic bags. The packed retentate was incubated in a temperature of  $44 \pm 2^\circ\text{C}$  until its pH reached as level between 5,0 and 5,2; thereafter, it was cooled to a temperature of  $6^\circ\text{C}$ . The yoghurt cheese, manufactured using the method described, was utilized while manufacturing processed cheese; the latter was then standardized to a 55% water and a 55% fat content in its dry matter. To manufacture processed cheeses, the following ingredients were used: yoghurt cheese, Gouda-type rennet cheese (young and mature), butter, water, melting salts (Joha PL), and salt. Different amounts of the yoghurt cheese were added to the mixture being processed in order to achieve specific per cent proportion rates of the yoghurt cheese and other cheese ingredients, i.e.: 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, and 100%.

It was proved that the yoghurt cheese was a high quality, useful cheese base to manufacture a processed cheese which spread well, provided its content among all other components of the cheese mixture did not exceed 30%. If the addition of yoghurt cheese exceeded this level, the taste and flavor characteristics of a typical product usually manufactured from a mature, rennet cheese became milder. On the other hand, it was stated that with the increasing content of the yoghurt cheese, the pH value of the cheese mass decreased, but its hardness and apparent viscosity increased. It was proved that the yoghurt

cheese could replace a non-mature rennet cheese, since its advantage was that it contained all milk proteins.

**Key words:** ultrafiltration, cheese base, processed cheese ☒

JOANNA NIEWCZAS, DOROTA SZWEDA, MARTA MITEK

**ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH SKŁADNIKÓW PROZDROWOTNYCH  
W OWOCACH DYNI OLBRZYMIEJ (*CUCURBITA MAXIMA*)**

Streszczenie

Celem pracy było określenie zawartości witaminy C,  $\beta$ -karotenu oraz karotenoidów ogółem w dyni olbrzymiej oraz analiza zmian zawartości tych związków w badanych owocach podczas ich przechowywania.

Materiał doświadczalny stanowiły trzy nowe mieszańce dyni olbrzymiej (678, 679 i 680), jedna odmiana zarejestrowana w 1974 r. (Bambino) oraz jedna nowa odmiana zarejestrowana na początku 2005 r. (Karowita).

Badania przeprowadzono w następujących terminach po zbiorze owoców: I – bezpośrednio po zbiorze, II – 4 tygodnie, III – 8 tygodni, IV – 12 tygodni i V – 16 tygodni. Dynie przechowywano początkowo w tunelu foliowym, a następnie w chłodni. Temperatura przechowywania wynosiła ok. 8–10°C, a wilgotność 75%.

Zawartość witaminy C w badanych odmianach dyni bezpośrednio po zbiorze wynosiła od 22,0 do 31,0 mg/100 g świeżej masy. Podczas składowania owoców zawartość tej witaminy stopniowo zmniejszała się i po 3 miesiącach przechowywania była niższa o 17–32%. W dyniach przechowywanych dłużej (mieszaniec 679) zawartość witaminy C ulegała dalszemu zmniejszeniu, nawet o 43%. Zawartość karotenoidów ogółem w badanych dyniach bezpośrednio po zbiorze wynosiła od 3,7 do 8,7 mg/100 g świeżej masy. W większości odmian następował wzrost zawartości karotenoidów ogółem podczas całego okresu przechowywania. Wyjątkiem była odmiana Bambino, w owocach której największą zawartość karotenoidów stwierdzono po 8 tygodniach przechowywania. Zawartość  $\beta$ -karotenu ulegała zmianom podczas przechowywania dyni. Początkowo wynosiła ona od 3,3 do 7,6 mg/100 g świeżej masy. Najwyższy poziom  $\beta$ -karotenu w dyniach odmiany Karowita i mieszańcu 678 stwierdzono po 8 tygodniach przechowywania, natomiast w dyniach odmiany Bambino oraz mieszańcach 679 i 680 po 12 tygodniach.

**Słowa kluczowe:** dynia olbrzymia, przechowywanie, witamina C, karotenoidy,  $\beta$ -karoten

## Wprowadzenie

Żywność pochodzenia roślinnego jest głównym źródłem witamin przeciwutleniających w ludzkiej diecie, m.in. kwasu askorbinowego i  $\beta$ -karotenu (prowitamina A) [1].

Kwas askorbinowy jest jedną z najważniejszych witamin o właściwościach przeciwutleniających. Pełni kluczową rolę w fotosyntezie oraz we wzroście i rozwoju komórek roślinnych [22]. Zawartość kwasu askorbinowego zmienia się w czasie wzrostu oraz dojrzewania owoców i warzyw, jest ona zależna od gatunku i odmiany [15]. Witamina C jest bardzo wrażliwa na warunki przechowywania pozbiorowego, zwłaszcza na zawartość tlenu, temperaturę, światło i łatwo ulega zniszczeniu [1, 15].

Ponad 90% witaminy C w ludzkiej diecie pochodzi z owoców i warzyw. Jest ona niezbędna do ochrony przed skorbutem, do utrzymania zdrowej skóry i naczyń krwionośnych, a także pełni wiele innych ważnych biologicznych funkcji. Do warzyw o największej zawartości witaminy C należą: brokuł, kapusta biała, brukselka, nac pietruszki [13, 15]. W dyni olbrzymiej zawartość tej witaminy, w zależności od odmiany, wynosi od 8 do 50 mg/100 g świeżej masy [6, 7, 13].

Karotenoidy są jedną z najważniejszych grup naturalnych barwników. Ich budowa nadaje im specjalne i wyjątkowe właściwości, dzięki którym mogą pełnić różnorodne funkcje we wszystkich żywych organizmach. Większość karotenoidów ma silne właściwości przeciwutleniające [3, 9].

Karotenoidy są syntetyzowane przez wiele roślin, jednak tylko około 10% z nich wykazuje aktywność witaminy A. Barwnikiem z najwyższą aktywnością witaminy A jest  $\beta$ -karoten. Dwa inne, powszechnie występujące karotenoidy, które mają również znaczną aktywność tej witaminy, to  $\alpha$ - i  $\gamma$ -karoten [1, 9]. Konwersji do witaminy A może ulegać także  $\beta$ -kryptoksantina. Mimo, że nie wszystkie karotenoidy mogą ulegać tej przemianie, większość z nich ma właściwości przeciwutleniające (np. luteina), nadając im istotne znaczenie żywieniowe [2].

W roślinach karotenoidy pełnią istotną funkcję w fotosyntezie, ochraniają chloroplasty przed fotoutleniającym zniszczeniem [1]. W organizmie ludzkim karotenoidy pełnią wiele istotnych funkcji, m.in. wspomagają system immunologiczny, pełnią rolę przeciwutleniaczy, zmniejszają ryzyko zachorowania na raka. Karotenoidy zapobiegają także chorobom serca, oczu i skóry [2, 8].

Do warzyw bogatych w karotenoidy ogółem i w  $\beta$ -karoten należą m.in.: marchew, rzeżucha, pietruszka, szpinak, słodki ziemniak, kapusta [4, 8, 11]. Owoce dyni olbrzymiej charakteryzują się wysoką zawartością karotenoidów. Zawierają one do 36 mg karotenoidów ogółem w 100 g ś.m. [12, 24]. Zawartość  $\alpha$ -karotenu kształtuje się na poziomie od 0,4 do 1,5 mg/100 g ś.m. Dużo wyższa jest zawartość  $\beta$ -karotenu, od 0,2 do 17,2 mg/100 g ś.m. [17, 24]. W dyni olbrzymiej występuje ponadto luteina,

zeaksantyna,  $\beta$ -kryptoksantyna [17]. W niektórych odmianach występują także niewielkie ilości likopenu [16].

Celem pracy było określenie zawartości witaminy C,  $\beta$ -karotenu oraz karotenoidów ogółem w dyni olbrzymiej oraz analiza zmian zawartości tych związków w badanych owocach podczas ich przechowywania.

### **Materiał i metody badań**

Materiał doświadczalny stanowiły 3 nowe mieszańce dyni olbrzymiej (678, 679 i 680), tradycyjna odmiana Bambino oraz nowa odmiana, zarejestrowana w 2005 r., Karowita. Badane dynie pochodziły z pola doświadczalnego „Wolica”, należącego do Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu SGGW. Zbiór owoców przeprowadzono 14 września 2004 r. Do badań pobierano owoce, które w dniu zbioru miały od 62 do 66 dni, za wyjątkiem odmiany Karowita, która zakwitła później i miała od 50 do 53 dni.

Badania przeprowadzono w następujących terminach po zbiorze owoców: I – bezpośrednio po zbiorze, II – 4 tygodnie, III – 8 tygodni, IV – 12 tygodni i V – 16 tygodni. Dynie przechowywano początkowo w tunelu foliowym w temp. 8–10°C, a od połowy listopada w chłodni w temp. 10°C i wilgotności powietrza 75%. Nie wszystkie odmiany i mieszańce udało się przechować przez 4 miesiące, bowiem część z nich uległa zmianom gnilnym. I tak, dynie odmiany Bambino były badane tylko w trzech terminach, ‘Karowita’ i mieszańce 678 i 680 – w czterech, a mieszańców 679 w pięciu terminach.

Próbki do badań pobierano z najbardziej nasłonecznionej części sześciu owoców każdej z odmian dyń. Strona nasłoneczniona, to strona przeciwległa do części spoczywającej na ziemi i odznaczającej się jaśniejszą barwą oraz spłaszczoną powierzchnią. Jednakowej wielkości kawałki owoców obierano, odpestczano i wspólnie rozdrabniano. Z uzyskanej w ten sposób ujednocionej próby ogólnej pobierano od 3 do 5 średnich próbek laboratoryjnych, będących bezpośrednim materiałem do badań analitycznych.

W dyniach oznaczano zawartość: witaminy C (bezpośrednia redukcyjność) metodą ksylenową [19],  $\beta$ -karotenu metodą chromatografii kolumnowej i karotenoidów ogółem metodą spektrofotometryczną [21].

W celu stwierdzenia różnic w składzie chemicznym dyń pomiędzy poszczególnymi odmianami i okresami przechowywania przeprowadzono analizę statystyczną przy użyciu programu Statgraphics Plus, stosując 3-czynnikową analizę wariancji, a istotność różnic między wartościami średnimi badano testem Duncana.

## Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczania zawartości: witaminy C, karotenoidów ogółem oraz  $\beta$ -karotenu w badanych dyniach przedstawiono w tab. 1–3.

Zawartość witaminy C w dyniach badanych odmian wynosiła bezpośrednio po zbiorze od 22,0 do 31,0 mg/100 g ś.m. (tab. 1). Najwięcej witaminy C zawierały owoce nowego mieszańca: 679, niewiele mniej 678, a najmniej ‘Bambino’. Podczas przechowywania zawartość ta stopniowo zmniejszała się i po 12 tyg. przechowywania była mniejsza o 17–32%. W mieszańcu 679, który był przechowywany przez 16 tyg., zawartość witaminy C uległa dalszemu zmniejszeniu – o 43% w stosunku do wartości oznaczonej bezpośrednio po zbiorze.

Tabela 1

Zawartość witaminy C w dyniach podczas przechowywania.

Content of vitamin C during the storage of pumpkins.

Odmiana lub mieszańiec dyni Cultivar or hybrid of pumpkin	Witamina C [mg/ 100 g ś.m.] Vitamin C [mg/100 g f.w.]				
	Okres przechowywania [tygodnie] / Storage period [weeks]				
	0	4	8	12	16
	$\bar{x}$ + SD	$\bar{x}$ + SD	$\bar{x}$ + SD	$\bar{x}$ + SD	$\bar{x}$ + SD
678	30,5 ± 0,8 <sup>aD</sup>	29,9 ± 0,5 <sup>bC</sup>	24,1 ± 0,7 <sup>cC</sup>	21,6 ± 0,8 <sup>dA</sup>	–
679	31,0 ± 0,8 <sup>aD</sup>	25,4 ± 0,7 <sup>bB</sup>	23,1 ± 0,6 <sup>cC</sup>	21,2 ± 0,5 <sup>dA</sup>	17,6 ± 0,7 <sup>e</sup>
680	25,9 ± 0,2 <sup>aC</sup>	23,7 ± 0,3 <sup>bB</sup>	22,2 ± 0,7 <sup>bC</sup>	19,4 ± 0,6 <sup>bA</sup>	–
Karowita	24,4 ± 0,2 <sup>aB</sup>	23,6 ± 0,1 <sup>bB</sup>	19,1 ± 0,6 <sup>bcB</sup>	18,5 ± 0,8 <sup>cA</sup>	–
Bambino	22,0 ± 0,4 <sup>aA</sup>	20,4 ± 0,4 <sup>aA</sup>	16,6 ± 0,5 <sup>bA</sup>	–	–

Explanatory Notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

a, b, c, d, e – wartości średnie oznaczone w wierszach w obrębie tego samego wyróżnika tą samą literą nie różniły się statystycznie istotnie na poziomie  $\alpha = 0,05$  / mean values as denoted in the lines by the same letter, and included in the same characteristics, do not statistically significantly differ at  $\alpha = 0,05$  level.

A, B, C, D – wartości średnie oznaczone w kolumnach w obrębie tego samego wyróżnika tą samą literą nie różniły się statystycznie istotnie na poziomie  $\alpha = 0,05$  / mean values as denoted in the columns by the same letter, and included in the same characteristics, do not significantly differ at  $\alpha = 0,05$  level.

Nowe mieszańce charakteryzują się na ogół mniejszą średnicą owoców i mniejszą masą, a jednocześnie większą zawartością suchej substancji i ekstraktu niż odmiany tradycyjne. Ponadto nowe mieszańce charakteryzują się mniejszymi ubytkami masy podczas przechowywania [6]. Dotyczy to również badanych dyń mieszańców 678 i 679, które wyróżniały się mniejszą masą. Masa pobieranych do analizy owoców tych

odmian wynosiła od 2 do 2,5 kg, podczas gdy owoce tradycyjnej odmiany Bambino ważyły ok. 5–10 kg.

Jak wykazały badania Danilchenko i wsp.[7], zawartość witaminy C w owocach dyni olbrzymiej jest związana z poziomem ekstraktu i suchej substancji. Kiedy zawartość ekstraktu i suchej substancji jest wysoka, dynie odznaczają się również dużą zawartością witaminy C [7]. Przeprowadzone badania własne potwierdziły tę zależność. Mieszzańce 678 i 679, charakteryzujące się 2–3-krotnie wyższą zawartością suchej substancji i ekstraktu w porównaniu z odmianą Bambino, miały też odpowiednio wysoką zawartość witaminy C [23].

Zawartość karotenoidów ogółem w badanych dyniach bezpośrednio po zbiorze wynosiła od 3,7 do 8,7 mg/100 g świeżej masy (tab. 2). Największą zawartość karotenoidów ogółem oznaczono w dwóch nowych mieszzańcach: 678 i 679, a najmniejszą w owocach odmiany Bambino. Według Niemirowicz-Szczytt [18], ‘Bambino’ zawiera mało karotenoidów ogółem w porównaniu z nowszymi odmianami, np. Amazonką (8,5 mg/100 g świeżej masy). Mieszaniec 678 zawierał ponad 2-krotnie więcej karotenoidów ogółem w porównaniu z dynią odmiany Bambino. Zawartość karotenoidów w warzywach m.in. w dyni olbrzymiej zależy od warunków pogodowych w danym sezonie, a także od odmiany [5, 7, 10, 17]. Dynie o mniejszych owocach, jakimi były nowe mieszzańce 678 i 679, miały większą zawartość karotenoidów. Zależność tę potwierdzają badania Sztangret i wsp. [24].

W przypadku dyni wszystkich badanych odmian i mieszzańców stwierdzono wzrost zawartości karotenoidów ogółem podczas całego okresu przechowywania, przy czym w zależności od odmiany zaobserwowany wzrost wynosił od 25% („Karowita”) do 70% wyjściowej wartości.

Tabela 2

Zawartość karotenoidów ogółem w dyniach podczas przechowywania.  
Content of total carotenoids during the storage of pumpkins.

Odmiana lub mieszaniec dyni Cultivar or hybrid of pumpkin	Karotenoidy ogółem [mg/100g ś.m.] Total carotenoids [mg/100g f.w.]				
	Okres przechowywania [tygodnie] / Storage period [weeks]				
	0	4	8	12	16
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
678	8,7 ± 0,1 <sup>aD</sup>	9,6 ± 0,3 <sup>bD</sup>	10,5 ± 0,1 <sup>cD</sup>	11,8 ± 0,2 <sup>dC</sup>	–
679	6,6 ± 0,2 <sup>aC</sup>	7,5 ± 0,1 <sup>bC</sup>	9,4 ± 0,1 <sup>cC</sup>	10,0 ± 0,2 <sup>dB</sup>	11,3 ± 0,3 <sup>e</sup>
680	4,2 ± 0,1 <sup>aB</sup>	5,4 ± 0,1 <sup>bB</sup>	5,7 ± 0,3 <sup>bB</sup>	5,7 ± 0,3 <sup>bA</sup>	–
Karowita	4,4 ± 0,2 <sup>aB</sup>	5,2 ± 0,1 <sup>bB</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>bcA</sup>	5,5 ± 0,1 <sup>cA</sup>	–
Bambino	3,7 ± 0,1 <sup>aA</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>aA</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>bA</sup>	–	–

Objaśnienia jak w tab. 1/ Explanatory notes as in Tab. 1

W większości karotenogenicznych owoców i warzyw dojrzewaniu towarzyszy wzmożona biosynteza karotenoidów, wskutek czego następuje znaczny wzrost ich zawartości, w tym również prowitaminy A. W nieuszkodzonych owocach karotenogeneza może być również kontynuowana po zbiorze. Rodriguez-Almaya [20] stwierdził przyrost karotenoidów podczas przechowywania między innymi w brokułach, marchwi, zielonym groszku i dyni.

Wzrost zawartości karotenoidów ogółem oraz  $\beta$ -karotenu w czasie składowania zaobserwowali również Lan Huong Tran i wsp. [14] podczas badań prowadzonych na owocach gorzkiego melona. Rozważali oni trzy drogi syntezy  $\beta$ -karotenu. Według pierwszej teorii  $\beta$ -karoten powstaje w wyniku wewnętrznych przemian poszczególnych karotenoidów, a prekursorem tej syntezy jest likopen. Według drugiej –  $\beta$ -karoten powstaje z  $\beta$ -zeakarotenu. Według trzeciej teorii  $\beta$ -karoten powstaje na drodze cyklizacji z  $\zeta$ -karotenu.

Tabela 3

Zawartość  $\beta$ -karotenu w dyniach podczas przechowywania.  
Content of  $\beta$ -carotene during the storage of pumpkins.

Odmiana lub mieszaniec dyni Cultivar or hybrid of pumpkin	$\beta$ -karoten [mg/100 g ś.m.] / $\beta$ -carotene [mg/100 g f.w.]				
	Okres przechowywania [tygodnie] / Storage period [weeks]				
	0	4	8	12	16
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
678	7,6 $\pm$ 0,1 <sup>aD</sup>	7,8 $\pm$ 0,1 <sup>aE</sup>	8,7 $\pm$ 0,2 <sup>bE</sup>	8,6 $\pm$ 0,2 <sup>bC</sup>	–
679	6,3 $\pm$ 0,2 <sup>aC</sup>	6,4 $\pm$ 0,1 <sup>aD</sup>	7,6 $\pm$ 0,2 <sup>bD</sup>	9,1 $\pm$ 0,1 <sup>cC</sup>	7,1 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>
680	3,8 $\pm$ 0,1 <sup>aB</sup>	4,9 $\pm$ 0,3 <sup>cC</sup>	4,3 $\pm$ 0,2 <sup>bC</sup>	4,5 $\pm$ 0,2 <sup>bcB</sup>	–
Karowita	3,5 $\pm$ 0,1 <sup>abA</sup>	3,6 $\pm$ 0,2 <sup>bbB</sup>	3,6 $\pm$ 0,1 <sup>bbB</sup>	3,3 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	–
Bambino	3,3 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	3,0 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	3,3 $\pm$ 0,1 <sup>aA</sup>	–	–

Objaśnienia jak w tab. 1/ Explanatory notes as in Tab. 1

Karoteny w dyni reprezentowane są głównie przez  $\beta$ -karoten, który ma najwyższą aktywność biologiczną w porównaniu z innymi formami tego związku [12].

Zawartość  $\beta$ -karotenu w badanych w pracy odmianach dyń ulegała zmianom podczas przechowywania. Początkowo wynosiła ona od 3,3 do 7,6 mg/100 g świeżej masy (tab. 3). Bezpośrednio po zbiorze i przez 8 tyg. przechowywania najwięcej  $\beta$ -karotenu zawierały owoce dyni mieszańca 678. Jednak po 16 tygodniach najbardziej zasobna w ten składnik okazała się dynia mieszańca 679. Największy poziom  $\beta$ -karotenu w owocach dyni mieszańca 678 zaobserwowano po 8 tyg. przechowywania, w mieszańcu 679 po 16 tyg., natomiast w mieszańcu 680 po 4 tyg.



składowania. W owocach dyni odmian: Karowita i Bambino przez 8 tyg. przechowywania nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic zawartości  $\beta$ -karotenu. W dyni mieszańcu 679, który był przechowywany przez 16 tyg. (nie wystąpiły w nim zmiany gnilne), w ostatnim terminie badań nastąpiło zmniejszenie zawartości  $\beta$ -karotenu. Dynie odmian zarejestrowanych, czyli Karowita i Bambino zawierały najmniej  $\beta$ -karotenu. Najwięcej  $\beta$ -karotenu oznaczono w składzie nowych mieszańców: 678 i 679.  $\beta$ -karoten w badanych odmianach i mieszańcach stanowił ok. 40-50% karotenoidów ogółem.

Jak podają Dąbrowski i wsp. [6], zawartość  $\beta$ -karotenu wzrasta po zbiorze i najczęściej do końca okresu przechowywania utrzymuje się na wyższym poziomie niż początkowy (bezpośrednio po zbiorze). Przeprowadzone badania potwierdziły tę tendencję. Znaczny wzrost zawartości  $\beta$ -karotenu podczas 3-miesięcznego przechowywania dyni olbrzymiej zaobserwowali również Chavasit i wsp. [5].

Poznanie zmian zawartości witamin podczas przechowywania owoców dyni olbrzymiej jest ważne ze względu na możliwość ich przemysłowego wykorzystania w momencie, gdy zawierają one maksymalną zawartość cennych składników, jakimi są m.in. karotenoidy. Dlatego też istotnym wydaje się dalsze prowadzenie badań w tym zakresie.

### Wnioski

1. Nowe mieszańce dyni olbrzymiej: 678 i 679 charakteryzują się wyższą zawartością witaminy C, karotenoidów ogółem i  $\beta$ -karotenu w porównaniu z uprawianą w Polsce od ponad 30 lat dynią odmiany Bambino oraz nową odmianą Karowita.
2. Zawartość witaminy C podczas przechowywania owoców dyni olbrzymiej stopniowo maleje, przy czym straty tej witaminy po 4 miesiącach przechowywania osiągają nawet 43%.
3. Podczas magazynowania dyni wzrasta zawartość karotenoidów ogółem. W zależności od odmiany  $\beta$ -karoten osiąga największy poziom od 8 do 12 tygodni po zbiorze.

### Literatura

- [1] Bartz J., Brecht J.: Postharvest physiology and pathology of vegetables. Marcel Dekker Inc. New York 2003.
- [2] Bates C.: Vitamin A. *Lancet*, 1995, **345**, 31-35.
- [3] Borowska J.: Owoce i warzywa jako źródła naturalnych przeciwutleniaczy (2). *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 2003, **6**, 29-30.
- [4] Bushway R.: Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.*, 1986, **34**, 409-412.

- [5] Chavasit V, Pisaphab R, Sungpuag P, Jittinandana S, Wasantwisut E.: Changes in  $\beta$ -carotene and vitamin A-rich foods in Thailand during preservation and storage. *J Food Sci.* 2002, **67** (1), 375-379.
- [6] Dąbrowski A., Gałązka J., Zalewski S.: Technological properties, nutritional value and storage properties of new pumpkin varieties. *Acta Alim.*, 1989, **15** (2), 153-157.
- [7] Danilchenko H., Paulauskiene A., Dris R., Niskanen R.: Biochemical composition and processability of pumpkin cultivars. *Acta Hort.*, 2000, **510**, 493-497.
- [8] Fraser P., Bramley P.: The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress Lipid Res.*, 2004, **43**, 228-265.
- [9] Handelman G.: The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition.* 2001, **17** (10), 818-822.
- [10] Heinonen M., Ollilainen V., Linkola E., Varo P., Koivistonen P.: Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **37**, 655-659.
- [11] Holden J., Eldrige A., Beecher G., Buzzard I., Bhagwat S., Davis C., Douglas L., Gebhart S., Haytowitz D., Schakel S.: Carotenoid content of U.S. foods: An update of the database. *J. Food Comp. Anal.*, 1999, **12**, 169-196.
- [12] Krzysik K, Bogucka W.: Dynia – wartościowy surowiec do produkcji przetworów dla dzieci. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1981, **4**, 23-25.
- [13] Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K.: Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych. IŻŻ. Warszawa 1998.
- [14] Lan Huong Tran T., Raymundo L.: Biosynthesis of carotenoids in bittermelon at high temperature. *Phytochem.* 1999, **52**, 275-280.
- [15] Lee S., Kader A.: Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.*, 2000, **20**, 207-220.
- [16] Murkovic M., Gams K., Draxl S., Pfannhauser W.: Development of Austrian carotenoid databases. *J. Food Comp. Anal.*, 2000, **13**, 435-440.
- [17] Murkovic M., Mulleder U., Neunteufl H.: Carotenoid content in different varieties of pumpkins. *J. Food Comp. Anal.*, 2002, **15**, 633-638.
- [18] Niemirowicz-Szczytt K., Korzeniewska A., Gałęcka T.: Nowe odmiany dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima* Duch.) o podwyższonej zawartości suchej masy, białka i karotenoidów. *Mat. VI Ogólnopolskiego Zjazdu Hodowców Roślin Ogrodniczych „Hodowla roślin o podwyższonej jakości”*, Kraków, 15-16 lutego 1996, s. 148-151.
- [19] PN-A-04019:1998. Produkty spożywcze. Oznaczanie witaminy C.
- [20] Rodriguez-Almaya D.: Carotenoids and food preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1997, [www.mostproject.org/carrot2.pdf](http://www.mostproject.org/carrot2.pdf)
- [21] Rutkowska U.: Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności. *PZWŁ.* Warszawa 1981, s. 302-331.
- [22] Smirnoff N.: The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Biol.*, 1996, **78**, 661-669.
- [23] Sosińska P.: Charakterystyka składu chemicznego nowych odmian dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*) ze szczególnym uwzględnieniem frakcji sacharydów. Praca magisterska. WTŻ. SGGW. Warszawa 2005.
- [24] Sztangret J., Korzeniewska A., Horbowicz M., Niemirowicz-Szczytt K.: Comparison of fruit yields and carotenoids content in new winter squash hybrids (*Cucurbita maxima* Duch.). *Vegetables Crop Research Bulletin*, Research Institute of Vegetable Crops – Skierniewice, 2004, **61**, 51-60.

**THE CONTENT OF SELECTED PRO-HEALTHFUL COMPONENTS IN WINTER SQUASH  
(*CUCURBITA MAXIMA*) FRUITS****S u m m a r y**

The objective of the paper was to determine the content of vitamin C,  $\beta$ -carotene, and total carotenoids in the winter squash fruits, and to analyze changes in the contents of these compounds in the fruits investigated during their storage.

The experimental material were 3 new hybrids (678, 679, 680) of winter squash, one variety registered in 1974 (Bambino), and one new variety registered at the beginning of 2005 (Karowita).

The investigations were performed during the following periods after the fruit harvest performed: period I – directly after the harvest; period II – 4 weeks after the harvest; period III – 8 weeks after the harvest; period IV – 12 weeks after the harvest; and period V – 16 weeks after the harvest. The pumpkins under analysis were, at first, stored in a folic tunnel, and, next, in a cold storage room. The storage temperature was about 8<sup>0</sup>C to 10<sup>0</sup>C, and the humidity in the storage room: 75%.

The content of vitamin C in the variations of pumpkins investigated directly after the harvest amounted from 22,0 to 31,0 mg/100 g of fresh mass. During the storage, this content gradually decreased, and, after the 3 months of storage, it was lower by 17–32%. In the pumpkins stored longer (pumpkin variety 679), the content of vitamin C decreased even by 43%.

The content of total carotenoids in the pumpkins analysed during the first period amounted from 3,7 to 8,7 mg/100 g of fresh mass. For the majority of varieties, the content of total carotenoids increased during the entire storage period. The variety Bambino was the only exception since it showed the highest amount of carotenoids after the 8 weeks of storage.

The content of  $\beta$ -carotene changed during the storage of pumpkins. Initially, it was from 3,3 to 7,6 mg/100 g of fresh mass. The highest content of  $\beta$ -carotene in the variety 678 and Karowita occurred after the 8 weeks of storage, whereas in the varieties 679, 680, as well as in Bambino – after the 12 weeks of storage.

**Key words:** winter squash, storage, vitamin C, carotenoids,  $\beta$ -carotene ☒

KAROLINA POSZYTEK, ANDRZEJ LENART

## **WPŁYW AGLOMERACJI NA WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE KASZEK MLECZNO-ZBOŻOWYCH W PROSZKU DLA DZIECI**

### **Streszczenie**

Celem pracy było określenie wpływu aglomeracji nawilżeniowej na właściwości fizyczne aglomeratów kaszek mleczno-zbożowych z dodatkiem kakao bądź suszonych owoców w kawałkach lub w proszku. Aglomerację prowadzono poprzez mieszanie nawilżanej mieszaniny w pneumatycznie lub mechanicznie generowanym złożu fluidalnym.

Analiza właściwości fizycznych obejmowała następujące oznaczenia: aktywność i zawartość wody, skład granulometryczny, gęstość nasypowa i utrzęsiona, sypkość, kąt zsypania z różnych powierzchni i zwilżalność kaszek przed i po aglomeracji.

Nieaglomerowane kaszki były proszkami trudno rozpuszczalnymi w wodzie, o dużej gęstości nasypowej i małej sypkości. Aglomeracja nawilżeniowa wpłynęła na polepszenie właściwości fizycznych kaszek mleczno-zbożowych. Uzyskane aglomeraty charakteryzowały się szczególnie dobrą sypkością i zwilżalnością, niezależnie od składu surowcowego kaszki i zastosowanej metody aglomeracji.

**Słowa kluczowe:** kaszki dla dzieci, proszki spożywcze, aglomeracja, złoże fluidalne

### **Wprowadzenie**

Obserwuje się coraz większe zapotrzebowanie na żywność wygodną, łatwo dostępną, umożliwiającą proste przygotowanie posiłków w dowolnym czasie i różnych sytuacjach. Od dawna poszukuje się takich sposobów przetwarzania i utrwalania surowców żywnościowych, aby otrzymać produkt bezpieczny, o podwyższonej jakości [2]. Ma to szczególne znaczenia w przypadku produktów dla dzieci i niemowląt, gdyż te produkty gotowe muszą odpowiadać rygorystycznym wymaganiom.

Cechy produktów spożywczych w formie sypkiej, otrzymywanych różnymi metodami, które bardzo często decydują o jakości gotowego produktu, związane są

---

*Mgr inż. K. Poszytek, prof. dr hab. A. Lenart; Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa*

z właściwościami fizycznymi proszków [4]. Znajomość tych właściwości pozwala na określenie cech produktów sypkich ważnych zarówno dla konsumenta, jak i producenta.

Celem pracy było określenie wpływu aglomeracji nawilżeniowej, poprzez mieszanie w pneumatycznie i mechanicznie generowanym złożu fluidalnym, na właściwości fizyczne otrzymanych aglomeratów, na przykładzie produktów dla dzieci – kaszek mleczno-zbożowych z dodatkiem kakao bądź suszonych owoców w kawałkach lub w proszku.

### **Materiał i metody badań**

Materiał do badań stanowiły cztery rodzaje rynkowych kaszek mleczno-zbożowych w proszku dla dzieci. Kaszki zawierały dodatkowo kakao lub suszone owoce w postaci proszku lub liofilizowanych kawałków. Skład surowcowy kaszek był następujący:

A – mleko w proszku, mąka ryżowa, cukier, kakao.

B – mleko w proszku, kaszka ryżowa, cukier, kawałki truskawek, kuleczki ryżowe.

C – mleko w proszku, kaszka pszenna, cukier, proszek bananowy, zmielone sucharki.

D – mleko w proszku, kaszka ryżowa, cukier, kawałki jabłek, proszek jabłkowy.

Aglomerację w pneumatycznie generowanym złożu fluidalnym przeprowadzono w aglomeratorze STREA 1 firmy Niro-Aeromatic AG. Parametry procesu aglomeracji były następujące: wsad 300 g, ciecz nawilżająca – woda 60 g, temp. powietrza wlotowego  $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ , strumień przepływu powietrza przez złożę od 50 do  $80\text{ m}^3/\text{h}$ , ciśnienie sprężonego powietrza w dyszy rozpylającej 1 bar, nawilżanie z przerwami w czasie około 10 min, suszenie aglomeratu przez 15 min w temp.  $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Aglomerację w mechanicznie generowanym złożu fluidalnym przeprowadzono w laboratoryjnym mieszalniku lemieszowo-płuzącym firmy Lodige, typ L5, do granulacji substancji sypkich. Parametry procesu aglomeracji były następujące: wsad 400 g, ciecz nawilżająca – woda 70 g, ciśnienie sprężonego powietrza w dyszy rozpylającej 0,5 bara, nawilżanie w czasie 3 min, suszenie aglomeratu przez 30 min w temp.  $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Analiza właściwości fizycznych kaszek i utworzonych z nich aglomeratów obejmowała: skład granulometryczny (analyzer wielkości cząstek ciał stałych w powietrzu AWK-V97, Kamika), gęstość nasypową luźną i utrzęsioną, współczynnik Hausera (objętościomierz wstrząsowy STAV 2003, Engelsmann AG) [1], kąt zsypania, sypkość, zwilżalność, a także zawartość i aktywność wody.

### **Wyniki i dyskusja**

Analiza składu granulometrycznego kaszek przed aglomeracją i powstałych aglomeratów wykazała, że proces aglomeracji wpłynął na zmianę składu

granulometrycznego poprzez zwiększenie udziału większych cząstek [3]. Sposób aglomeracji (w pneumatycznie, jak i mechanicznie generowanym złożu fluidalnym) nie powodował istotnych różnic w składzie granulometrycznym kaszek. Wyjątek stanowiła kaszka A, która charakteryzowała się największą wielkością cząstek aglomerowanych w mechanicznie generowanym złożu (tab. 1, 2, 3; rys. 1).

Gęstość nasypowa luźna i utrząsiona kaszek po aglomeracji, niezależnie od ich rodzaju, była zdecydowanie mniejsza niż kaszek przed aglomeracją. Bardziej znaczące zmniejszenie gęstości nasypowej zaobserwowano podczas aglomeracji w pneumatycznie generowanym złożu fluidalnym (rys. 2 i 3).

Tabela 1

Właściwości fizyczne kaszek mleczno-zbożowych przed aglomeracją.  
Physical properties of infant milk-and-cereal powdered porridges before the agglomeration.

Wyróżniki fizyczne Physical properties	Kaszki mleczno-zbożowe Infant milk-and-cereal powdered porridges			
	A	B	C	D
Skład granulometryczny Granulometric composition:				
$d_{10}$ [ $\mu\text{m}$ ]	340	285	252	307
$d_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	759	648	582	659
$d_{90}$ [ $\mu\text{m}$ ]	1573	1375	1089	1122
Współczynnik Hausera Hausner ratio, $I_H$ [-]	1,17	1,19	1,17	1,17
Kąt zsypania z metalu Repose angle from metal [ $^\circ$ ]	24	23	16	15
Kąt zsypania ze szkła Repose angle from glass [ $^\circ$ ]	36	36	34	35
Zwilżalność Flowability [s]	>300	>300	>300	>300
Aktywność wody Water activity, $a_w$ [-]	0,22	0,16	0,13	0,08
Zawartość wody Water content, $x$ [g $\text{H}_2\text{O}/100$ g s.s.]	4,07	5,12	4,67	4,03

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$d_{10}$  – średnica / diameter of the particle;  $d_{50}$  – średnia średnica (mediana) / mean diameter of the particle;  
 $d_{90}$  – średnica / diameter of the particle

Z gęstością nasypową luźną i utrząsioną związany jest współczynnik Hausera  $I_H$  (stosunek gęstości nasypowej utrząsionej do gęstości nasypowej luźnej). Współczynnik  $I_H$  jest wskaźnikiem sypkości proszków [5]. Kaszki przed aglomeracją

charakteryzowały się gorszą sypkością niż po aglomeracji. Aglomerowanie w mechanicznie generowanym złożu fluidalnym powodowało, że badane kaszki charakteryzowały się najmniejszym współczynnikiem Hausera. Podobny współczynnik  $I_H$  miały kaszki aglomerowane w pneumatycznie generowanym złożu fluidalnym, co świadczy o dobrej sypkości utworzonych aglomeratów (tab. 1, 2 i 3).

Inny wskaźnik sypkości, czas wysypu (sypkość), w sposób bardziej jednoznaczny charakteryzuje badane kaszki. Kaszki aglomerowane uzyskały czas mniejszy niż 20 s, czyli charakteryzowały się dobrą sypkością (rys. 4).

Tabela 2

Właściwości fizyczne kaszek mleczno-zbożowych aglomerowanych w pneumatycznie generowanym złożu fluidalnym.

Physical properties of milk-and cereal powdered porridges agglomerated in a fluidized, pneumatically generated bed.

Wyróżniki fizyczne Physical properties	Pneumatycznie aglomerowane kaszki mleczno-zbożowe Pneumatically agglomerated milk-and cereal powdered porridges for infants			
	A	B	C	D
Skład granulometryczny Granulometric composition distribution				
$d_{10}$ [ $\mu\text{m}$ ]	428	340	285	384
$d_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	935	659	615	792
$d_{90}$ [ $\mu\text{m}$ ]	1595	2752	1144	1786
Współczynnik Hausera Hausner ratio, $I_H$ [-]	1,16	1,12	1,15	1,15
Kąt zsypania z metalu Repose angle from metal [ $^\circ$ ]	19	18	18	17
Kąt zsypania ze szkła Repose angle from glass [ $^\circ$ ]	30	33	37	35
Zwilżalność Flowability [s]	3	4	3	3
Aktywność wody Water activity, $a_w$ [-]	0,04	0,03	0,05	0,04
Zawartość wody Water content $x$ [g $\text{H}_2\text{O}/100$ g s.s.]	2,68	2,34	2,75	3,04

Objaśnienia jak w tab. 1 / Explanatory notes as in Tab. 1.

Wskaźnikiem charakteryzującym właściwości rekonstruktoryjne jest zwilżalność. Zwilżalność kaszek nieaglomerowanych jest niewielka, porcja proszku utrzymywała się na powierzchni cieczy przez dłuższy czas. Uległa ona zdyspergowaniu w wodzie dopiero w trakcie intensywnego mieszania. Zwilżalność odpowiadającą właściwości

błyskawicznej rozpuszczalności (instant) uzyskano we wszystkich aglomeratach niezależnie od zastosowanej metody (tab. 1, 2 i 3).

Analiza kąta zsypania z powierzchni metalowej i szklanej nie wykazała różnic w mierze kąta pomiędzy kaszkami przed i po aglomeracji, niezależnie od zastosowanej metody (tab. 1, 2 i 3).

Tabela 3

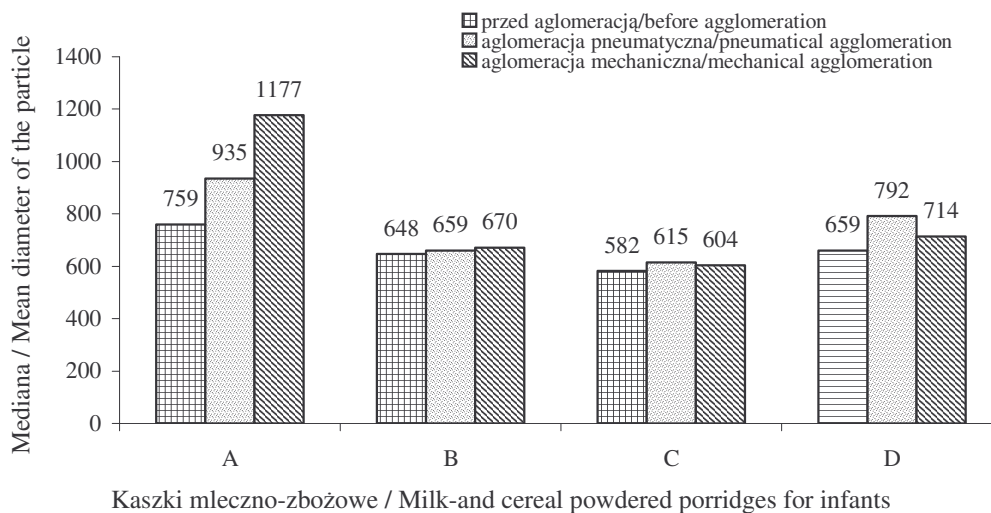
Właściwości fizyczne kaszek mleczno-zbożowych aglomerowanych w mechanicznie generowanym złożu fluidalnym.

Physical properties of milk-and cereal powdered porridges agglomerated in a mechanically generated fluidized bed.

Wyróżniki fizyczne Physical properties	Mechanicznie aglomerowane kaszki mleczno-zbożowe Mechanically agglomerated milk-and cereal powdered porridges for infants			
	A	B	C	D
Skład granulometryczny Granulometric composition				
$d_{10}$ [ $\mu\text{m}$ ]	725	340	274	362
$d_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	1177	670	604	714
$d_{90}$ [ $\mu\text{m}$ ]	2036	1430	1210	1816
Współczynnik Hausera Hausner ratio, $I_H$ [-]	1,10	1,14	1,14	1,14
Kąt zsypania z metalu Repose angle from metal [ $^\circ$ ]	27	23	23	22
Kąt zsypania ze szkła Repose angle from glass [ $^\circ$ ]	27	27	28	28
Zwilżalność Flowability [s]	3	5	2	5
Aktywność wody Water activity, $a_w$ [-]	0,66	0,66	0,69	0,65
Zawartość wody Water content $x$ [g $\text{H}_2\text{O}/100$ g s.s.]	12,02	12,66	13,28	12,61

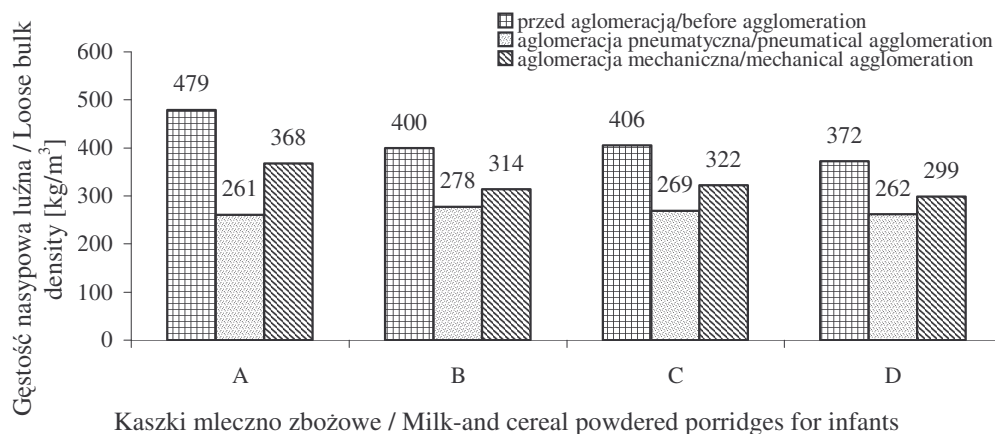
Objaśnienia jak w tab. 1 / Explanatory notes as in Tab. 1.





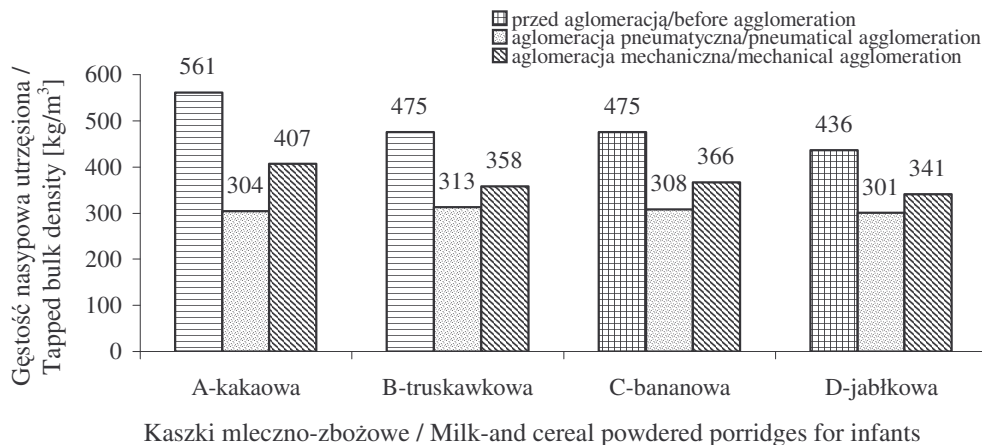
Rys. 1. Mediana  $d_{50}$  kaszek mleczno-zbożowych przed i po aglomeracji w pneumatycznie lub mechanicznie generowanym złożu fluidalnym.

Fig. 1.  $d_{50}$  mean diameter of particles of the milk-and cereal powdered porridges before and after the agglomeration in a pneumatically or mechanically generated fluidized bed.



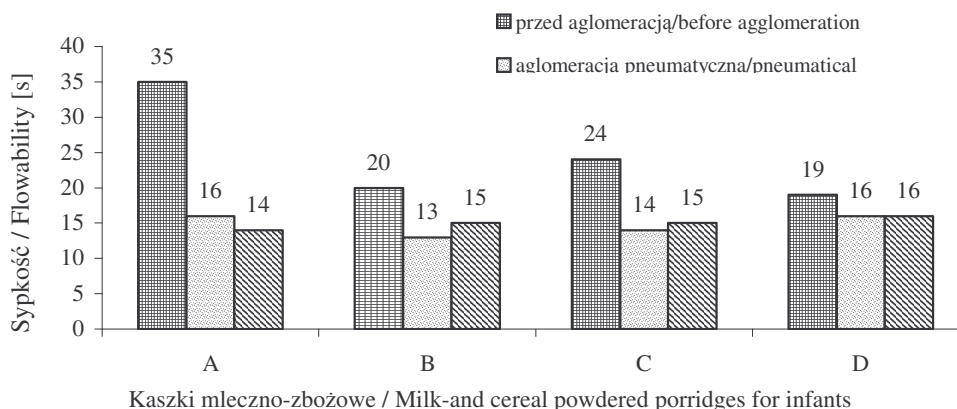
Rys. 2. Gęstość nasypowa luźna kaszek mleczno-zbożowych przed i po aglomeracji w pneumatycznie lub mechanicznie generowanym złożu fluidalnym.

Fig. 2. Loose bulk density of the milk-and cereal powdered porridges before and after the agglomeration in a pneumatically or mechanically generated fluidized bed.



Rys. 3. Gęstość nasypowa utrżęsiona kaszek mleczno-zbożowych przed i po aglomeracji w pneumatycznie lub mechanicznie generowanym złożu fluidalnym.

Fig. 3. Tapped bulk density of the milk-and cereal powdered porridges before and after the agglomeration in a pneumatically or mechanically generated fluidized bed.



Rys. 4. Sypkość kaszek mleczno-zbożowych przed i po aglomeracji w pneumatycznie lub mechanicznie generowanym złożu fluidalnym.

Fig. 4. Looseness of the milk-and cereal powdered porridges before and after the agglomeration in a pneumatically or mechanically generated fluidized bed.

## Wnioski

1. Nieaglomerowane kaszki mleczno-zbożowe były proszkami o wysokiej gęstości nasypowej, słabej sypkości i trudno rozpuszczalne w wodzie.
2. Aglomeracja nawilżeniowa wpłynęła na polepszenie właściwości fizycznych kaszek mleczno-zbożowych. Uzyskane aglomeraty charakteryzowały się

szczególnie dobrą sypkością i zwilżalnością, niezależnie od składu surowcowego kaszki i zastosowanej metody aglomeracji.

### Literatura

- [1] DIN 66145: 1976. Darstellung von Korn – (Teilchen-) grüßender Teilungen, RRSB – Netz, Ausgabe 1976-04.
- [2] Gwiazda A.: Wzrost popytu na wygodną zdrową żywność. Przem. Spoż., 2002, **8**, 46-48.
- [3] Kowalska J., Lenart A.: The influence of ingredients distribution on properties of agglomerated cocoa products. J. Food Eng., 2005, **68**, 155-161.
- [4] Schubert H.: Instantization of powdered foods. Inter. Chem.l Engin., 1993, **33** (1), 28-45.
- [5] Wong A.C.-Y.: Characterisation of the flowability of glass beads by bulk densities ratio. Chem. Eng. Sci., 2000, **55**, 3855-3859.


### THE EFFECT OF AGGLOMERATION ON PHYSICAL PROPERTIES OF MILK-AND-CEREAL POWDERED PORRIDGES FOR INFANTS

#### S u m m a r y

The objective of this paper was to determine the effect of moisture agglomeration on physical properties of milk-and-cereal powdered porridges with added cocoa, pieces of dried fruits, or powdered dried fruits, developed for infants. The agglomeration was carried out by mixing the mixture being moisturized in a fluidized bed that was either pneumatically or mechanically generated.

The analysis of physical properties included: water activity and water content, granulometric composition, loose and tapped bulk density, looseness, repose angle from different surfaces and flowability of powdered porridges before and after the agglomeration accomplished.

Non-agglomerated porridges for infants were sparingly water-soluble powders, showed a high bulk density and a low looseness. The moisture agglomeration contributed to improving the physical properties of milk-and-cereal powdered porridges for infants. The agglomerates produced were characterized by a particularly high looseness and flowability, regardless of the content of raw materials in the porridges and of the agglomeration method applied.

**Key words:** milk-and-cereal powdered porridge for infants, food powders, agglomeration, fluidized bed 

KATARZYNA RAJKOWSKA, ALINA KUNICKA

## ANALIZA PROFILI FERMENTACYJNYCH I CECH GENOTYPOWYCH MEZOFILNYCH SZCZEPÓW DROŹDŹY WINIARSKICH

### Streszczenie

Celem badań było określenie aktywności fermentacyjnej oraz analiza cech genotypowych mezofilnych szczepów drożdży winiarskich gatunków *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus*. Drożdże charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością fermentacyjną. Statystycznie istotne różnice dotyczyły wydajności produkcji etanolu i glicerolu, zawartości dwutlenku siarki oraz wykorzystania cukrów. Parametry win, zgodne z wymaganiami normatywnymi, świadczyły o wysokiej przydatności technologicznej badanych szczepów. Drożdże cechowały się zdolnością wydajnej biodegradacji kwasu L-jabłkowego w warunkach beztlenowych, zmniejszając jego zawartość o 65,6–68,4%. Testowane szczepy wykazywały polimorfizm genomowego DNA, a profile elektroforetyczne chromosomalnego i mitochondrialnego DNA różniły się liczbą, położeniem oraz intensywnością prążków. Jednoznaczne rozróżnienie szczepów możliwe było na podstawie analizy genetycznej z równoczesnym zastosowaniem dwóch technik biologii molekularnej: kariotypowania oraz analizy restrykcyjnej mtDNA. Zawartość DNA w komórkach drożdży wyznaczona metodą cytometrii przepływowej wskazywała na ich diploidalność bądź aneuploidalność. Różnice cech fizjologicznych i genetycznych dowodziły wyraźnej odmienności drożdży, nie pozwoliły jednak na jednoznaczne taksonomiczne zakwalifikowanie szczepów do gatunków *S. cerevisiae* i *S. bayanus*, co może wskazywać na hybrydyzację drożdży w obrębie rodzaju *Saccharomyces* w środowisku naturalnym.

**Słowa kluczowe:** drożdże winiarskie, aktywność fermentacyjna, kariotypowanie, analiza restrykcyjna mtDNA, cytometria przepływowa

### Wprowadzenie

Stosowana w technologii winiarskiej inokulacja moszczów czystymi kulturami wyselekcjonowanych ras drożdży prowadzi do uzyskania win o zdefiniowanych walorach sensorycznych. Starterowe kultury drożdży powinny charakteryzować się zdolnością wydajnego prowadzenia procesu fermentacji alkoholowej oraz wytwarzania ubocznych produktów korzystnie wpływających na jakość wina [21, 28]. W polskim winiarstwie jednym z istotnych problemów jest wysoka kwasowość moszczów i win owocowych, spowodowana m.in. nadmiarem kwasu jabłkowego w surowcu [11, 28]. Uzyskanie produktu o odpowiednich walorach smakowych wymaga zmniejszenia

zawartości tego kwasu, zatem szczepy przemysłowe powinny dodatkowo charakteryzować się zdolnością biodegradacji kwasu L-jabłkowego. Ze względu na zróżnicowanie cech drożdży winiarskich, właściwy dobór ras produkcyjnych zależy od przeprowadzenia dokładnej charakterystyki cech fizjologicznych i genetycznych szczepu. Identyfikacja drożdży klasycznymi metodami mikrobiologicznymi związana jest z ograniczeniami wynikającymi z braku genetycznej jednolitości i stabilności szczepów przemysłowych [1, 2, 15, 27]. Z tego powodu w klasyfikacji drożdży coraz powszechniej stosowane są techniki badania polimorfizmu DNA (analiza restrykcyjna mtDNA, kariotypowanie) [3, 4, 14, 22, 25]. Techniki te oraz badanie ploidalności ras przemysłowych umożliwiają identyfikację szczepów i prognozowanie ich stabilności.

Celem przeprowadzonych badań była analiza cech genotypowych mezofilnych szczepów drożdży winiarskich, ocena aktywności fermentacyjnej oraz zdolności tych szczepów do biodegradacji kwasu L-jabłkowego.

## **Materiał i metody badań**

### *Materiał biologiczny*

Materiał biologiczny stanowiły cztery szczepy drożdży gatunku *Saccharomyces cerevisiae*: Syrena, W-13, Y.00911, Y.00925; szczep gatunku *Saccharomyces bayanus* Cz-2; oraz haploidalne szczepy markerowe: Cm a, Gm  $\alpha$ .

Szczepy: Syrena, W-13, Cz-2 pochodziły z Kolekcji Czystych Kultur Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej ŁOCK105. Szczepy: Y.00911 oraz Y.00925 pochodziły z National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms University of Horticulture and Food Science w Budapeszcie, a szczepy markerowe Cm a i Gm  $\alpha$  – z Kolekcji Instytutu Nauk Rolniczych w Zamościu.

### *Analiza win*

Aktywność fermentacyjną szczepów badano w wystandaryzowanym moszczu jabłkowym, zawierającym  $6,94 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$  kwasu L-jabłkowego oraz  $192 \text{ g} \times \text{dm}^{-3}$  sacharozy. Nie stosowano związków siarki do konserwacji moszczu. Inokulum 48-godzinnej hodowli drożdży w moszczu jabłkowym stanowiło 5% objętościowych nastawu. Próby fermentacyjne inkubowano w temp.  $25^{\circ}\text{C}$ , a za moment zakończenia procesu uznano ustabilizowanie masy prób. Próby prowadzono w trzech równoległych powtórzeniach. Kwasowość ogólną wina, zawartość cukrów i dwutlenku siarki oznaczano zgodnie z Polską Normą [17-20]. Do oznaczenia poziomu etanolu oraz wybranych ubocznych produktów fermentacji: kwasu mlekowego, bursztynowego, octowego i glicerolu zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC [8]. Zawartość kwasu L-jabłkowego w nastawie i winie określono metodą enzymatyczną (testy Test-Combination L-Malic acid, Boehringer Mannheim) [7].

### *Analiza chromosomalnego DNA*

Izolację jądrowego DNA przeprowadzono za pomocą zestawu preparacyjnego CHEF Genomic DNA Plug Kit (Bio-Rad) według metodologii referencyjnej [24]. Chromosomy rozdzielono metodą elektroforezy pulsacyjnej PFGE przy użyciu aparatu CHEF-DR II (Bio-Rad) w 0,8% żelu agarozowym. Elektroforezę prowadzono w buforze 0,5 x TBE schłodzonym do temp. 10°C, w ciągu 28 godz., przy napięciu 6 V/cm i liniowo wzrastającym czasie trwania pulsu od 110 do 220 s. Po rozdziale żel wybarwiono w roztworze bromku etydy (0,5 µg/ml).

### *Analiza mitochondrialnego DNA*

Izolację całkowitego DNA komórkowego oraz analizę restrykcyjną mitochondrialnego DNA prowadzono wg metody Querol i wsp. [22]. Do trawienia mtDNA zastosowano enzym restrykcyjny *Hinf*I (Roche Diagnostic), a rozdział prowadzono w 0,7% żelu agarozowym, w buforze 0,5 x TBE, przy napięciu 60 V, w ciągu 5 godz.

### *Oznaczenie ploidalności szczepów*

Zawartość DNA wyznaczano w komórkach wybarwionych jodkiem propidyny przy użyciu cytometru przepływowego Becton-Dickinson FACSCalibur, wyposażonego w 15 mW laser argonowy (488 nm) [13]. Oznaczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach, a do analizy danych zastosowano program WinMDI 2.8.

### *Statystyczne opracowanie wyników*

Do testowania statystycznej istotności różnic pomiędzy średnimi wartościami parametrów chemicznych win zastosowano test Newmana-Keulsa ( $p < 0,05$ ), używając programu Statistica wersja 5.5.

## **Wyniki i dyskusja**

Stosowane w badaniach przemysłowe rasy drożdży zostały wyselekcjonowane jako przydatne do fermentacji środowisk modelowych o podwyższonej zawartości kwasu jabłkowego. W prezentowanych badaniach sprawdzono ich aktywność fermentacyjną w moszczu jabłkowym o nieregulowanej kwasowości, zawierającym 6,94 g·dm<sup>-3</sup> kwasu L-jabłkowego. Parametry chemiczne uzyskanych win wskazują na znaczące zróżnicowanie międzyszczepowe badanych drożdży (tab. 1).

Stwierdzono statystycznie istotne różnice zawartości etanolu w wytworzonych winach, co związane było z wyraźnie odmienną dynamiką wykorzystania cukrów podczas fermentacji (dane niepublikowane).

Poziom dwutlenku siarki był niski i nie przekraczał 17,9 mg x dm<sup>-3</sup>, chociaż obserwowano wyraźne zróżnicowanie zależnie od szczepu drożdży. Ocena statystyczna poziomu SO<sub>2</sub> nie wykazała różnic jedynie pomiędzy szczepami Y.00911 i

Y.00925. Pomimo nieobowiązywania Polskich Norm, oznaczone parametry były zgodne z podanymi w PN dla win owocowych [16].

Tabela 1

Wyniki analizy chemicznej win.

Results of the chemical analysis of wine types.

Drożdże Yeast	Etanol Ethanol	Glicerol Glycerol	Ekstrakt bezcukrowy Sugar-free extract	Cukry redukujące Reducing sugars	SO <sub>2</sub> ogółem Total SO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub> wolny Free SO <sub>2</sub>
	[% obj.]		[g x dm <sup>-3</sup> ]		[mg x dm <sup>-3</sup> ]	
Syrena	14,76 ± 0,01	6,69 ± 0,05	27,03 ± 0,89	13,16 ± 0,96	17,2 ± 0,1	11,2 ± 0,1
W-13	13,97 ± 0,65	7,19 ± 0,22	19,07 ± 0,94	15,58 ± 0,60	10,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2
Y.00911	10,72 ± 0,65	4,71 ± 0,04	31,27 ± 0,34	27,70 ± 0,30	8,9 ± 0,1	4,5 ± 0,6
Y.00925	13,07 ± 0,11	4,78 ± 0,01	26,35 ± 0,65	24,17 ± 0,27	8,3 ± 0,0	4,8 ± 0,1
Cz-2	15,73 ± 0,15	5,65 ± 0,01	17,34 ± 0,69	1,66 ± 0,39	17,9 ± 0,0	10,2 ± 0,0

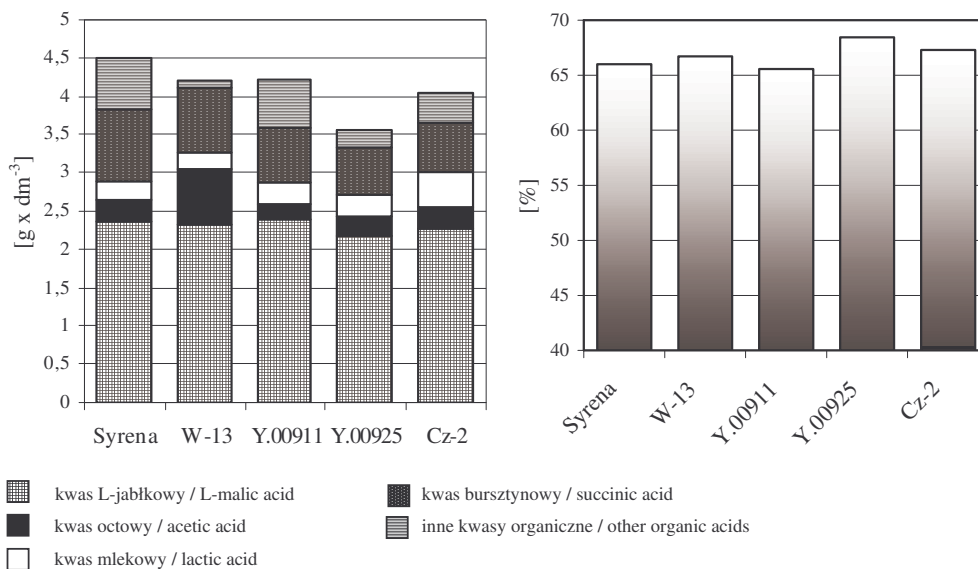
Kwasowość ogólna win różniła się w zależności od stosowanego szczepu (rys. 1a). Spośród oznaczonych kwasów organicznych – jabłkowego, octowego, mlekowego i bursztynowego – największy udział w kwasowości ogólnej miał kwas jabłkowy. Stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy szczepami *S. cerevisiae* Y.00925 i *S. bayanus* Cz-2 pod względem poziomu produkcji kwasu bursztynowego oraz pomiędzy drożdżami *S. cerevisiae*: Syrena, Y.00911, Y.00925 w tworzeniu kwasu mlekowego. Po fermentacji przy udziale szczepu W-13 obserwowano trzykrotnie wyższy poziom kwasu octowego niż przy użyciu pozostałych drożdży.

Obniżenie kwasowości środowiska po fermentacji było głównie wynikiem rozkładu kwasu jabłkowego. Drożdże fermentowały od 65,6 do 68,4% L-jabłczanu (rys. 1b). Testowane szczepy charakteryzowały się wysoką zdolnością biodegradacji kwasu L-jabłkowego w porównaniu z danymi literaturowymi [26]. Zwykle biologiczny rozkład kwasu L-jabłkowego przez drożdże winiarskie z rodzaju *Saccharomyces* jest niecałkowity i zależnie od szczepu wynosi od 5 do 48% [26]. Jednocześnie badane przez nas szczepy produkowały kwas mlekowy na niskim poziomie, nie przekraczającym 0,46 g x dm<sup>-3</sup>, podczas gdy niektóre rasy drożdży z gatunku *S. cerevisiae* zdolne są wytwarzać kwas mlekowy w ilościach dochodzących do 5 g x dm<sup>-3</sup> [28].

Na jakość wina silny wpływ wywiera kwas octowy, którego optymalna zawartość w winie powinna wynosić pomiędzy 0,2 a 0,7 g x dm<sup>-3</sup> [12]. Ilość kwasu octowego w analizowanych winach zawierała się w podanych granicach, przy czym – zgodnie z podziałem wprowadzonym przez Delfini i Cervetti [6] – szczep W-13 wytwarzał kwas octowy na wysokim poziomie, a pozostałe szczepy produkowały niewielkie jego ilości.

a.

b.



Rys. 1a. Udział kwasów organicznych w ogólnej kwasowości win.

Fig. 1a. Content of organic acids and their effect on the overall wine acidity.

Rys. 1 b. Wykorzystanie kwasu L-jabłkowego po fermentacji moszczu jabłkowego.

Fig. 1b. Utilization of L-malic acid after the apple must fermentation performed.

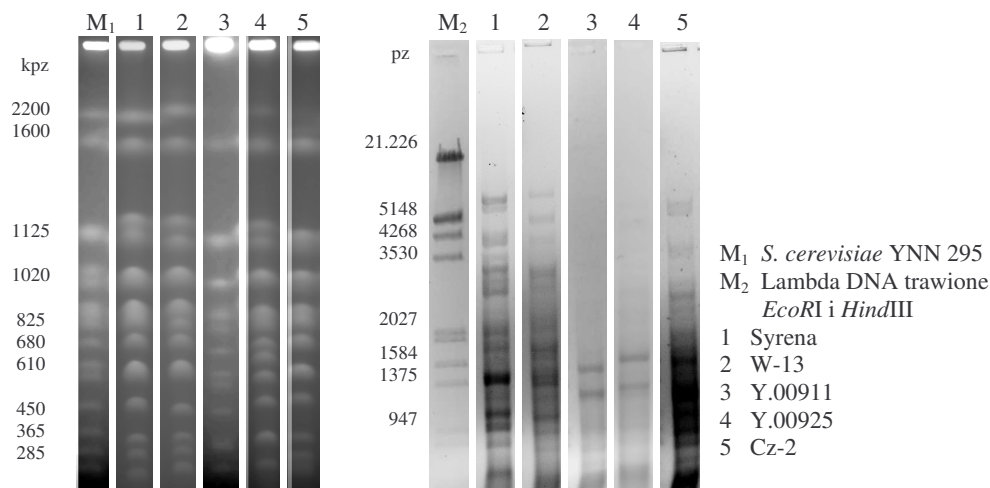
Dodatkowo, na sensoryczną jakość wina wpływa glicerol, który już w stężeniu  $5,2 \text{ g x dm}^{-3}$  nadaje winu wrażenie lekkiej słodyczy [23]. Zawartość glicerolu w winach wytworzonych przez badane drożdże, poza szczepami Y.00911 i Y.00925, przekraczała graniczne stężenie, korzystnie wpływając na jego walory smakowe. Mała zawartość kwasu octowego, stosunkowo duża ilość glicerolu oraz inne wymienione powyżej parametry win odpowiadają wymaganiom normatywnymi i świadczą o ich wysokiej jakości.

Analiza chromosomalnego DNA metodą elektroforezy w zmiennym polu pulsacyjnym umożliwiła uzyskanie obrazu kariotypów badanych drożdży (rys. 2a). Wszystkie szczepy zakwalifikowano do rodzaju *Saccharomyces*, a w ich profilach elektroforetycznych obserwowano od 11 do 13 prążków o wielkości molekularnej w zakresie 200–2200 kpz. Wg danych literaturowych [4], analogiczne rezultaty uzyskano w przypadku 65 szczepów drożdży winiarskich należących do grupy *Saccharomyces sensu stricto*.

a.

b.





Rys. 2 a. Rozdział elektroforetyczny chromosomalnego DNA.

Fig. 2 a. Electrophoretic separation of the chromosomal DNA.

Rys. 2 b. Profile elektroforetyczne mitochondrialnego DNA trawionego enzymem *HinfI*.

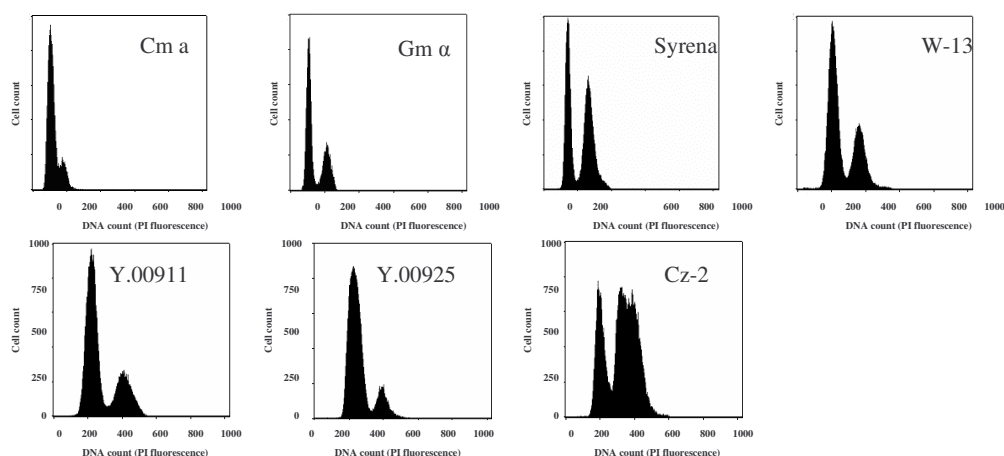
Fig. 2 b. Electrophoretic profiles of the mitochondrial DNA digested by the *HinfI* enzyme.

Profile chromosomalne badanych szczepów różniły się liczbą i położeniem prążków odpowiadających największym chromosomom szczepu markerowego *S. cerevisiae* YNN 295. Szczepy Y.00911 oraz Cz-2 charakteryzowały się występowaniem jednego prążka o masie molekularnej 1600 kpcz, podczas gdy w profilach pozostałych szczepów obserwowano po dwa prążki: 2200 i 1600 kpcz. Istotne różnice stwierdzono także w grupie chromosomów o masie molekularnej 450–225 kpcz. Poza drożdżami Y.00911 i Y.00925, profile pozostałych szczepów wykazywały obecność trzech prążków w tym regionie. Nie obserwowano wyraźnych różnic pomiędzy obrazami elektroforetycznymi chromosomalnego DNA szczepów Syrena oraz W-13, przy jednocześnie występujących różnicach w profilach mtDNA (rys. 2b). Zastosowanie enzymu *HinfI* w analizie restrykcyjnej mtDNA pozwoliło na uzyskanie od 15 do 17 prążków w przypadku drożdży Syrena, W-13 i Cz-2. Odmienne profile elektroforetyczne, charakteryzujące się występowaniem jedynie 2 prążków, otrzymano w przypadku szczepów Y.00911 oraz Y.00925.

Profile elektroforetyczne chromosomalnego i mitochondrialnego DNA badanych szczepów drożdży prezentują wyraźne różnice liczby, położenia, jak i intensywności wybarwionych prążków, co wskazuje na polimorfizm genomowego DNA. Nie jest jednak możliwe jednoznaczne klasyfikowanie analizowanych szczepów do gatunków *S. bayanus* i *S. cerevisiae* tylko na podstawie ich kariotypów. Wg Naumova i wsp. [14] jedynie dla *S. cerevisiae* charakterystyczne są trzy prążki w regionie 225–365 kpcz, podczas gdy wyniki naszych badań wskazują na występowanie takiego układu zarówno u drożdży *S. cerevisiae* (Syrena, W-13), jak i *S. bayanus* (Cz-2). Profile elektroforetyczne testowych szczepów nie potwierdzają także doniesień o obecności w

obrazach kariotypów drożdży *S. bayanus* dwóch wyraźnie rozdzielonych prążków o wielkości 2200 i 1300 kpz [25]. Uzyskane dane są zgodne z teorią o braku możliwości różnicowania gatunków z rodzaju *Saccharomyces* w oparciu o obecność pojedynczego prążka albo grupy prążków w obrazach elektroforetycznych chromosomalnego DNA [2–4]. Wg danych literaturowych [5, 22], rozróżnienie szczepów możliwe jest na podstawie analizy genetycznej z równoczesnym zastosowaniem przynajmniej dwóch technik biologii molekularnej, co potwierdzają wyniki prezentowane w niniejszej pracy. Ze względu na brak wyraźnych różnic w kariotypach drożdży Syrena i W-13, zróżnicowanie tych szczepów jest możliwe jedynie w oparciu o wspólną analizę chromosomalnego i mitochondrialnego DNA.

Zawartość DNA w komórkach drożdży wyznaczono metodą cytometrii przepływowej, stosując laboratoryjne szczepy Cm a i Gm  $\alpha$  jako haploidalne wzorce (rys. 3). Biorąc pod uwagę średnie z trzech niezależnych powtórzeń oraz odchylenia standardowe, wnioskowano o diploidalności szczepów: *S. cerevisiae* W-13 oraz *S. bayanus* Cz-2. Szczepy *S. cerevisiae* Syrena, Y.00911 oraz Y.00925 uznano za aneuploidalne (tab. 3).



Rys. 3. Zawartość DNA wyznaczona metodą cytometrii przepływowej.

Fig. 3. Contents of DNA determined by a flow cytometry analysis.

Rasy przemysłowe drożdży są zwykle diploidalne, poliploidalne lub aneuploidalne [1, 9]. Prezentowane przez nas wyniki świadczą o diploidalności lub aneuploidalności badanych szczepów drożdży. Jednak zawartości DNA w komórce na poziomie 2C nie zawsze odzwierciedla diploidalność genomu jądrowego. Organizacja genomu diploidalnych drożdży może być bardziej złożona i charakteryzować się monosomią, disomią albo polisomią pojedynczych chromosomów [10].

Tabela 2

Zawartość DNA w komórkach drożdży.  
Content of DNA in wine yeast strain cells.

Drożdże Yeast	Zawartość DNA* DNA content*	Ploidalność Ploidy
Cm a	1,01 ± 0,01	haploidalny
Gm α	1,06 ± 0,09	haploidalny
Syrena	1,36 ± 0,04	aneuploidalny
W-13	2,06 ± 0,16	diploidalny
Y.00911	2,15 ± 0,03	aneuploidalny
Y.00925	2,23 ± 0,03	aneuploidalny
Cz-2	2,03 ± 0,06	diploidalny

\* – zawartość DNA wyrażona we względnych jednostkach w odniesieniu do ilości DNA w komórkach haploidalnych szczepów Cm a oraz Gm α;

\* – The content of DNA is expressed in relative units in relation to the DNA quantities as contained in the haploid cells of the Cm a and Gm α strains.

### Wnioski

1. Badane przemysłowe szczepy drożdży charakteryzowały się wysoką przydatnością technologiczną, a ocena parametryczna wytwarzanych win odpowiadała wymaganiom normatywnym, pomimo że nie są one obowiązujące.
2. Drożdże cechowały się zdolnością wydajnej biodegradacji kwasu L-jabłkowego, zmniejszając jego zawartość o 65,6–68,4% w zależności od szczepu.
3. Różnice profili elektroforetycznych chromosomalnego i mitochondrialnego DNA wskazywały na polimorfizm genomowego DNA wśród testowanych szczepów.
4. Rozróżnienie szczepów możliwe było na podstawie analizy genetycznej z równoczesnym zastosowaniem dwóch technik biologii molekularnej: kariotypowania oraz analizy restrykcyjnej mtDNA.
5. Badane szczepy drożdży uznano za diploidalne (*S. cerevisiae* W-13, *S. bayanus* Cz-2) bądź aneuploidalne (*S. cerevisiae* Syrena, Y.00911, Y.00925).
6. Pomimo stwierdzonych różnic fizjologicznych i genetycznych pomiędzy drożdżami, nie było możliwe jednoznaczne taksonomiczne zakwalifikowanie szczepów do gatunków *S. cerevisiae* oraz *S. bayanus*.

### Literatura

- [1] Bakalinsky A.T., Snow R.: The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1990, **6**, 367-382.
- [2] Briones A.I., Ubeda J., Grando M.S.: Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. Int. J. Food Microbiol., 1996, **28**, 369-377.
- [3] Canas P.M.I., Iranzo J.F., Perez A.I.B.: Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepenas in two consecutive vintages. Food. Microbiol., 1997, **14**, 221-225.
- [4] Cardinali G., Martini A.: Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1994, **44**, 791-797.
- [5] Cavalieri D., Barberio C., Casalone E., Pinzauti E., Sebastiani F., Mortimer R.K., Polsinelli M.: Genetic and molecular diversity in *Saccharomyces cerevisiae* natural populations. Food Technol. Biotechnol., 1998, **36**, 45-50.
- [6] Delfini C., Cervetti F.: Metabolic and technological factors affecting acetic acid production by yeasts during alcoholic fermentation. Vitic. Enol. Sci., 1991, **46**, 142-150.

- [7] Elkins E.R., Heuser J.R.: Detection of adulteration in apple juice by L-malic/total malic acid ratio. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern., 1994, **77**, 411-415.
- [8] Frayne R.F.: Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using HPLC. Am. J. Enol. Vitic., 1986, **37**, 281-287.
- [9] Guijo S., Mauricio J.C., Salmon J.M., Ortega J.M.: Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'flor' film ageing of dry sherry-type wines. Yeast, 1997, **13**, 101-117.
- [10] Ibeas I.I., Jimenez J.: Genomic complexity and chromosomal rearrangements in wine-laboratory yeast hybrids. Curr. Genet., 1996, **30**, 410-416.
- [11] Kunicka A., Szopa J.S.: Otrzymywanie międzyrodzajowych hybrydów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* na drodze fuzji protoplastów. Biotechnologia, 1998, **1**, 167-177
- [12] Lambrechts M.G., Pretorius I.S.: Yeast and its importance to wine aroma – a review. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2000, **21**, 97-128.
- [13] [13] Nadal D., Carro D., Fernandez-Larrea J., Pina B.: Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. Appl. Environ. Microbiol., 1999, **65**, 1688-1695.
- [14] Naumov G.I., Masneuf I., Naumova E.S., Aigle M., Dubourdiou D.: Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. Res. Microbiol., 2000, **151**, 683-691.
- [15] Pataro C., Guerra J.B., Petrillo-Peixoto M.L., Mendonca-Hagler L.C., Linardi V.R., Rosa C.A.: Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. J. Appl. Microbiol., 2000, **89**, 24-31.
- [16] PN-80/A-79121. Wino owocowe.
- [17] PN-90/A-79120/05. Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości ekstraktu całkowitego i bezcukrowego.
- [18] PN-90/A-79120/06 Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości cukrów.
- [19] PN-90/A-79120/07 Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie kwasowości ogólnej.
- [20] PN-90/A-79120/10 Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości dwutlenku siarki (SO<sub>2</sub>).
- [21] Pretorius I.S., Bauer F.: Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. Trends Biotechnol., 2002, **20**, 426-432.
- [22] Querol A., Barrio E., Ramon D.: A comparative study of different methods of yeast strain characterization. System. Appl. Microbiol., 1992, **15**, 439-446.
- [23] Romano P., Caruso M., Capece A., Lipani G., Paraggio M., Fiore C.: Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape must. World J. Microbiol. Biotechnol., 2003, **19**, 311-315.
- [24] Schwartz DC, Cantor C: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 1984, **37**, 67-75.
- [25] Tornai-Lehoczki J., Dlauchy D.: An opportunity to distinguish species of *Saccharomyces sensu stricto* by electrophoretic separation of the larger chromosomes. Lett. Appl. Microbiol., 1996, **23**, 227-230.
- [26] Volschenk H., van Vuuren H.J.J., Viljoen-Bloom M.: Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. Curr. Genet., 2003, **43**, 379-391.
- [27] Vaughan-Martini A., Martini A., Cardinali G.: Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. Antonie van Leeuwenhoek, 1993, **63**, 145- 156.
- [28] Wzorek W., Pogorzelski E.: Technologia winiarstwa owocowego i gronowego. Sigma NOT. Warszawa 1997.

### THE ANALYSIS OF FERMENTATION PROFILES AND SOME GENETIC PROPERTIES OF MESOPHILIC WINE YEAST STRAINS

The objective of this study was to analyze fermentation activity and some genetic traits of mesophilic wine yeast strains representing two species: *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. The yeast strains analyzed were characterized by a varying physiological activity. Statistical differences were to be attributed to the production of ethanol and glycerol, as well as to the SO<sub>2</sub> level and sugar consumption. Chemical properties of wine fulfilled the standard recommendations, thus, they proved the high technological usefulness of the strains examined. The yeasts were also characterized by a good ability to biodegrade L-malic acid under the anaerobic conditions, after the wine fermentation completed, and they reduced the content of this acid by 65,6 to 68,4%. The yeast strains tested showed a polymorphism of the genome's DNA, and electrophoretic profiles of the chromosomal and mitochondrial DNA patterns differed in their number, location, and intensity of stripes. It was possible to unambiguously differentiate between individual wine yeast strains on the basis of genetic analysis applied simultaneously with two other techniques from the domains of molecular biology: karyotyping and mtDNA restriction analysis. The DNA contents in yeast cells as determined by a flow cytometry indicated that yeast strains were either diploid or aneuploid. Differences in the physiological and genetic properties of the yeast strains tested proved clear dissimilarities among them; however, those dissimilarities did not allow for the definite, taxonomical classification of the yeast strains to *S. cerevisiae* and *S. bayanus* groups; this fact may confirm the hybridization of yeast within a *Saccharomyces* group in a natural environment.

**Key words:** wine yeast, fermentation activity, karyotyping, mtDNA restriction analysis, flow cytometry 

MILLENA RUSZKOWSKA, ANETA OCIECZEK

## SORPCYJNE WŁAŚCIWOŚCI ZUP W PROSZKU TYPU INSTANT

### Streszczenie

Celem pracy było określenie właściwości sorpcyjnych koncentratów spożywczych na podstawie analizy izoterm sorpcji. Uzyskane wyniki przedyskutowano w aspekcie trwałości i zdolności do rehydracji badanych produktów.

W badaniach określono początkową zawartość wody w materiale metodą suszenia termicznego pod ciśnieniem atmosferycznym. Właściwości sorpcyjne obu rodzajów produktów badano metodą statyczną, wyznaczając izotermy sorpcji w zakresie 0,07–0,98 aktywności wody. Wyznaczone izotermy sorpcji poddano przekształceniu BET w zakresie 0,07–0,44, obliczono pojemność warstwy monomolekularnej  $V_m$  i odpowiadającą jej aktywność wody oraz określono powierzchnię właściwą sorpcji.

Wykazano, że początkowa zawartość wody w badanych koncentratkach uzależniona była od składu chemicznego produktu i zastosowanej technologii. Izotermy sorpcji badanych produktów odpowiadały typowi III w klasyfikacji Brunauera. Pojemność warstwy monomolekularnej oraz powierzchnia właściwa sorpcji, będąca jej pochodną, były zależne od składu chemicznego produktu. Znaczne powinowactwo części badanych produktów do wody wskazywać może na ich zadowalającą podatność na rehydrację. Ponadto duża pojemność warstwy monomolekularnej może korzystnie wpływać na trwałość przechowalniczą produktu.

**Słowa kluczowe:** koncentraty spożywcze, izotermy sorpcji, monowarstwa, powierzchnia właściwa sorpcji

### Wstęp

O jakości koncentratów spożywczych decyduje, oprócz składu surowcowego i technologii produkcji, w głównej mierze zawartość wody. Każdy produkt spożywczy charakteryzuje się tak zwaną krytyczną zawartością wody, po przekroczeniu której obserwuje się wiele niepożądanych zmian cech jakościowych. W przypadku zmniejszenia zawartości wody poniżej tej wartości następuje ubytek masy, stwardnienie produktu, a także podatność na utlenianie tłuszczu. Powyżej tej granicy mogą wystąpić niekorzystne zmiany o charakterze fizycznym, chemicznym oraz mikrobiologicznym, wpływające na jakość i nieodwracalne zmiany w żywności [3].

Optymalną zawartość wody w produktach spożywczych stanowi zawartość odpowiadająca pojemności monowarstwy, w której intensywność zachodzących reakcji jest mniejsza [9].

Proces pochłaniania lub oddawania przez produkt wody oraz zależność pomiędzy jej zawartością w produkcie a aktywnością opisują izotermy sorpcji. Kształt izoterm sorpcji odzwierciedla proces wiązania wody w materiale oraz umożliwia badanie struktury materiału, tym samym przyczyniając się do przewidywania optymalnych warunków przechowywania produktów w opakowaniach.

W badaniach żywności typowa izoterma sorpcji wody ma kształt sigmoidalny i składa się z 3 obszarów, charakteryzujących kolejne etapy procesu:

- obszar I – sorpcja wody na aktywnych grupach polarnych, punkt przegięcia odpowiada warstwie jednocząsteczkowej; woda w tym zakresie jest najsilniej związana z materiałem;
- obszar II – tworzy się warstwa wielocząsteczkowa wody;
- obszar III – następuje kondensacja kapilarna, woda słabo związana z materiałem ma takie same właściwości jak woda niezwiązana.

Jednym z modeli izoterm sorpcji jest izoterma BET, wyprowadzona przez Brunnauera, Emmetta i Tellera [1]. Model BET zakłada, że jeżeli pierwsza warstwa adsorpcyjna może być podłożem dalszej adsorpcji (np. fizycznej), wówczas można oczekiwać, że zamiast izoterm dążącej przy wyższych ciśnieniach asymptotycznie do pewnej wartości nasycenia, izoterma będzie rosła do nieskończoności. Izoterma BET umiarkowanie dobrze opisuje dane doświadczalne w ograniczonym zakresie ciśnień, zaniżając adsorpcję pod niskimi ciśnieniami i zawyżając ją pod ciśnieniami wyższymi.

Według Brunauera [6] wyróżnia się pięć zasadniczych typów izoterm sorpcji gazów i par:

- typ I odpowiada izotermie Langmuira i charakteryzuje się monotonicznym zbliżaniem się do adsorpcji granicznej, która prawdopodobnie odpowiada kompletnej warstwie monomolekularnej;
- typ II jest bardziej rozpowszechniony w przypadku adsorpcji fizycznej i wiąże się z powstaniem wielomolekularnej warstwy adsorpcyjnej;
- typ III jest stosunkowo rzadki (adsorpcja  $Br_2$  na żelu krzemionkowym). W tym przypadku cechą charakterystyczną jest ciepło adsorpcji równe lub mniejsze, co do wartości bezwzględnej, ciepłu skraplania czystego adsorbentu;
- typ IV i V odpowiada krzywom typu II i III różniąc się od nich jedynie tym, że maksimum adsorpcji osiągnięte jest przy ciśnieniu mniejszym od ciśnienia pary nasyconej. Uważa się, że odzwierciedlają one zjawiska tzw. kondensacji kapilarnej.

Produkty białkowe charakteryzowane są najczęściej izotermą sorpcji typu II, w przypadku zaś produktów zawierających znaczne ilości substancji krystalicznych (np. glukozy, sacharozy, kwasu cytrynowego) zazwyczaj są to izotermy typu III.



Występowanie izoterm IV i V uwarunkowane jest wielkością kapilar materiału porowatego oraz stopniem jego rozdrobnienia.

Znajomość izoterm sorpcji odgrywa duże znaczenie w charakterystyce produktu. Na podstawie ich kształtu można określać wrażliwość produktów na wilgoć i ich zdolność do chłonięcia wody, a zatem oceniać wybrane właściwości użytkowe żywności. Zastosowanie izoterm sorpcji jako wskaźnika trwałości przechowalniczej produktu polega m.in. na obliczeniu na ich podstawie pojemności warstwy monomolekularnej odpowiadającej pojedynczej warstwie zaadsorbowanych cząsteczek pary wodnej. Według Salwina [cyt. za 4 i 9], określona teoretycznie wilgotność produktu odpowiadająca tej warstwie stanowi optymalną zawartość wody w produkcie.

Celem pracy było określenie właściwości sorpcyjnych koncentratów spożywczych na podstawie analizy izoterm sorpcji. Uzyskane wyniki przedyskutowano w aspekcie trwałości i zdolności do rehydracji badanych produktów, zakładając, że te wyróżniki jakości są pochodną właściwości sorpcyjnych.

### **Materiał i metody badań**

Materiał do badań stanowiły zupy w proszku typu instan: barszcz czerwony (A) i grochowa (B), wyprodukowane przez firmę Knorr (I) i Winiary (II). Po procesie rehydracji koncentraty A tworzyły roztwór właściwy, a koncentraty B roztwór o charakterze koloidu. Skład surowcowy i chemiczny badanych produktów przedstawiono w tab. 1.

Zawartość wody w badanych próbkach została określona metodą termicznego suszenia przy ciśnieniu atmosferycznym [8].

W badaniach właściwości sorpcyjnych użyto koncentratów zup po oddzieleniu od nich dodatków (grzanek, przypraw). Właściwości sorpcyjne badano metodą statyczną, wyznaczając równowagę wilgotnościową pomiędzy badanymi próbkami a ich otoczeniem o określonej wilgotności względnej. Próbkę przechowywano w temp. 20°C, przez okres 3 miesięcy, w higrostatkach zawierających nasycone roztwory soli, których zakres aktywności wody wynosił od 0,07 do 0,98. Na podstawie początkowej masy produktu oraz zmian jej zawartości w czasie, obliczono równowagowe zawartości wody i wykreślono izotermy sorpcji. Każdy z punktów na izotermie sorpcji był średnią arytmetyczną z 3 równoległych powtórzeń. Na wykresie zaznaczono jednocześnie wartości odchylenia standardowego. Pomiary masy próbek wykonywano za pomocą wagi analitycznej.

Graficzną analizę wyników opracowano w programie komputerowym Statistica 6.0.

Izotermę adsorpcji przedstawiono w układzie współrzędnych  $(p/p_0)/a(1-p/p_0)$  i  $p/p_0$ . Parametry równania BET o postaci:

T a b e l a 1

Skład surowcowy i chemiczny badanych zup w proszku typu instant.



Raw materials content and chemical composition of powdered instant-type soups.

Produkt Product	Skład surowcowy Raw material	Parametr Parameter	Wartość Value
Barszcz czerwony Beetroot soup (borscht) IA	Koncentrat soku z buraków suszony (42%), skoncentrowany sok z buraków, maltodekstryna, cukier, sól, tłuszcz roślinny utwardzony, substancje wzmacniające smak i zapach: glutaminian sodu, ekstrakt drożdżowy suszony, regulatory kwasowości: kw.cytrynowy, dwuocian sodu i laktoza, aromat naturalny, substancja przeciwzbrylająca E551	Wartość kaloryczna Calorific value [kJ (kcal)]	98,8 (23,6)/100 ml
		Białko / Protein	0,4 g/100 ml
		Węglowodany	4,6 g/100 ml
		Tłuszcz / Fat	0,4 g/100 ml
Barszcz czerwony Beetroot soup (borscht) II A	cukier, koncentrat z buraków suszonych, grzanki, sól, naturalne aromaty, substancje wzmacniające smak i zapach (E621, E635), regulator kwasowości (E330), przyprawy, tłuszcz roślinny, identyczny z naturalnym aromatem	Wartość kaloryczna Calorific value [kJ (kcal)]	284 (68) w porcji
		Białko / Protein	0,9 g w porcji
		Węglowodany Carbohydrates	12,0 g w porcji
		Tłuszcz / Fat	1,8 g w porcji
Zupa grochowa Pea soup IB	Mąka grochowa (57%), grzanki pszenne 8%, skrobia ziemniaczana, sól, tłuszcze roślinne utwardzone, boczek wędzony prażony (4%), substancje wzmacniające smak i zapach: glutaminian sodu, inozynian sodu, guanylan sodu, przyprawy: czosnek, majeranek, pieprz i glukoza, ekstrakt drożdżowy suszony, aromat	Wartość kaloryczna Calorific value [kJ (kcal)]	168 (40)/100 ml
		Białko / Protein	1,9 g/100 ml
		Węglowodany Carbohydrates	5,4 g/100 ml
		Tłuszcz / Fat	1,2 g/100 ml
Zupa grochowa Pea soup IIB	Mąka grochowa parowana, grzanki, tłuszcz roślinny, sól, substancje wzmacniające smak i zapach (E621, E635), maltodekstryna, naturalne aromaty, ekstrakt drożdżowy, cebula suszona, substancje zagęszczające E412, przyprawy, barwniki (E150c, E101)	Wartość kaloryczna Calorific value [kJ (kcal)]	360 (86) w porcji
		Białko / Protein	3,1 g w porcji
		Węglowodany Carbohydrates	10,9 g w porcji
		Tłuszcz / Fat	3,3 g w porcji

Źródło: Zestawienie wykonane na podstawie danych z opakowań jednostkowych badanych produktów.  
Source: This listing was made on the basis of data as appearing on labels on unit packages of products analysed.

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{a(1 - \frac{p}{p_0})} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \cdot \frac{p}{p_0}$$

gdzie:  $a$  – adsorpcja, [kg/kg],

$V_m$  – maksymalna wielkość adsorpcji odpowiadająca całkowitemu pokryciu powierzchni jednocząsteczkową warstwą adsorbentu, [kg/kg],

$C$  – stała, związana w sposób wykładniczy z różnicą pomiędzy ciepłem adsorpcji na pierwszej i następnych warstwach, przyjęta za niezmienną i równą ciepłu kondensacji,

$p$  – prężność par adsorbowanego związku chemicznego w fazie gazowej, [Pa],

$p_0$  – prężność par adsorbowanego związku chemicznego, znajdujących się nad cieczą w stanie równowagi w temperaturze adsorpcji, [Pa];

wyznaczono na podstawie danych z zakresu  $a_w = 0,07-0,44$ , wychodząc z założenia, że izoterma BET umiarkowanie dobrze opisuje dane doświadczalne w ograniczonym zakresie ciśnień.

Przeprowadzone obliczenia analityczne umożliwiły określenie struktury badanych koncentratów poprzez wyznaczenie objętości warstwy monomolekularnej wraz z odpowiadającą jej aktywnością wody oraz powierzchni właściwej sorpcji.

Powierzchnię właściwą sorpcji wyznaczono na podstawie wilgotności monomolekularnej (określonej z równania BET), posługując się równaniem:

$$PS = \frac{V_m \cdot L \cdot N}{M}$$

gdzie:  $PS$  – powierzchnia właściwa sorpcji, [m<sup>2</sup>/pojemność],

$V_m$  – pojemność monowarstwy, [g H<sub>2</sub>O/100g s.s.],

$M$  – masa cząsteczkową wody, [18 g/mol],

$N$  – liczba Avogadro, [6,023·10<sup>23</sup> cząsteczki/mol],

$L$  – powierzchnia pokrywana przez cząsteczkę wody, [1,05·10<sup>-19</sup> m<sup>2</sup>/cząsteczkę].

### Wyniki badań i dyskusja

Na podstawie wyników oceny zawartości wody w badanym materiale stwierdzono, że koncentraty zupy grochowej (IB i IIB) charakteryzowały się większą zawartością wody w porównaniu z koncentratami barszczu czerwonego (IA i IIA). Wilgotność koncentratów zupy grochowej wynosiła od 5,23 do 6,63%. Zawartość wody w koncentraty barszczu czerwonego zawierała się w przedziale od 1,70 do 2,16% (tab. 2).

Tabela 2

Charakterystyki równania BET badanych koncentratów zup typu instant w zakresie  $a_w = 0,07-0,98$ .  
The BET equation parameters of powdered instant-type soup concentrates within the water activity range from 0,07 to 0,98.

Produkt Product	Średnia zawartość wody [%] Mean water content [%]	Równanie $y=a+bx$ Equation $y=a+bx$		Miary dopasowania Measures of fit			
		a	b	$R^2(yx)$	$R(yx)$	$Se(y)$	$\phi^2(yx)$
IA	2,16	-11,8999	61,6343	0,8584	0,9824	8,3686	0,1416
IIA	1,70	-11,5528	58,5811	0,8561	0,9253	8,0276	0,1439
IB	6,63	-4,3108	38,8845	0,7919	0,8899	6,6643	0,2081
IIB	5,23	-7,9542	49,4740	0,7958	0,8921	8,3780	0,2042

Objaśnienia: / Explanatory notes:

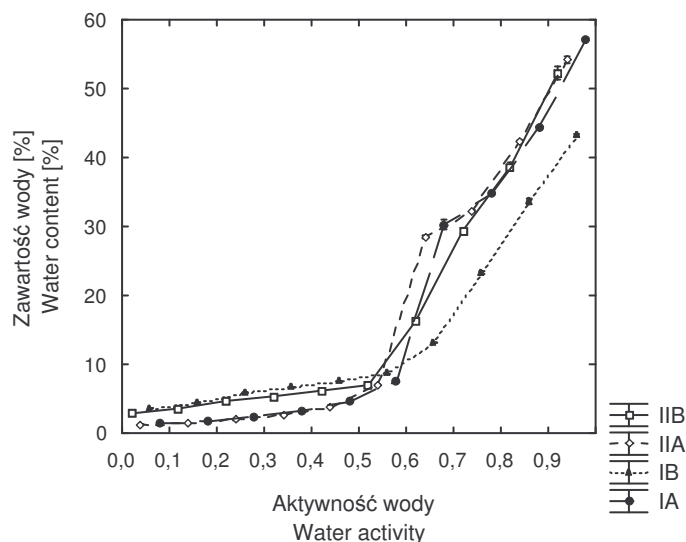
$R^2(yx)$  – współczynnik determinacji / coefficient of determination

$R(yx)$  – indeks korelacji / correlation index

$Se(y)$  – średni błąd szacunku / average error of estimation

$\phi^2(yx)$  – współczynnik zbieżności / coefficient of convergence

Kształt izoterm sorpcji badanych produktów odpowiadał III typowi izoterm w klasyfikacji Brunauera, który jest charakterystyczny dla produktów zawierających znaczne ilości substancji niskocząsteczkowych (rys. 1). Analizując różnice w kształcie izoterm badanych produktów przypuszczać można, że były one skutkiem zróżnicowania tych produktów pod względem składu surowcowego oraz ich struktury wewnętrznej. Przebieg izoterm sorpcji odzwierciedlał wrażliwość koncentratów zup na oddziaływanie środowiska o różnej aktywności wody. Wykazano podobny przebieg izoterm sorpcji we wszystkich badanych koncentratkach. W koncentratkach barszczu czerwonego (IA i IIA) stwierdzono intensywny wzrost zawartości wody przy aktywności równej 0,52, a w koncentratkach zupy grochowej (IB i IIB) przy aktywności wody 0,72. W kształcie badanych izoterm nie można było jednoznacznie określić charakterystycznych obszarów izoterm sorpcji wody typowej dla żywności. Zaobserwowano brak wyraźnie zarysowanego obszaru I charakteryzującego proces adsorpcji monowarstwowej. Fakt ten świadczyć może o wrażliwości produktu na wilgoć dopiero po przekroczeniu określonego progu granicznego oraz o braku zjawiska adsorpcji monowarstwowej.



Rys. 1. Izotermie sorpcji koncentratów zup IA, IIA, IB, IIB w temp. 20°C.

Fig. 1. Sorption isotherms of concentrated soups IA, IIA, IB, IIB in a temperature of 20°C.

Produkty IA i IIA (barszcz czerwony) w warunkach charakteryzujących się podwyższonym poziomem wilgotności adsorbowały większe ilości wody niż produkty IB i IIB (zupa grochowa). Przypuszczać zatem można, że trwałość przechowalnicza barszczu czerwonego w proszku typu instant w znacznej mierze uzależniona jest od szczelności opakowań jednostkowych. Po przekroczeniu 69% wilgotności w otoczeniu odpowiadającej 0,69  $a_w$  następuje szybkie pochłanianie wody przez koncentrat barszczu czerwonego, któremu towarzyszy zjawisko rozpuszczania, będące konsekwencją niskocząsteczkowego charakteru składników tworzących koncentrat.

Przedstawiając izotermę adsorpcji w układzie współrzędnych  $(p/p_0)/a(1-p/p_0)$  i  $p/p_0$ , wyznaczono parametry równania BET na podstawie danych z zakresu  $a_w = 0,07-0,44$ , w postaci pojemności warstwy monomolekularnej  $V_m$  i odpowiadającej jej aktywności wody oraz powierzchni właściwej sorpcji PS (tab. 3).

Największą pojemnością monowarstwy charakteryzowały się koncentraty zupy grochowej (IB i IIB), przyjmując odpowiednio wartości 4,4050 g H<sub>2</sub>O/100 g s.s. i 3,6164 g H<sub>2</sub>O/100 g s.s.. Wartościom tym odpowiadały następujące aktywności wody 0,2241 i 0,2339. Koncentraty barszczu czerwonego wykazywały niższe wartości pojemności monowarstwy 2,7238 g H<sub>2</sub>O/100 g s.s. (IA) i 2,2724 g H<sub>2</sub>O/100 g s.s. (IIA). Pojemnościom tym odpowiadały jednak nieznacznie wyższe wartości aktywności wody (0,2373 i 0,2360). Przypuszczać zatem można, że koncentraty zupy grochowej cechuje większe powinowactwo do wody, czego konsekwencją może być lepsza podatność na rehydrację. Z punktu widzenia konsumenta zup w proszku typu instant, właściwość ta w znaczący sposób determinuje jakość tych koncentratów. Konsument oczekuje bowiem, że ta właśnie grupa towarowa cechować się będzie dużą

podatnością na rehydrację, w wyniku której produkt uzyska pożądane właściwości (szybkie przygotowanie do spożycia). Prowadząc analizę uzyskanych wyników pod względem zróżnicowania badanych koncentratów na skutek zastosowanych technologii (producent I i II) stwierdzono, że w przypadku producenta I produkty cechowały się zawsze wyższymi wartościami warstwy monomolekularnej. Pozwala to przypuszczać, że trwałość koncentratów zup producenta I była większa w porównaniu z koncentratami producenta II. Jakość produktów sypkich obniża się po zaadsorbowaniu wody w ilości przekraczającej pojemność monowarstwy. Zatem znaczne rozwinięcie monowarstwy chroni produkt przed szybkim zepsuciem w wyniku pochłonięcia określonej ilości wody.

Tabela 3

Parametry równania BET badanych koncentratów zup typu instant.

The BET equation parameters of powdered, instant-type soup concentrates tested.

Produkt Product	Pojemność warstwy monomolekularnej [g H <sub>2</sub> O/100 g s.s.] Capacity of a monolayer [g H <sub>2</sub> O/100 g d.m.]	Aktywność wody Water activity	Powierzchnia właściwa sorpcji [m <sup>2</sup> /g] Specific surface of sorption [m <sup>2</sup> /g]
IA	2,7238	0,2373	9,597E+03
IIA	2,2724	0,2360	8,006E+03
IB	4,4050	0,2241	1,552E+04
IIB	3,6164	0,2339	1,274E+04

Na podstawie analizy matematycznej określono strukturę badanych zup w proszku typu instant poprzez obliczenie powierzchni właściwej sorpcji (tab. 2). Koncentraty zupy grochowej (IB i IIB), tworzące po procesie rehydracji roztwór koloidalny, charakteryzowały się większą powierzchnią sorpcji, rzędu 10<sup>4</sup>, natomiast koncentraty barszczu czerwonego (IA i IIA) odznaczały się wartościami zdecydowanie niższymi, rzędu 10<sup>3</sup>. Uzyskane wyniki dowodzą, że lepszą zdolnością do rehydracji, wynikającą z rozwinięcia powierzchni właściwej sorpcji, charakteryzować się będą produkty IB i IIB (zupa grochowa), tworzące po uwodnieniu roztwór koloidalny. Powstawanie roztworów o naturze koloidalnej uwarunkowane jest obecnością makrocząsteczek, takich jak białko czy polisacharydy typu skrobia. Biopolimery cechuje znaczne rozwinięcie powierzchni oraz znaczna ilość miejsc aktywnych zdolnych do przyłączenia cząsteczek wody. W związku z tym w naturalny sposób wielkość powierzchni sorpcji koncentratów zawierających biopolimery jest większa, a w związku z tym również ich podatność na rehydrację.

## Wnioski

1. Koncentraty barszczu czerwonego w proszku typu instant, w zakresie aktywności wody  $a_w = 0,52-0,98$ , adsorbowały większe ilości wody niż tego samego typu koncentraty zupy grochowej.

2. Analiza kształtu izoterm wykazała brak wyraźnego obszaru charakteryzującego obszar adsorpcji monowarstwowej.
3. Koncentraty w proszku typu instant firmy Knorr – zarówno barszcz czerwony, jak i zupa grochowa – charakteryzowały się większą pojemnością monowarstwy niż analogiczne produkty firmy Winiary, co wskazywać może na wyższą trwałość koncentratów firmy Knorr.
4. Zupa grochowa w proszku typu instant (obu producentów) wykazała znaczne rozwinięcie powierzchni właściwej, co sugerować może jej znaczną podatność na rehydrację.

### Literatura

- [1] Atkins P.W.: Chemia fizyczna. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 2001.
- [2] Domian E., Lenart A.: Adsorpcja pary wodnej przez żywność w proszku. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **4 (25)**, 25-35.
- [3] Kim H.K., Song Y., Yam K.L.: Water sorption characteristics of dried red peppers. *Inter. J. Food Sci. Technol.*, 1991, **26**, 339.
- [4] Kowalska J., Lenart A.: Wpływ powlekania na kinetykę adsorpcji pary wodnej przez napój kakaowy w proszku. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1999, **2 (19)**, 50-64.
- [5] Ociecek A.: Badania modeli oceny trwałości przechowalniczej produktów higroskopijnych na przykładzie makaronu. Praca doktorska. WSM. Gdynia 2001.
- [6] Ościk J.: Adsorpcja. PWN. Warszawa 1993.
- [7] PN-86/A-94000. Koncentraty spożywcze. Nazwy i określenia.
- [8] PN-A-79011-3. Koncentraty spożywcze. Metody badań. Oznaczenie zawartości wody.
- [9] Salwin H.: Defining minimum moisture contents for stability in dehydrated food. *Food Technol.* 1959, **17**, 1114.
- [10] Świtka J.: Wpływ wybranych czynników na właściwości sorpcyjne suszonych produktów mleczarskich. Rozprawy naukowe. Gdynia 1992.

### SORPTION PROPERTIES OF POWDERED, INSTANT TYPE SOUPS

#### S u m m a r y

The objective of this paper was to determine sorption qualities of food concentrates on the basis of an analysis of sorption isotherms. The analysis results obtained were discussed from the point of view of the durability and ability to rehydrate of the products analysed.

The study included the determination of initial water content in the material analysed USING a method of thermal drying under the atmospheric pressure. The sorption qualities of the two types of products were investigated with the use of a static method by selecting sorption isotherms within the water activity range from 0,07 to 0,98. The sorption isotherms selected underwent a BET transformation within the range of 0,07-0,44; the  $V_m$  capacity of monomolecular layer and its corresponding water activity were calculated; also, a specific surface of sorption was determined.

It was proved that the initial water content in the concentrates under analysis depended on both the chemical composition of product and the employed technology. The sorption isotherms of products investigated corresponded to type III according to the Brunauer's classification. The capacity of monomolecular layer and the specific surface of sorption, its derivative, depended on the chemical

composition of product. A significant affinity among some parts of products analysed and water might indicate their satisfactory rehydratability. Additionally, a high volume of the monomolecular layer may favourably impact the storing durability of products.

**Key words:** food concentrates, sorption isotherms, monolayer, specific surface of sorption ☒

URSZULA SAMOTYJA, ALEKSANDRA URBANOWICZ

## PRZECIWUTLENIAJĄCE WŁAŚCIWOŚCI HANDLOWYCH EKSTRAKTÓW Z ROZMARYNU

### Streszczenie

W pracy porównano właściwości przeciwutleniające handlowych ekstraktów z rozmarynu. Oceniono ich właściwości przeciwrodnikowe (test z rodnikiem DPPH<sup>·</sup>) i redukujące (test FRAP). Oznaczono także zawartość związków fenolowych ogółem oraz *o*-difenoli.

Wykazano zróżnicowanie właściwości przeciwutleniających badanych ekstraktów. Właściwości przeciwutleniające preparatów z rozmarynu stanowią wypadkową wielokierunkowego charakteru działania związków aktywnych. Ekstrakt Stabiloton OS (Oil-Soluble), wyprodukowany przez firmę Raps, był najbardziej aktywnym preparatem, zarówno pod względem właściwości przeciwrodnikowych, jak i redukujących, zawierał także najwięcej związków fenolowych spośród badanych ekstraktów. Ogólna zawartość związków fenolowych wynosiła od 3,5 do 14 g/100 g handlowego ekstraktu, z czego od 14 do 27% stanowiły związki o strukturze *o*-difenoli. Na właściwości przeciwutleniające ekstraktów z rozmarynu mogła wpływać zarówno ilość, jak i skład jakościowy związków fenolowych w preparacie.

**Słowa kluczowe:** rozmaryn, naturalne przeciwutleniacze, DPPH<sup>·</sup>, aktywność przeciwutleniająca, związki fenolowe

### Wprowadzenie

Utlenianie lipidów prowadzi do obniżenia jakości żywności, konsekwencją tych procesów jest bowiem obniżenie trwałości, wynikające z pogorszenia cech sensorycznych, spadku wartości odżywczej oraz zmniejszenia bezpieczeństwa zdrowotnego produktów spożywczych. Zmiany te dotyczą nie tylko kwasów tłuszczowych, lecz również składników frakcji nieglicerydowej, takich jak witaminy czy sterole [21].

Degradacja wodoronadtlenków, pierwotnych produktów utleniania, prowadzi do powstania szerokiej gamy związków lotnych, wywierających bezpośredni wpływ na smak i zapach tłuszczów [6]. Najbardziej podatne na procesy oksydacyjne są kwasy tłuszczowe o wysokim stopniu nienasylenia. Równoległe z procesami zachodzącymi w

---

*Mgr inż. U. Samotyja, mgr inż. A. Urbanowicz, Katedra Towaroznawstwa Artykułów Spożywczych, Wydz. Towaroznawstwa, Akademia Ekonomiczna, Al. Niepodległości 10, 60-967 Poznań*



kwasach tłuszczowych zachodzi utlenianie witamin A, E, D i  $\beta$ -karotenu, obecnych we frakcji lipidowej, oraz innych witamin, występujących w produktach spożywczych [2]. Produkty utleniania kwasów tłuszczowych mogą reagować z nielipidowymi składnikami żywności, np. aminokwasami białek, zmniejszając ich strawność i przyswajalność [21].

Podczas utleniania lipidów powstają związki mogące wywoływać negatywny wpływ na zdrowie człowieka [10]. Należą do nich m.in. wolne rodniki oraz produkty utlenienia steroli. Przypuszcza się, że toksyczne oddziaływanie wolnych rodników jest przyczyną zmian miażdżycowych, schorzeń układu sercowo-naczyniowego oraz występowania wielu innych stanów chorobowych [1]. Niepożądane działanie rodników lipidowych w patogenezie miażdżycy polega m.in. na modyfikowaniu lipoprotein LDL, co skutkuje uszkodzeniem śródbłonna naczyniowego i zapoczątkowaniem procesu powstawania blaszki miażdżycowej [4]. Produkty utlenienia steroli, tzw. oksysterole i oksyfitosterole, powstają w organizmie człowieka pod wpływem enzymów na szlakach syntezy kwasów żółciowych i hormonów steroidowych oraz w konsekwencji działania wolnych rodników, a także w żywności – w trakcie procesów obróbki technologicznej i podczas niewłaściwego lub długotrwałego przechowywania produktów spożywczych [9, 22]. Powodują one uszkodzenie śródbłonna naczyniowego, przyczyniając się do rozwoju miażdżycy. Oksysterolom przypisuje się też działanie kancerogenne i mutagenne [8, 23].

Jednym ze sposobów zapobiegania niekorzystnym zmianom oksydacyjnym lipidów żywności jest stosowanie przeciwutleniaczy. Mimo, że syntetyczne przeciwutleniacze są stosunkowo niedrogie i łatwo dostępne, doniesienia o ich potencjalnym toksycznym oddziaływaniu wywołały dyskusję [11]. Brak zaufania konsumentów do związków syntetycznych przejawiał się rosnącym zainteresowaniem związkami pochodzenia naturalnego, w opinii powszechnej uznawanymi za bezpieczne. Przedmiotem zainteresowania producentów żywności są preparaty roślinne, akceptowane przez konsumentów nie tylko ze względu na naturalne pochodzenie surowca, ale też z powodu możliwego korzystnego oddziaływania na organizm człowieka. Cennym źródłem przeciwutleniaczy są zioła i rośliny przyprawowe, np. rozmaryn, szałwia, oregano, tymianek, mięta, melisa, imbir [13]. Niektóre z nich od wieków były wykorzystywane jako składniki aromatyzujące w produktach spożywczych. Jedną z roślin przyprawowych, która znalazła zastosowanie do produkcji handlowych preparatów przeciwutleniających jest rozmaryn (*Rosmarinus officinalis*), wpisany na listę GRAS [ang. Generally Recognized As Safe] jako substancja uznawana za bezpieczną.

Wśród silnie działających aktywnych składników ekstraktu z rozmarynu zidentyfikowano karnozol i kwas karnozynowy. Do innych aktywnych składników ekstraktu z rozmarynu należy kwas rozmarynowy, rozmanol, rozmadial, epirozmanol, izorozmanol, karnozynian metylu, rozmarynodifenol, rozmarynochinon, 7-

metyloepirozmanol, kwas kawowy oraz wiele innych związków, którym przypisuje się działanie synergistyczne [13, 19, 20, 16]. W suszonym rozmarynie stwierdzono od 1,7 do 3,9% kwasu karnozynowego, 0,2–0,4% karnozolu [12] oraz 0,2–4,3% kwasu rozmarynowego [5].

Celem pracy było porównanie handlowych ekstraktów z rozmarynu pod względem właściwości przeciwutleniających (przeciwrodnikowych i redukujących) i zawartości związków fenolowych.

### **Materiał i metody badań**

Przedmiotem badań były komercyjne ekstrakty z rozmarynu: Stabiloton OS (Oil Soluble), Stabiloton WS (Water Soluble), wyprodukowane przez firmę Raps (Niemcy), otrzymane od firmy Prowana z Radzimina, oraz Guardian 08, Guardian 09, Guardian 11, których producentem była firma Danisco Cultor z Danii.

Ekstrakty OS i WS, występujące w formie sproszkowanej, uzyskane zostały z rozmarynu metodą ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym. Według informacji na opakowaniu, ekstrakt OS zawierał 30% ( $\pm 3\%$ ) substancji aktywnych (diterpenów fenolowych), ekstrakt WS-9% ( $\pm 1\%$ ). Ekstrakty Stabiloton zawierają takie substancje technologiczne, jak: dwutlenek krzemu (E 551), olej jadalny, a WS dodatkowo chlorek sodu i mono- i diglicerydy kwasów tłuszczowych estryfikowane kwasem mono- i diacetylowinowym (E 472e) (informacja na opakowaniu). Producent zadeklarował stabilność substancji aktywnych w temp. niższej niż 130°C. Ekstrakt OS jest zalecany do stabilizacji fazy lipidowej żywności, w ilości 0,2–0,35 g/kg tłuszczu, a WS do stosowania w układach tłuszczowych zawierających wodę, w ilości 0,4–0,8 g/kg tłuszczu.

Ekstrakty Guardian 08 i 09 występują w formie płynnej, ekstrakt 11 w formie sproszkowanej. Zgodnie z deklaracją producenta zawierają one 5% diterpenów fenolowych. W ich skład wchodzi ponadto mono- i diglicerydy kwasów tłuszczowych, mono- i diglicerydy kwasów tłuszczowych estryfikowane kwasem octowym (E 472a) (ekstrakt 08), glikol propylenowy i naturalny ekstrakt z rozmarynu (08 i 09), monooleinian polioksyetylenosorbitolu (E 434) (ekstrakt 09) oraz maltodekstryna (ekstrakt 11).

Zakres badań obejmował ocenę aktywności przeciwrodnikowej w teście z rodnikiem DPPH<sup>•</sup>, ocenę właściwości redukujących (test FRAP), oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem oraz *o*-difenoli.

Badanie aktywności przeciwrodnikowej ekstraktów rozmarynu prowadzono według metody Sanchez–Moreno i wsp. [17], z modyfikacją polegającą na użyciu etanolowego roztworu DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenylo-2-pikrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, 0,025 g/1000 cm<sup>3</sup> 96% etanolu).

Oznaczenie polegało na pomiarze absorbancji i obserwacji jej zmian, które zachodziły podczas inkubacji rodnika DPPH<sup>•</sup> z aktywnymi składnikami ekstraktów

rozmarynowych. Zakres stężeń ekstraktów w układzie reakcyjnym i częstotliwość pomiarów ustalano doświadczalnie. Stężenie DPPH<sup>·</sup> w układzie reakcyjnym i ilość niewygaszonego (pozostałego w układzie) rodnika DPPH<sup>·</sup> obliczano na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej.

Pomiarów dokonywano przy  $\lambda = 515$  nm za pomocą spektrofotometru Genesys 2 (Milton Roy). Wykonywano 3 równoległe oznaczenia prób każdego z ustalonych stężeń ekstraktu.

Miarą aktywności przeciwrodnikowej był parametr AE, uwzględniający zarówno szybkość, jak i siłę działania przeciwutleniaczy. AE wyznaczano zgodnie z równaniem:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot T \cdot EC_{50}}$$

w którym: AE – aktywność przeciwrodnikowa,

EC<sub>50</sub> – stężenie przeciwutleniacza potrzebne do obniżenia początkowej zawartości DPPH<sup>·</sup> o połowę, przy braku dalszego spadku absorbancji,

T EC<sub>50</sub> – czas potrzebny do osiągnięcia stałego stężenia DPPH<sup>·</sup> przy stężeniu ekstraktu wynoszącym EC<sub>50</sub>.

Właściwości redukujące badanych ekstraktów oceniono na podstawie testu FRAP (ang. Ferric-Reducing Antioxidant Power) [3]. Oznaczenie polegało na pomiarze absorbancji i obserwacji jej wzrostu przy  $\lambda = 593$  nm, które następowały podczas inkubacji odczynnika FRAP z aktywnymi składnikami ekstraktów, na skutek redukcji Fe<sup>+3</sup> – TPTZ (Fe<sup>+3</sup> – tripyridylotriazyna, Fluka) do Fe<sup>+2</sup>–TPTZ. Wartości FRAP (w  $\mu\text{M}/1000 \text{ cm}^3$ ) poszczególnych próbek wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej [24]. Pomiarów dokonywano w spektrofotometrze Genesys 6 (Thermo Spectronic). Wykonywano 3 równoległe oznaczenia każdego preparatu.

Zawartość związków fenolowych ogółem w ekstraktach z rozmarynu oznaczano metodą spektrofotometryczną przy długości fali  $\lambda=725$  nm z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu'a (Sigma-Aldrich) [18]. Zawartość *o*-difenoli w ekstraktach roślinnych oznaczano spektrofotometrycznie z użyciem molibdenianu sodu [POCH] przy długości fali  $\lambda = 350$  nm za pomocą spektrofotometru Genesys 2 (Milton Roy) [7]. Przeprowadzono cztery równoległe oznaczenia każdego ekstraktu. Zawartość związków fenolowych ogółem oraz *o*-difenoli obliczano na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej z użyciem kwasu kawowego (Sigma-Aldrich).

W celu porównania wartości średnich stosowano analizę wariancji. Istotność różnic obliczano testem Tukey'a, na poziomie  $p < 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Test z rodnikiem DPPH<sup>·</sup> umożliwił ocenę właściwości przeciwrodnikowych ekstraktów z rozmarynu. Miarą zdolności dezaktywowania wolnych rodników były

parametry  $EC_{50}$  i  $T EC_{50}$ , świadczące o sile oraz szybkości działania ekstraktów. Na ich podstawie wyznaczono parametr aktywności przeciwrodnikowej AE.

Wartości parametrów  $EC_{50}$  i  $T EC_{50}$  przedstawiono w tab. 1. Największą siłą działania, mierzoną jako  $EC_{50}$  charakteryzował się ekstrakt OS. Relatywnie niską wartość parametru  $EC_{50}$  należy interpretować w ten sposób, że do neutralizowania połowy ilości rodnika DPPH $\cdot$  wystarczy mniejsza ilość ekstraktu OS niż pozostałych badanych preparatów. Pod względem parametru  $T EC_{50}$  najlepszy był ekstrakt 11, który w najkrótszym czasie dezaktywował połowę wolnych rodników obecnych w układzie. Należy zauważyć, że rezultat ten osiągnięto przy stosunkowo dużym stężeniu ekstraktu 11.

Tabela 1

Parametry aktywności przeciwrodnikowej ekstraktów rozmarynu.

Parameters of the antiradical activity of rosemary extracts.

Ekstrakt handlowy Commercial extract	Zakres stężeń [g ekstraktu / kg DPPH $\cdot$ ] Ranges of concentrations [g of extract / kg DPPH $\cdot$ ]	$EC_{50}$ <sup>*</sup> [g ekstraktu / kg DPPH $\cdot$ ] [g of extract / kg DPPH $\cdot$ ]	$T EC_{50}$ <sup>**</sup> [min]
OS	163-1630	758 <sup>a***</sup>	21,0 <sup>a</sup>
WS	815-4897	2174 <sup>b</sup>	28,0 <sup>b</sup>
08	815-4897	2604 <sup>c</sup>	14,5 <sup>c</sup>
09	815-4897	2538 <sup>c</sup>	13,5 <sup>c</sup>
11	815-4897	3165 <sup>d</sup>	11,0 <sup>d</sup>

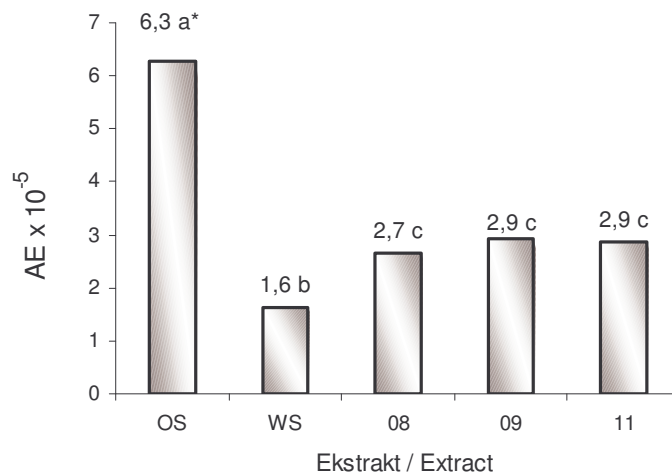
Objaśnienia:/ Explanatory notes:

<sup>\*</sup> $EC_{50}$  – stężenie przeciwutleniacza potrzebne do obniżenia początkowej zawartości DPPH $\cdot$  o połowę / the concentration level of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH $\cdot$  concentration by 50%,

<sup>\*\*</sup> $T EC_{50}$  – czas potrzebny do osiągnięcia stałego stężenia DPPH $\cdot$  przy stężeniu ekstraktu wynoszącym  $EC_{50}$  / the time needed to reach a steady state at a concentration level corresponding to  $EC_{50}$ ,

<sup>\*\*\*</sup>Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie między sobą ( $p < 0,05$ ),  $n = 3$  / mean values within each column and denoted by different letters are statistically significantly different ( $p < 0,05$ ),  $n = 3$ .

Wartości obliczonego parametru AE, będącego miarą całkowitej aktywności przeciwrodnikowej, przedstawiono na rys. 1. Stwierdzono zróżnicowanie właściwości przeciwrodnikowych badanych ekstraktów. Najwyższą aktywność przeciwrodnikową (AE) wykazywał ekstrakt OS, ekstrakty 08, 09 i 11 średnią, a ekstrakt WS najniższą.

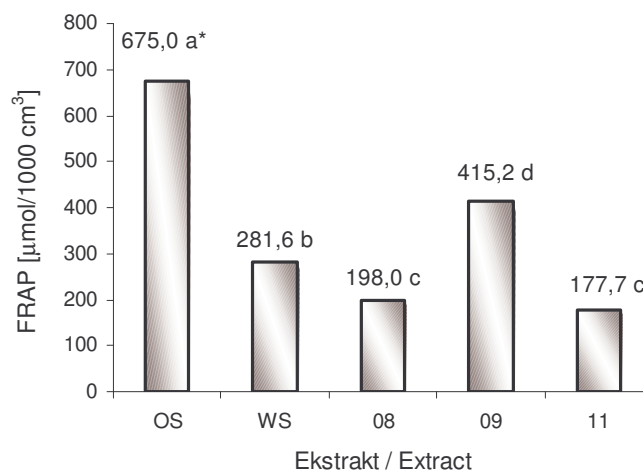


Rys.1. Aktywność przeciwnodnikowa ekstraktów z rozmarynu oznaczona w teście z DPPH<sup>·</sup>.

Fig. 1. The antiradical activity of rosemary extracts measured using a test with DPPH<sup>·</sup>.

Objaśnienia:/ Explanatory notes:

\*Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie między sobą ( $p < 0,05$ ),  $n = 3$  / Mean values denoted by different letters are statistically significantly different ( $p < 0,05$ ),  $n = 3$ .



Rys. 2. Siła redukująca ekstraktów z rozmarynu oznaczona w teście FRAP.

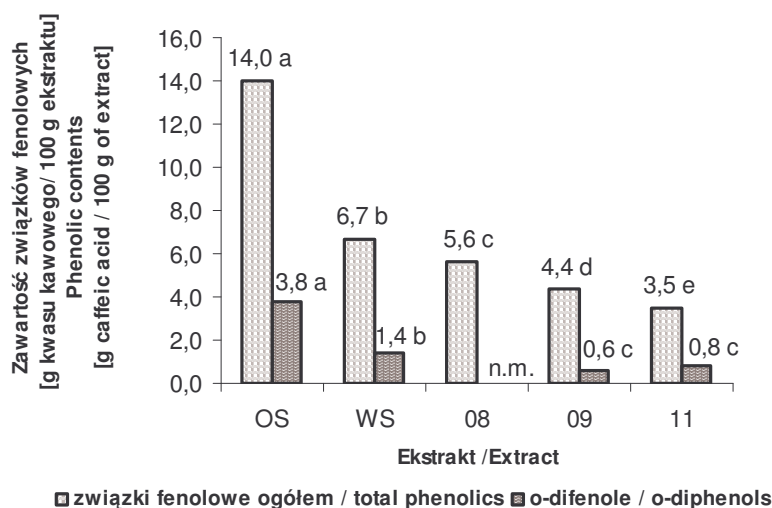
Fig. 2. Ferric-Reducing Antioxidant Power of rosemary extracts.

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\*Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie między sobą ( $p < 0,05$ ),  $n = 3$

\*Mean values denoted by different letters are statistically significantly different ( $p < 0,05$ ),  $n = 3$ .

Obliczone wartości  $EC_{50}$  badanych ekstraktów mogą wydawać się wysokie w porównaniu z danymi literaturowymi odnoszącymi się do czystych wzorców [14, 15, 17], co wynika ze sposobu wyrażenia stężenia  $EC_{50}$ . W pracach badawczych jest ono najczęściej wyrażone jako ilość substancji aktywnej w odniesieniu do ilości DPPH, co w szczególności dotyczy oceny aktywności pojedynczych przeciwutleniaczy. W niniejszej pracy stężenie  $EC_{50}$  wyrażano jako ilość ekstraktu w stosunku do ilości DPPH. Wyrażenie aktywności przeciwrodnikowej w przeliczeniu na masę preparatu, a nie związków aktywnych (np. związków fenolowych), związane jest z praktycznym aspektem stosowania ekstraktów z rozmarynu. Badane preparaty z rozmarynu zawierają bowiem w swym składzie wiele substancji technologicznych, ułatwiających ich aplikację. Zastosowany sposób wyrażenia stężenia  $EC_{50}$  w pełni umożliwił porównanie aktywności przeciwrodnikowej handlowych ekstraktów.



■ związki fenolowe ogółem / total phenolics ■ o-difenole / o-diphenols

Rys. 3. Zawartość związków fenolowych ogółem i *o*-difenoli w ekstraktach z rozmarynu.

Fig. 3. Content of total phenolic compounds and *o*-diphenols in rosemary extracts.

Objaśnienia: / Explanatory notes:

n.m. – nie mierzono / not measured,

Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie między sobą (w ramach danej grupy związków fenolowych) ( $p < 0,05$ ),  $n = 4$  / Mean values denoted by different letters are statistically significantly different (within a given group of phenolic compounds) ( $p < 0,05$ ),  $n = 4$ .

Zdolność redukcji jonów metali jest jednym z mechanizmów działania przeciwutleniaczy, obok dezaktywacji wolnych rodników. Działanie tego mechanizmu jest typowe dla przeciwutleniaczy wtórnych [6]. Wyniki testu FRAP (rys. 2) wskazują, że największe właściwości redukujące miał ekstrakt OS. Następne w kolejności były ekstrakty: 09, WS, 08 i 11.

Ogólna zawartość związków fenolowych w ekstraktach wynosiła od 3,5 do 14 g/100 g ekstraktu handlowego, z czego od 14 do 27% stanowiły związki o

strukturze *o*-difenoli (rys. 3). W ekstrakcie 08 nie oznaczono zawartości *o*-difenoli ze względu na zmętnienie próbki.

Najwięcej związków fenolowych zawierał ekstrakt OS, który równocześnie charakteryzował się najsilniejszymi właściwościami antyrodnikowymi i siłą redukującą. Z kolei ekstrakt 09, który w porównaniu z innymi ekstraktami wykazywał stosunkowo dużą aktywność przeciwutleniającą, zawierał relatywnie mało związków fenolowych.

Jednym z czynników decydujących o sile redukującej preparatów z rozmarynu może być zawartość substancji fenolowych wchodzących w skład ekstraktu, przy czym istotna może być nie tylko całkowita ich zawartość, ale również rodzaj i właściwości poszczególnych związków.

### Wnioski

1. Komercyjne ekstrakty z rozmarynu różnią się aktywnością przeciwutleniającą. Ich właściwości przeciwutleniające stanowią wypadkową wielokierunkowego charakteru działania związków aktywnych. Ekstrakt OS był najbardziej aktywnym preparatem, zarówno pod względem właściwości przeciwrodnikowych, jak i redukujących.
2. Na właściwości przeciwutleniające ekstraktów z rozmarynu może wpływać zarówno ilość, jak i skład jakościowy związków fenolowych w preparacie.

### Literatura

- [1] Aruoma O.I.: Free radicals, antioxidants and international nutrition, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 1999, **8**, 53-63.
- [2] Belitz H.D., Grosch W.: *Food Chemistry*. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg 1999, pp. 378-394.
- [3] Benzie I.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of "antioxidant power": The Frap assay. *Anal. Biochem.*, 1996, **239**, 70-76.
- [4] Czyżewska K.: *Patofizjologiczne podstawy wybranych chorób*, cz. I. Miażdżyca. AM w Poznaniu. Poznań 1998.
- [5] Fecka I., Mazur A., Cisowski W.: Kwas rozmarynowy, ważny składnik terapeutyczny niektórych surowców roślinnych. *Postępy Fitoterapii* 2002, 8, <http://www.borgis.pl>.
- [6] Frankel E.N.: *Lipid Oxidation*, The Oily Press Ltd. Dundee 1998.
- [7] Gutfinger T.: Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1981, **58**, 966-968.
- [8] Hwang P.L.: Biological activities of oxygenated sterols: physiological implications. *Bio Essays*, 1991, **13**, 583-589.
- [9] Johannes Ch., Lorenz R.L.: Preparation and mass spectrometry of fourteen pure and <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-labeled oxidation products from the phytosterols beta-sitosterol and stigmasterol. *Anal. Biochem.*, 2004, **325**, 107-116.
- [10] Kubow S.: Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods, *Free Radic. Biol. Med.*, 1992, **12**, 63-81.
- [11] Lindenschmidt R.C., Trika A.F., Guard M.E., Witschi H.P.: The effect of butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*, 1986, **38**, 151-160.



- [12] Munné-Bosch S., Alegra L., Schwarz K.: The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate. Eur. Food Res. Technol., 2000, **210**, 263-267.
- [13] Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (red.): Antioxidants in food: Practical applications. Woodhead Publishing Limited. Cambridge 2001.
- [14] Psomiadou E., Tsimidou M.: On the role of squalene in olive oil stability, J. Agric. Food Chem., 1999, **47**, 4025-4032.
- [15] Samotyja U., Małecka M., Klimczak I.: Skład i właściwości przeciwrodnikowe fenolokwasów słodu, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2002, **3 (32)**, 67-76.
- [16] Saenz-Lopez R., Fernandez-Zurbano P., Tena M.T.: Capillary electrophoretic separation of phenolic diterpenes from rosemary. J. Chrom. A, 2002, **953**, 251-156.
- [17] Sanchez -Moreno C., Larrauri J. A., Saura-Calixto F.: A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agric., 1998, **76**, 270-276.
- [18] Singleton V.L., Rossi J.A. jr.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic., 1965, **16**, 144-158.
- [19] Six P.: Current research in natural food antioxidants. INFORM, 1994, **5**, 679-687.
- [20] Wang H., Provan G.J., Helliwell K.: Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. Food Chem., 2004, **87**, 307-311.
- [21] Wąsowicz E., Gramza A., Heś M., Jeleń H.H., Korczak J., Małecka M., Mildner-Szkudlarz S., Rudzińska M., Samotyja U., Zawirska-Wojtasiak R.: Oxidation of lipids in food. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2004, **13/54**, SI 1, 87-100.
- [22] Wielkoszyński T.: Utlenione pochodne cholesterolu - oksysterole. Cz. I - struktura, powstawanie, przemiany biologiczne i metody analizy. Czynniki Rzyzka, 2003, **2-4**, 26-38.
- [23] Wielkoszyński T.: Utlenione pochodne cholesterolu – oksysterole. Cz. II - aktywność biologiczna oksysteroli. Czynniki Rzyzka, 2003, **2-4**, 39-47.
- [24] Paiva-Martins F., Gordon M.H.: Effects of pH and ferric ions on the antioxidant activity of olive polyphenols in oil-in-water emulsions. J. Am. Oil Chem. Soc., 2002, **79**, 571-576.

## ANTIOXIDANT PROPERTIES OF COMMERCIAL EXTRACTS OF ROSEMARY

### S u m m a r y

In the paper, the antioxidant activity of commercial extracts of rosemary was assessed, as were their antiradical (test with DPPH<sup>•</sup> radical) and reducing properties (test FRAP). Contents of total phenolic compounds and of *o*-diphenols were determined.

It was proved that the antioxidant activity of rosemary extracts under analysis varied. Antioxidant properties of the rosemary preparations were the resultant of multidirectional activity of their compounds. The Stabiloton OS extract (oil-soluble), a product of a 'Raps' company, was the most active preparation from the point of view of both the antiradical and the reducing properties; it also contained the highest amount of phenolic compounds compared to all the preparations analyzed. The total content of phenols ranged from 3,5 to 14g per 100g of commercial extract; and the compounds showing an *o*-Diphenol structure covered from 14% to 27% of the total content of phenolics. The antioxidant properties of rosemary extracts could be affected by both the quantity and the qualitative profile of phenolic compounds contained in a preparation.

**Key words:** rosemary, natural antioxidants, DPPH<sup>•</sup>, antioxidant activity, phenolic compounds 



BARTOSZ SOŁOWIEJ, WALDEMAR GUSTAW, STANISŁAW MLEKO

## WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW NA ŻELOWANIE κ- I ι-KARAGENU

### Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu stężenia różnych kationów, pH i stężenia sacharozy na właściwości reologiczne roztworów i żeli wybranych frakcji karagenu. Właściwości reologiczne różnych frakcji karagenu oznaczano poprzez pomiary lepkości i tekstury otrzymanych roztworów i żeli. Największą lepkością (450 mPa·s) charakteryzował się roztwór polisacharydu w 0,15 M CaCl<sub>2</sub>. Wzrost stężenia wszystkich zastosowanych soli powodował przesunięcie temperatury żelowania ku wyższym wartościom w przypadku obu żelujących frakcji karagenu. Zakres temperatury żelowania ι-karagenu był dużo wyższy w porównaniu z frakcją κ-karagenu i wynosił od 48 do 73°C. Natomiast wzrost pH środowiska wpływał na podwyższenie temperatury żelowania κ-karagenu i wzrost twardości jego żeli. Wzrost pH z 3 do 8 powodował przesunięcie temperatury żelowania z temp. 21 do 26°C. Dodatek sacharozy powodował wzrost twardości żeli κ-karagenu, jednak przy wysokich stężeniach cukru (30%) żele były bardzo kruche.

**Słowa kluczowe:** ι-karagen, κ-karagen, właściwości reologiczne

### Wprowadzenie

Hydrokoloidy stanowią ważną grupę dodatków do żywności. Są to naturalne polimery, najczęściej polisacharydy o dużej masie cząsteczkowej, które mogą być rozpuszczone lub rozproszone w wodzie, dające efekt zagęszczania i/lub żelowania.

Duże znaczenie hydrokoloidów wynika z ich unikalnych właściwości funkcjonalnych w tym: zdolności do wiązania wody, ograniczania intensywności parowania, zmiany szybkości zamrażania i tworzenia kryształów lodu, możliwości regulowania właściwości reologicznych, a także zdolności do stabilizowania pian i emulsji [6]. Jednym z częściej wykorzystywanych w produkcji żywności hydrokoloidów jest karagen.

Karageny są liniowymi polimerami zbudowanymi z reszt dwugalaktozowych, które mogą być połączone z innymi związkami. Podstawowa jednostka dwucukrowa łańcucha karagenu składa się naprzemiennie ze związków (1,3) α-D-galaktopiranozy i (1,4) β-D-galaktopiranozy. W niektórych frakcjach drugi związek galaktopiranozy

zastąpiony jest przez 3,6 anhydrogalaktozę. Rodzaj otrzymanej frakcji karagenu zależy od gatunku wodorostu i sposobu ekstrakcji. Najczęściej spotykanymi i wykorzystywanymi frakcjami są kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) i lambda ( $\lambda$ ).

Pomimo, że właściwości karagenu były badane już wielokrotnie, to jego właściwości fizykochemiczne są ciągle przedmiotem zainteresowań wielu naukowców [2, 14, 15].

Celem pracy było określenie wpływu stężenia różnych kationów, pH i stężenia sacharozy na właściwości reologiczne roztworów i żeli różnych frakcji karagenu.

### **Materiał i metody badań**

W badaniach użyto  $\kappa$ -,  $\iota$ - i  $\lambda$ -karagenu (Sigma Chemical Co., USA), NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub> (POCH, Gliwice).

#### *Przygotowanie roztworów różnych frakcji karagenu*

Roztwory  $\kappa$ - i  $\iota$ -karagenu przyrządzono przez rozpuszczenie za pomocą mieszadła magnetycznego podczas ogrzewania układu do temp. 75°C, natomiast frakcję  $\lambda$  rozpuszczano w temp. 20±2°C.

#### *Pomiary reologiczne*

Badania roztworów wykonano przy użyciu wiskozymetru rotacyjnego Brookfield DV-II+ (Brookfield Engineering, Stoughton, MA, USA), w układzie cylindrów współosiowych (Small Sample Adapter). W oznaczeniach wpływu temperatury na zmianę lepkości pozornej badanych roztworów stosowano stałe obroty wrzeciona 20 obr./min. Badane roztwory podgrzewano do temp. 85°C, a następnie chłodzono do ok. 20°C. Wyniki rejestrowano za pomocą programu Win Gather V 1,0 (Brookfield Engineering, Stoughton, MA, USA).

#### *Oznaczanie tekstury*

Teksturę żeli badano przy użyciu analizatora tekstury TA-XT2i (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK). Żele karagenu (0,5%) ściskano pomiędzy dwoma równoległymi płytkami o średnicy 36 mm, przy prędkości przesuwu głowicy 1 mm/s w temp. pokojowej (20 ± 2°C). Próby prowadzono w 3 powtórzeniach po 6 walców. Żele traktowano jako materiały nieściśliwe i obliczano względne odkształcenie podczas ściskania oraz naprężenie ścinające przy pęknięciu.

Względne odkształcenie podczas ściskania:

$$\varepsilon_{CH} = -\ln [1 - (\Delta h / h)]$$

gdzie:  $h$  – wysokość walca [mm],

$\Delta h$  – wielkość przesunięcia głowicy do zniszczenia próbki [mm].

Naprężenie niszczące przy ściskaniu:

$$\delta_c = F[1 - (\Delta h / h)] / \pi r^2$$

gdzie:  $F$  – siła powodująca pęknięcie walca [N],

$r$  – początkowy promień walca [mm].

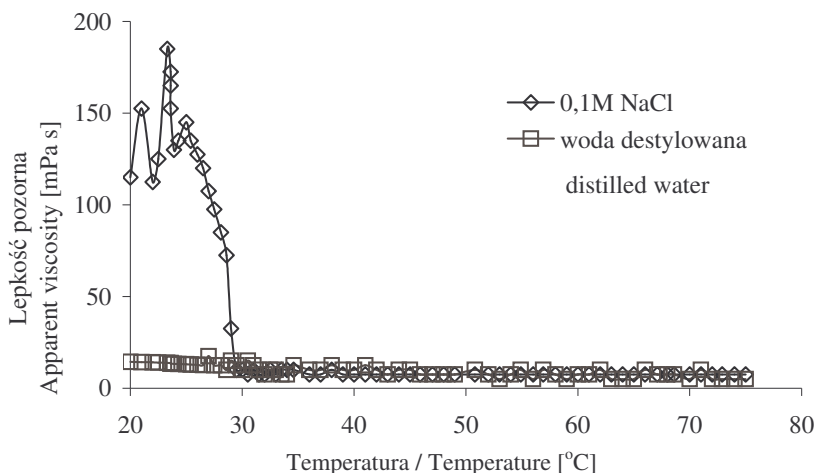
#### *Analiza statystyczna*

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej stosując test t-Studenta wg Programu Stat 1, ISK Skierniewice.

#### **Wyniki i dyskusja**

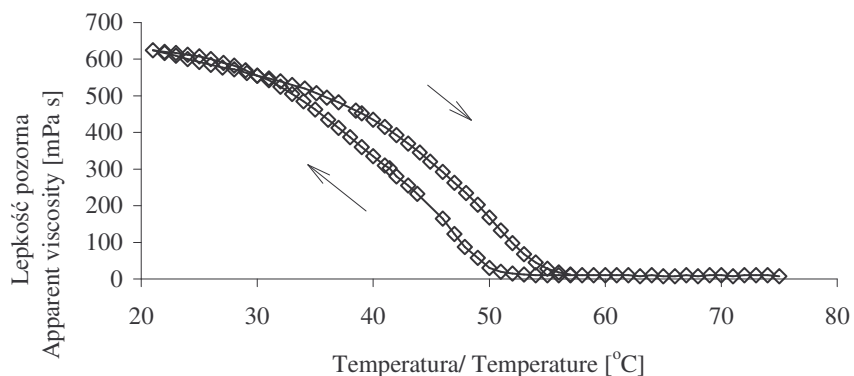
Właściwości reologiczne różnych frakcji karagenu oznaczano poprzez pomiary lepkości podczas ogrzewania i chłodzenia 0,5% roztworów polisacharydu. Na rys. 1. przedstawiono przebieg krzywych lepkości roztworów  $\kappa$ -karagenu (KK) sporządzonych w wodzie destylowanej i 0,1M NaCl. Ogrzewanie roztworów do temp. 75°C nie powodowało zmiany lepkości obu roztworów, która wynosiła około 7,5 mPa·s, również chłodzenie roztworów tego polisacharydu do temp. około 30°C nie wpływało na zmianę ich lepkości. W temp. poniżej 30°C zaobserwowano nagły wzrost lepkości pozornej roztworu KK sporządzonego w 0,1M NaCl, który spowodowany był żelowaniem polisacharydu. Natomiast roztwór KK w wodzie destylowanej nie żelował w temp. poniżej 30°C, zauważono natomiast niewielki wzrost lepkości pozornej do 17 mPa·s w temp. 20°C. Żel utworzony przez KK w obecności soli był kruchy, o czym świadczą wahania lepkości pozornej spowodowane rozpadaniem się matrycy żelu na skutek działania sił ścinających. Hermansson i wsp. [7] stwierdzili, że żelowanie KK zależy od obecności i stężenia jonów metali.

Na rys. 2. przedstawiono pętlę zmiany lepkości 0,5% roztworu  $\iota$ -karagenu (JK), sporządzonego w 0,1M KCl, utworzoną podczas chłodzenia układu od temp. 75 do 20°C, a następnie ponownego ogrzania do temp. 75°C. Roztwór JK zaczął żelować w temp. 53°C i osiągnął maksymalną lepkość pozorną w temp. 20°C. Ponowne ogrzewanie roztworu polisacharydu powodowało powolny spadek lepkości pozornej aż do roztopienia żelu w temp. 56°C. W porównaniu z żelem KK, żel utworzony przez tę frakcję był bardziej odporny na działanie siły ścinającej. Żele utworzone przez JK opisywane są jako elastyczne, niełamliwe i nie ulegające synerezie, natomiast żele KK są kruche i wykazują tendencję do uwalniania wody [3].



Rys. 1. Zmiany lepkości pozornej roztworów 0,5%  $\kappa$ -karagenu sporządzonych w wodzie destylowanej i 0,1M NaCl

Fig. 1. Changes in the apparent viscosity of 0,5 %  $\kappa$ -carrageenan solutions prepared in distilled water and 0,1M NaCl



Rys. 2. Zmiany lepkości pozornej 0,5% roztworu  $\iota$ -karagenu sporządzonego w 0,1M KCl.

Fig. 2. Changes in the apparent viscosity of 0,5 %  $\iota$ -carrageenan solutions prepared in 0,1M KCl.

Roztwory trzeciej frakcji  $\lambda$ -karagenu nie żelowaly w wodzie destylowanej, jak również w roztworach soli (dane nie zamieszczone).

W tab. 1. przedstawiono wartości lepkości pozornej 0,5% roztworów KK sporządzonych w różnych roztworach soli, otrzymane w temp. 20°C. Najwyższą lepkością charakteryzował się roztwór polisacharydu w 0,15 M  $\text{CaCl}_2$ , która wynosiła 450 mPa's. Wyższe stężenie jonów wapniowych wpływało jednak na pogorszenie właściwości reologicznych żeli KK, czyli wyraźny spadek lepkości. Wzrost stężenia jonów sodowych powodował zwiększenie lepkości żeli KK do 0,2 M stężenia NaCl, wyższe stężenie soli wpływało na spadek lepkości pozornej badanych żeli. W przypadku roztworów zawierających jony potasowe, najwyższą lepkość pozorną uzyskano przy 0,1 M KCl, dalszy wzrost stężenia tych jonów negatywnie wpływał na lepkość roztworów galaktanu. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku

układów sporządzonych w roztworach  $MgCl_2$ . Hermansson i wsp. [7] stwierdzili, że żełe KK powstałe w środowisku jonów potasowych były najmocniejsze, a ich moc wzrastała ze wzrostem stężenia  $K^+$ , natomiast w przypadku  $Na^+$  nie zaobserwowali takiej zależności i żełe w obecności tego kationu, jak i  $Ca^{2+}$  były słabe. Nie stwierdzono wpływu jonów  $Cl^-$  na żelowanie KK w połączeniach z wyżej wymienionymi kationami [13].

Tabela 1

Wpływ stężenia i rodzaju dodanej soli na lepkość pozorną 0,5% roztworów  $\kappa$ -karagenu.

The effect of the concentration level and type of the salt added on the apparent viscosity of 0,5%  $\kappa$ -carrageenan solutions.

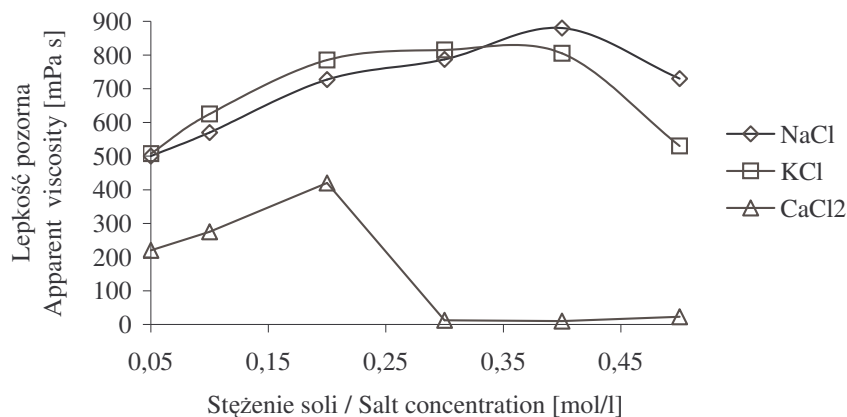
Rodzaj soli Type of salt	Lepkość pozorną / Apparent viscosity [mPa·s]									
	Stężenie soli Salt concentr	0,05 M	0,1 M	0,15 M	0,2 M	0,25 M	0,3 M	0,35 M	0,4 M	0,45 M
NaCl	119,0 <sup>ab</sup> ± 9,0	175,0 <sup>cd</sup> ± 8,9	208,0 <sup>d</sup> ± 17,5	284,0 <sup>e</sup> ± 15,1	266,0 <sup>e</sup> ± 17,5	152,5 <sup>bc</sup> ± 6,7	158,7 <sup>bc</sup> ± 4,6	126,0 <sup>b</sup> ± 9,1	145,0 <sup>bc</sup> 11,4	84,1 <sup>a</sup> ± 9,1
KCl	208,5 <sup>f</sup> ± 16,5	238,5 <sup>g</sup> ± 18,5	175,0 <sup>e</sup> ± 5,0	153,5 <sup>cd</sup> ± 13,5	144,0 <sup>c</sup> ± 9,2	163,5 <sup>de</sup> ± 16,5	80,0 <sup>b</sup> ± 7,2	37,5 <sup>a</sup> ± 2,5	40,0 <sup>a</sup> ± 5,0	55,0 <sup>a</sup> ± 4,6
CaCl <sub>2</sub>	225,0 <sup>e</sup> ± 18,7	183,5 <sup>d</sup> ± 14,2	450,0 <sup>f</sup> ± 25,5	96,2 <sup>c</sup> ± 6,2	100,0 <sup>c</sup> ± 7,5	63,7 <sup>b</sup> ± 4,3	65,0 <sup>b</sup> ± 3,7	41,2 <sup>a</sup> ± 5,5	25,0 <sup>a</sup> ± 3,7	26,2 <sup>a</sup> ± 3,0
MgCl <sub>2</sub>	157,5 <sup>f</sup> ± 11,9	200,0 <sup>g</sup> ± 14,3	112,0 <sup>d</sup> ± 10,0	185,0 <sup>g</sup> ± 14,1	140,0 <sup>e</sup> ± 16,7	85,0 <sup>c</sup> ± 5,4	65,0 <sup>b</sup> ± 5,0	77,0 <sup>bc</sup> ± 8,3	30,0 <sup>a</sup> ± 2,0	15,0 <sup>a</sup> ± 0,5

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a-h różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ).

a-h the differences among mean values denoted using different letters are statistically significant ( $p < 0,05$ ).

Wzrost siły jonowej roztworów JK, sporządzonych w obecności NaCl, wpływał na zwiększenie ich lepkości wraz ze wzrostem stężenia soli do 0,4 M, dalszy wzrost stężenia NaCl miał negatywny wpływ na tę właściwość reologiczną (rys. 3). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku jonów potasowych, natomiast w obecności  $CaCl_2$ , już przy 0,3 M stężeniu soli nie obserwowano żelowania tego polisacharydu w zakresie temp. od 75 do 20°C. Według Nortona [11], JK wykazuje małą specyficzność w stosunku do jonów jednowartościowych, natomiast obecność jonów wapniowych wyraźnie sprzyja żelowaniu tej frakcji karagenu. Michel i wsp. [10] również stwierdzili, że jony dwuwartościowe mają większy wpływ na żelowanie jota karagenu.

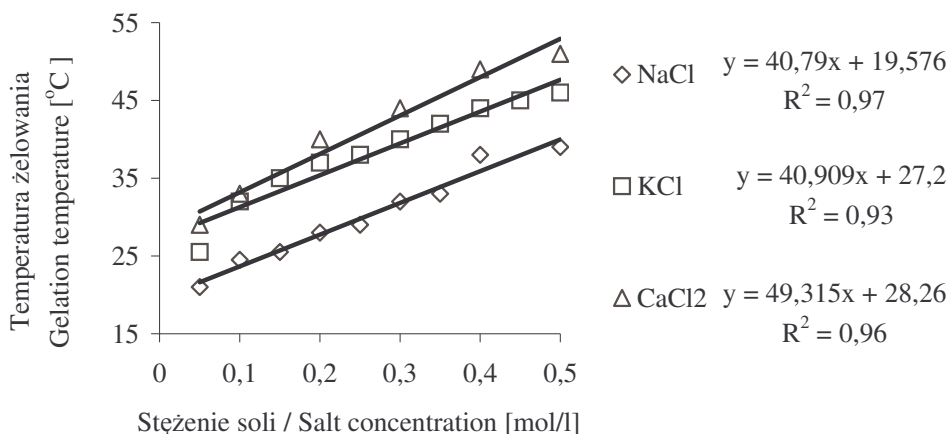
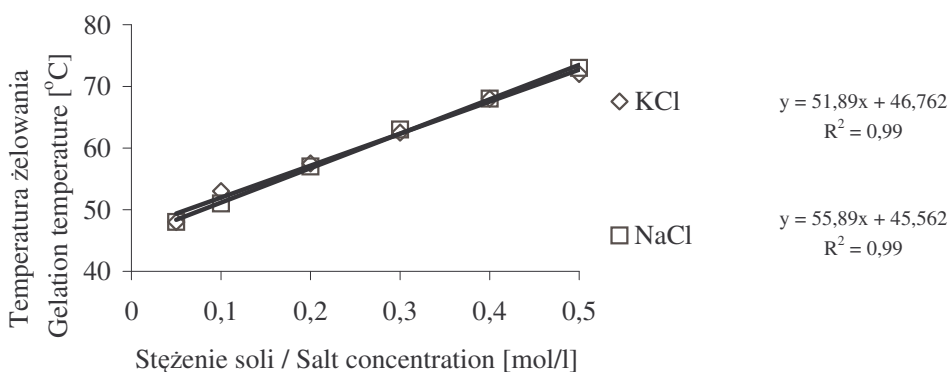


Rys. 3. Wpływ stężenia różnych soli na lepkość pozorną 0,5% roztworów ι-karagenu w temp. 20°C.

Fig. 3. The effect of concentration levels of various salts on the apparent viscosity of 0,5% ι-carrageenan solutions in 20°C.

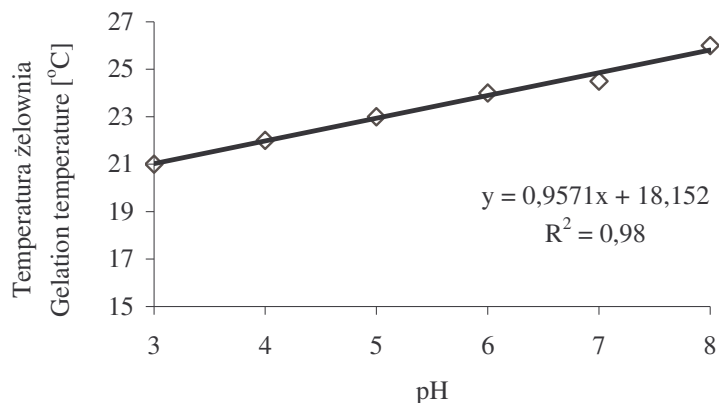
Rodzaj obecnej w układzie soli, jak i jej stężenie, miały duży wpływ na zmianę temp. żelowania 0,5% roztworów KK (rys. 4). Wzrost stężenia wszystkich zastosowanych soli powodował przesunięcie temp. żelowania ku wyższym wartościom. W obecności soli kationów jednowartościowych temperatura żelowania polisacharydu była niższa w porównaniu z roztworami CaCl<sub>2</sub>. Keogh i wsp. [9] stwierdzili niewielki wpływ wzrostu stężenia NaCl, z 0,6 do 1,2%, na zmianę temperatury żelowania κ-karagenu, podobne wyniki otrzymali przy zwiększeniu stężenia CaCl<sub>2</sub> z 0,06 do 0,12%. Również rodzaj formy jonowej κ-karagenu miał wpływ na temp. żelowania, która była najwyższa w przypadku soli sodowej tej frakcji karagenu (44°C), a najniższa w obecności soli potasowej (43,2°C) [1].

Temperatura żelowania JK była dużo wyższa w porównaniu z poprzednią frakcją karagenu i wynosiła od 48 do 73°C (rys. 5). Wzrost stężenia NaCl i KCl zwiększał temperaturę żelowania JK, jednak wzrost nie był tak duży jak w przypadku KK (rys. 5). W obecności CaCl<sub>2</sub> temp. żelowania wzrastała z 29°C (0,05 M) do 41°C (0,2 M), jednak roztwory zawierające stężenia soli >0,2 M nie żelowały w badanym zakresie temperatur. Nie stwierdzono wyraźnych różnic pomiędzy NaCl i KCl na zmianę temperatury żelowania JK.

Rys. 4. Wpływ rodzaju i stężenia soli na temperaturę żelowania 0,5% roztworów  $\kappa$ -karagenu.Fig. 4. The effect of concentration levels and type of salts on the gelation temperature of 0,5%  $\kappa$ -carrageenan solutions.Rys. 5. Wpływ rodzaju i stężenia soli na temperaturę żelowania 0,5% roztworów  $\iota$ -karagenu.Fig. 5. The effect of concentration levels and type of salts on the gelation temperature of 0,5%  $\iota$ -carrageenan solutions.

Znaczący wpływ wzrostu stężenia NaCl jak i CaCl<sub>2</sub> na zmianę temperatury żelowania  $\iota$ -karagenu zaobserwowali Koegh i wsp. [9]. Temperatura żelowania roztworów JK sporządzonych w obecności wszystkich badanych soli była wyższa niż w przypadku KK, co jest zgodne z wcześniejszymi informacjami o właściwościach żeli JK [3].

Zmiana pH środowiska również wpływała na temperaturę żelowania KK w 0,1 M NaCl (rys. 6). Wzrost pH z 3 do 8 powodował przesunięcie temp. żelowania z 21 do 26°C. Wyniki te nie są zgodne z wcześniejszymi badaniami nad wpływem pH na temperaturę żelowania KK, w których odczyn środowiska określono jako czynnik nieistotny [4]. W innych badaniach stwierdzono negatywny wpływ pH > 4,3 na właściwości reologiczne roztworów karagenu [8].



Rys. 6. Wpływ pH na temperaturę żelowania 0,5% roztworu  $\kappa$ -karagenu w 0,1 M NaCl.

Fig. 6. The effect of pH on the gelation temperature of 0,5%  $\kappa$ -carrageenan solutions in 0,1 M NaCl.

Teksturę żeli KK sporządzonych w środowiskach o różnych wartościach pH przedstawiono w tab. 2. Najtwardsze żele uzyskano w środowisku o pH 5 i 7, w pH kwaśnym żele tego galaktanu były słabsze. Spadek twardości żeli karagenu w pH kwaśnym mógł być spowodowany częściową hydrolizą polisacharydu, co sugerowano we wcześniejszych badaniach. Najbardziej kruchymi okazały się żele sporządzone w pH neutralnym, wraz ze spadkiem pH wartość względnego odkształcenia wzrastała (tab. 2).

Tabela 2

Wpływ pH na teksturę żeli 0,5%  $\kappa$ -karagenu sporządzonych w 0,1 M NaCl.

The effect of pH values on the texture of 0,5%  $\kappa$ -carrageenan gels in 0,1 M NaCl.

pH	Względne odkształcenie / Relative strain	Naprężenie niszczące / Shear stress [kPa]
pH 3	0,21 ± 0,02	4,20 ± 0,44
pH 4	0,26 ± 0,03	5,84 ± 0,37
pH 5	0,22 ± 0,02	6,96 ± 0,08
pH 7	0,15 ± 0,03	6,01 ± 0,44

W ostatnim etapie badań określono wpływ stężenia sacharozy na teksturę żeli KK sporządzonych w środowisku o pH 7, w obecności 0,1 M NaCl (tab. 3). Generalnie wraz ze wzrostem stężenia cukru zaobserwowano wzrost twardości żeli polisacharydu. Najtwardsze żele otrzymano przy 30% dodatku sacharozy, jednak były one bardzo kruche, niższe stężenia cukru wpływały natomiast na wyraźny wzrost elastyczności żeli karagenu. Pozytywny wpływ dodatku sacharozy na twardość żeli spowodowany był najprawdopodobniej wiązaniem przez sacharozę cząsteczek wody, co w rezultacie zwiększało liczbę wiązań pomiędzy cząsteczkami karagenu. Badania wpływu stężenia sacharozy na teksturę mieszanych żeli karagenu z galaktomannanami również wykazały dodatni wpływ na ich teksturę, ale do pewnego stężenia sacharozy [5].



Tabela 3

Wpływ stężenia sacharozy na teksturę żeli 0,5%  $\kappa$ -karagenu sporządzonych w 0,1M NaCl.  
The effect of the sucrose concentration on the texture of 0,5%  $\kappa$ -carrageenan gels in 0,1M NaCl.

Sacharoza Sucrose [%]	Względne odkształcenie Relative strain	Naprężenie niszczące Shear stress [kPa]
0	0,10 ± 0,01	6,88 ± 0,15
5	0,23 ± 0,03	5,17 ± 0,69
10	0,26 ± 0,02	11,36 ± 1,56
18	0,27 ± 0,01	8,76 ± 0,27
30	0,16 ± 0,03	11,36 ± 1,56

### Wnioski

1. Rodzaj obecnej w układzie soli, jak i jej stężenie, miały duży wpływ na zmianę temperatury żelowania 0,5% roztworów  $\kappa$ - i  $\iota$ -karagenu.
2. Wzrost stężenia wszystkich zastosowanych soli powodował przesunięcie temperatury żelowania ku wyższym wartościom w przypadku obu żelujących frakcji karagenu.
3. Wzrost pH środowiska wpływał na podwyższenie temperatury żelowania  $\kappa$ -karagenu i wzrost twardości jego żeli.
4. Dodatek sacharozy powodował wzrost twardości żeli  $\kappa$ -karagenu, jednak przy wysokich stężeniach cukru (30%) żele były bardzo kruche

### Literatura

- [1] Bourriot S., Garnier C., Doublier J.: Micellar casein-  $\kappa$ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carboh. Polym.*, 1999, **40**, 145-157.
- [2] Chen Y., Liao m-L., Dunstan D.: The rheology of  $K^+$ -  $\kappa$ -carrageenan as a weak gel, *Carboh. Polym.*, 2002, **50**, 109-116.
- [3] Chinachotti P.: Carbohydrates: functionality in foods. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, **61**, 922S-929S.
- [4] Drohan D., Tziboula A., McNulty D., Horne D.: Milk protein – carrageenan interactions. *Food Hydrocoll.*, 1997, **11**, 101-107.
- [5] Gustaw W., Achremowicz B., Mazurkiewicz J.: Właściwości reologiczne żeli  $\kappa$ -karagenu z dodatkiem galaktomannanów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2003, **1 (34)**, 25-38.
- [6] Gustaw W., Mleko S.: Właściwości funkcjonalne i zastosowanie karagenów w mleczarstwie. *Żywność. Technologia. Jakość*, 1998, **1 (14)**, 71-80.
- [7] Hermansson A-M., Eriksson E., Jordansson E.: Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behavior of kappa-carrageenan gels. *Carboh. Polym.*, 1991, **16**, 297-320.
- [8] Imeson E.: Thickening and gelling agents for food. *Bleckie Academic& Professional* 1997.
- [9] Keogh M., Laine K., O'Connor J.: Rheology of sodium caseinate-carrageenan mixtures. *J Text. Stud.*, 1995, **26**, 635-652.
- [10] Michel A., Mestdagh M, Axelos M.: Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *Internat. J Biol. Macromol.*, 1997, **21**, 195-200.

- [11] Norton I.: The influence of ionic environment and polymeric mixing on physical properties of iota and kappa carrageenan systems. *Gums and Stabilizers for the Food Industry* 5<sup>th</sup> Ed. 1989, pp. 511-514.
- [12] Singh S, Jacobsson S.: Kinetics of acid hydrolysis of kappa- carrageenan as determined by molecular weight (SEC-MALLS-RI), gel breaking strength and viscosity measurement. *Carboh. Polym.*, 1994, **23**, 89-103.
- [13] Stading M.: Rheological behaviour of biopolymer gels in relation to structure. *SIK-Report*, 1993, **594**, 1-49.
- [14] Yuguchi Y., Thuy T., Urakawa H., Kajiwara K.: Structural characteristic of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocoll.*, 2002, **16**, 515-522.
- [15] Yuguchi Y., Urakawa H., Kajiwara K.: Structural characteristic of carrageenan gels: types of counter ions. *Food Hydrocoll.*, 2003, **17**, 481-485.

#### EFFECT OF SOME SELECTED FACTORS ON THE GELATION OF κ- AND ι-CARRAGEENAN

##### S u m m a r y

The objective of this paper was to present the effect of concentration level of various cations, pH, and sucrose concentration level on the rheological properties of solutions and gels of some selected fractions of carrageenan. The rheological properties of various fractions of carrageenan were determined by measuring the viscosity and texture of the solutions and gels produced. The highest viscosity (450 mPa's) showed the polysaccharide solution in 0,15 M CaCl<sub>2</sub>. In the case of the two gelling fractions of carrageenan, the increase in the concentration level of all the salts used caused the increase in the gelation temperature. The range of the gelation temperature of ι-carrageenan was much higher than this of the κ-carrageenan fraction, and it was from 48°C to 73°C. However, the increase in pH impacted the increase in both the gelation temperature of κ-carrageenan and in the hardness of its gels. The increase in pH from 3 to 8 caused that the gelation temperature rose from 21°C to 26°C. When sucrose was added, the hardness of κ-carrageenan gels rose, however, the gels having high sugar concentration levels (30%) were very fragile.

**Key words:** iota carrageenan, kappa carrageenan, rheological properties ☒

HALINA STANIEK, JACEK ANIOŁA, JOLANTA CZARNOCIŃSKA

## **WPLYW ACETYLOWANEGO ADYPINIANU DISKROBIOWEGO NA WYBRANE WSKAŹNIKI ŻYWIENIOWE SZCZURA**

### **Streszczenie**

Badania miały na celu ocenę wpływu dodatku skrobi modyfikowanej do diety szczurów na wybrane wskaźniki żywieniowe oraz biodostępność witamin przeciwutleniających A i E.

Doświadczenie biologiczne przeprowadzono na 24 samcach szczurów rasy Wistar. Szczury podzielono na dwie grupy i żywiono przez okres 50 dni dietami półsyntetycznymi z dodatkiem skrobi. Diety grup zwierząt doświadczalnych różniły się rodzajem skrobi ziemniaczanej (niemodyfikowana lub modyfikowana chemicznie – acetylowany adypinian diskrobiowy), przy zalecanym, jednakowym poziomie witamin A i E.

Wykazano, że zastosowanie w diecie szczurów wysokiego dodatku skrobi modyfikowanej powodowało spadek wskaźnika wykorzystania diety i ograniczało przyrosty masy ciała szczurów, natomiast nie wpływało na zmniejszenie biodostępności witamin A i E.

**Słowa kluczowe:** skrobia modyfikowana, szczury, wykorzystanie diety, biodostępność, wit. A, wit. E

### **Wprowadzenie**

Do produkcji żywności szeroko wykorzystywane są preparaty skrobiowe, które pełnią przede wszystkim rolę dodatku funkcjonalnego. Skrobie natywne mają jednak ograniczone zastosowanie i często uniemożliwiają otrzymanie określonych produktów gotowych [2, 9, 12]. Dlatego w coraz większym stopniu zastępuje się je skrobiami chemicznie modyfikowanymi. Mimo szerokiego stosowania, wciąż istnieje stosunkowo mało informacji na temat biologicznej dostępności i wykorzystania przez organizm tego typu skrobi, a wyniki badań prowadzonych w tym zakresie są rozbieżne [2, 5, 7, 9]. Jeszcze mniej jest danych dotyczących oddziaływania skrobi modyfikowanych na inne składniki pożywienia.

Skrobie modyfikowane znalazły zastosowanie m.in. w produkcji żywności o obniżonej wartości energetycznej, gdzie są wykorzystywane jako zamienniki tłuszczu. Współczesne technologie żywności o obniżonej kaloryczności, np. margaryn, przewidują stosowanie skrobi modyfikowanych przy jednoczesnym wzbogacaniu tych

produktów w witaminy. Naukowcy [cyt. za 1, 13] zastanawiają się jednak, czy skrobie i jej modyfikowane pochodne, stosowane jako dodatki funkcjonalne, mogą wpływać dzięki odmiennej ich strawności na stopień strawności tłuszczu, a pośrednio na biodostępność witamin A i E.

W niniejszej pracy przeprowadzono doświadczenie biologiczne na szczurach laboratoryjnych, mające na celu określenie wpływu dodatku skrobi modyfikowanej do diet na wybrane wskaźniki żywieniowe oraz biodostępność witamin przeciwutleniających A i E.

### **Materiał i metody badań**

Badania zrealizowano na 24 6-tygodniowych samcach szczurów białych rasy Wistar o początkowej masie ciała około  $184 \pm 7$  g. Zwierzęta przebywały w indywidualnych klatkach, w pomieszczeniu ze sztucznym oświetleniem (12-godzinny cykl świetlny), z temperaturą  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  i stałą wilgotnością względną 50–60% (zgodą Lokalnej Komisji Etycznej w Poznaniu nr 89/2001).

Zwierzęta podzielono na dwie równoliczne grupy i żywiono przez okres 50 dni półocyszczonymi dietami różniącymi się rodzajem skrobi ziemniaczanej, przy zalecanym poziomie witamin A i E w diecie szczurów doświadczalnych, wynoszącym 2000 j.m. (tj. 1,07 mg witaminy A w postaci palmitynianu retinyli oraz 10 j.m. witaminy E (10 mg octanu  $\alpha$ - tokoferolu) na 100 g diety [6]). Dieta podstawowa zawierała: 20% kazeiny, 10% smalcu, 10% cukru, 5% skrobi ziemniaczanej, 4% mieszanki mineralnej i 1% mieszanki witaminowej oraz 50% badanych skrobi. W diecie zastosowano mieszankę soli mineralnych oraz mieszankę pozostałych witamin przygotowaną według zaleceń AOAC z 1975 roku [cyt. za 6]).

W doświadczeniu zastosowano dwa rodzaje skrobi: acetylowany adypinian diskrobiowy (E 1422) ze skrobi ziemniaczanej, rozpuszczalny na zimno (poddany obróbce hydrotermicznej); stopień podstawienia (DS – degree of substitution) grup adypinianowych DS = 0,002 i grup acetylenowych DS = 0,06 czyli około 1,5% oraz niemodyfikowaną skrobię ziemniaczaną również rozpuszczalną na zimno. Obie skrobie wyprodukowano w Centralnym Laboratorium Przemysłu Ziemniaczanego w Luboniu koło Poznania.

Podczas całego doświadczenia szczury otrzymywały wodę i pokarm *ad libitum*. Każdego dnia rejestrowano spożycie diety i ilość niewyjadków, a co 7 dni przeprowadzano kontrolne ważenie zwierząt. Na podstawie kumulatywnego spożycia diety i przyrostów masy ciała obliczano wskaźnik wykorzystania diety. Jako miernik efektywności żywienia przyjęto za Fitzpatrickiem i wsp. [4] wielkość przyrostu masy ciała zwierząt po spożyciu 100 g diety. W 21. dniu doświadczenia dokonano pomiaru czasu pasażu treści pokarmowej, metodą wskaźnikową z użyciem 1g tlenku chromu(III) na 100 g diety.

Po zakończeniu okresu karmienia szczury uśpiono iniekcją dootrzewnową Thiopentalem w dawce 40 mg/kg masy ciała i wykonano sekcję zwierząt. Pobrano

krew do heparynizowanych próbek i odwirowano, w celu uzyskania osocza do analiz biochemicznych oraz wypreparowano wątrobę, która stanowiła materiał do natychmiastowego oznaczenia zawartości witamin A i E.

Do oznaczeń analitycznych witamin A i E stosowano metodykę oznaczania retinolu, tokoferoli i tokotrienoli w osoczu oraz tkankach wg Uedy i Igarashi'ego [14], z zastosowaniem HPLC.

Uzyskane wyniki poddano weryfikacji statystycznej testem t-Studenta w układzie zmiennych niezależnych przy istotności  $\alpha=0,05$  za pomocą programu „Statistica 6.0”.

### Wyniki i dyskusja

Średnie wartości badanych wskaźników wraz z odchyleniem standardowym przedstawiono w tab. 1. oraz na rys. 1. i 2. Wartości średnie różniące się między sobą istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ ) oznaczono odmiennymi indeksami literowymi (a, b lub A, B).

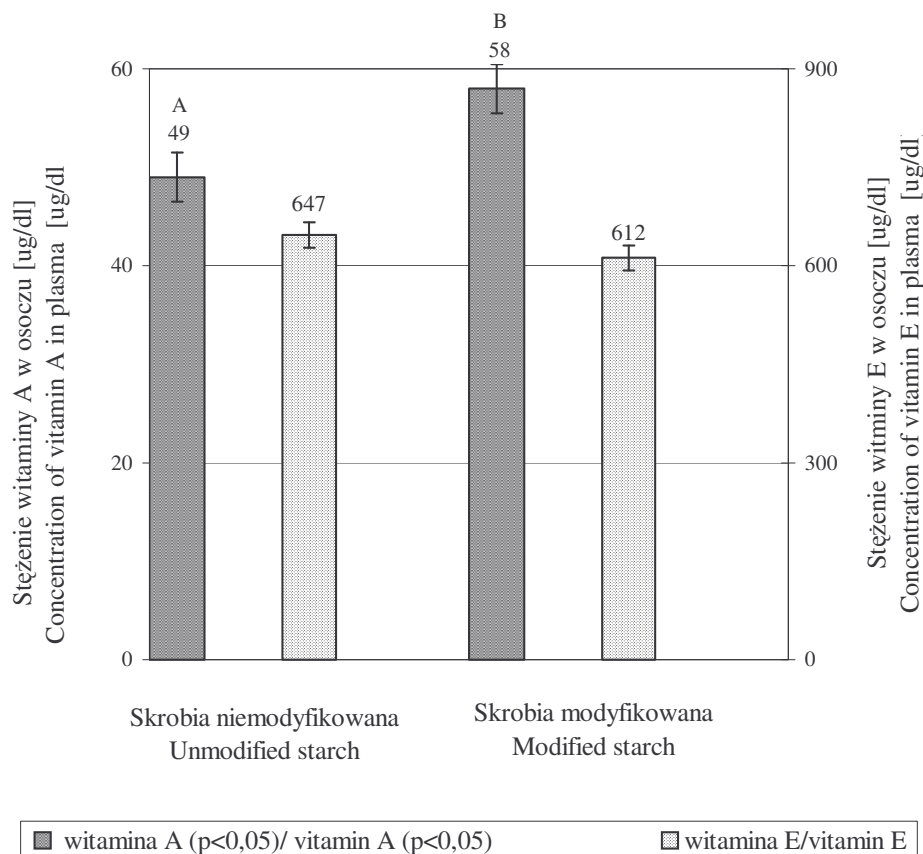
Tabela 1

Wpływ rodzaju skrobi na wybrane wskaźniki żywieniowe.  
Effect of a starch type on the selected nutritional parameters.

Parametr Parameter	Rodzaj skrobi Type of starch		Względna wartość oddziaływania Relative value of interaction [%]
	Niemodyfikowana Unmodified	Modyfikowana Modified	
Spożycie [g/24 h] Diet intake [g/24 h]	25,35±0,66	23,74±0,81	- 6,4
	n.s.*		
Przyrost masy ciała [g/24 h] Body weight gain [g/24 h]	5,69±0,19 <sup>a</sup>	4,16±0,24 <sup>b</sup>	- 26,9
	p < 0,05		
Wskaźnik wykorzystania diety [g/100 g] Food conversion efficiency [g/100 g]	22,42±0,45 <sup>a</sup>	17,48±0,55 <sup>b</sup>	- 22,0
	p < 0,05		
Czas pasażu [min] Transit time [min]	664±25	630±31	- 5,1
	n.s.		

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\* n.s.– nieistotnie statystycznie / statistically insignificant



Rys. 1. Wpływ rodzaju skrobi na stężenie witaminy A i E w osoczu krwi szczurów.

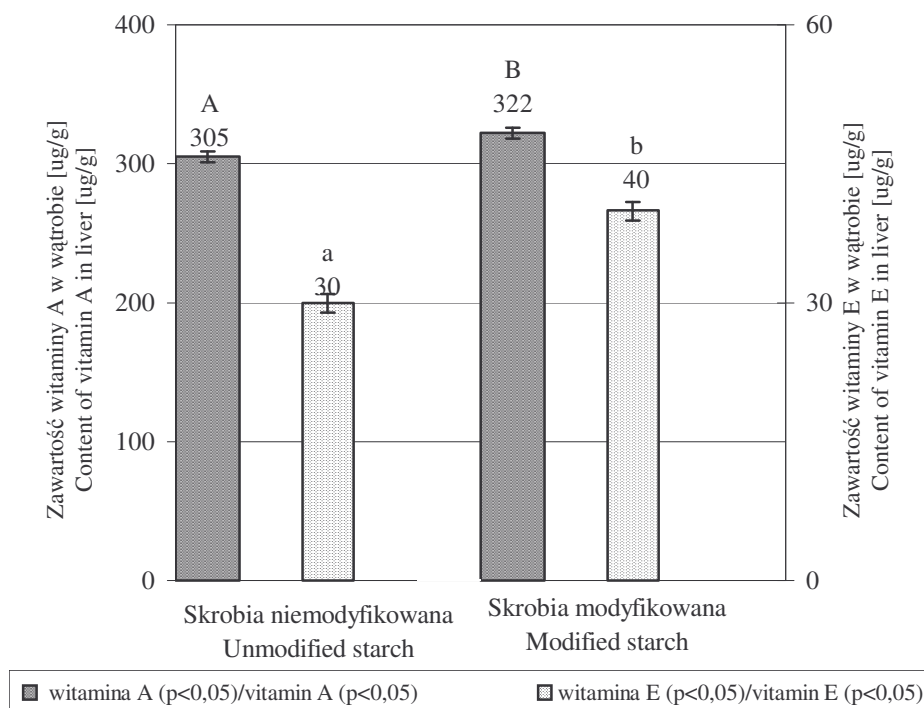
Fig. 1. Effect of a starch type on concentration levels of vitamins A and E in the blood plasma of rats.

Nie stwierdzono wpływu rodzaju skrobi na ilość spożytego przez szczury pokarmu. Wykazano jednak statystycznie istotne oddziaływanie tego czynnika na przyrost masy ciała i wskaźnik wykorzystania diety przez zwierzęta. Szczury skarmiane skrobią modyfikowaną chemicznie uzyskały istotnie mniejsze przyrosty masy ciała ( $4,16 \pm 0,24$  g/24 h), w porównaniu ze szczurami karmionymi skrobią niemodyfikowaną ( $5,69 \pm 0,19$  g/24 h). Dodatek skrobi modyfikowanej do diety zmniejszył efektywność żywienia o 22,0%, w odniesieniu do diety zawierającej skrobię niepoddaną modyfikacji chemicznej.

U zwierząt otrzymujących z paszą skrobię ziemniaczaną modyfikowaną obserwowano krótsze okresy tranzytu treści pokarmowej, jednak różnice nie okazały się statystycznie istotne.

W celu oceny wpływu rodzaju skrobi na biodostępność witamin A i E dla organizmu, oznaczono zawartość tych witamin w osoczu i wątrobie (rys. 1. i 2). Szczury karmione dietą z dużym dodatkiem acetylowanego adypinianu diskrobiowego wykazywały znamienne większą zawartość witaminy A zarówno w osoczu ( $58 \pm$

3  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), jak i w wątrobie ( $322 \pm 5 \mu\text{g}/\text{g}$ ), aniżeli szczury żywione skrobią niemodyfikowaną, odpowiednio ( $49 \pm 2 \mu\text{g}/\text{dl}$  i  $305 \pm 4 \mu\text{g}/\text{g}$ ). Stwierdzono również istotnie większą zawartość witaminy E w wątrobach zwierząt żywionych skrobią modyfikowaną ( $40 \pm 1 \mu\text{g}/\text{g}$ ), w porównaniu z ilością tego składnika oznaczoną w wątrobach szczurów karmionych skrobią niemodyfikowaną ( $30 \pm 1 \mu\text{g}/\text{g}$ ). Natomiast rodzaj skrobi w diecie nie miał istotnego wpływu na zawartość witaminy E w osoczu.



Rys. 2. Wpływ rodzaju skrobi na zawartość witaminy A i E w wątrobie szczurów.

Fig. 2. Effect of a starch type on the content of vitamins A and E in the liver of rats.

Doniesienia literaturowe dotyczące wpływu spożycia modyfikowanych skrobi na powyższe parametry są niejednoznaczne [3, 10, 15]. Mniejsze przyrosty masy ciała wśród zwierząt karmionych modyfikowaną skrobią opisywał Groot i wsp. [7], jako wynik ich niższej strawności [2, 8]. Z kolei Zhou i Kaplan [15] nie obserwowali różnic w masach ciał szczurów spożywających niemodyfikowane i modyfikowane skrobie.

Można przypuszczać, że mniejsze przyrosty masy ciała i efektywność żywienia w grupach zwierząt karmionych acetylowanym adypinianem diskrobiowym powodowane były mniejszą strawnością badanych skrobi, na którą mógł wpłynąć stopień usieciowania skrobi. Wskazywałby na to również nieznacznie krótszy czas pasażu treści pokarmowej u szczurów otrzymujących modyfikowaną skrobię, sugerujący niższą strawność tego preparatu w porównaniu ze strawnością skrobi niemodyfikowanej.

Derache [2] na podstawie swoich badań stwierdził, że skrobie acetylowane ulegają trawieniu w ponad 90%, przy czym ich strawność maleje ze wzrostem stopnia acetylowania. Skrobia acetylowana w niewielkim stopniu (1,6% acetylacji) jest hydrolizowana *in vitro* przez pankreatynę w 93%, a gdy acetylacja wynosi 2,3% tylko w 62%. Odmienne wyniki w kwestii acetylacji i jej wpływu na strawność skrobi uzyskali Liu i wsp. [11], którzy wykazali, że acetylacja powoduje wzrost strawności skrobi.

Lillford i Norton [10] stwierdzili, że wprowadzenie do produktów spożywczych skrobiowych dodatków polimerowych, pochodzących ze źródeł naturalnych, jest bezpieczne dla zdrowia pod warunkiem, że nie są one spożywane w nadmiarze.

Nie ma wcześniejszych danych eksperymentalnych opisujących wpływ modyfikacji chemicznej skrobi na biodostępność witamin A i E, w związkach używanych przy wzbogacaniu żywności. Jednak de Schrijver i wsp. [13] wskazują na wpływ skrobi odpornej na obniżenie strawności tłuszczu, co może powodować zmniejszenie ich wchłaniania z przewodu pokarmowego. Dodatkowo Rabe [cyt. za 1] uważa, że podczas przetwarzania mogą powstawać połączenia skrobi i tłuszczu, które są trudniej trawione, co w konsekwencji może powodować mniejszą dostępność witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, a wyższy poziom witamin A i E w wątrobie i witaminy A w osoczu krwi szczurów żywionych dietą z dodatkiem acetylowanego adypinianu diskrobiowego, może nawet świadczyć o wręcz odwrotnym zjawisku.

Wyniki niniejszych badań pozwalają stwierdzić, że duży dodatek acetylowanego adypinianu diskrobiowego, wynoszący ponad 50% całkowitej masy diety, nie wpływa negatywnie na przyswajanie badanych witamin rozpuszczalnych w tłuszczach.

## Wnioski

1. Zastosowanie w diecie 50-procentowego udziału acetylowanego adypinianu diskrobiowego przyczynia się do spadku wskaźnika wykorzystania diety i ogranicza przyrosty masy ciała szczurów.
2. Duży dodatek skrobi modyfikowanej nie wpływa negatywnie na biodostępność witamin A i E.

## Literatura

- [1] Cierpikowska M., Drywień M.: Skrobia oporna jako składnik żywności: wartość odżywcza i właściwości fizjologiczne. *Żyw. Czł. Met.*, 1999, **26**, **2**, 147-155.
- [2] Derache R.: Amidons modifies: donees nutritionnelles et toxicologiques. *Méd. et Nutr.*, 1983, **3**, 195-202.
- [3] Ebihara K., Shiraishi R., Okuma K.: Hydroksypropyl-modified potato starch fecal bile acid excretion in rats. *J. Nutr.*, 1998, **5**, 848-854.
- [4] Fitzpatrick D. W., Bannerman S.A., Ready A. E., Bruce V. M.: The effects of diet and exercise training on growth, body composition, and blood lipid levels in rats. *Nutr. Res.*, 1986, **6**, **7**, 837-847.
- [5] Galiński G., Gawęcki J., Lewandowicz G.: Strawność *in vitro* skrobi natywnych i modyfikowanych bez i z dodatkiem środków słodzących. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **3** (24), 69-77.



- [6] Gawęcki J., Jeszka J.: Żywnienie człowieka. Ćwiczenia. PWN. Warszawa 1995.
- [7] Groot A. P., Til H. P., Feron V. J., Dreef-van der Meulen H. C., Willems M. I.: Two-year feeding and multigeneration studies in rats on five chemically modified starches. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1974, **12**, 651-663.
- [8] Kishida T., Nakai Y., Ebihara K.: Hydroxypropyl-distarch phosphate from Tapiocastrach reduces zinc and iron absorption in rats. *J. Nutr.*, 2001, **131**, **2**, 294-300.
- [9] Lewandowicz G., Walkowski A.: Aspekty żywieniowe i toksykologiczne stosowania skrobi modyfikowanych. *Przem. Spoż.*, 1994, **11**, 365-368.
- [10] Lillford P. J., Norton J. T.: High molecular weight food additives: where are we going? *Trends in Food Sci. Technol.*, 1994, **5**, **6**, 196-198.
- [11] Liu H., Lawrence R., Corke H.: Physical properties and enzymatic digestibility of acetylated *ae, wx*, and normal maize starch. *Carbohydr. Polym.*, 1997, **34**, 283-289.
- [12] Luallen A.: Zastosowanie skrobi w mrożonych preparatach spożywczych. *Food Technol.*, 1994, **48**, **5**, 39-43.
- [13] De Schrijver R., Vanhoof K., Vande Ginste J.: Nutrient utilization in rats and pigs fed enzyme resistant starch. *Nutr. Res.*, 1999, **19**, **9**, 1349-1361.
- [14] Ueda T., Igarashi O.: Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC - pretreatment of samples and extraction of tocoferols. *J. Micronutr. Anal.*, 1990, **7**, 79-96.
- [15] Zhou X., Kaplan M.: Soluble amylose cornstarch is more digestible than soluble amylopectin potato starch in rats. *J. Nutr.*, 1997, **127**, **7**, 1349-1356.


#### THE EFFECT OF ACETYLATED DISTARCH ADIPATE ON SOME SELECTED NUTRITIONAL PARAMETERS IN THE RAT

##### S u m m a r y

The objective of the investigations was to access the effect of modified starch added to the diet of rats on some selected nutritional parameters, as well as on the bioavailability of antioxidant vitamins A and E.

The biological experiments were performed using 24 male rats of a Wistar race. The rats were divided into two groups, and fed using semi-purified diets containing starch addition, during a period of 50 days. The diets applied to experimental animals differed in the type of potato starch (non-modified or chemically modified, i.e. an acetylated distarch adipate), but the levels of vitamins A and E in the diets were identical as recommended.

It was stated that the addition of high amounts of modified starch to the diet of rats caused a decrease in the food conversion efficiency, and it also limited rates of body mass gain in rats; though, it did not produce any effect of reducing the bioavailability of vitamins A and E.

**Key words:** modified starch, rats, food conversion efficiency, bioavailability, vitamin A, vitamin E 

IWONA ŚCIBISZ, MARTA MITEK

**AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA I ZAWARTOŚĆ  
ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W DŻEMACH OTRZYMANYCH  
Z OWOCÓW BORÓWKI WYSOKIEJ (*VACCINIUM CORYMBOSUM L.*)  
ORAZ ICH ZMIANY PODCZAS PRZECHOWYWANIA**

Streszczenie

Celem pracy było określenie aktywności przeciwutleniającej oraz zawartości składników kształtujących tę aktywność, tj. polifenoli ogółem i antocyjanów, w dżemach otrzymanych z owoców borówki wysokiej. Ponadto zbadano wpływ warunków i czasu przechowywania na zawartość związków o charakterze przeciwutleniającym w uzyskanych dżemach.

Badaniami objęto trzy rodzaje dżemów: niskosłodzony o ekstrakcie 38%, niskosłodzony z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego o ekstrakcie 38% oraz dżem wysokosłodzony o ekstrakcie 65%. Otrzymane dżemy przechowywano w temp. 6 i 22°C bez dostępu światła przez okres 6 miesięcy. Część analityczna obejmowała charakterystykę podstawowego składu chemicznego owoców i dżemów. Ponadto w otrzymanych przetworach po 2, 4 i 6 miesiącach przechowywania oznaczono aktywność przeciwutleniającą z rodnikami ABTS oraz zawartość polifenoli ogółem i antocyjanów.

Dżemy otrzymane z owoców borówki wysokiej charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwutleniającą w zakresie od 17,2 do 20,3  $\mu\text{M}$  Troloxu/g produktu. Podczas procesu technologicznego, w dżemach z borówki wysokiej następował spadek zawartości polifenoli, w tym także antocyjanów, co wpłynęło na obniżenie aktywności przeciwutleniającej badanych produktów. Najwyższe, prawie 50-procentowe straty obserwowano w przypadku antocyjanów. Przechowywanie dżemów przez okres 6 miesięcy spowodowało spadek aktywności przeciwutleniającej o 33 do 63%, w zależności od rodzaju dżemu i temperatury przechowywania. Najmniejszy spadek zawartości barwników antocyjanowych podczas przechowywania obserwowano w dżemach wysokosłodzonych, co może wynikać ze stabilizującego działania wyższych stężeń cukru.

**Słowa kluczowe:** aktywność przeciwutleniająca, polifenole, antocyjany, borówka wysoka, dżem, przechowywanie

## Wprowadzenie

Zasobnym źródłem naturalnych przeciwutleniaczy są owoce jagodowe, w tym także borówka wysoka, zwana potocznie amerykańską [18, 24, 25]. Owoce te, uznawane w naszym kraju za typowo deserowe, ze względu na stale powiększający się areal ich uprawy, mogą już niedługo stać się doskonałym surowcem dla przemysłu. Jednym z możliwych kierunków przerobowych tych owoców jest produkcja dżemów [23]. Właściwości przeciwutleniające owoców borówek ulegać mogą znacznemu zmniejszeniu podczas przetwarzania i przechowywania produktów, co wynika głównie z przemian związków polifenolowych, zwłaszcza antocyjanów [11, 12]. Dotychczas w Polsce nie prowadzono badań nad stabilnością związków przeciwutleniających owoców borówki wysokiej podczas ich przetwarzania oraz przechowywania uzyskanych przetworów.

Celem pracy było określenie aktywności przeciwutleniającej oraz zawartości składników kształtujących tę aktywność, tj. polifenoli, w tym antocyjanów, w dżemach otrzymanych z owoców borówki wysokiej. Ponadto zbadano wpływ warunków i czasu przechowywania na zawartość związków o charakterze przeciwutleniającym w uzyskanych produktach.

## Materiał i metody badań

Do produkcji dżemów użyto owoców borówki wysokiej odmiany Bluecrop, pochodzących z Gospodarstwa Sadowniczego w Piskórcie koło Prażmowa. Zbioru dokonano 10 sierpnia 2003 roku. Zagęszczony sok jabłkowy otrzymano od producenta soków, z jabłek pochodzących z rejonu Grójca. Część technologiczna obejmowała opracowanie receptury i wyprodukowanie trzech rodzajów dżemów: niskosłodzonego o ekstrakcie 38%, niskosłodzonego z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego o ekstrakcie 38% oraz dżemu wysokosłodzonego o ekstrakcie 65%. Dżemy wyprodukowano w warunkach laboratoryjnych według receptury podanej w tab. 1. Odważone owoce wraz z cukrem, częścią wody i ewentualnie zagęszczonym koncentratem jabłkowym (o ekstrakcie 64% i kwasowości 2,6 g kwasu cytrynowego/100 g) gotowano w naczyniu otwartym przez 20 min, w temp. 98–100°C do momentu wysycenia borówek cukrem. Następnie dodawano uprzednio przygotowany roztwór substancji żelujących, całość dokładnie mieszano i gotowano przez kolejne 10 min. Jako substancje żelujące stosowano pektynę niskometylowaną LM 102 (dżemy niskosłodzone) oraz pektynę wysokometylowaną WE 5 (dżem wysokosłodzony). Pod koniec procesu dodawano kwas cytrynowy. Po wymieszaniu masy dżemowej rozlewano ją do szklanych słoików o pojemności 0,2 l. Otrzymane dżemy poddawano pasteryzacji w temp. 95°C przez 20 min, po czym chłodzono je do

temp. pokojowej ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) Dżemy przechowywano w temp.  $6 \pm 22^\circ\text{C}$  bez dostępu światła przez 6 miesięcy.

Tabela 1

Skład recepturowy surowców użytych do produkcji dżemów z owoców borówki wysokiej.  
Prescription ingredients of raw materials used to manufacture highbush blueberry jams.

Rodzaj dżemu Type of jam	Składniki użyte do produkcji dżemów [g/1000 g dżemu] Ingredients [g/1000 g jam]						
	Owoce borówek Blueberries	Sacharoza Sucrose	Pektyna WE 5 Pectin WE 5	Pektyna LM 102 Pectin LM 102	Zagęszczony sok jabłkowy Apple concentrated	Kwas cytrynowy Citric acid	Woda Water
Niskosłodzony Low-sugar jam	480	300	–	7,0	–	8,0	205
Niskosłodzony z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego Low-sugar jam with concentrated apple juice added	480	65	–	7,0	380	–	68
Wysokosłodzony High sugar jam	445	542	5,0	–	–	8,0	–

Część analityczna obejmowała charakterystykę podstawowego składu chemicznego owoców oraz otrzymanych dżemów. Zawartość ekstraktu refraktometrycznego określano za pomocą refraktometru Abbego, kwasowość miareczkową oznaczano metodą potencjometryczną i wyrażano w procentach kwasu cytrynowego, a do oznaczenia zawartości cukrów bezpośrednio redukujących i sacharozy zastosowano metodę Luffa-Schoorla [4]. Ponadto w dżemach po 2, 4 i 6 miesiącach przechowywania oznaczano aktywność przeciwutleniającą z rodnikami ABTS, wytwarzanymi z syntetycznego substratu – kwasu 2,2'-azino-bis(3-etylbentiazolino-6-sulfonowego) pod wpływem methemoglobiny aktywowanej przez nadtlenek wodoru [15] oraz zawartość polifenoli ogółem i antocyjanów. Zawartość polifenoli ogółem oznaczano metodą z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a, w której czynnikiem ekstrahującym był 75% wodny roztwór acetonu. Wyniki podano w przeliczeniu na kwas galusowy [16]. Antocyjany ogółem oznaczano metodą polegającą na określeniu różnicy absorbancji roztworów o pH 1 (forma oksoniowa) oraz pH 4,5 (forma pseudozasadowa) [6]. Wyniki podano w przeliczeniu na cyjanidyno-3-glukozyd.

Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu trzyczynnikowej analizy wariancji. Do porównania średnich posłużono się testem Tukey`a przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

### Wyniki i dyskusja

Podstawą do opracowania receptury dżemów był skład chemiczny owoców borówki wysokiej przedstawiony w tab. 2. Owoce odmiany Bluecrop charakteryzowały się wysokim ekstraktem refraktometrycznym wynoszącym 14,5%. Otrzymane wyniki są wyższe od zawartości ekstraktu tej odmiany owoców uprawianych w Niemczech w latach 1993–1997, wynoszącej od 12,3 do 13,9% [8]. Również w polskim piśmiennictwie podawana jest mniejsza zawartość ekstraktu w tej odmianie borówek, mieszcząca się w zakresie od 10,0 do 13,5% [13, 21]. Wyższa zawartość ekstraktu w badanych owocach wynika prawdopodobnie z warunków pogodowych (niewielkich opadów i wysokich temperatur) podczas dojrzewania owoców. Podstawowym składnikiem ekstraktu są cukry reprezentowane głównie przez glukozę i fruktozę oraz niewielkie ilości sacharozy [9]. Owoce jagodowe zawierają niewielką ilość sacharozy, podobnie jak badane w pracy owoce borówki, w których stanowi ona zaledwie 5% cukrów ogółem. Kwasowość miareczkowa owoców w przeliczeniu na kwas cytrynowy wynosiła 0,5%. Zawartość ta jest zbliżona do wyników podawanych przez Sapersa i wsp. [19] oraz Skupień [21]. Jednak badania prowadzone przez Lenartowicza i wsp. [13] wskazują na wyższą kwasowość owoców tej odmiany, wynoszącą 1,12–1,29. Rozbieżności te wynikają z różnego stopnia dojrzałości badanych owoców, gdyż podczas dojrzewania borówek następuje spadek zawartości kwasów organicznych. [14].

Owoce borówki wysokiej charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwutleniającą, wyróżniającą je spośród innych owoców. Oznaczona w niniejszej pracy aktywność przeciwutleniająca owoców wynosiła 40,2  $\mu\text{M}$  Troloxu/g. Według Prior i wsp. [18], aktywność owoców borówki wysokiej waha się od 17 do 43  $\mu\text{M}$  Troloxu/g. Natomiast Kalt i wsp. [10] podają znacznie wyższe wartości, wynoszące nawet 60,1  $\mu\text{M}$  Troloxu/g. Liczne badania dowodzą, że aktywność przeciwutleniająca borówek zależy od wielu czynników, takich jak: odmiana, wielkość owoców, warunki klimatyczne i agrotechniczne uprawy, warunki i czas przechowywania ich po zbiorze, a także stosowana metoda oznaczenia aktywności [3, 10, 12, 18]. Według Priora i wsp. [18] oraz Zhenga i Wanga [25], aktywność przeciwutleniająca owoców borówki wysokiej kształtowana jest głównie przez związki polifenolowe, a tylko w bardzo niewielkim stopniu przez witaminę C. Niewielka ilość tego składnika w otrzymanych dżemach spowodowała, że nie uwzględniono tego wyróżnika w omawianym doświadczeniu.

Ogólna zawartość polifenoli w owocach wynosiła 599,3 mg/100 g. Według Connor i wsp. [3], owoce odmiany Bluecrop charakteryzują się mniejszą zawartością polifenoli ogółem, wynoszącą w zależności od miejsca uprawy od 295 do 461 mg%. Również Ehlenfeldt i wsp. [5] uzyskali mniejszą zawartość polifenoli w owocach tej odmiany, wynoszącą 480 mg%. Uzyskane w pracy wyższe wartości mogą wynikać z zastosowania innej, w stosunku do wyżej wymienionych autorów, metody analitycznej.

Tabela 2

Podstawowy skład chemiczny owoców borówki wysokiej i dżemów z nich otrzymanych.  
Basic chemical composition of the highbush blueberry fruits and jams manufactured from them.

Skład chemiczny Chemical composition	Owoce Fruits	Dżem niskosłodzony Low-sugar jam	Dżem niskosłodzony z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego Low-sugar jam with concentrated apple juice added	Dżem wysokosłodzo- ny High sugar jam
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Ekstrakt refraktometryczny Soluble solids [%]	14,5 ± 0,5	39,0 ± 0,5	41,0 ± 0,4	64,0 ± 0,5
Kwasowość miareczkowa Titration acidity [%]	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1
pH	3,5 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Cukry bezpośrednio redukujące Directly reducing saccharides [%]	13,7 ± 0,2	28,6 ± 0,3	30,9 ± 0,5	41,2 ± 0,4
Sacharoza Saccharose [%]	0,6 ± 0,1	9,0 ± 0,3	7,8 ± 0,1	19,1 ± 0,4
Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity [ $\mu$ M Troloxu/g]	40,2 ± 0,8	18,6 ± 0,4	20,3 ± 0,1	17,2 ± 0,3
Polifenole ogółem Total polyphenols [mg/100 g]	599,3 ±4,6	284,1 ± 3,1	356,5 ± 2,3	268,4 ± 1,5
Antocyjany ogółem Total anthocyanins [mg/100 g]	159,4 ±1,1	48,6 ± 0,8	37,9 ± 0,6	34,7 ± 0,5

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

Istotny wpływ na aktywność przeciwutleniającą owoców borówki wysokiej ma zawartość antocyjanów [18]. W badanych owocach wynosiła ona 159,4 mg%. Zawartość antocyjanów w borówkach w dużym stopniu zależy od wielkości owoców, gdyż barwniki te zlokalizowane są głównie w skórce [12]. W badaniach Lenartowicza i wsp. [13] zawartość antocyjanów w owocach odmiany Bluecrop była mniejsza i wynosiła 105 i 116 mg%, przy czym badane przez nich owoce były o kilkanaście procent większe od borówek będących surowcem w niniejszej pracy.

Charakterystykę podstawowego składu chemicznego dżemu niskosłodzonego z założonym ekstraktem 38%, dżemu z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego (ekstrakt 38%) oraz dżemu wysokosłodzonego (ekstrakt 65%) przedstawiono w tab. 2. Otrzymane dżemy charakteryzowały się wartościami ekstraktu i kwasowości bardzo zbliżonymi do danych założonych. Wartości te zawierają się także w granicach tolerancji proponowanych przez PN-94/A-75100 [17]. Zawartość cukrów w badanych dżemach była zróżnicowana w zależności od rodzaju dżemu, i wynikała z różnej ilości sacharozy w składzie recepturowym. Otrzymane produkty charakteryzowały się niską zawartością sacharozy, co prawdopodobnie spowodowane było jej hydrolizą do cukrów prostych w czasie produkcji dżemów.

Aktywność przeciwutleniająca dżemów kształtowała się w zależności od składu recepturowego od 17,2 do 20,3  $\mu\text{M}$  Troloxu/g. Zastąpienie kwasu cytrynowego zagęszczonym sokiem jabłkowym wpłynęło na wzrost aktywności otrzymanego dżemu. Z przeprowadzonego bilansu owoców, uwzględniając straty technologiczne powstałe na skutek odparowania przede wszystkim wody podczas gotowania dżemów w kotle otwartym, obliczono, że straty aktywności przeciwutleniającej podczas produkcji dżemu niskosłodzonego wyniosły 8%, natomiast w przypadku dżemu wysokosłodzonego 9%.

Zawartość polifenoli ogółem w badanych dżemach mieściła się w zakresie od 268,4 do 356,5 mg%. Największą zawartością polifenoli charakteryzował się dżem niskosłodzony z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego, będącego dodatkowym, oprócz owoców borówki, źródłem związków polifenolowych. Proces produkcji dżemów spowodował nieznaczny spadek zawartości polifenoli wynoszący 4% w dżemie wysokosłodzonym i 6% w dżemie niskosłodzonym. Zbliżone wyniki otrzymali Amakura i wsp. [1], którzy stwierdzili około 10-procentowy spadek zawartości polifenoli podczas produkcji dżemów z owoców jagodowych.

Wysoka temperatura stosowana podczas gotowania dżemów oraz ich pasteryzacji spowodowały stosunkowo wysokie, bo sięgające 50%, straty barwników antocyjanowych. Otrzymane dżemy zawierały od 48,6 do 34,7 mg antocyjanów w 100 g produktu. Sapers i wsp. [20] wykazali, że proces gotowania dżemów z owoców borówki wysokiej powodował 10-procentowy spadek zawartości antocyjanów. Podobne wartości podczas produkcji dżemów z borówek uzyskali Amakura i wsp. [1].



Większą degradację antocyjanów, na poziomie 38%, zaobserwowali Garcia-Viguera i wsp. [7] podczas produkcji dżemów truskawkowych. Niższa degradacja antocyjanów stwierdzona przez innych autorów wynika z krótszego czasu gotowania dżemów w porównaniu z zastosowanym w niniejszej pracy. Zawartość antocyjanów w otrzymanym dżemie niskosłodzonym była o 20% większa niż w dżemie o takim samym wsadzie owocowym, ale z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego. Zagęszczony sok jabłkowy zawiera związki fenolowe łatwo ulegające utlenieniu (katechiny, pochodne floretyny, procyanidyny, kwas chlorogenowy), które mogły reagować z antocyjanami borówek, tworząc nierozpuszczalne polimery. Na taki kierunek przemian wskazują Sokół-Łętowska i wsp. [22], którzy w sokach jabłkowo-aroniowych stwierdzili większy przyrost spolimeryzowanych antocyjanów niż w samym soku aroniowym. Udział polimerów był tym większy, im większy był udział soku jabłkowego w próbkach.

Tabela 3

Wpływ temperatury i okresu przechowywania na aktywność przeciwutleniającą dżemów otrzymanych z owoców borówki wysokiej.

The effect of storage time and storage temperature on the antioxidant activity of jams manufactured from highbush blueberry fruits.

Rodzaj dżemu Type of jam	Aktywność przeciwutleniająca [ $\mu\text{M}$ Troloxu/g] Antioxidant activity [ $\mu\text{M}$ Trolox eq/g]							
	Okres przechowywania [miesiące] w temp. 6°C Storage duration [months] at 6°C				Okres przechowywania [miesiące] w temp. 22°C Storage duration [months] at 22°C			
	0	2	4	6	0	2	4	6
Dżem niskosłodzony Low-sugar jam	18,6	14,6	13,1	10,5	18,6	13,7	9,3	6,7
Dżem niskosłodzony z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego Low-sugar jam with concentrated apple juice added	20,3	17,4	15,6	13,0	20,3	16,7	14,2	9,3
Dżem wysokosłodzony High sugar jam	17,2	14,7	12,3	11,5	17,2	13,4	12,7	8,8

NIR<sub>0,05</sub> rodzaj dżemu / temperatura i czas przechowywania = 0,41

LSD<sub>0,05</sub> type of jam/time and temperature of storage = 0,41

NIR<sub>0,05</sub> temperatura przechowywania / rodzaj dżemu i czas przechowywania = 0,34

LSD<sub>0,05</sub> temperature of storage / type of jam and time of storage = 0,34

NIR<sub>0,05</sub> czas przechowywania / rodzaj dżemu i temperatura przechowywania = 0,45

LSD<sub>0,05</sub> time of storage / type of jam and temperature of storage = 0,45



W pracy określono także wpływ temperatury i czasu przechowywania na aktywność przeciwutleniającą otrzymanych dżemów (tab. 3). Na podstawie analizy statystycznej dowiedziono, że na aktywność przeciwutleniającą dżemów istotny wpływ miała zarówno temperatura oraz czas przechowywania, jak i rodzaj badanego dżemu. Produkty przechowywane przez 6 miesięcy w niższej temperaturze charakteryzowały się znacznie wyższymi aktywnościami (o 20–36%), w porównaniu z dżemami przechowywanymi w temp. pokojowej. Okres przechowywania wpłynął także na obniżenie aktywności przeciwutleniającej. Np. aktywność przeciwutleniająca dżemu niskosłodzonego przechowywanego w temp. 6°C przez 2 miesiące wynosiła 14,6  $\mu\text{M}$  Troloxu/g, natomiast po 6 miesiącach tylko 10,5  $\mu\text{M}$  Troloxu/g. Na aktywność przeciwutleniającą, niezależnie od czasu i temperatury przechowywania, wpływ miał także rodzaj dżemu. Najmniejszy spadek pojemności obserwowano podczas przechowywania dżemów wysokosłodzonych, co może wynikać ze stabilizującego działania wysokich stężeń cukru na składniki przeciwutleniające owoców borówek.

Tabela 4

Wpływ temperatury i okresu przechowywania na zawartość polifenoli ogółem w dżemach otrzymanych z owoców borówki wysokiej.

The effect of storage time and storage temperature on the content of total polyphenols in jams manufactured from highbush blueberry fruits.

Rodzaj dżemu Type of jam	Polifenole ogółem [mg/100 g] Total polyphenols [mg/100g]							
	Okres przechowywania [miesiące] w temp. 6°C Storage duration [months] at 6°C				Okres przechowywania [miesiące] w temp. 22°C Storage duration [months] at 22°C			
	0	2	4	6	0	2	4	6
Dżem niskosłodzony Low-sugar jam	284,1	265,2	258,3	244,9	284,1	260,4	229,8	209,2
Dżem niskosłodzony z dodatkiem zagęszczzonego soku jabłkowego Low-sugar jam with concentrated apple juice added	356,5	341,1	327,8	312,7	356,5	332,3	307,9	287,2
Dżem wysokosłodzony High sugar jam	268,4	260,6	255,4	242,7	268,4	255,6	238,9	212,7

NIR<sub>0,05</sub> rodzaj dżemu / temperatura i czas przechowywania = 5,12

LSD<sub>0,05</sub> type of jam/time and temperature of storage = 5,12

NIR<sub>0,05</sub> temperatura przechowywania / rodzaj dżemu i czas przechowywania = 4,26

LSD<sub>0,05</sub> temperature of storage / type of jam and time of storage = 4,26

NIR<sub>0,05</sub> czas przechowywania / rodzaj dżemu i temperatura przechowywania = 5,64

LSD<sub>0,05</sub> time of storage / type of jam and temperature of storage = 5,64

Podczas przechowywania dżemów nastąpił spadek zawartości polifenoli ogółem, na który wpływ miała temperatura i czas przechowywania oraz rodzaj dżemu (tab. 4). W dżemach przechowywanych przez 6 miesięcy nastąpił 10-26% spadek zawartości polifenoli w zależności od temperatury przechowywania. Składowanie dżemów w niższej temperaturze (6°C) spowodowało większe zachowanie związków polifenolowych. Według Chaovanalikit i wsp. [2], przechowywanie syropów wiśniowych w temp. 2 i 22°C przez 5 miesięcy nie wpływało istotnie na zawartość w nich polifenoli.

Tabela 5

Wpływ temperatury i okresu przechowywania na zawartość antocyjanów ogółem w dżemach z owoców borówki wysokiej.

The effect of storage time and storage temperature on the content of total anthocyanins in jams manufactured from highbush blueberry fruits.

Rodzaj dżemu Type of jam	Antocyjany [mg/100 g] Anthocyanins [mg/100 g]							
	Okres przechowywania [miesiące] w temp. 6°C Storage duration [months] at 6°C				Okres przechowywania (miesiące) w temp. 22°C Storage duration [months] at 22°C			
	0	2	4	6	0	2	4	6
Dżem niskosłodzony Low-sugar jam	48,6	44,3	42,7	38,1	48,6	38,9	30,8	27,6
Dżem niskosłodzony z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego Low-sugar jam with concentrated apple juice added	37,9	33,6	32,7	28,9	37,9	29,8	25,5	20,4
Dżem wysokosłodzony High sugar jam	34,7	32,9	32,2	30,2	34,7	30,1	27,8	25,1

NIR<sub>0,05</sub> rodzaj dżemu / temperatura i czas przechowywania = 1,03

LSD<sub>0,05</sub> type of jam /time and temperature of storage = 1,03

NIR<sub>0,05</sub> temperatura przechowywania / rodzaj dżemu i czas przechowywania = 0,85

LSD<sub>0,05</sub> temperature of storage / type of jam and time of storage = 0,85

NIR<sub>0,05</sub> czas przechowywania / rodzaj dżemu i temperatura przechowywania = 1,13

LSD<sub>0,05</sub> time of storage / type of jam and temperature of storage = 1,13

Zawartość barwników w dżemach podczas przechowywania ulegała stopniowemu zmniejszaniu (tab. 5). Temperatura przechowywania w istotny sposób wpływała na stopień redukcji antocyjanów. W dżemie niskosłodzonym z dodatkiem zagęszczonego soku jabłkowego zawartość antocyjanów po 6-miesięcznym przechowywaniu

zmniejszyła się o 24% w temp. 6°C, natomiast aż o 46%, przy składowaniu dżemu w temp. 22°C. W badaniach Garcia-Viguera [7] również obserwowano istotny wpływ temperatury przechowywania na zawartość antocyjanów w dżemach truskawkowych. Na stopień degradacji antocyjanów istotny wpływ miał skład recepturowy dżemów. Największą stabilnością charakteryzowały się barwniki w dżemie o dużym stężeniu cukru. Podobne zależności obserwowano podczas przechowywania antocyjanowych roztworów modelowych o różnych stężeniach sacharozy. Stwierdzono mianowicie zwiększenie trwałości antocyjanów w roztworach o dużym stężeniu sacharozy (65%) w porównaniu z próbkami bezcukrowymi oraz z niewielką zawartością cukru (13%) [23].

### Wnioski

1. Dżemy otrzymane z owoców borówki wysokiej charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwutleniającą w zakresie od 17,2 do 20,3  $\mu\text{M}$  Troloxu/g dżemu.
2. Zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej owoców borówki wysokiej w czasie procesu technologicznego otrzymywania dżemów wynosiło około 10% i było podobne do strat zawartości polifenoli ogółem. Znacznie wyższą degradację, sięgającą 50%, obserwowano pod względem zawartości antocyjanów.
3. Zastąpienie kwasu cytrynowego zagęszczonym sokiem jabłkowym w produkcji dżemów borówkowych wpłynęło na wzrost ogólnej aktywności przeciwutleniającej otrzymanych produktów. Wykazano jednak, że podczas procesu gotowania związki polifenolowe zawarte w koncentracji jabłkowym wpływają na degradację antocyjanów borówek.
4. Przechowywanie dżemów przez 6 miesięcy spowodowało obniżenie ich aktywności przeciwutleniającej o 33 do 63%, w zależności od rodzaju dżemu i temperatury przechowywania.
5. Najmniejszy spadek zawartości barwników antocyjanowych podczas przechowywania obserwowano w dżemach wysokosłodzonych, co może wynikać ze stabilizującego działania wyższych stężeń cukru.

*Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2004-2006 jako projekt badawczy nr 2P06T05826.*

### Literatura

- [1] Amakura Y., Umino Y., Tsuji S., Tonogai Y.: Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 6292-6297.
- [2] Chaovanalikit A., Wrolstad R.E.: Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *J. Food. Sci.*, 2004, **69**, **1**, FCT67-FCT72.

- [3] Connor A.M., Luby J.J., Tong C. B.S.: Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2002, **127**, 1, 89-97.
- [4] Drzazga B.: Analiza techniczna w przemyśle spożywczym. WSiP. Warszawa 1999.
- [5] Ehlenfeld M. K., Prior R. L.: Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentration in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 2222-2227.
- [6] Fuleki T., Francis F. J.: Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.*, 1968, **33**, 72.
- [7] García-Viguera C., Zafrilla P., Romero F., Abellán P., Artès F. Tomàs-Barberà F.A.: Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. *J. Food Sci.*, 1999, **64**, 2, 243-247.
- [8] Haffner K., Vestrheim S., Grønnerød K.: Qualitätseigenschaften von Kulturheidelbeersorten *Vaccinium corymbosum* L. *Erwerbsobstbau*, 1998, **40**, 112-116.
- [9] Kader F., Rovel B., Girardin M., Metchie M.: Composition du fruit du bluet (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivé dans la région des Vosges. *Sciences des Aliments*, 1994, **14**, 281-290.
- [10] Kalt W., Forney C. F., Martin A., Prior R. L.: Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4638-4644.
- [11] Lahachoopol V., Szrednicki G., Craske J.: The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004, **5**, 248-252.
- [12] Lee J., Wrolstand R.: Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry – processing waste. *J. Food Sci.*, 2004, **69**, 7, C564-C573.
- [13] Lenartowicz W., Zbroszczyk J., Plocharski W.: The quality of highbush blueberry fruit. *Fruit Sci. Reports*, 1990, **18**, 2, 77-85.
- [14] Marzia L., Botta R., Peano C., Bounous G.: Evoluzione della maturazione e indici di qualità nel mirtillo gigante. *Rivista di Frutticoltura*, 1998, **18**, 23-26.
- [15] Miller N. J., Rice-Evans C.: Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report.*, 1996, **2**, (3), 519-525.
- [16] Peri C., Pompei G.: An assay of different phenolic fraction in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1971, **22**, 2.
- [17] PN-94/A-75100. Dżemy.
- [18] Prior R. L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeld M., Kalt W., Krewer G., Mainland C. M.: Antioxidant capacity as influenced by total phenolics and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 2686-2693.
- [19] Sapers G. M., Burgher A. M., Phillips J. G., Jones S. B.: Color and composition of highbush blueberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1984, **109**, 1, 105-111.
- [20] Sapers G. M., Burger A. M., Phillips J. G., Jones S. B.: Effects of freezing, thawing, and cooking on the appearance of highbush blueberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1984, **109**, 1, 112-117.
- [21] Skupień K.: Ocena wartości odżywczej owoców czterech odmian borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.). *Folia Univ. Agric. Stein., Agricultura*, 2004, **96**, 171-174.
- [22] Sokół-Łętowska A., Oszmiański J., Sożyński J.: Stabilność związków fenolowych i barwy w mieszanych sokach z jabłek, aronii i owoców róży. *Zesz. Nauk. AR Wrocław, Technol. Żyw.*, 1991, **215**, 155-163.
- [23] Stasiak A., Pawlak M., Sosnowska D., Wilska-Jeszka J.: Szybkość degradacji barwników antocyjanowych i kwasu askorbinowego w roztworach o różnym stężeniu sacharozy. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1998, **12**, 26-34.

- [24] Villata M.: Cultivated blueberries: a true-blue baking ingredient. *Cereal Food World*, 1998, **43**, **3**, 128-130.
- [25] Zheng W., Wang S.: Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 502-509.

#### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN JAMS OBTAINED FROM Highbush BLUEBERRY FRUITS (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)

##### S u m m a r y

The objective of the paper was to determine the antioxidant activity of and the content of compounds impacting this activity, i.e. total polyphenols and anthocyanins, in jams obtained from highbush blueberry fruits. Furthermore, the investigations included the impact of storage conditions and storage duration on the content of compounds, showing antioxidant activity, in jams produced. The investigation included three types of jam produced from this fruit: low-sugar jam ( $e = 38\%$ ), low-sugar jam with concentrated apple juice added ( $e = 38\%$ ), and high sugar jam ( $e = 65\%$ ). Highbush blueberry jams produced were stored during a period of six months, at temperatures of  $6^{\circ}\text{C}$  and  $22^{\circ}\text{C}$ , under no light conditions. The analytical part of the study comprised the profile of the basic chemical composition of fruits and jams. Additionally, after the 2, 4, and 6 months of storing the products manufactured, the antioxidant activity with ABTS radicals, and the content of total polyphenols and anthocyanins in them were determined.

The jams manufactured from highbush blueberry fruits were characterized by a high antioxidant activity ranging from 17,2 to 20,3  $\mu\text{M}$  of Trolox/g of the product. During the technological process, there was a decrease in the contents of polyphenols and anthocyanins in the highbush blueberry jams. This fact impacted the antioxidant activity of the products investigated. The highest, almost 50% losses were found in the case of anthocyanins. When jams were stored during a six month period, their antioxidant activity was decreased by 33% to 66% depending on the type of jam and the storage temperature. The lowest drop in the anthocyanin dyes occurring during their storage was stated in the high sugar jams, and this fact could be attributed to the stabilizing activity and impact of higher concentrations of sugar.

**Keywords:** antioxidant activity, highbush blueberry, jam, storage, anthocyanins, polyphenols ☒

JOANNA LE THANH, KRYSZYNA PROCHASKA, GRAŻYNA LEWANDOWICZ

## **HYDROLIZA ENZYMATYCZNA SKROBI UTLENIONEJ W BIOREAKTORZE MEMBRANOWYM**

### **Streszczenie**

Skrobie utlenione E 1404 są najczęściej stosowanymi spożywczymi skrobiami modyfikowanymi, jednak brak doniesień literaturowych na temat podatności tych skrobi na amylolizę, a właściwości funkcjonalne produktów hydrolizy enzymatycznej skrobi utlenionych są nieznane.

Celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania bioreaktora membranowego do hydrolizy enzymatycznej skrobi utlenionej oraz ocena aktywności powierzchniowej otrzymanych produktów. Proces hydrolizy prowadzono w bioreaktorze membranowym z ceramicznym modułem ultrafiltracyjnym o konfiguracji rurowej. Przebadano procesy jedno- i dwuetapowy, w których zastosowano różne enzymy amylolityczne. W celu oceny właściwości adsorpcyjnych przeprowadzono badania napięcia powierzchniowego, stosując metodę oderwania pierścienia du Noüy'a. Stwierdzono, że skrobia utleniona ulega hydrolizie w enzymatycznym bioreaktorze membranowym, przy czym w celu uzyskania efektywnego przebiegu procesu nie jest konieczne stosowanie wstępnego upłynniania  $\alpha$ -amylazą. W jednoetapowym procesie hydrolizy enzymatycznej uzyskuje się produkty o relatywnie niskim stopniu scurzenia DE. W przypadku procesu dwuetapowego optymalny stopień upłynnienia  $\alpha$ -amylazą bakteryjną w pierwszym etapie hydrolizy determinuje efektywność całego procesu. Zjawisko foulingu nie wywiera istotnego wpływu na wydajność separacji otrzymanych maltodekstryn. Produkty hydrolizy enzymatycznej skrobi utlenionej, jak również wyjściowy surowiec, wykazują aktywność powierzchniową i powodują obniżenie napięcia powierzchniowego na granicy faz woda/powietrze.

**Słowa kluczowe:** hydroliza enzymatyczna, bioreaktor membranowy, skrobia utleniona, aktywność powierzchniowa

### **Wprowadzenie**

Zastosowanie enzymatycznego bioreaktora membranowego do hydrolizy skrobi staje się coraz bardziej popularne ze względu na możliwość zwiększenia wydajności

---

*Mgr inż. J. Le Thanh, dr hab. inż. Grażyna Lewandowicz, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, prof. dr hab. inż. Krystyna Prochaska, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Poznańska, Pl. M. Skłodowskiej-Curie, 60-965 Poznań*

procesu, skrócenia czasu reakcji, obniżenia kosztów związanych ze zużyciem enzymów, jak również stabilizacji właściwości otrzymywanych produktów. Szczególnie zalecane jest stosowanie bioreaktorów membranowych do otrzymywania produktów niskocząsteczkowych, takich jak: glukoza, maltoza, syropy skrobiowe lub maltodekstryny [8–10].

Skrobie modyfikowane należą do najbardziej wielofunkcyjnych dodatków stosowanych obecnie w przemyśle spożywczym. Jako odnawialny, łatwo dostępny i relatywnie tani surowiec są szeroko stosowane głównie do zagęszczania i stabilizacji wielu produktów spożywczych. Głównym celem modyfikacji skrobi jest m.in. zwiększenie jej stabilności reologicznej w warunkach wysokiej i niskiej temperatury oraz niskich wartości pH [2]. Utlenianie skrobi naturalnej za pomocą chloranu (I) sodu ma największe znaczenie praktyczne [13, 14]. Skrobie modyfikowane chemicznie są stosowane prawie wyłącznie jako substancje wysokocząsteczkowe. Jedynym wyjątkiem są produkty hydrolizy enzymatycznej soli sodowej oktenylobursztynianu skrobiowego (E 1450) zalecane do stosowania jako substancja o charakterze emulgującym [7]. Podatność skrobi modyfikowanych chemicznie na hydrolizę za pomocą enzymów amylolitycznych jest zagadnieniem, które było przedmiotem bardzo niewielu opracowań. Wykazano, że fosforany skrobiowe charakteryzują się obniżoną podatnością na amyloлизę, a stopień inhibicji wzrasta ze wzrostem zawartości grup fosforanowych [9]. Z drugiej strony wysoko podstawione octany skrobiowe, tworzące wytrzymałe, również w środowisku wodnym, filmy ulegają efektywnie hydrolizie  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylazami [4]. Zastosowanie enzymatycznego bioreaktora membranowego do hydrolizy skrobi modyfikowanych chemicznie mogłoby przyczynić się do poszerzenia gamy funkcjonalnych dodatków do żywności, jednak wymaga wiedzy na temat efektywności tego procesu, jak również właściwości tak otrzymanych produktów.

Celem pracy było określenie możliwości zastosowania bioreaktora membranowego do hydrolizy enzymatycznej handlowej skrobi utlenionej „Lubox” oraz ocena aktywności powierzchniowej otrzymanych produktów.

### **Materiał i metody badań**

Materiał badawczy stanowiła handlowa skrobia utleniona „Lubox” (E 1404), zawierająca 0,5% grup karboksylowych, produkowana przez Wielkopolskie Przedsiębiorstwo Przemysłu Ziemiaczanego S.A. w Luboniu.

W procesie hydrolizy stosowano następujące preparaty enzymatyczne firmy Novo Nordisk (Dania):

- BAN 480L (bakteryjna  $\alpha$ -amylaza produkowana przez wyselekcjonowane szczepy *Bacillus amyloliquefaciens*),



- Promozyme<sup>®</sup> D (pululanaza produkowana przez wyselekcjonowane szczepy *Bacillus acidopullulyticus*),
- Dextrozyme<sup>™</sup> E (zbalansowana mieszanina glukoamylazy produkowanej przez genetycznie modyfikowane szczepy *Aspergillus niger* i pululanazy produkowanej przez genetycznie modyfikowane szczepy *Bacillus*).

Przebadano przebieg hydrolizy enzymatycznej skrobi utlenionej w dwóch typach procesów – jednoetapowym, przebiegającym tylko w reaktorze membranowym oraz dwuetapowym, w którym proces membranowy poprzedzony był wstępnym upłynnianiem  $\alpha$ -amylazą. Do badań zastosowano bioreaktor membranowy z zewnętrznym modułem ultrafiltracyjnym zawierającym trójkanałową membranę ceramiczną (punkt odcięcia cut-off:  $3 \cdot 10^3$  Da) o konfiguracji rurowej (Tami Industries, France), powierzchni  $0,01 \text{ m}^2$  i długości  $0,3 \text{ m}$ .

#### *Procedura I – proces jednoetapowy*

Przygotowywano 1500 ml 20% zawiesiny skrobiowej o pH = 6,5 i poddawano kleikowaniu w łaźni wodnej, w temp.  $80^\circ\text{C}$ , a następnie sterylizowano w autoklawie w temp.  $126^\circ\text{C}$  w ciągu 11 min. Tak przygotowany kleik rozcieńczano do stężenia 5%, a następnie dodawano preparatu enzymatycznego Dextrozyme<sup>™</sup> E lub Promozyme<sup>®</sup> D w ilości  $0,3 \text{ ml/kg}$  skrobi. Hydrolizę prowadzono w bioreaktorze membranowym przez 3 godz. w stałej temp.  $60^\circ\text{C}$ , przy różnych ciśnieniach transmembranowych  $0,1$ ;  $0,2$  i  $0,3 \text{ MPa}$ , które zmieniano co 1 godz. Zbierano frakcję filtratu co 30 min, podczas gdy retentat był zawracany. W każdej z pobranych partii filtratu oznaczano zawartość suchej substancji oraz wartość równoważnika glukozy DE. Po zakończonym procesie hydrolizy zebraną frakcję permeatu suszono za pomocą suszarki rozpyłowej Mobile Miner<sup>™</sup> 2000 (Niro A/S), a uzyskany produkt poddawano oznaczeniu napięcia powierzchniowego w układzie woda/powietrze.

#### *Procedura II – proces dwuetapowy*

Przygotowywano 1500 ml 20% zawiesiny skrobiowej o pH = 6,5 i poddawano kleikowaniu w łaźni wodnej, w temp.  $80^\circ\text{C}$ , a następnie sterylizowano w autoklawie w temp.  $126^\circ\text{C}$  w ciągu 11 min. Do tak przygotowanego roztworu dodawano odpowiednią ilość preparatu enzymatycznego BAN 480L, stosując różne ilości enzymu w stosunku do suchej masy Luboxu, ( $0,5 \text{ ml/kg}$  lub  $5 \text{ ml/kg}$  skrobi) i prowadzono hydrolizę okresową w temp.  $60$ – $65^\circ\text{C}$ , w ciągu 10 min. Po zakończonej hydrolizie wstępnej, w celu dezaktywacji enzymu, kleik zakwaszono do pH = 3,0 i sterylizowano w temp.  $126^\circ\text{C}$  w ciągu 11 min. Kleik po zobojętnieniu do pH optymalnego dla enzymu stosowanego w II etapie hydrolizy i rozcieńczeniu do stężenia 5%



umieszczano w bioreaktorze membranowym, w którym prowadzono drugi etap hydrolizy w identyczny sposób jak w procedurze I.

Wartość równoważnika glukozowego DE oraz zawartość suchej substancji w hydrolizatach oznaczano zgodnie z PN-78/A-74701 [5].

Napięcie powierzchniowe oznaczano metodą odrywania pierścienia du Noüy'a. Użyto w tym celu tensjometr K12 firmy Krüss (Niemcy). Badania prowadzono w temp. 21°C. Badane roztwory wodne o stężeniu od 10<sup>-3</sup> do 1% przygotowano drogą kolejnych rozcieńczeń. Eksperymentalnie uzyskane izotermy napięcia powierzchniowego  $\gamma = f(c)$  aproksymowano równaniem Szyszkowskiego [1]:

$$\gamma_i = \gamma_0 \left[ 1 - B_{Sz} \ln \left( \frac{c}{A_{Sz}} + 1 \right) \right] \quad (1)$$

gdzie:  $\gamma_i$  – napięcie powierzchniowe,  $\gamma_0$  – napięcie powierzchniowe w układzie woda/powietrze niezawierającym hydrolizatu,  $c$  – stężenie hydrolizatu,  $R$  – stała gazowa,  $T$  – temperatura,  $A_{Sz}$ ,  $B_{Sz}$  – współczynniki Szyszkowskiego.

Różniczkując równanie (1) względem stężenia i wprowadzając wyrażenie  $d\gamma/dc$  do izotermy Gibbsa [1]:

$$\Gamma = - \frac{c}{RT} \frac{d\gamma}{dc} \quad (2)$$

otrzymano zależność nadmiaru powierzchniowego  $\Gamma_{SZ}^i$  jako funkcję stężenia:

$$\Gamma_{SZ}^i = \frac{\gamma_0 B_{Sz}}{RT} \frac{c_i}{(c_i + A_{Sz})} \quad (3)$$

Zastosowanie izotermy Szyszkowskiego, jako równania aproksymującego pozwoliło bezpośrednio oszacować wartość swobodnej energii adsorpcji  $\Delta G_{ads}$ :

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln A_{Sz} \quad (4)$$

oraz wartość stężenia powierzchniowego hydrolizatu na nasyconej granicy faz  $\Gamma_{\infty}$ :

$$\Gamma_{\infty} = \frac{\gamma_0 B}{RT} \quad (5)$$

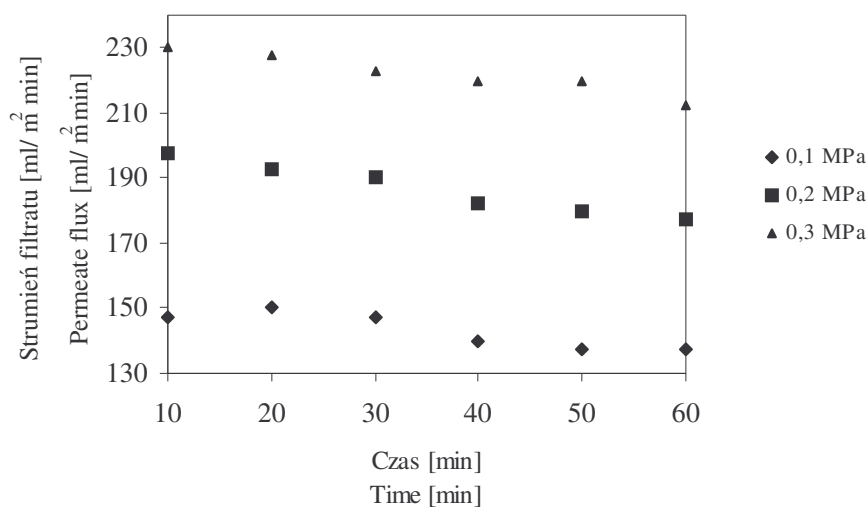
Na podstawie wyliczonych wartości stężenia powierzchniowego  $\Gamma_{\infty}$ , określono  $A_{min}$  – statyczną wielkość powierzchni zajmowaną przez pojedynczą cząsteczkę (w przeliczeniu na jednostkę anhydroglukozy) w warstwie monomolekularnej na granicy faz:

$$A_{min} = \frac{1}{\Gamma_{\infty} N_A} \quad (6)$$

gdzie:  $N_A$  – liczba Avogadro,  $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ .

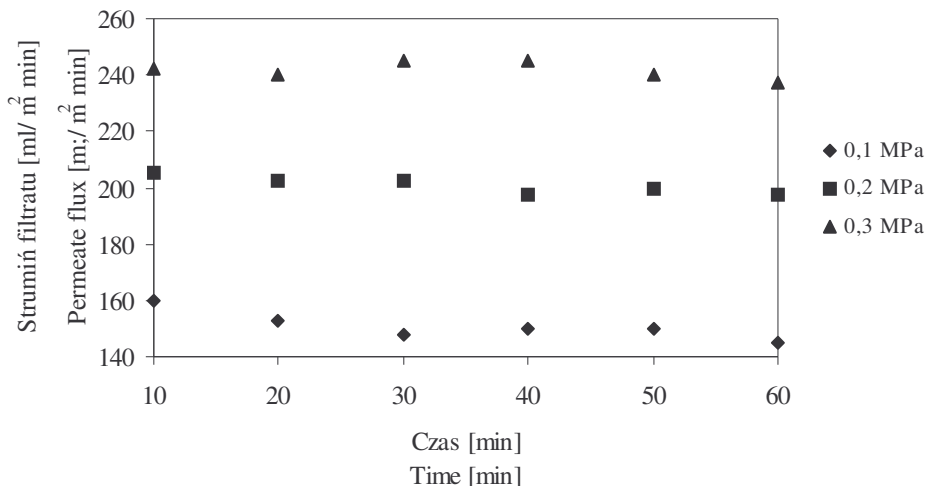
### Wyniki i dyskusja

Zastosowanie reaktorów membranowych w procesach hydrolizy enzymatycznej skrobi przyczynia się do znacznego zwiększenia efektywności tych procesów, jednak ograniczone jest w zasadzie do etapu scukrzania, ze względu na zbyt wysoką lepkość kleików skrobiowych niepoddanych wstępnemu upłynnieniu i możliwy fouling membran [8, 10, 11]. Badany preparat skrobi utlenionej Lubox charakteryzuje się relatywnie wysokim stopniem utlenienia (zawartość grup karboksylowych wynosi 0,5%), czemu towarzyszy silnie zmniejszona lepkość kleików [12]. Powyższe właściwości fizykochemiczne kleików skrobi Lubox umożliwiły przeprowadzenie jednoetapowej hydrolizy w bioreaktorze membranowym, wyposażonym w moduł UF z membraną o cut-off  $3 \cdot 10^3$  Da. Analiza danych przedstawionych na rys. 1. i 2. dowiodła, że w obu przypadkach hydrolizy jednoetapowej, niezależnie od wartości ciśnienia transmembranowego, nastąpiło częściowe blokowanie membrany produktami hydrolizy. Zmniejszenie strumienia filtratu w czasie procesu było większe, gdy hydrolizę prowadzono z udziałem preparatu Dextrozyme<sup>TM</sup> E niż Promozyme<sup>®</sup> D.



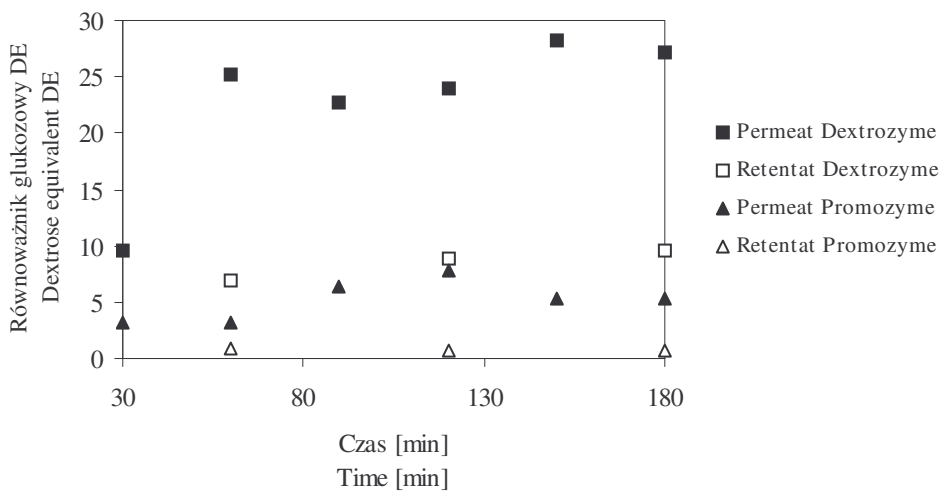
Rys. 1. Zmiana strumienia filtratu w czasie procesu jednoetapowej hydrolizy Luboxu za pomocą preparatu enzymatycznego Dextrozyme<sup>TM</sup> E.

Fig. 1. Permeate flux changes during the one-step hydrolysis of Lubox with the Dextrozyme<sup>TM</sup> E enzyme preparation.



Rys. 2. Zmiana strumienia filtratu w procesie jednoetapowej hydrolizy Luboxu za pomocą preparatu enzymatycznego Promozyme<sup>®</sup> D.

Fig. 2. Permeate flux changes during the one-step hydrolysis of Lubox with the Promozyme<sup>®</sup> D enzyme preparation.

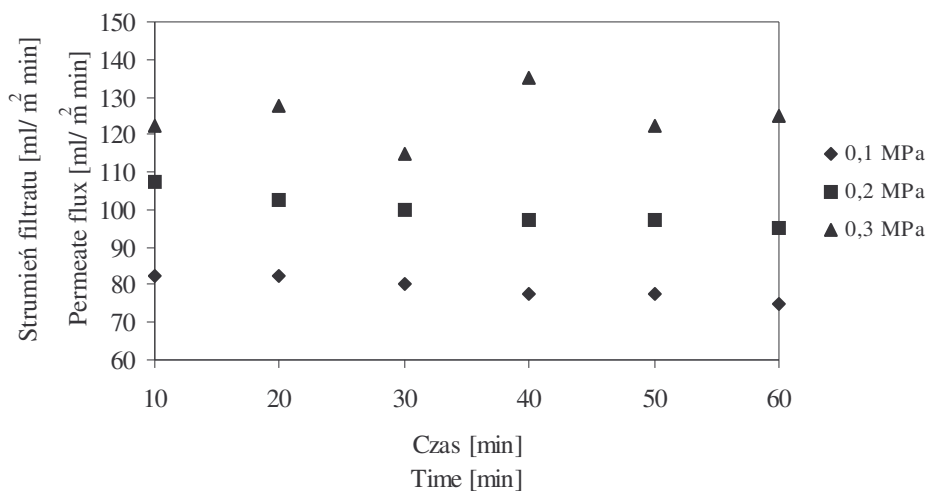


Rys. 3. Zmiana stopnia scukrzenia produktów w toku jednoetapowej hydrolizy Luboxu preparatami enzymatycznymi: Dextrozyme<sup>™</sup> E, oraz Promozyme<sup>®</sup> D.

Fig. 3. Changes in the degree of saccharification during the one-step hydrolysis of Lubox with the Dextrozyme<sup>™</sup> E, and Promozyme<sup>®</sup> D enzyme preparations.

Zastosowanie różnych preparatów enzymatycznych w jednoetapowej hydrolizie skrobi utlenionej Lubox prowadziło do uzyskania produktów znacznie różniących się wielkością masy cząsteczkowej (rys. 3). W przypadku preparatu enzymatycznego Dextrozyme™ E, będącego mieszaniną glukoamylazy i pululanazy, już po dwóch godzinach hydrolizy odpowiednie wartości DE filtratu były około trzykrotnie większe niż w przypadku samej pululanazy, czyli preparatu Promozyme® D. Biorąc jednak pod uwagę niską aktywność amylolityczną pululanazy w porównaniu z enzymami innych grup [3] należy uznać, iż w opisywanym eksperymencie skrobia utleniona Lubox efektywnie uległa hydrolizie nie tylko glukoamylazą, ale również pululanazą.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę zmniejszenia zjawiska foulingu poprzez przeprowadzenie hydrolizy dwuetapowej ze występnym upłynnieniem  $\alpha$ -amylazą. W celu ustalenia dawki preparatu enzymatycznego w pierwszym etapie hydrolizy przeprowadzono dwie serie badań z użyciem preparatu enzymatycznego BAN 480L, w ilości 0,5 ml/kg i 5 ml/kg preparatu skrobiowego. Jak wynika z danych przedstawionych na rys. 4. i 5., pomimo wstępnego upłynnienia Luboxu w pierwszym etapie hydrolizy nie stwierdzono znacznej poprawy zdolności separacyjnej modułu ultrafiltracyjnego.

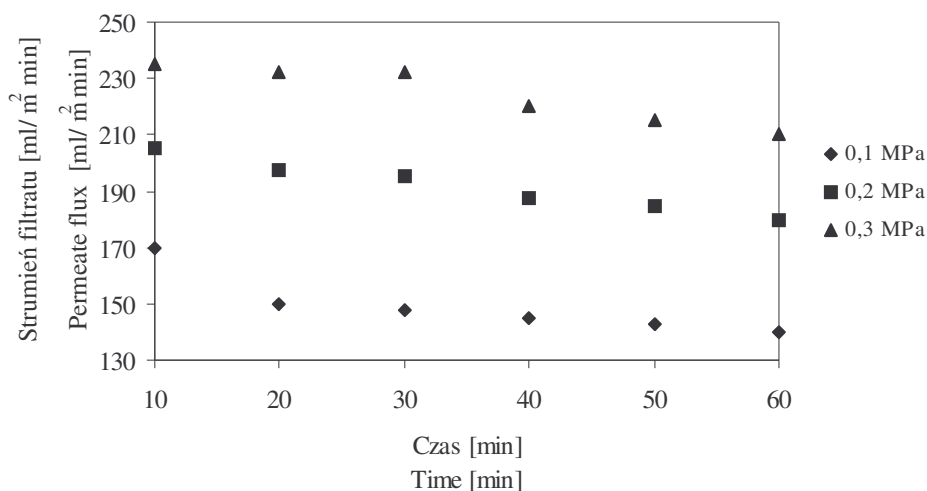


Rys. 4. Zmiana strumienia filtratu w czasie drugiego etapu hydrolizy preparatem Dextrozyme™ E poprzedzonego hydrolizą wstępną przy użyciu preparatu BAN 480L w ilości 5ml/kg.

Fig. 4. Permeate flux changes during the second step of hydrolysis of Lubox with the Dextrozyme™ E enzyme preparation preceded by the initial hydrolysis with a 5 ml/kg preparation BAN 480L.

Wprawdzie po jednej godz. prowadzenia procesu nastąpiło zmniejszenie strumienia filtratu jedynie o około 10%, jednak bezwzględne wartości były niższe niż

w procesie jednoetapowym, szczególnie w przypadku zastosowania dużej ilości  $\alpha$ -amylazy na etapie wstępnego upłynniania. Wskazywałoby to na fakt, że za fouling membrany były odpowiedzialne raczej enzymy stosowane w hydrolizie, a nie frakcja sacharydowa.



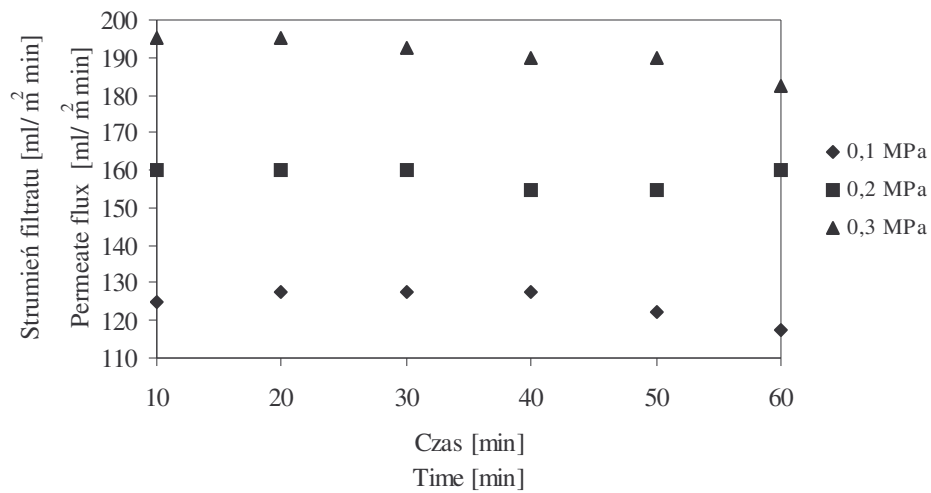
Rys. 5. Zmiana strumienia filtratu w czasie drugiego etapu hydrolizy preparatem Dextrozyme<sup>TM</sup> E poprzedzonego hydrolizą wstępną przy użyciu preparatu BAN 480L w ilości 0,5ml/kg.

Fig. 5. Permeate flux changes during the second step of hydrolysis of Lubox with the Dextrozyme<sup>TM</sup> E enzyme preparation preceded by the initial hydrolysis with a 5 ml/kg preparation BAN 480L.

Zastosowanie w drugim etapie hydrolizy preparatu enzymatycznego Promozyme<sup>®</sup> D w miejsce Dextrozyme<sup>TM</sup> E spowodowało nieco silniejsze blokowanie membrany ultrafiltracyjnej (rys. 6). Efekt ten może być związany zarówno z różnymi właściwościami stosowanych białek enzymatycznych, jak i z różnicami w składzie produktów hydrolizy.

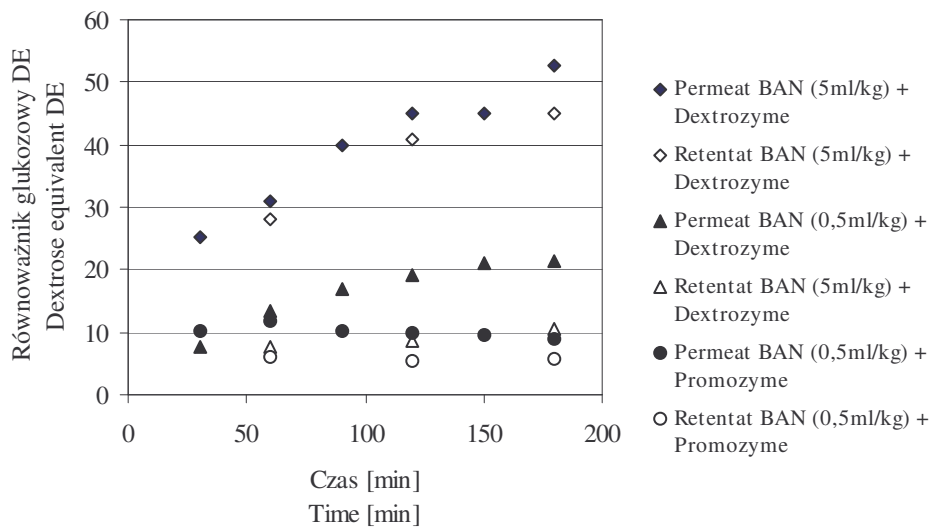
Zmiana ilości enzymu, zastosowanego w pierwszym etapie hydrolizy, w bardzo silny sposób rzutowała na stopień scukrzenia produktów drugiego etapu hydrolizy (rys. 7). Zastosowanie dużej ilości preparatu enzymatycznego BAN 480L w pierwszym etapie hydrolizy prowadziło do stałego wzrostu zawartości cukrów redukujących zarówno we frakcji permeatu, jak i retentatu. Powyższa obserwacja wskazuje na fakt, że szybkość hydrolizy była zbyt duża w stosunku do zdolności separacyjnej zastosowanej membrany ultrafiltracyjnej. W przypadku zastosowania mniejszej ilości  $\alpha$ -amylazy na etapie hydrolizy wstępnej stopień scukrzenia zależy od rodzaju enzymu użytego w procesie membranowym. Podobnie jak w procesie jednoetapowym, produkty hydrolizy w przypadku zastosowania preparatu enzymatycznego

Dextrozyme™ E miały wyższy stopień scukrzenia niż przy zastosowaniu preparatu Promozyme® D.



Rys. 6. Zmiana strumienia filtratu w czasie drugiego etapu hydrolizy preparatem Promozyme® D poprzedzonego hydrolizą wstępną przy użyciu preparatu BAN 480L w ilości 0,5 ml/kg.

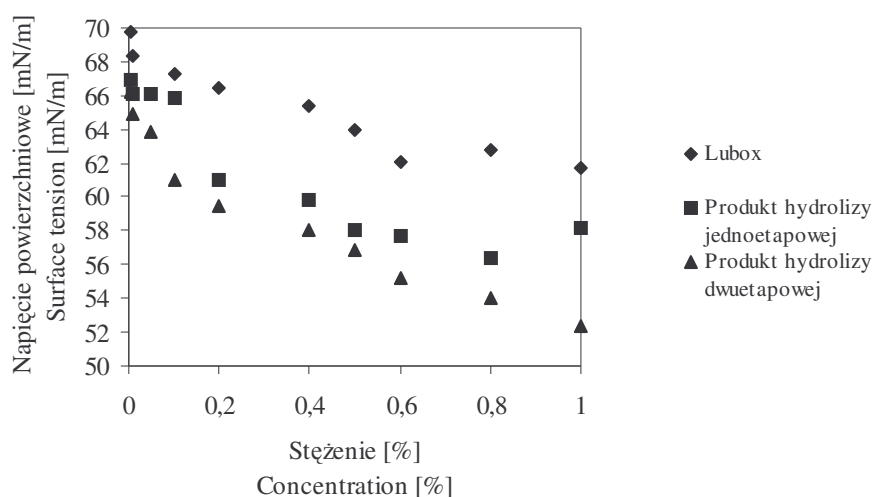
Fig. 6. Permeate flux changes during the second step of hydrolysis of Lubox with the Promozyme® D enzyme preparation preceded by the initial hydrolysis with a 5 ml/kg preparation BAN 480L.



Rys. 7. Zmiana stopnia scukrzenia produktów w toku dwuetapowej hydrolizy Luboxu w bioreaktorze membranowym.

Fig. 7. Changes in the degree of saccharification during the two-step hydrolysis of Lubox with the Dextrozyme™ E or Promozyme® D enzyme preparations.

Badania aktywności powierzchniowej na granicy faz woda-powietrze wodnych roztworów skrobi modyfikowanej Luboxem oraz wybranych produktów hydrolizy wykazały, że wszystkie analizowane produkty adsorbowały się na granicy faz woda/powietrze i obniżały napięcie powierzchniowe (rys. 8, tabela 1).



Rys. 8. Napięcie powierzchniowe jako funkcja stężenia objętościowego wodnych roztworów Luboxu oraz produktów jego hydrolizy.

Fig. 8. Surface tension as a function of volume concentration of water solutions of Lubox and of products of its hydrolysis.

Właściwości powierzchniowe zhydrolizowanych pochodnych skrobi utlenionych zależały od warunków prowadzenia hydrolizy (tab. 1). Produkty otrzymane w procesie dwuetapowym charakteryzowały się nieco większą tendencją do adsorpcji na granicy faz woda/powietrze. Natomiast pochodne zhydrolizowane w procesie jednoetapowym tworzyły zdecydowanie bardziej upakowaną warstwę adsorpcyjną. Wartość nadmiaru powierzchniowego na nasyconej granicy faz była równa  $1,367 \cdot 10^6 \text{ mol/m}^2$  podczas gdy  $\Gamma^\infty$  oszacowane w odniesieniu do pochodnych otrzymanych w procesie dwuetapowym było znacznie mniejsze i wynosiło  $0,88 \cdot 10^6 \text{ mol/m}^2$ . Znaczne różnice w oszacowanych wartościach nadmiaru powierzchniowego wskazywały na odmienną strukturę warstwy powierzchniowej powstającej w obu badanych układach. Obserwowane różnice właściwości adsorpcyjnych zhydrolizowanych pochodnych skrobi utlenionych wynikały najprawdopodobniej z różnego stopnia scukrzenia badanych preparatów. W procesie dwuetapowym produkty hydrolizy charakteryzowała znacznie większa zawartość cukrów zredukowanych, czyli pochodnych o mniejszej masie

cząsteczkowej. Hydrolizaty te wykazały większą mobilność z fazy objętościowej do granicy faz w układzie woda/powietrze. Z drugiej jednak strony, z racji na odmienną orientację na granicy faz tworzyły nasyconą warstwę adsorpcyjną o stosunkowo niskim stężeniu.

Tabela 1

Parametry adsorpcji produktów hydrolizy jednoetapowej i dwuetapowej.

Adsorption parameters of the products produced during the one-step and two-step hydrolysis.

Parametry adsorpcji Adsorption parameters	Jednostka Unit	Produkt hydrolizy jednoetapowej One-step hydrolysis product	Produkt hydrolizy dwuetapowej Two-step hydrolysis product
$A_{Sz}$	mol/dm <sup>3</sup>	$1,74 \cdot 10^{-3}$	$3,54 \cdot 10^{-4}$
$B_{Sz} \cdot 10^2$	–	4,64	3,00
$\Gamma^\infty \cdot 10^6$	mol/m <sup>2</sup>	1,37	0,88
$A_{min}$	nm <sup>2</sup>	1,21	1,88
$-\Delta G_{ads}$	kJ/mol	15,50	19,40

## Wnioski

1. Skrobia utleniona Lubox zawierająca 0,5% grup karboksylowych ulega hydrolizie w enzymatycznym bioreaktorze membranowym, przy czym w celu uzyskania efektywnego przebiegu procesu nie jest konieczne stosowanie wstępnego upłynniania  $\alpha$ -amylazą.
2. W jednoetapowym procesie hydrolizy enzymatycznej uzyskuje się produkty o relatywnie niskiej wartości stopnia scukrzenia DE.
3. W przypadku procesu dwuetapowego optymalny stopień upłynnienia  $\alpha$ -amylazą bakteryjną w pierwszym etapie hydrolizy determinuje efektywność całego procesu; w przypadku zbyt zaawansowanej hydrolizy wstępnej w drugim etapie procesu w reaktorze membranowym efektywność filtracji jest zbyt mała w stosunku do szybkości zachodzącej hydrolizy.
4. W prowadzonych procesach z wykorzystaniem bioreaktora membranowego zjawisko foulingu nie wywiera istotnego wpływu na wydajność separacji otrzymanych produktów hydrolizy.
5. Wszystkie badane substancje, tj. zarówno modyfikowana chemicznie skrobia, jak i produkty jej hydrolizy, absorbują się na granicy faz woda/powietrze i obniżają napięcie powierzchniowe.
6. Zdolność obniżania napięcia powierzchniowego produktów hydrolizy jest wyższa niż wyjściowej skrobi modyfikowanej.



7. Lepsze właściwości adsorpcyjne mają skrobie zhydrolizowane w procesie dwuetapowym niż jednoetapowym.

*Pracę zrealizowano w ramach grantu KBN nr 2 P06T 052 27 oraz badań własnych nr 32-118/05 BW.*

### Literatura

- [1] Chattoraj D. K., Birdi K. S.: Adsorption and the Gibbs Surface Excess. Plenum Press. New York 1984.
- [2] Lewandowicz G., Wronkowska M., Sadowska J., Soral-Śmietana M., Błaszczak W., Walkowski A.: Influence of potato starch oxidation on texture and rheological behaviour of some sweet desserts. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2003, **12/53**, 31-36.
- [3] Nebesny E.: Changes of carbohydrate composition during enzymatic hydrolysis of starches of various origin. *Starch-Stärke*, 1993, **45 (12)**, 426-429.
- [4] Parandosh S., Hudson S.M.: The acetylation and enzymatic degradation of starch films. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1993, **48**, 787-791.
- [5] PN-78/A-74701. Hydrolizaty skrobiowe. Metody badań.
- [6] Prochaska K.: Interfacial activity of metal ion extractant. Review, *Adv. Colloid Interface. Sci.*, 2002, **95**, 51-70.
- [7] Shogren R.A., Wiswanathan A., Felker F., Gross R.A.: Distribution of octenyl succinate groups in octenyl succinic anhydride modified waxy maize starch. *Starch-Stärke*, 2000, **52**, 196-204.
- [8] Sims K.A., Cheryan M.: Continuous saccharification of corn starch in a membrane reactor. Part II: Membrane performance and reactor stability. *Starch-Stärke*, 1992, **44 (9)**, 345-348.
- [9] Sitohy M.Z., Ramadan M.F.: Degradability of different phosphorylated starches and thermoplastic films prepared from corn starch phosphomonoesters. *Starch-Stärke* 2001, **53**, 317-322.
- [10] Słomińska L., Grajek W., Grześkowiak A., Goczałek M.: Enzymatic starch saccharification in an ultrafiltration membrane reactor. *Starch-Stärke*. 1998, **50 (9)**, 390-396.
- [11] Słomińska L., Szostek A., Grześkowiak A.: Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Carbohydr. Polym.*, 2002, **50**, 423-428.
- [12] Śmigielńska H., Lewandowicz G., Walkowski A.: Wpływ dodatku mikroelementów na właściwości użytkowe skrobi utlenionych. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, seria Scientia Alimentaria*, w druku.
- [13] Walkowski A., Lewandowicz G.: Skrobie modyfikowane - właściwości technologiczne i zakres stosowania. *Przem. Spoż.*, 2004, **58 (5)**, 49-51.
- [14] Walkowski A., Mączyński M., Lewandowicz G.: Tendencies in a development of food starch products market in Poland. In: *Starch: From Starch Containing Sources to Isolation of Starches and Their Applications* – red. Yuryev V.P., Tomasik P., Ruck H. Nova Science Publishers, Inc. New York 2004, pp. 29-38.

### S u m m a r y

Oxidised starches E 1404 are the most popular food modified starches, but in the literature available, there are no reports referring to enzyme susceptibility of these derivatives, neither are known functional properties of the oxidised products of enzymatic hydrolysis.

The objective of this research was to study possibilities of applying a membrane bioreactor in the process of enzymatic hydrolysis of oxidised starches, and to assess surface properties of the products obtained. The hydrolysis process was carried out in a membrane bioreactor equipped with an ultra-filtration module of a tubular configuration. Single-step and two-step hydrolysis processes were investigated; various amylolytic enzymes were used in the processes studied. For the purpose of assessing adsorptive properties, surface tension was investigated using a 'du Noüy' ring method. It was stated that the oxidised starches underwent hydrolysis in the enzymatic membrane bioreactor; furthermore, it was proved that it was not necessary to apply the initial liquefaction of starches with an  $\alpha$ -amylase to achieve an effective progress of the hydrolysis process. During the single-step hydrolysis the products obtained showed a relatively low degree of saccharification. As for the two- step hydrolysis, the complete process effectiveness depended on the optimal degree of liquefaction with an  $\alpha$ -amylase during the first stage of the hydrolysis. The phenomenon of fouling did not significantly impact the separation efficiency of maltodextrin produced. The oxidised products of hydrolysis, as well as the raw material showed surface activity, and caused the reduction in the surface tension at the water-air interface.

**Key words:** enzymatic hydrolysis, membrane bioreactor, oxidised starch, surface activity 

MONIKA TWORKO

**BADANIE POSTAW KONSUMENTÓW W ZAKRESIE RELACJI –  
HIGIENA ŚRODOWISKA DOMOWEGO A ŻYWNOSĆ  
(BADANIA PILOTAŻOWE)**

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu szeroko rozumianej higieny środowiska domowego na jakość zdrowotną posiłków przygotowywanych w domu.

Badania przeprowadzono za pomocą kwestionariusza ankietowego. Obejmowały one 50 losowo wybranych gospodarstw domowych z dwóch województw (mazowieckiego i podkarpackiego). Wykazano nieprawidłowości związane z higieną środowiska domowego (np. zwracanie niedostatecznej uwagi na termin przydatności produktu żywnościowego do spożycia), nieprzestrzeganie podstawowych zasad higieny (np. układanie produktów w chłodziarce na przypadkowych półkach). Głównym źródłem wiedzy respondentów z zakresu higieny środowiska domowego były informacje wyniesione z domu rodzinnego (86%), natomiast w mniejszym stopniu z radia, telewizji i czasopism (26–36%).

Analizowane wyniki wskazują na potrzebę dalszych badań w tym zakresie, co mogłoby stanowić cenne źródło informacji służącej edukacji dotyczącej bezpieczeństwa żywności, tak aby zredukować przypadki zatrucia żywnością w domu.

**Słowa kluczowe:** higiena środowiska domowego, bezpieczeństwo żywności

## Wprowadzenie

Wg Codex Alimentarius [13], higiena żywności to wszystkie warunki i środki niezbędne do zapewnienia bezpieczeństwa i odpowiednich właściwości żywności na wszystkich etapach łańcucha żywnościowego. Przy czym przez bezpieczeństwo żywności rozumie się zapewnienie, że żywność nie spowoduje uszczerbku zdrowia konsumenta, jeśli jest przygotowana i/lub spożywana zgodnie z zamierzonym zastosowaniem.

Do zagadnień zapewnienia bezpieczeństwa i wysokiej jakości zdrowotnej żywności przywiązuje się coraz większą wagę. Problematyka ta staje się tym bardziej aktualna, że mimo stałego podnoszenia standardów higienicznych produkcji żywności

i wprowadzania nowoczesnych technologii, liczba notowanych zatruc i zakażeń pokarmowych jest nadal duża [17]. W krajach Unii Europejskiej priorytetową sprawą stała się potrzeba bezpieczeństwa zdrowotnego żywności, co znalazło odzwierciedlenie w reformie prawa żywnościowego [15].

W dalszym ciągu zatrucia pokarmowe stanowią duży udział w liczbie zachorowań. W Polsce, w 2004 r. ogólna liczba zatruc wyniosła ponad 20 tys. odnotowanych przypadków [12]. Studia epidemiologiczne w Holandii wskazują, że 80% zakażeń bakteriami *Salmonella* i *Campylobacter* było powiązanych z przygotowywaniem żywności w domu. W Niemczech i we Francji duża liczba chorób pochodzenia pokarmowego w rodzinach świadczy o tym, że przygotowanie potraw w domach jest głównym źródłem chorób powiązanych z żywnością. Należy sobie zdawać sprawę z równie dużej liczby przypadków zatruc nienotowanych, a powiązanych z żywnością przygotowywaną w domu [4].

W wielu rozwijających się krajach choroby zakaźne są głównym powodem zgonów, szczególnie wśród dzieci. Organizacja WHO określa, że 1 z 3 zgonów jest skutkiem chorób zakaźnych. Wzrost liczby zatruc pokarmowych obserwowany jest w prawie każdym kraju europejskim. Przypisano temu zmiany stylu życia i gorszą higienę w domu [10]. Środowisko domowe jest integralną częścią życia człowieka, oddziałującą w sposób bezpośredni na jego zdrowie i dobrostan. W domu istnieje wiele czynników, które wpływają na stan zdrowia mieszkańców np.: zwierzęta domowe, powierzchnie blatów, podłóg (farby, lakiery), środki utrzymania higieny (np. deratyzacyjne lub dezynfekcyjne), osoby odwiedzające itp. Kontrola higieny środowiska domowego może zapobiec wielu infekcjom. Szeroko rozumiany postęp i rozwój wielu dziedzin życia, stworzyły konieczność zwrócenia uwagi na ten aspekt. Wskazują na to także dane epidemiologiczne dotyczące liczby chorób, których przyczyną jest środowisko domowe [3].

Tak, jak w przedsiębiorstwach przetwarzania żywności, potencjalne niebezpieczeństwa w domu mogą być podzielone na 3 kategorie [11]:

- biologiczne, w tym mikrobiologiczne: bakterie, wirusy, pasożyty,
- chemiczne: substancje czyszczące itd.,
- fizyczne: szkło, metal, inne ciała obce.

Konsument ma ograniczony wpływ na to, co znajduje się w produkcie, który kupuje. Jednak od niego zależy, w jaki sposób zajmie się jego obróbką w gospodarstwie domowym. Produkt całkowicie bezpieczny, po przyniesieniu do domu może, poprzez nieprawidłowe postępowanie np.: nie zwracanie uwagi na termin przydatności produktów do spożycia, przerwanie łańcucha chłodniczego, niehigieniczne obchodzenie się z produktami surowymi (głównie mięsem) czy zbyt długie przechowywanie w temperaturze pokojowej potraw po ugotowaniu, zostać skażony mikrobiologicznie lub chemicznie i stać się niebezpieczny dla zdrowia [17].

Proponuje się więc zastosowanie metody HACCP do analizy zagrożeń w gospodarstwie domowym. Badania uważa się za uzasadnione w celu opracowania

właściwych praktyk higienicznych i podstaw materiałów edukacyjnych skierowanych do różnych grup docelowych [4, 9, 14, 17]. Bolton [4] uważa, że niezbędna jest edukacja konsumentów dotycząca właściwych zasad higieny żywności, określająca najczęstsze błędy związane z jej brakiem, które występują w czasie przygotowywania posiłków w domu.

Celem przedstawionych badań było określenie wpływu szeroko rozumianej higieny środowiska domowego na jakość zdrowotną żywności przygotowywanej w domu.

### **Materiał i metody badań**

Przedmiot badań, przeprowadzonych w Zakładzie Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności SGGW w Warszawie, stanowiły gospodarstwa domowe województwa podkarpackiego i mazowieckiego. Obszary te są wyraźnie zróżnicowane pod względem ekonomicznym i społecznym. Liczba ludności woj. mazowieckiego (ponad 5 mln) jest dwa razy większa w porównaniu z woj. podkarpackim, a 60% tej ludności stanowi ludność miejska, gdy tymczasem w woj. podkarpackim ludność miejska stanowi 40%. Stopa bezrobocia w woj. mazowieckim wynosi 17,4% co stanowi najniższy wskaźnik w kraju. W przeciwieństwie do tego, w woj. podkarpackim stopa bezrobocia wynosi 21,4% i jest to jeden z najwyższych wskaźników w kraju [6, 7].

Badaniem objęto po 25 losowo wybranych respondentów w każdym z województw, w wieku od 25 do 60 lat. W skład analizowanej grupy wchodziło 47 kobiet oraz 3 mężczyzn zajmujących się przygotowywaniem posiłków w domu.

Badania wykonano metodą ankietową, za pomocą wywiadu bezpośredniego przeprowadzanego z osobą odpowiedzialną w największym stopniu w każdym z gospodarstw domowych za zakup żywności, jej przechowywanie i przygotowanie. W związku z tym zwrotność ankiet wynosiła 100%. Kwestionariusz ankiety zawierał 29 pytań dotyczących:

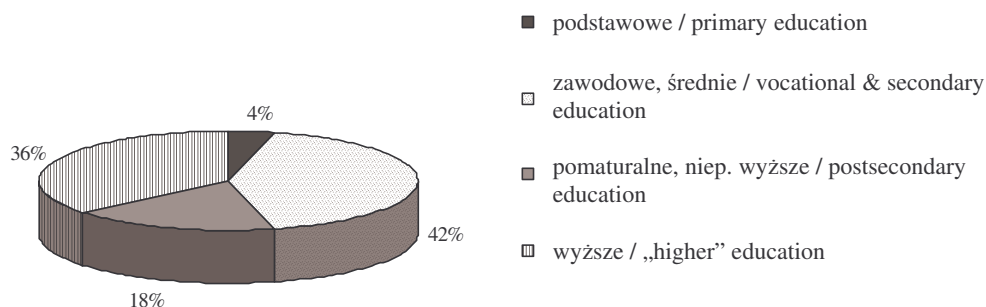
- sposobu kupowania i przechowywania żywności,
- postępowania z żywnością podczas sporządzania posiłków,
- czynności związanych z utrzymaniem higieny w gospodarstwie domowym,
- opinii stwierdzających stopień świadomości żywieniowej badanych,
- źródła informacji z zakresu higieny,
- stwierdzonych przypadków zatruc pokarmowych w gospodarstwie domowym.

Kwestionariusz ankiety został sformułowany w taki sposób, że w poszczególnych pytaniach była możliwość zaznaczenia więcej niż jednej odpowiedzi.

### **Wyniki i dyskusja**

Respondenci byli członkami gospodarstw domowych o zróżnicowanym charakterze pod względem liczby osób w gospodarstwie, wykształcenia i dochodu netto na 1 członka w rodzinie. Elementy te uwzględniono w analizie wyników badania.

Badana grupa składała się z 48% gospodarstw 4–5 osobowych, 24% gospodarstw 2–3 osobowych, 20% gospodarstw 6–10 osobowych oraz 8% gospodarstw 1-osobowych. Strukturę wykształcenia respondentów przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Struktura respondentów pod względem wykształcenia.

Fig. 1. Percentage distribution of respondents with regard to their education levels.

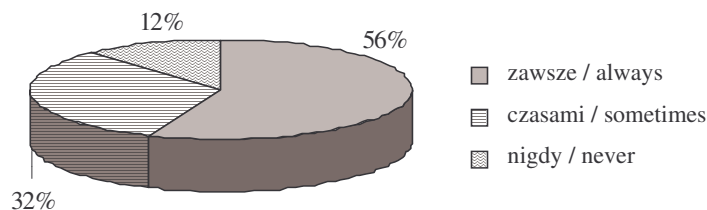
Dochód netto na 1 członka w rodzinie badanej grupy wynosił:

- do 300 zł – 38%,
- od 300–600 zł – 18%,
- od 600–1000 zł – 22%,
- 1000–1500 zł – 12%,
- pow. 1500 zł – 10%.

Ze względu na wagę bezpieczeństwa środowiska domowego, w badaniach ankietowych szczególne znaczenie miały pytania dotyczące kupowania i przechowywania żywności, poprawnego postępowania kulinarnego oraz wiedzy z zakresu higieny.

Systemy monitorowania skażeń żywności wskazują, że zwiększa się ryzyko obecności w produktach drobnoustrojów zagrażających zdrowiu konsumenta. Zdarzające się zatrucia pokarmowe wynikają m.in. z braku nawyku kontrolowania terminu przydatności do spożycia produktu spożywczego [8].

Z przeprowadzonych badań wynika, że 56% respondentów zawsze, podczas zakupu produktu spożywczego, zwracało uwagę na termin jego przydatności do spożycia, 32% robiło to czasami, natomiast 12% nigdy nie sprawdzało podczas zakupu terminu przydatności produktu do spożycia (rys. 2).



Rys. 2. Udział osób deklarujących sprawdzanie podczas zakupu terminu przydatności do spożycia produktu spożywczego.

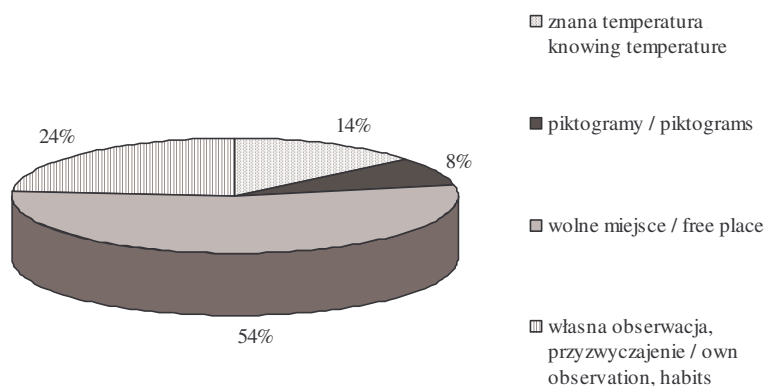
Fig. 2. Percentage distribution of people declaring that they check expire dates of products when purchasing them.

Analiza postępowania konsumentów w gospodarstwie domowym, dotycząca przechowywania żywności i sporządzania posiłków, była kolejnym etapem rozpoznania wiedzy respondentów o sposobie osiągnięcia bezpieczeństwa zdrowotnego produktów.

Właściwe przechowywanie żywności zapewnia jej odpowiednią jakość i bezpieczeństwo zdrowotne [11]. W związku z wymaganiami konsumentów dotyczącymi minimalnie przetworzonej żywności i produktów z długim okresem przydatności do spożycia, użycie chłodziarki wzrosło znacząco w ciągu ostatnich kilkunastu lat. Bardzo ważne jest jednak właściwe obchodzenie się z żywnością w niej przechowywaną [1]. W analizowanej grupie 54% respondentów odpowiedziało, że układa produkty na wolnym miejscu w chłodziarce, 24% deklorowało własne przyzwyczajenia i obserwacje, 14% ankietowanych przy układaniu kierowało się znaną temperaturą na półkach, natomiast tylko nieliczna grupa 8% układała produkty zgodnie z piktogramami znajdującymi się w chłodziarkach (rys. 3).

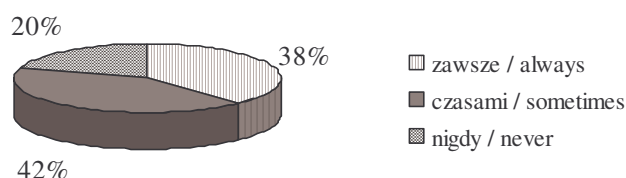
W pytaniu kwestionariusza dotyczącym świadomości konsumentów odnośnie tego czy „produkty w chłodziarce powinny być układane zgodnie ze wskazaniem producenta żywności lub wiedzą na temat przechowywania poszczególnych produktów” tylko 10% respondentów odpowiedziało, że nie zgadza się z tą opinią, 18% nie miało zdania. Pozostała część grupy badanych deklorowała, że zgadza się z tym stwierdzeniem (30%) oraz prawie połowa (42%) „całkowicie zgadza się” z tą opinią.

Natomiast w przypadku pytania dotyczącego sprawdzania terminu przydatności produktu do spożycia, przechowywanego w domu, w momencie wyjmowania go z chłodziarki, największa, licząca 42% grupa badanych respondentów odpowiedziało, że robi to czasami, podobna liczba badanych (38%) deklorowała kontrolę ważności produktu zawsze. Mniej liczna, ale równie duża liczba badanych (20%) sugerowała, że nigdy nie wykonuje tej czynności (rys. 4.).



Rys. 3. Udział osób deklarujących sposoby układania produktów w chłodziarce.

Fig. 3. Participation of people declaring ways of arranging the products in the fridge.



Rys. 4. Udział osób deklarujących sprawdzanie terminu przydatności do spożycia po wyjęciu produktu z chłodziarki.

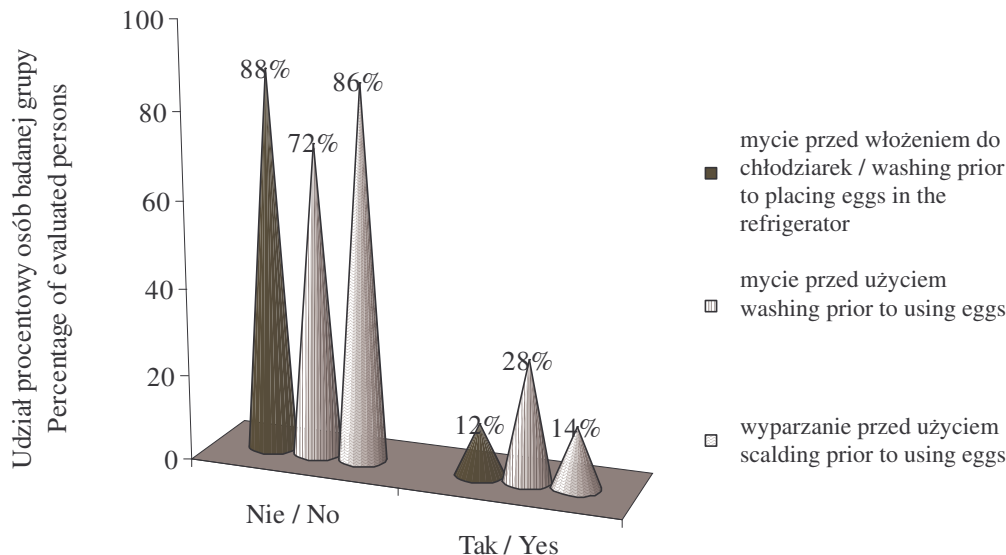
Fig. 4. Percentage distribution of people declaring that they check expiry dates of food products as soon as they take them out from refrigerators.

Na pytanie czy „należy kontrolować termin przydatności do spożycia produktów przechowywanych w chłodziarce”, znaczna grupa respondentów (92%) deklarowała, że całkowicie zgadza się z tym stwierdzeniem, nieliczni (2%) deklarowali, że nie mają zdania, a 6% badanych całkowicie nie zgadzało się z tym stwierdzeniem.

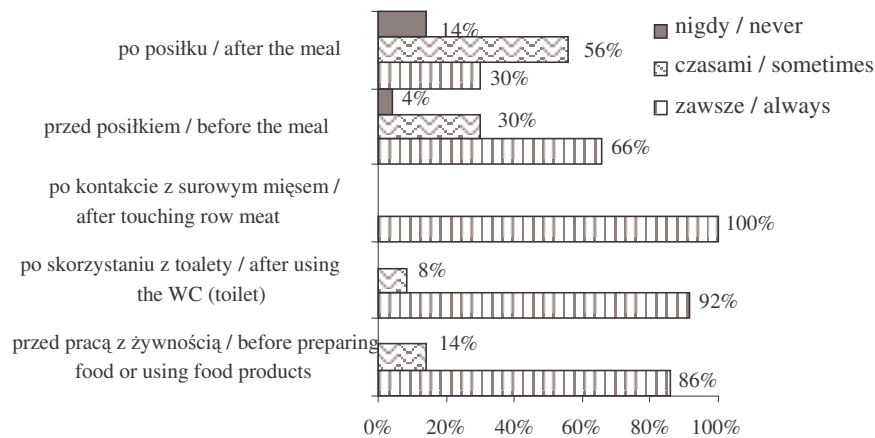
Bardzo ważne jest właściwe obchodzenie się z jajami spożywczymi podczas przygotowania posiłku, ze względu na zatrucie powodowane przez *Salmonella* [11, 16]. Problem mycia jaj w nowoczesnej technologii ma tyle samo zwolenników, co i przeciwników. Z jednej strony zabieg mycia może istotnie zmniejszać zakażenie mikroflorą bakteryjną wybitej treści jaj. Z drugiej natomiast istnieje możliwość uszkodzenia słabych skorup i przedostania się zakażeń do treści jaja [16].

Na pytanie czy jaja są myte przed włożeniem do chłodziarki 88% respondentów odpowiedziało „nie” co jest prawidłową procedurą, natomiast 12% „tak”. W pytaniu dotyczącym mycia jaj przed zastosowaniem 72% stanowiły odpowiedzi „nie”, a 28% odpowiedzi „tak”. Natomiast w kwestii parzenia jaj przed użyciem, 86% respondentów odpowiedziało, że tego nie robi, a 14% odpowiedziało pozytywnie (rys. 5).





Rys. 5. Udział procentowy osób deklarujących postępowanie z jajami podczas przygotowania posiłku.  
 Fig. 5. Percentage distribution of people declaring that they specifically prepare eggs prior to applying them to make a meal.



Rys. 6. Zestawienie procentowe odpowiedzi dotyczących sytuacji, w których respondenci myją ręce.  
 Fig. 6. Percentage breakdown of answers related to situations when respondents wash their hands.

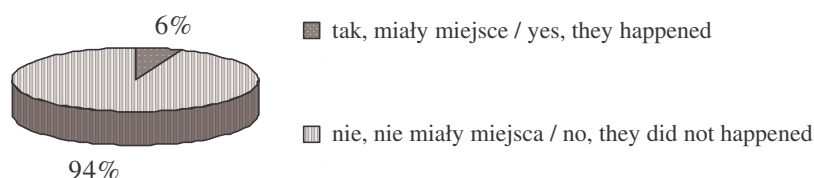
Natomiast w pytaniu kwestionariusza dotyczącym świadomości konsumentów odnośnie tego czy „jaja powinny być myte lub myte i parzone przed użyciem” około 4/5 (82%) ankietowanych całkowicie zgodziło się z tą opinią, pozostali dzielili się na tych, którzy nie mają zdania (10%) oraz nie zgadzają się ze stwierdzeniem (8%).

Według deklaracji respondentów, przywiązują oni dużą wagę do mycia rąk. Ponad 80% twierdziło, że myje ręce przed pracą z żywnością (86%), po skorzystaniu z toalety (92%), po kontakcie z surowym mięsem (100%). Mniejsza, ale znaczna liczba deklaruje mycie rąk przed posiłkiem (66%), natomiast mycie rąk po posiłku wykonuje

30%. Zgodnie z deklaracjami respondentów tylko 4% nie myje rąk przed posiłkiem i 14% po posiłku (rys. 6).

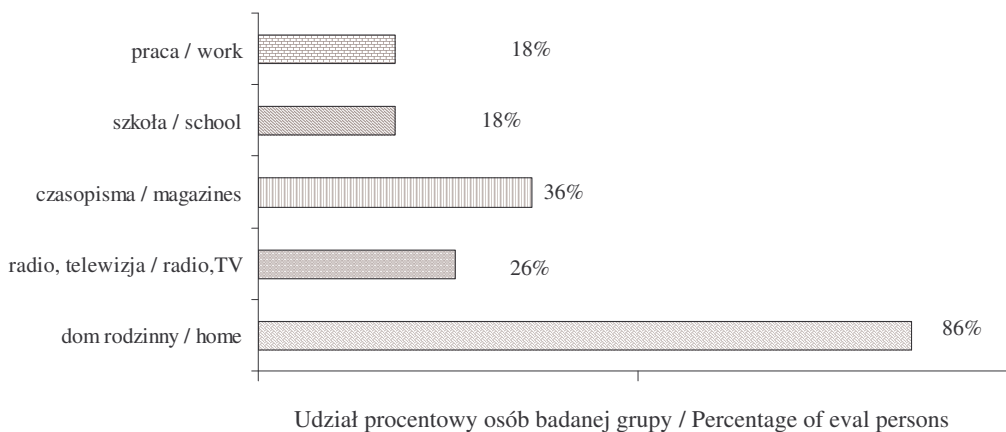
Na pytanie o przypadki zatruc pokarmowych w ciągu ostatniego roku 94% respondentów twierdziło, że ani oni, ani członkowie ich rodzin nie doznali zatrucia pokarmowego w tym czasie. Ci, którzy mieli zatrucia pokarmowe w tym czasie (6%) jako źródło podejrzewają żywność kupioną w supermarkecie (rys. 7).

Na podstawie badań przeprowadzonych w Irlandii uzyskano podobne wyniki: 80,5% respondentów twierdziło, że pytanie nie odnosi się do nich, gdyż zatrucie pokarmowe w ich domu nie miało miejsca w ciągu ostatnich 12 miesięcy. Miejsca, które wymieniono jako źródło zatruc pokarmowych to: restauracje, żywność kupowana na wnos, pikniki [5].



Rys. 7. Deklarowane przypadki zatruc pokarmowych w rodzinie w okresie ubiegłego roku.

Fig. 7. Declared cases of food poisoning in a family during the past year.



Rys. 8. Deklarowane źródło wiedzy z zakresu higieny postępowania z żywnością.

Fig. 8. Declared source of knowledge referring to hygienic proceeding with food.

Wiedza z zakresu higieny postępowania z żywnością pochodzi w przypadku większości (86%) z domu rodzinnego. Kolejnym ważnym źródłem, stanowiącym 36%, były czasopisma, w 26% radio/telewizja i po 18% szkoła i praca (rys. 8.).

W badaniach przeprowadzonych w Irlandii respondenci deklarowali, że wiedzę żywieniową czerpią w 52,1% z domu rodzinnego, w ponad 20% ze szkoły, w 21% z telewizji, w 16,6% z czasopism. Ważne źródło informacji dla ankietowanych, stanowiące 25,6%, było bliżej nie zdefiniowane ogólne doświadczenie życiowe [5].

Sposób odpowiedzi respondentów na pytania zawarte w kwestionariuszu ankiety wskazuje na konieczność konstruowania pytań w ankiecie umożliwiających bardziej wnikliwą ocenę rzeczywistej wiedzy respondentów o prawidłowych zasadach higieny żywności i żywienia w środowisku domowym.

### Wnioski

1. Przeprowadzone badania wykazały nieprawidłowości związane z higieną środowiska domowego polegające między innymi na niedostatecznym zwracaniu uwagi na termin przydatności produktu żywnościowego do spożycia, nieprzestrzeganiu podstawowych zasad higieny dotyczących np. układania produktów w chłodziarce na przypadkowych półkach.
2. Głównym źródłem wiedzy respondentów z zakresu higieny środowiska domowego są informacje wyniesione z domu rodzinnego, natomiast w mniejszym stopniu z radia/telewizji i czasopism.

### Literatura

- [1] Azevedo I., Regalo M., Mena C., Almeida G., Carneiro L., Teixeira P., Hogg T., Gibbs P.A.: Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control*, 2005, **16**, 121-124.
- [2] Bertrand J.: Nadzór higieniczny nad żywnością w armii w perspektywie historycznej. *Materiały XXVIII Sesji Naukowej Żywnienie Człowieka i Metabolizm*. Warszawa 2001, 50-55.
- [3] Beumer R., Bloomfield S. F., Exner M., Fara G.M.: Recommendations for selection of suitable hygiene procedures for use in the domestic environment, Supplement to the Guidelines for prevention of infection and cross infection in the domestic environment, International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH), 2003.
- [4] Bolton D.J.: Food Safety Knowledge. Microbiological Hazards in the Domestic Kitchen. *Catering Food Safety of Responsibility Ignored*, EU-RAIN Conference Presentations CD, Budapest, Hungary, 26-28.11. 2003.
- [5] Bolton D.J., Kennedy J., Jackson V., Blair I., Cowan C.: A scientific study of consumer food safety knowledge. *Food Safety Risk Communication: The Message and Motivational Strategies*, EU-RAIN. Gothenburg, Sweden 2005, pp. 86-91.
- [6] Charakterystyka gospodarcza i struktura geograficzna woj. mazowieckiego, [http://pl.wikipedia.org/wiki/Kategoria:Wojewodztwo\\_mazowieckie](http://pl.wikipedia.org/wiki/Kategoria:Wojewodztwo_mazowieckie).
- [7] Charakterystyka gospodarcza i struktura geograficzna woj. podkarpackiego, [www.podkarpackie.pl](http://www.podkarpackie.pl).
- [8] Fandrejewska M., Olczyk B.: Sposoby zachowania przez konsumentów bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów mlecznych w gospodarstwie domowym. *Materiały XXVIII Sesji Naukowej, Żywnienie Człowieka i Metabolizm*. Warszawa 2001, s. 321-326.
- [9] Jackson V.: Food Safety Knowledge and Practices in Irish Homes. *Catering Food Safety – A Responsibility Ignored?*, Conference Programme. EU-RAIN, Budapest, Hungary 26-28.11. 2003.
- [10] Jones M.V.: Application of HACCP to identify hygiene risks in the home. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1998, **41**, 191-199.
- [11] Kołożyn-Krajewska D. (red.): *Higiena produkcji żywności*. Wyd. SGGW. Warszawa 2003.
- [12] Meldunek roczny 2004 o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach związkami chemicznymi zgłoszonych w 2004 r., [www.pzh.gov.pl/epimeld](http://www.pzh.gov.pl/epimeld).
- [13] Recommended International Code of Practice – general Principles of Food Hygiene, CAC/RCP 1-1969, Rev (1997), Amended 1999, vol.1A.

- [14] Ropkins K., Beck A.J.: HACCP in the home: a framework for improving awareness of hygiene and safe food handling with respect to chemical risk. Trends Food Sci. Technol., 2000, **11**, 105-114.
- [15] Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych
- [16] Trziszka T. (red.): Jajczarstwo. Nauka. Technologia. Praktyka. Wyd. AR Wrocław. Wrocław 2000.
- [17] Quigley T.: Promoting safe food handling in the home. Food Safety Risk Communication: The Message and Motivational Strategies, EU-RAIN. Gothenburg, Sweden, 2005, 128-131.

*Przedstawione badania stanowią wstęp do pracy doktorskiej wykonywanej pod kierunkiem prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej*

#### **THE STUDY ON CONSUMER ATTITUDES TO THE RELATION BETWEEN HYGIENE IN HOME ENVIRONMENT AND FOOD (A PILOT STUDY)**

##### S u m m a r y

The objective of the study was to assess the effect of a domestic kitchen environment on the safety of meals prepared at home.

The survey was performed using a questionnaire method. It comprised 50 randomly selected households from two provinces (Województwo Mazowieckie and Województwo Podkarpackie). Improprieties referring to the hygiene in home environments were pointed out (for example, expire dates of food products were disregarded or insufficiently regarded); it was stated that basic principles of food hygiene were not obeyed (for example, food products were placed on random shelves in refrigerators). Respondents (86%) acquired information about the hygiene in home environment from their families (it was their main source of information), and, to a lower degree, over radio, TV and/or magazines (26-36% of respondents).

The study results analysed prove that there is a necessity to conduct further investigations in this domain, since their outcome and conclusions could be a valuable source of information useful in educating people with food safety in order to reduce incidence of food poisoning in the homes.

**Key words:** environment home hygiene, food safety 

MARIA WACHOWIAK, JAN KIRYLUK

## **PRÓBA OPRACOWANIA METODY SZACOWANIA ZAWARTOŚCI β-GLUKANÓW W OTRĘBACH OWSIANYCH**

### **Streszczenie**

Celem badań było opracowanie prostej i taniej metody oznaczania zawartości β-glukanów jako narzędzia kontroli procesu produkcji otręb owsianych i jakości produktu finalnego.

Materiał doświadczalny stanowiły handlowe otręby owsiane, które poddano rozdrabnianiu i sortowaniu. Wydzielono 3 frakcje o zróżnicowanej zawartości β-glukanów. Przez zmieszanie odpowiednich ilości tych frakcji uzyskano 10 mieszanek o zawartości β-glukanów od 2 do 7%. Z prób sporządzano kwaśne ekstrakty i mierzono ich lepkość dynamiczną. Zmiennymi w doświadczeniach były: skład granulacyjny prób, czas rozpoczęcia pomiaru lepkości od chwili sporządzenia ekstraktu, stężenie ekstraktu, zawartość tłuszczu w próbach.

Wzrost zawartości β-glukanów w mieszankach otręb owsianych od 2 do 7% powodował proporcjonalny wzrost lepkości kwaśnych ekstraktów z tych mieszanek od 1,5 do 10cP. Odtłuszczenie otręb owsianych przed przygotowaniem kwaśnych ekstraktów nie miało statystycznie istotnego wpływu na lepkość tych ekstraktów. Na podstawie pomiarów lepkości dynamicznej kwaśnych ekstraktów – przy zachowaniu sposobu przygotowania prób oraz warunków prowadzenia pomiarów lepkości, określonych w niniejszej pracy – można szacować zawartość β-glukanów w otrębach owsianych.

**Słowa kluczowe:** ziarno owsa, β-glukany, lepkość dynamiczna

### **Wstęp**

Skład chemiczny ziarna owsa istotnie różni się od innych zbóż. Korzystny zestaw składników odżywczych oraz wysoka zawartość błonnika pokarmowego w ziarnie owsa stanowi o jego znacznych walorach odżywczych i profilaktycznych. Ziarno owsa może być surowcem do otrzymywania żywności funkcjonalnej o specjalnie skoncentrowanej w procesie technologicznym zawartości błonnika pokarmowego, z dużym udziałem szczególnie cennej w profilaktyce hipercholesterolemii i cukrzycy

---

*Mgr inż. M. Wachowiak, dr hab. J. Kiryluk, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań*

jego frakcji rozpuszczalnej. W skład frakcji rozpuszczalnej błonnika pokarmowego ziarna owsa wchodzi głównie  $\beta$ -glukany [3, 4, 5].

Obecnie znane są już metody przemiału ziarna owsa umożliwiające uzyskanie między innymi otrąb owsianych – produktu wysokobłonnikowego. Zgodnie z wymaganiami jakościowymi otręby owsiane powinny zawierać co najmniej 5,5%  $\beta$ -glukanów w s.m., a zawartość błonnika pokarmowego nie powinna być mniejsza niż 16% s.m. [1]. Analiza jakości otrąb owsianych dostępnych na rynku amerykańskim i niemieckim wykazała, że znaczna ich część nie odpowiada tym wymaganiom i nadużyciem jest ich sprzedaż jako produktu o cechach żywności funkcjonalnej [6]. Stąd też celowe wydaje się opracowanie stosunkowo taniej i szybkiej metody szacowania zawartości  $\beta$ -glukanów w produktach pośrednich i końcowych, uzyskanych w procesie przemiału ziarna owsa, jako narzędzia kontroli procesu technologicznego i jakości produktu finalnego.

Celem pracy była próba opracowania metody szacowania zawartości  $\beta$ -glukanów w produktach przemiału ziarna owsa na podstawie pomiaru lepkości kwaśnych ekstraktów. W badaniach uwzględniono wpływ: stężenia ekstraktu, granulacji prób, odtłuszczania oraz przyjętej metody pomiaru na lepkość kwaśnych ekstraktów.

### **Materiał i metody badań**

Materiał doświadczalny stanowiły handlowe otręby owsiane wyprodukowane we wrześniu 2004 r. w Zakładach Zbożowo-Młynarskich w Kruszwicy. Otręby poddano rozdrabnianiu przy użyciu młyna udarowego Record i sortowaniu za pomocą odsiewacza laboratoryjnego (SZ-1). Uzyskano frakcje A, B i C różniące się wielkością cząstek (A –  $d < 150 \mu\text{m}$ ., B –  $150 < d < 265 \mu\text{m}$  i C –  $d > 265 \mu\text{m}$ ). We frakcjach tych oznaczano zawartość  $\beta$ -glukanów [1].

W dalszej części doświadczeń frakcje B i C dodatkowo rozdrabniano. Rozdrabnianie prowadzono przy użyciu laboratoryjnego młynka udarowego typu MH10a, a następnie odsiewano w odsiewaczu płaskim na sicie o wielkości otworów  $150 \mu\text{m}$  z gumowymi krążkami przez 10 min. Zabieg ten powtarzano do momentu, gdy całość materiału przesiała się przez to sito. Z frakcji A oraz po dodatkowym rozdrabnianiu frakcji B i C o znanej zawartości  $\beta$ -glukanów sporządzono mieszanki tak by zawartość  $\beta$ -glukanów w mieszankach wynosiła: 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7%. Część uzyskanych frakcji A, B i C i mieszanek poddano odtłuszczaniu. Próby odtłuszczano przy użyciu n-heksanu ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) [8].

Przygotowanie kwaśnego ekstraktu z badanych prób prowadzono zgodnie z metodą podaną przez R.S. Batthy'ego i wsp. [2]. Metodę modyfikowano przez zmianę stężenia ekstraktów (stosunek masy ekstrahowanej próby do objętości cieczy ekstrahującej). Przyjęto następujące stężenia ekstraktów 1:10, 1:15, 1:20.

Pomiaru lepkości dynamicznej ekstraktów dokonywano przy użyciu lepkościomierza Höepplera ( $k = 0,041968$  cSt/s) oraz przy użyciu lepkościomierza kapilarnego Ostwalda ( $k = 0,020975$  cSt/s). Pomiarów dokonywano bezpośrednio po uzyskaniu ekstraktu oraz po upływie 3 i 5 godz. od chwili uzyskania ekstraktu (czas odstania 3 i 5 godz.). Z każdego ekstraktu pobierano po 5 prób do pomiarów lepkości w temp.  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Według Zhanga i wsp.[9], zmiana temp. ekstraktów w zakresie od  $19$  do  $21^\circ\text{C}$  może powodować zmianę ich lepkości o około  $0,2$  cP.

W zależności od etapu doświadczeń dokonywano pomiaru lepkości dynamicznej ekstraktów uzyskanych z następujących produktów:

- w celu ustalenia stężenia ekstraktu i wpływu wielkości cząstek próby na lepkość ekstraktów analizowano lepkość ekstraktów uzyskanych z frakcji A oraz B i C bez dodatkowego rozdrabniania;
- w celu określenia wpływu czasu odstania na lepkość ekstraktów analizowano lepkość ekstraktów uzyskanych z frakcji A oraz B i C po dodatkowym rozdrabnianiu;
- w celu określenia wpływu zawartości  $\beta$ -glukanów i odtłuszczenia prób na lepkość ekstraktów mierzoną lepkościomierzem Höepplera analizowano lepkość ekstraktów ze wszystkich frakcji i wybranych mieszanek bez i po ich odtłuszczeniu;
- w celu określenia wpływu zawartości  $\beta$ -glukanów na lepkość uzyskanych ekstraktów mierzoną lepkościomierzem kapilarnym Ostwalda analizowano lepkość ekstraktów uzyskanych ze wszystkich frakcji i mieszanek bez ich odtłuszczenia.

Do analizy wyników zastosowano metodę regresji liniowej oraz wieloczynnikową analizę wariancji wg metod zawartych w pakiecie Statistica MS 2000.

## Wyniki i dyskusja

Otręby handlowe zawierały  $4,98\%$   $\beta$ -glukanów, natomiast zawartość  $\beta$ -glukanów we frakcjach A, B i C, uzyskanych z rozdrabniania otrąb, wynosiła odpowiednio  $1,97$ ,  $4,78$  oraz  $7,47\%$ .

Na podstawie wstępnych doświadczeń ustalono, że:

- Lepkość ekstraktów o stężeniu 1:20 zawierała się w zakresie pomiarowym lepkościomierza kapilarnego Ostwalda oraz lepkościomierza Höepplera. We wszystkich późniejszych doświadczeniach stosowano stężenie 1:20.
- Zmierzona lepkość ekstraktu uzyskanego z produktu C o największej zawartości  $\beta$ -glukanów ( $7,47\%$ ) była mniejsza niż lepkość ekstraktu uzyskanego z próby B o zawartości  $\beta$ -glukanów  $4,78\%$ . Ze względu na to, że o lepkości roztworu decyduje stopień wyekstrahowania  $\beta$ -glukanów (czynnika lepkiego), należy się



spodziewać, że w przypadku frakcji B o wielkości cząstek  $150 < d < 265 \mu\text{m}$  ekstrakcja

$\beta$ -glukanów była ułatwiona w porównaniu z ekstrakcją frakcji C o wielkości cząstek  $d > 265 \mu\text{m}$ . Jak podaje Zhang i wsp. [9], wielkość cząstek ma istotny wpływ na szybkość tworzenia kleiku z mąki owsianej.

W dalszych doświadczeniach frakcje B i C, zawierające cząstki większe niż  $150 \mu\text{m}$ , poddawano dodatkowemu rozdrabnianiu, tak by uzyskany produkt mógł być przesiany w całości przez sito o wielkości otworów  $150 \mu\text{m}$ .

- Wykonanie pomiaru lepkości ekstraktów bezpośrednio po ich uzyskaniu oraz po 3- i 5-godzinnym czasie odstania wykazało zmniejszenie się ich lepkości z upływem czasu. Lepkość zmierzona po 5-godzinnym okresie odstania zmniejszyła się o ponad 20% w stosunku do lepkości ekstraktów zmierzonej bezpośrednio po uzyskaniu ekstraktu. Uwzględniając szybkość zmian lepkości ekstraktu w czasie można oszacować, że w ciągu 1 godz. od chwili sporządzenia ekstraktu jego lepkość może zmniejszyć się o około 4%. W dalszych doświadczeniach lepkość ekstraktów mierzono przed upływem 1 godz. od chwili sporządzenia ekstraktu.

Ze wzrostem zawartości  $\beta$ -glukanów w analizowanych produktach przemiału ziarna owsa wzrastała proporcjonalnie lepkość uzyskanych ekstraktów niezależnie od zawartości tłuszczu w produktach przed ekstrakcją. Na podstawie wieloczynnikowej analizy wariancji wykazano, na poziomie istotności  $p=0,05$ , że odtłuszczanie prób nie powodowało statystycznie istotnych różnic pomiędzy lepkością odpowiadających sobie prób odtłuszczonych i nieodtłuszczonych ( $F_{\text{obl}} = 1,112$   $F_{\text{obl}} < F_{\text{tab}}$ , oraz  $p_{\text{obl}} = 0,294$   $p_{\text{obl}} > p_{\text{tab}}$ ), natomiast istotne było zróżnicowanie lepkości pomiędzy ekstraktami uzyskanymi z prób o różnej zawartości  $\beta$ -glukanów. Stwierdzenie to zgodne jest z wynikami podanymi przez Zhanga i wsp. [9].

Na rys. 1. przedstawiono prostą regresji określającą zależność pomiędzy zawartością  $\beta$ -glukanów w odtłuszczonych i nieodtłuszczonych produktach przemiału otrąb owsianych a lepkością ekstraktów uzyskanych z tych prób (lepkościomierz Höeplera).

W celu określenia związku pomiędzy lepkością ekstraktów (mierzoną lepkościomierzem Höeplera), z produktów przemiału otrąb owsianych niezależnie od zawartości tłuszczu, a zawartością  $\beta$ -glukanów w tych produktach, wyznaczono równanie regresji, które przyjęło postać:

$$\eta = 1,14 Z_{\beta} - 1,49$$

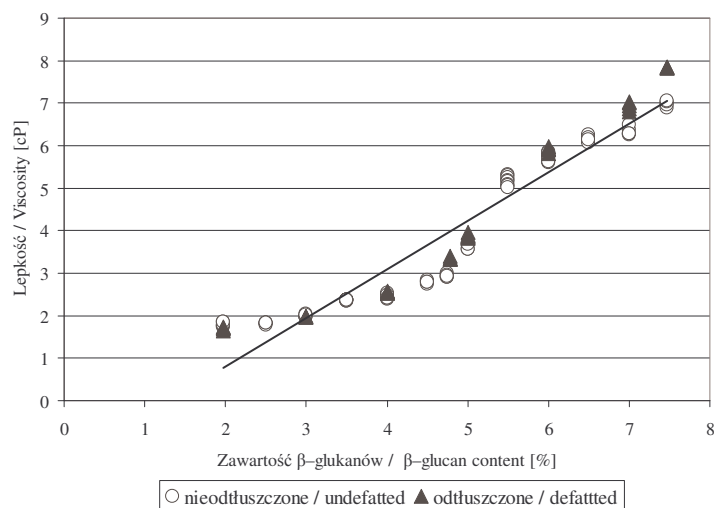
gdzie:  $\eta$  – lepkość dynamiczna [cP],

$Z_{\beta}$  – zawartość  $\beta$ -glukanów [%].

Zależność ta jest statystycznie istotna, a współczynnik determinacji wynosi 0,92.



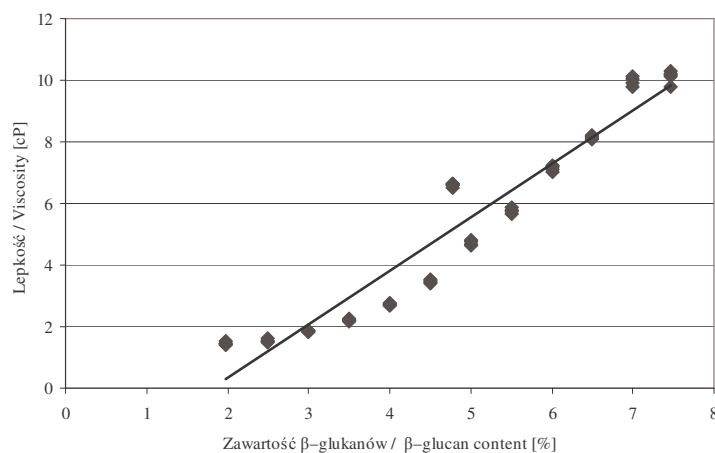
Ekstrakty z tych samych prób poddano także pomiarom lepkości przy użyciu lepkościomierza Oswalda.



Rys. 1. Zależność pomiędzy zawartością  $\beta$ -glukanów w odtłuszczonych i nieodtłuszczonych produktach przemiału otręb owsianych a lepkością ekstraktów uzyskanych z prób tych produktów (lepkościomierz Höeplera).

Fig. 1. The relationship between  $\beta$ -glucan content in defatted and undefatted oat bran milling products and viscosity of extracts obtained from samples of those products. (Höepler viscometer).

Na rys. 2. przedstawiono prostą regresji określającą związek pomiędzy lepkością ekstraktów z nieodtłuszczonych produktów przemiału otręb owsianych a zawartością  $\beta$ -glukanów w tych próbach (lepkościomierz Ostwalda).



Rys. 2. Wpływ zawartości  $\beta$ -glukanów na lepkość ekstraktów z nieodtłuszczonych produktów przemiału otrąb owsianych (lepkościomierz Ostwalda).

Fig. 2. Effect of the content of  $\beta$ -glucan on the viscosity of extracts made from undefatted oat bran milling products (Ostwald viscometer).

Wyznaczone równanie określające związek pomiędzy zawartością  $\beta$ -glukanów w próbie a lepkością ekstraktu mierzoną lepkościomierzem Ostwalda ma postać:

$$\eta = 1,73 Z_{\beta} - 3,12$$

i po przekształceniu do postaci:

$$Z_{\beta} = (\eta + 3,12) / 1,73$$

gdzie:  $\eta$  – lepkość dynamiczna [cP],

$Z_{\beta}$  – zawartość  $\beta$ -glukanów [%],

umożliwia obliczenie zawartości  $\beta$ -glukanów na podstawie wyznaczonej lepkości ekstraktów.

Zależność ta jest statystycznie istotna, a współczynnik determinacji wynosi 0,92.

Przedstawione wyniki badań wskazują, że lepkość ekstraktów z produktów przemiału ziarna owsa może być wskaźnikiem zawartości  $\beta$ -glukanów w tych produktach. Jednak stwierdzono różnice lepkości ekstraktów sporządzanych wg wspólnej metody z tych samych prób mierzonych lepkościomierzem Höepplera i Ostwalda. Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że różnice te są statystycznie istotne nawet przy poziomie istotności  $p = 0,1$ .

## Wnioski

1. Wzrost zawartości  $\beta$ -glukanów w otrębach owsianych powoduje proporcjonalny wzrost lepkości kwaśnych ekstraktów z tych produktów.
2. Odtłuszczanie otrąb owsianych przed przygotowaniem ekstraktu nie ma statystycznie istotnego wpływu na lepkość kwaśnych ekstraktów mierzoną lepkościomierzem Höeplera.
3. Na podstawie pomiaru lepkości dynamicznej kwaśnych ekstraktów z otrąb owsianych można szacować zawartość  $\beta$ -glukanów w tych produktach przy zachowaniu następujących warunków:
  - temperatura ekstraktu podczas pomiaru lepkości powinna wynosić  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,
  - pomiar lepkości kwaśnego ekstraktu powinien odbywać się przed upływem 1 godz. od momentu otrzymania ekstraktu,
  - stosunek masy produktu do objętości roztworu ekstrakcyjnego powinien wynosić 1 g/20 ml,
  - wielkość cząstek analizowanej próby powinna być mniejsza niż 150  $\mu\text{m}$ .
4. Proponowana metoda może być przede wszystkim zastosowana do określenia względnych różnic zawartości  $\beta$ -glukanów pomiędzy produktami uzyskiwanymi w procesie przemiału otrąb owsianych.
5. Z równań regresji  $\eta = f(Z_\beta)$  wyznaczonych dla obu metod wynika, że mają one podobną dokładność (współczynnik determinacji 0,92), natomiast wyższą czułością charakteryzuje się metoda z wykorzystaniem do pomiaru lepkości lepkościomierza Ostwalda.
6. Wyznaczenie bezwzględnej zawartości  $\beta$ -glukanów ( $Z_\beta$ ) w produktach przemiału otrąb owsianych na podstawie równania regresji wymaga dalszych badań, w których uwzględnić należy między innymi wpływ zmienności składu chemicznego surowca, warunków prowadzenia zabiegów hydrotermicznych i sposobu pomiaru lepkości na współczynniki równania regresji.

## Literatura

- [1] Approved Methods of the AACC, American Association of Cereal Chemists. The Association, St.Paul. MN., 1995.
- [2] Batthy R.S., MacGregor A.W., Rossnagel B.G.: Total and acid-soluble  $\beta$ -glucan content of hulles barley and its relationship to acid-extract viscosity. *Cereal Chem.*, 1991, **3** (68), 221-227.
- [3] Gąsiorowski H.: Owies w żywieniu zdrowego i chorego człowieka. PTTŻ OW. Poznań 1992, 33
- [4] Gąsiorowski H. (red): Owies – chemia i technologia PWRiL, Poznań 1995, 181
- [5] Gąsiorowski H.: Owies w żywieniu człowieka *Przeegl. Zboż – Młyn*, 2003, **4** (47), 2-3.
- [6] Gąsiorowski H., Kawka A., Kiryluk J., Ratajczak P.: Surowce i przetwory zbożowe o charakterze profilaktycznym i ich wykorzystanie. W: Stan aktualny i perspektywy rozwoju wybranych dziedzin

- przetwórstwa żywności – pod red. J. Warchalewskiego. PTTŻ – Oddział Wielkopolski, Polagra 1994, 167-203.
- [7] Michniewicz J, Kołodziejczyk P., Nadolińska J., Anioła J., Lichnowska A.: Ocena zawartości różnych form nieskrobiowych polisacharydów. *Przegl. Zboż. Młyn* 1998 **5** (42), 14-17.
- [8] Wu Y.V., Stringfellow A.C.: Enriched protein and  $\beta$ -glucan fractions from high-protein Oats by Air Classification. *Cereal Chem.*, 1995, **1** (72), 132-134.
- [9] Zhang D., Doehlert D.C., Moore W.R.: Factors affecting viscosity of slurries of oat groat flours. *Cereal Chem.*, 1997, **6** (74), 722-726.

### AN ATTEMPT TO ELABORATE THE METHOD OF ESTIMATING THE $\beta$ -GLUCAN CONTENT IN OAT BRAN

#### S u m m a r y

The objective of the paper presented was to develop an easy and low-cost method allowing for the determination of  $\beta$ -glucan content; this method would be a tool to manage the oat bran production process and the quality of final product.

The experimental material comprised commercial oat bran that were ground and sorted out. Three fractions were selected, each one containing a different content of  $\beta$ -glucan. By mixing adequate quantities of the three fractions, 10 mixtures were produced containing 2% to 7% of  $\beta$ -glucan. The samples obtained were used to make acid extracts; and the dynamic viscosity of the extracts was determined. In the experiences, the following parameters were variables: granulate composition of the samples; time period from the moment when the extract had been made and the moment of commencing the viscosity measurement, extract concentration level, and fat content in samples.

The increase in  $\beta$ -glucan content (by 2% to 7%) in oat bran mixtures caused a proportional increase in the viscosity (by 1,5 cP to 10 cP) of the acid extracts made from the mixtures. The process of defatting oat bran prior to making acid extracts had no statistically significant effect on the viscosity of extracts. Provided the method of making samples as indicated in this paper was applied, and all the specific conditions of measuring the viscosity levels were maintained, it was possible, on the basis of levels of dynamic viscosity measured, to estimate the the  $\beta$ -glucan content in oat bran.

**Key words:** oat grain,  $\beta$ -glucan, dynamic viscosity 

INGRID WACHOWICZ

## **WPLYW ROZMRAŻANIA SOLANKOWEGO NA JAKOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ MIĘSA KURCZĄT**

### **Streszczenie**

Celem pracy była ocena bezpieczeństwa mikrobiologicznego mięsa tuszek kurcząt po zastosowaniu rozmrażania solankowego i w powietrzu.

W mięsie tuszek kurcząt, po rozmrożeniu solankowym i w powietrzu oraz w 2., 4., 6. dniu przechowywania w temp. 4°C, oznaczono ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD) oraz liczbę psychrotrofów klasycznymi metodami płytkowymi.

Stwierdzono, że stosowanie rozmrażania solankowego nie wpłynęło w istotny sposób na bezpieczeństwo mikrobiologiczne mięsa tuszek kurcząt w stosunku do prób rozmrażanych w powietrzu. Zastosowano prognostyczny model Conline'a do zobrazowania wzrostu drobnoustrojów w mięsie po rozmrożeniu, w trakcie przechowywania. Na podstawie wyników analizy mikrobiologicznej OLD oszacowano termin trwałości mikrobiologicznej (średnio na 3-4 dni) mięsa tuszek kurcząt rozmrażanych badanymi metodami.

Stwierdzono, że stan mikrobiologiczny mięsa po rozmrożeniu tuszek w solance i w powietrzu nie różnił się statystycznie istotnie. Zatem rozmrażanie solankowe tuszek kurcząt nie wpłynęło istotnie na bezpieczeństwo mikrobiologiczne mięsa pochodzącego z tych tuszek w stosunku do mięsa z tuszek rozmrażanych w powietrzu.

**Słowa kluczowe:** mięso kurcząt, bezpieczeństwo mikrobiologiczne, rozmrażanie solankowe, rozmrażanie w powietrzu

### **Wprowadzenie**

Pojęcie jakości produktów drobiarskich obejmuje ich zdrowotność, atrakcyjność sensoryczną, wartość żywieniową, dyspozycyjność w obrocie i w użyciu przez konsumenta [1, 4]. Według Kijowskiego i Sikory [7] oraz Olszewskiego [11] jakość artykułów spożywczych, w tym produktów mięsnych, to stopień ich zdrowotności, atrakcyjności sensorycznej i dyspozycyjności. Jakość zdrowotna żywności jest to zbiór cech i kryteriów, za pomocą których charakteryzuje się żywność pod względem

---

*Mgr inż. I. Wachowicz, Katedra Techniki i Technologii Gastronomicznej, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa*

wartości odżywczej, jakości sensorycznej oraz bezpieczeństwa dla zdrowia konsumenta, zaś bezpieczeństwo żywności to warunki, które muszą być spełnione, i działania, które muszą być podjęte na wszystkich etapach produkcji żywności i obrotu żywnością w celu zapewnienia zdrowia i życia człowieka [17].

Mięso, ze względu na dużą zawartość białka, odczyn środowiska ( $\text{pH} = 6$ ) oraz obecność związków chemicznych w łatwo przyswajalnej formie, może być bardzo dobrym środowiskiem rozwoju drobnoustrojów, a szczególnie bakterii [8].

Najistotniejsze zagrożenia zdrowotne w produkcji drobiarskiej związane są z zakażeniem mikrobiologicznym (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* czy *Clostridium perfringens*), pozostałościami zanieczyszczeń chemicznych i fizycznych oraz leków [4].

Przechowywanie produktów mięsnych w stanie zamrożonym, w tym także tuszek drobiowych, ma na celu zachowanie przez długi okres takich cech jakościowych mięsa, jakie miało w chwili zamrożenia. Zamrażanie stwarza niekorzystne warunki do rozwoju drobnoustrojów i w ten sposób przedłuża trwałość przechowalniczą tuszek drobiowych. W niskiej temperaturze, która powoduje spadek aktywności wody poniżej dolnej granicy tolerowanej przez drobnoustroje, ich wzrost zostaje zahamowany [6, 11]. Wiadomo również, że dobór metody rozmrażania surowca decyduje o niektórych cechach jakościowych rozmrożonego mięsa. Rozmrażanie mięsa należy prowadzić w takich warunkach, w których możliwe jest najpełniejsze odtworzenie jego pierwotnych cech. Powinno się ograniczyć do minimum niepożądane zmiany, które mogłyby spowodować pogorszenie jakości, takie jak: zwiększenie wycieku soków w czasie rozmrażania, co skutkuje mniejszą soczystością produktu i stratami składników odżywczych; denaturacja białek; zmiany barwy i konsystencji oraz spadek odporności na zakażenia mikrobiologiczne, co prowadzi do zmniejszenia bezpieczeństwa mikrobiologicznego rozmrożonego mięsa [11].

Celem pracy była ocena bezpieczeństwa mikrobiologicznego tuszek kurcząt po rozmrożeniu metodą solankową i w powietrzu, w czasie przechowywania do sześciu dni oraz określenie terminu trwałości mikrobiologicznej badanych tuszek. Praca stanowi kontynuację wcześniejszych badań, dotyczących optymalizacji parametrów procesów solankowania i rozmrażania solankowego kurcząt [18].

### **Materiał i metody badań**

Materiał do badań stanowiły mrożone tuszki kurcząt zakupione bezpośrednio u producenta „Indykpol”, przechowywane przez 3 tygodnie w temp.  $-18^{\circ}\text{C}$ . Tuszki były rozmrażane solankowo z zastosowaniem następujących parametrów procesu (stężenie solanki / czas rozmrażania): 5%/5 h; 6%/4,5 h, 7%/4 h, 8%/3,5 h, 9%/3,5 h, 10%/3,5 h oraz 11%/3 h, które zostały uznane we wcześniejszych badaniach [18] za korzystne ze względu na właściwe nasolenie tuszki. Próbkę kontrolną stanowiły tuszki kurcząt rozmrażane w powietrzu w warunkach chłodniczych (temp.  $4^{\circ}\text{C}$ ) w ciągu 24 h.

Analizom mikrobiologicznym poddawano mięso tuszek kurcząt (mięśnie: udowe, piersiowe i drobne, wycięte z tuszek, po usunięciu kości, razem ze skórą) rozmrażanych solankowo i w powietrzu, tuż po rozmrożeniu oraz w 2., 4., 6. dniu przechowywania. W celu pełnego zbadania wzrostu drobnoustrojów, a następnie wyznaczenia terminu trwałości mikrobiologicznej rozmrożonych tuszek, całe tuszki kurcząt były przechowywane jałowo w woreczkach przez okres 6 dni w temp. 4°C. W przypadku każdego badanego wariantu rozmrażano jednorazowo 4 tuszki kurcząt, pobierano próbę do analizy w 0., 2., 4., 6. dniu przechowywania. Wykonano 4 serie badań wszystkich wariantów rozmrażania.

Przed posiewem mięso rozdrabniano w wysterylizowanym wilku laboratoryjnym. Z rozdrobnionego surowca pobierano jałowo 5 g próby i przenoszono do jałowego woreczka do stomachera (Seward), a następnie dodawano 45 ml wody peptonowej. Przeprowadzono homogenizację w aparacie STOMACHER typu 80 przez 60 s, ze standardową prędkością. Otrzymywano pierwsze rozcieńczenie  $10^{-1}$ , z którego przygotowywano kolejne dziesiętne rozcieńczenia, przenosząc jałowo 1 ml zawiesiny bakteryjnej z poprzedniego rozcieńczenia do probówki z 9 ml jałowej wody peptonowej. Za każdym razem zawartość probówki dokładnie mieszano przy użyciu mieszadła mikrobiologicznego (Heidolph). Na płytki Petriego wylewano po 1 ml zawiesiny bakteryjnej z trzech kolejnych rozcieńczeń (w zależności od oczekiwanego poziomu skażenia produktu), w dwóch powtórzeniach. Zalewano płytki rozplynnionym, ostudzonym agarem odżywczym, mieszano i pozostawiano do inkubacji. Do liczenia wybierano płytki zawierające od 15 do 300 kolonii.

Oznaczano ogólną liczbę drobnoustrojów tlenowych mezofilnych [w jtk/g] (skrótowo: ogólna liczba drobnoustrojów - OLD) na agarze odżywczym (Noack Polen), według PN [12] oraz instrukcji przygotowania podłoża firmy Noack Polen. Posiewy wykonywano metodą wgłębną; temp. inkubacji 37°C, okres inkubacji 48 h.

Ogólną liczbę psychrotrofów (OLP) [w jtk/g] oznaczano na agarze odżywczym (Noack Polen), według PN-ISO [13]. Posiewy wykonywano metodą wgłębną; temp. inkubacji 7°C, okres inkubacji 10 dni.

Statystyczne opracowanie wyników obejmowało obliczenie regresji prostoliniowej z wykorzystaniem programu Statgraphics Plus 4.0. Do interpretacji wyników zastosowano model wzrostu, przeżywalności i inaktywacji drobnoustrojów Conline'a, opisany przez Einarssona [3]. Krzywa regresji opisana jest funkcją  $y = a_n + b_n x$ , gdzie:  $y = \log \text{ jtk/g}$ ;  $a_n$  – odpowiada w przybliżeniu początkowej liczbie drobnoustrojów,

$b_n$  – nachylenie krzywej wzrostu (współczynnik szybkości wzrostu –  $k$ ). Obliczano również istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi prób, stosując test UR [19].

## Wyniki i dyskusja

### *Zmiany ogólnej liczby drobnoustrojów i ogólnej liczby psychrotrofów w mięsie tuszek kurcząt rozmrażanych różnymi metodami w czasie przechowywania*

Ogólną liczbę drobnoustrojów (A) oraz psychrotrofów (B) w mięsie tuszek kurcząt rozmrażanych solankowo i w powietrzu, w różnych warunkach stężenia solanki oraz czasu rozmrażania i przechowywania przedstawiono w tab. 1.

Równania krzywych wzrostu (modeli) OLD (A) oraz bakterii psychrotrofowych (OLP) (B) w tuszkach drobiowym rozmrażanym różnymi metodami przedstawiono poniżej:

tuszki kurcząt rozmrażane w powietrzu (A)	$\log N = 3,69 + 0,57t$	$r^2 = 85,26\%$
(B)	$\log N = 4,53 + 0,67t$	$r^2 = 81,46\%$
tuszki kurcząt rozmrażane solankowo:		
- w 5% solance w czasie 5 h (A)	$\log N = 3,85 + 0,48t$	$r^2 = 73,68\%$
(B)	$\log N = 4,30 + 0,64t$	$r^2 = 82,64\%$
- w 6% solance w czasie 4,5 h (A)	$\log N = 3,94 + 0,63t$	$r^2 = 74,34\%$
(B)	$\log N = 4,44 + 0,74t$	$r^2 = 81,77\%$
- w 7% solance w czasie 4 h (A)	$\log N = 3,71 + 0,52t$	$r^2 = 68,74\%$
(B)	$\log N = 3,98 + 0,71t$	$r^2 = 83,78\%$
- w 8% solance w czasie 3,5 h (A)	$\log N = 4,03 + 0,5t$	$r^2 = 76,98\%$
(B)	$\log N = 5,2 + 0,45t$	$r^2 = 78,99\%$
- w 9% solance w czasie 3,5 h (A)	$\log N = 3,64 + 0,51t$	$r^2 = 89,15\%$
(B)	$\log N = 4,04 + 0,69t$	$r^2 = 86,19\%$
- w 10% solance w czasie 3,5 h (A)	$\log N = 3,63 + 0,51t$	$r^2 = 70,92\%$
(B)	$\log N = 4,45 + 0,59t$	$r^2 = 81,91\%$
- w 11% solance w czasie 3h (A)	$\log N = 3,61 + 0,57t$	$r^2 = 74,39\%$
(B)	$\log N = 4,03 + 0,7t$	$r^2 = 91,86\%$

Stwierdzono, że stosowanie różnych metod rozmrażania (solankowego i w powietrzu) nie wpłynęło w istotny sposób na wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów oraz liczby psychrotrofów w mięsie tuszek kurcząt po rozmrożeniu, w czasie przechowywania w temp. 4°C. Jedynie zastosowanie rozmrażania solankowego w 6% solance w ciągu 4,5 h spowodowało istotny wzrost OLD w stosunku do prób rozmrażanych w powietrzu w 4. dniu przechowywania. Istotnie wyższą liczbą bakterii psychrotrofowych charakteryzowała się próba rozmrażana w 8% solance w ciągu 3,5 h tuż po rozmrożeniu, zaś w 4. dniu przechowywania tuszek obserwowano istotnie niższą OLP w porównaniu z próbą rozmrażaną w powietrzu. Na podstawie analizy wariancji stwierdzono wysoce istotny wpływ czasu przechowywania na OLD i OLP. Obserwowano prawie dwukrotny wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych i psychrotrofowych w trakcie przechowywania tuszek drobiowych przez sześć dni.



Tabela 1

Zmiany ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD – A) oraz liczby bakterii psychrotrofowych (OLP – B) [log jtk/g] w mięsie tuszek kurcząt rozmrażanych solankowo i w powietrzu, przechowywanych po rozmrożeniu w temp. 4°C; n = 4.

Changes in the Total Plate Count (TPC – A) and count of psychrotrophic bacteria (PBC – B) [log cfu/g] in meat of chicken carcasses thawed in brine and air, during storage at 4°C; n = 4.

Sposób rozmrażania a Method of thawing	Zmiany OLD - A OLP - B Changes in TPC - A ; PBC - B	Czas przechowywania tuszek kurcząt [dni] Duration of storage of chicken carcasses [days]			
		0 $\bar{x} \pm S$	2 $\bar{x} \pm S$	4 $\bar{x} \pm S$	6 $\bar{x} \pm S$
W powietrzu In air	A	3,98 ± 0,58	4,52 ± 0,37	5,69 ± 0,42	7,36 ± 0,65
	B	4,73 ± 0,852	5,29 ± 0,39	7,81 ± 0,74	8,35 ± 0,59
Solankowo, z zastosowaniem następujących parametrów procesu (stężenie solanki / czas rozmrażania) Brine thawing using the following process parameters (salt content [%] in brine / thawing time [h])					
5%/5 h	A	3,89 ± 0,14	4,91 ± 1,13	5,42 ± 0,68	6,89 ± 0,43
	B	4,73 ± 0,62	4,82 ± 0,61	7,18 ± 0,49	8,38 ± 0,4
6%/4,5 h	A	4,25 ± 1,11	4,57 ± 0,43	6,77* ± 0,63	7,68 ± 0,99
	B	4,43 ± 1,01	5,49 ± 0,22	8,28 ± 0,52	8,44 ± 0,6
7%/4 h	A	4,19 ± 0,53	4,21 ± 0,63	5,43 ± 0,54	7,26 ± 1,09
	B	4,28 ± 0,8	4,9 ± 0,92	6,96 ± 0,61	8,35 ± 0,52
8%/3,5 + 0,5 h	A	4,49 ± 0,34	4,34 ± 0,62	6,07 ± 0,61	7,28 ± 0,34
	B	5,68* ± 0,25	5,39 ± 0,25	7,01* ± 0,25	8,18 ± 0,41
9%/3,5 + 0,5 h	A	3,78 ± 0,39	4,46 ± 0,61	5,68 ± 0,22	6,78 ± 0,44
	B	4,29 ± 0,73	4,91 ± 0,83	7,07 ± 0,46	8,19 ± 0,29
10%/3,5 + 0,5 h	A	3,68 ± 0,04	4,55 ± 0,41	5,84 ± 1,07	6,62 ± 1,19
	B	4,68 ± 0,75	5,33 ± 1,04	6,79 ± 0,23	8,14 ± 0,39
11%/3 + 0,5 h	A	3,82 ± 0,08	4,45 ± 0,36	5,87 ± 1,25	7,13 ± 1,04
	B	4,15 ± 0,41	5,01 ± 0,12	7,35 ± 0,37	8,07 ± 0,27

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ( $\bar{x}$ ) oraz odchylenie standardowe (S). Wartości oznaczone \* w kolumnach różnią się statystycznie istotnie w stosunku do prób rozmrażanych w powietrzu na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ ;

In the Table, there are shown means ( $\bar{x}$ ) and  $\pm$  standard deviation (S). The means in columns, denoted by \* differ statistically significantly from meat samples thawed in air, at a level of  $\alpha = 0,05$ .

Lind i Hulthen [10] podają, że sposób rozmrażania nie ma dużego wpływu na jakość mikrobiologiczną mięsa, z wyjątkiem tych metod, w których stosuje się wysoką temperaturę rozmrażania (>10°C) lub poziom skażenia mikroorganizmami surowca był wysoki przed zamrożeniem. Niebezpieczeństwo rozwoju mikroorganizmów w czasie rozmrażania występuje wówczas, gdy mięso lub ryby są zamrożone w dużych partiach, a czas niezbędny do rozmrożenia jest długi. Stosując metody rozmrażania w wodzie

lub roztworach soli można skrócić czas o połowę, gdyż przekazywanie ciepła do surowca następuje szybciej, gdy czynnikiem rozmrażającym jest woda, a nie powietrze [2, 10]. We wcześniejszych badaniach [18] wykazano, że stosowanie solankowego rozmrażania tuszek drobiowych pozwala 4-6-krotnie skrócić czas procesu (3,5 h–5 h) w stosunku do rozmrażania w powietrzu (24 h). Wyniki własne są zbliżone z uzyskanymi przez Kusewicza i wsp. [9]. Autorzy ci wykazali mniejszą liczbę bakterii psychrotrofowych w mięśniach piersiowych i udowych; kształtowała się ona na poziomie 2,3 log jtk/1g w mięśniach piersiowych i 5,2 log jtk/g – w udowych, a podczas przechowywania przez 6 dni obserwowali dwukrotny wzrost liczby tych bakterii w mięśniach drobiu. W badaniach własnych zaobserwowano również dwukrotny wzrost liczby bakterii psychrotrofowych w trakcie przechowywania tuszek kurcząt po rozmrożeniu solankowym i w powietrzu.

Barat i wsp. [2] podają, że zmniejszenie ilości soli w szynce wieprzowej, przy wyższej wilgotności i aktywności wody podczas rozmrażania solankowego może sprzyjać rozwojowi bakterii. Samelis i wsp. [15] stwierdzili, że stosowanie rozmrażania solankowego (przy wykorzystaniu polifosforanów i substancji peklujących) powoduje wzrost liczby bakterii mezofilnych i kwasu mlekowego, nie wpływając na liczbę bakterii rodzaju *Pseudomonas*, przy zahamowaniu wzrostu drożdży w mięśni piersiowym indyka. Alvarez-Astroga i wsp. [1] oraz Russell [14] wykazali, że liczba bakterii psychrotrofowych w tuszkach kurcząt jest zawsze wyższa niż bakterii mezofilnych, co świadczy o dominującym wpływie tych drobnoustrojów na trwałość produktów drobiowych. W badaniach własnych stwierdzono nieco wyższą liczbę bakterii psychrotrofowych w tuszkach kurzych brojlerów niż bakterii tlenowych mezofilnych (tab.1). Natomiast Samelis i wsp. [15] obserwowali zbliżoną liczbę bakterii psychrotrofowych i mezofilnych w mięsie tuszek kurcząt rozmrażanych w powietrzu i solankowo.

Zawartość soli w surowcu po rozmrożeniu solankowym nie przekraczała 1,5% [18]. Tan i Shelef [15] podają, że zmniejszenie ilości soli w produkcie poniżej 2% nie wpływa istotnie na zahamowanie rozwoju mikroorganizmów w czasie przechowywania mięsa.

Współczynniki szybkości wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów i psychrotrofów oraz wartości współczynników statystycznych przedstawiono w tab. 2.

Obliczone współczynniki wzrostu ( $k$ ) OLD w mięsie kurcząt wynosiły 0,48–0,63. Na podstawie analizy tych wartości można stwierdzić, że stosowanie różnych parametrów rozmrażania solankowego nie wpływało w istotny sposób na tempo wzrostu mikroorganizmów w czasie przechowywania mięsa. Najwyższy współczynnik wzrostu OLD obserwowano przy stosowaniu rozmrażania solankowego w 6% solance w czasie 4,5 h ( $k = 0,63$ ). Próby rozmrażane w solance o wysokich stężeniach ( $> 7\%$ ) w czasie 3–3,5 h charakteryzowały się takim samym współczynnikiem szybkości wzrostu OLD, co wskazuje, że stężenie solanki nie miało większego wpływu na tempo

wzrostu drobnoustrojów po rozmrożeniu. Próby rozmrażane w powietrzu, a następnie przechowywane, charakteryzowały się wyższym współczynnikiem szybkości wzrostu ( $k = 0,57$ ), lecz różnice nie były na tyle istotne, aby wpłynąć na wyższą liczbę drobnoustrojów w mięsie rozmrożonym w ten sposób (tab. 1).

Tabela 2

Współczynniki szybkości wzrostu OLD i OLP w tuszkach kurcząt rozmrażanych w powietrzu i solankowo oraz wartości współczynników statystycznych.  
Coefficients of TPC and PBC growth rates in carcasses of chickens thawed in air and in brine, as well as values of statistical coefficients.

Sposób rozmrażania Method of thawing	Współczynnik szybkości wzrostu (k) Coefficient of growth rate		Współczynnik determinacji ( $r^2$ ) [%] Coefficient of determination		Współczynnik korelacji r (OLD/czas) Correlation coefficient		Odchylenie standardowe SD Standard deviation SD	
	OLD	OLP	OLD	OLP	OLD	OLP	OLD	OLP
W powietrzu In air	0,57	0,67	85,26	81,46	0,92	0,90	0,56	0,76
Solankowo, z wykorzystaniem następujących parametrów rozmrażania (stężenie solanki [%] / czas rozmrażania [h]) Brine thawing using the following thawing process parameters (salt content [%] in brine / time of thawing)								
5% / 5 h	0,48	0,64	73,68	82,64	0,86	0,91	0,67	0,71
6% / 4,5 h	0,63	0,74	74,34	81,77	0,86	0,90	0,88	0,84
7% / 4 h	0,52	0,71	68,74	83,78	0,83	0,91	0,84	0,75
8% / 3,5 h	0,5	0,45	76,98	78,99	0,88	0,89	0,66	0,56
9% / 3,5 h	0,51	0,69	89,15	86,19	0,94	0,93	0,43	0,66
10% / 3,5 h	0,51	0,59	70,92	81,92	0,92	0,91	0,68	0,66
11% / 3 h	0,57	0,7	74,39	91,87	0,86	0,96	0,79	0,50

Współczynniki szybkości wzrostu drobnoustrojów psychrotrofowych wynosiły 0,45–0,74. Najniższą wartość współczynnika wzrostu bakterii psychotropowych obserwowano w tuszkach rozmrażanych w 8% solance w ciągu 3,5 h, ale próba ta charakteryzowała się również najwyższą liczbą mikroorganizmów tuż po rozmrożeniu. Najwyższy współczynnik wzrostu bakterii psychrotrofowych obserwowano podczas rozmrażania w 6% solance w czasie 4,5 h ( $k = 0,74$ ).

Wysokie wartości współczynników determinacji (OLD:  $r^2 = 68,74\text{--}89,15\%$ , OLP:  $r^2 = 78,99\text{--}91,87\%$ ) świadczą o dobrym dopasowaniu funkcji (modelu) do danych eksperymentalnych. Wartości współczynników korelacji wynosiły odpowiednio od  $r = 0,83$  do  $r = 0,92$  w przypadku OLD, oraz od  $r = 0,89$  do  $r = 0,96$  (OLP) i wskazują na wysoce istotną zależność pomiędzy OLD i OLP a czasem przechowywania tuszek (tab. 2).

Na podstawie skonstruowanych modeli wzrostu określono okres trwałości mikrobiologicznej mięsa tuszek kurcząt po zastosowaniu różnych sposobów rozmrażania, zakładając, że mięso (zgodnie z normą PN [12] jest bezpieczne pod względem mikrobiologicznym, gdy liczba drobnoustrojów w 1 g nie przekracza  $10^6$  komórek). Wyliczone okresy trwałości mikrobiologicznej w przypadku ogólnej liczby drobnoustrojów przedstawiono w tab. 3.

Na podstawie wyznaczonego okresu trwałości mikrobiologicznej mięsa tuszek kurcząt rozmrażanego w powietrzu i solankowo stwierdzono, że stosowanie różnych metod rozmrażania nie wpłynęło na bezpieczeństwo mikrobiologiczne surowca, a także jego trwałość w czasie przechowywania. Jedynie w przypadku rozmrażania w 6% solance w czasie 4,5 h okres trwałości mięsa tuszek kurcząt wynosił poniżej 4 dni. Długi okres trwałości świadczy o dobrym stanie mikrobiologicznym surowca bez względu na sposób rozmrażania.

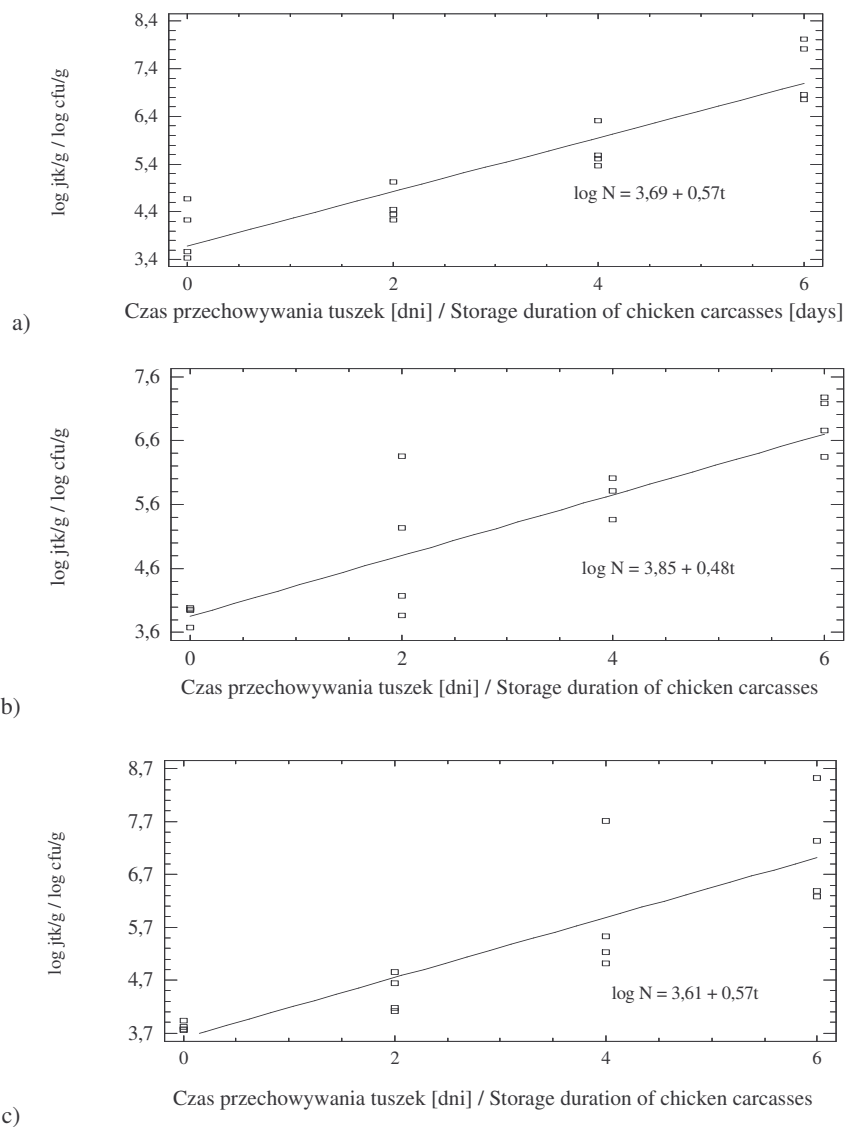
Tabela 3

Okres trwałości mikrobiologicznej mięsa tuszek kurcząt po zastosowaniu rozmrażania solankowego i w powietrzu, obliczony na podstawie modeli prognostycznych.

Shelf life of meat of chicken carcasses after they have been thawed in brine and in air, calculated on the basis of predictive models.

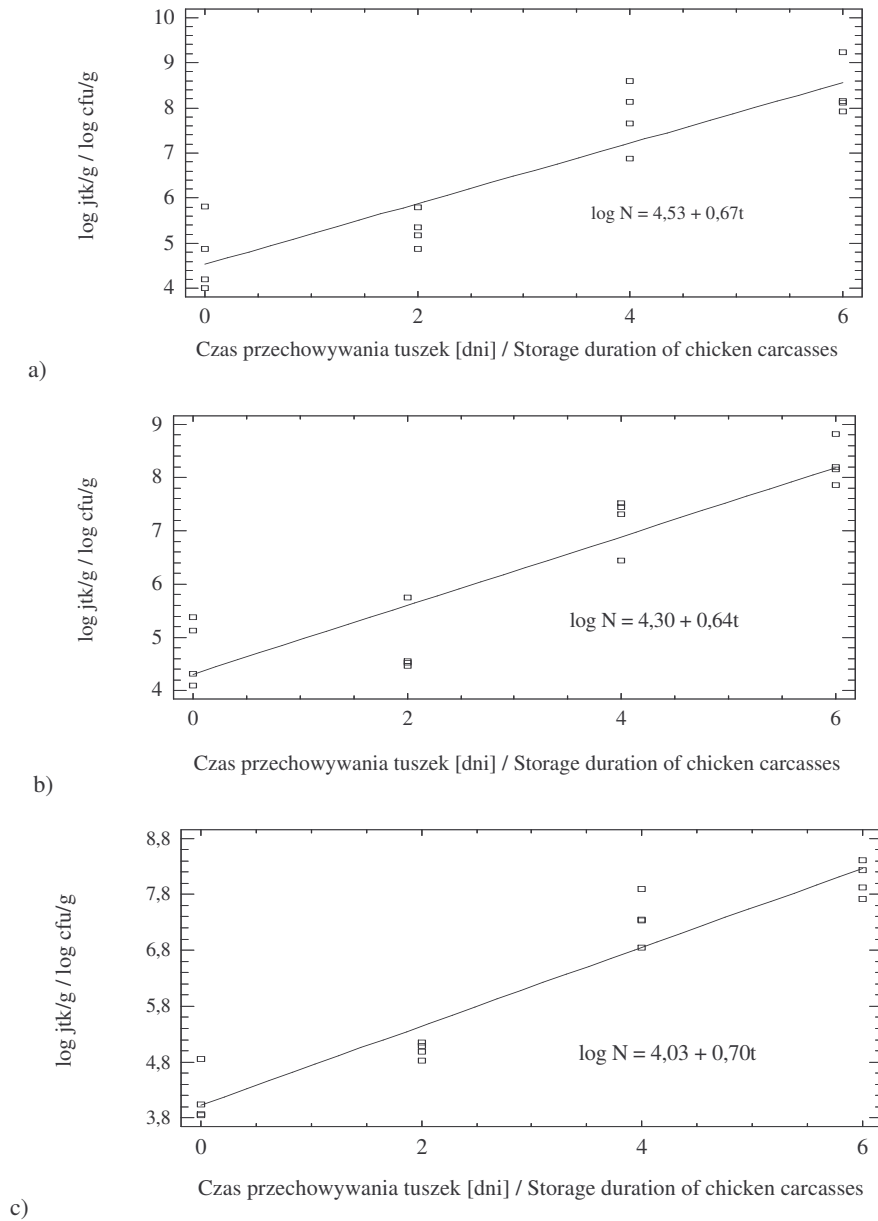
Tuszki kurcząt rozmrażane Chicken carcasses being thawed	Czas przechowywania [dni] Storage duration [days]
W powietrzu In air	4
Solankowo, z zastosowaniem następujących parametrów procesu (stężenie solanki [%] / czas rozmrażania [h]) Brine thawing using the following process parameters (salt content [%] in brine/ time of thawing)	
5% / 5 h	4 i 12 h
6% / 4,5 h	3
7% / 4 h	4 i 8 h
8% / 3,5 h	4
9% / 3,5 h	4 i 16 h
10% / 3,5 h	4 i 16 h
11% / 3 h	4

Przykładowe krzywe wzrostu (modele) ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD) oraz liczby psychrotrofów (OLP) przedstawiono odpowiednio na rys. 1. i 2.



Rys. 1. Liniowy model wzrostu, przeżywalności i inaktywacji ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD) w mięsie tuszek kurcząt rozmrażanym a) w powietrzu, b) solankowo z użyciem 5% solanki w ciągu 5 h, c) solankowo, z użyciem 11% solanki w ciągu 3 h.

Fig. 1. A linear model of the growth, survival and inactivation of the total count of bacteria (TPC) in meat of chicken carcasses: a) thawed in air; b) thawed in brine (5%/5h); c) thawed in brine (11%/3 h).



Rys. 2. Liniowy model wzrostu, przeżywalności i inaktywacji liczby bakterii psychrotrofowych (OLP) w mięsie tuszek kurcząt rozmrażanych: a) w powietrzu, b) solankowo w 5% solance w ciągu 5 h, c) solankowo w 11% solance w ciągu 3 h.

Fig. 2. A linear model of growth, survival and inactivation of the psychrotrophic bacteria in meat of chicken carcasses: a) thawed in air; b) thawed in brine (5%/5h); thawed in brine (11%/3 h).

## Wnioski

1. Bezpieczeństwo mikrobiologiczne i trwałość tuszek kurcząt brojlerów rozmrażanych metoda solankową i w powietrzu są zbliżone.
2. Ustalona, na podstawie prognostycznego modelu Conline'a, trwałość mikrobiologiczna mięsa tuszek kurcząt, po zastosowaniu rozmrażania solankowego czy w powietrzu wynosi 3–4 dni, w zależności od sposobu rozmrażania oraz parametrów procesu.

*Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej.*

## Literatura

- [1] Álvarez-Astorga M., Capita R., Alonso-Calleja C., Moreno B., Garcia-Fernández M.C.: Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Sci.*, 2002, **62**, 45-50.
- [2] Barat J.M., Grau R., Ibanez J.B., Fito P.: Post salting studies in Spanish cured ham manufacturing. Time reduction by using brine thawing - salting. *Meat Sci.*, 2005, **69**, 201-208.
- [3] Einarsson H: Evaluation of predictive model for the shelf life of cod (*Gadus morhua*) fillets stored in to different atmospheres at varying temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, **24**, **1-2**, 93-102.
- [4] Kijowski J.: Bezpieczeństwo zdrowotne i jakość żywieniowa mięsa drobiowego i jaj. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **4** (29) **Supl.**, 82-92
- [5] Kijowski J.: Systemowe zapewnienie jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego produktów drobiarskich. *Polskie Drobiarstwo*, **10** (1), 2001, 37-41.
- [6] Kijowski J.: Metody utrwalania mięsa drobiowego. W: *Technologia mięsa drobiowego*, pod red. T. Grabowskiego. WNT. Warszawa 1993, s. 81.
- [7] Kijowski J., Sikora T. (red.): Zarządzanie jakością i bezpieczeństwem żywności. Praca zbiorowa, WNT. Warszawa 2003, s. 3.
- [8] Kortz J.: Ocena i wykorzystanie surowców rzeźnych. Wyd. AR Szczecin 1997, s. 28.
- [9] Kusiewicz D., Piątkiewicz A., Krala L.: Mikroflora porcjowanych kurcząt przechowywanych w kontrolowanej atmosferze i w powietrzu. *Chłodnictwo*, 1996, **31/4**, 36-40.
- [10] Lind I., Hulthen B: Thawing of food in catering. *J. Foodservice Systems.*, 1986, **4**, 81-96.
- [11] Olszewski A.: *Technologia przetwórstwa mięsa*. WNT. Warszawa 2002, s. 170.
- [12] PN-A-82055-6:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne, oznaczanie ogólnej ilości drobnoustrojów.
- [13] PN-ISO-17410:2003. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby psychrotrofowych mikroorganizmów.
- [14] Russell S.M.: Spoilage bacteria associated with poultry. In: *Poultry Meat Processing*. A.R.Sams (ed.), CRC Press, Boca Raton 2001, p. 159.
- [15] Samelis J., Kakouri A., Rementzis J: The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000., **56**, 133-143.
- [16] Tan W., Shelef L.A.: Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. *Meat Sci.*, 2002, **62**, 27-32.
- [17] Ustawa z dnia 11 maja 2001 o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia (Dz. U. 2001 r. Nr 63, poz. 634) z późn. zmianami.

- [18] Wachowicz I.: Próba optymalizacji parametrów solankowania i rozmrażania solankowego kurcząt. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **2(27) Supl**, 150-158.
- [19] Volk W.: *Statystyka stosowana dla inżynierów*. WNT. Warszawa 1975.

### THE EFFECT OF BRINE THAWING ON THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CHICKEN MEAT

#### S u m m a r y

The objective of this study was to evaluate the microbiological safety of chicken carcass meat after it has been thawed in brine and in air.

Total count of bacteria (TCB) and count of psychrotrophic bacteria were determined in the chicken carcass meat just after it has been thawed in brine and in air, as well as on the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 6<sup>th</sup> day of storing it at a temperature of 4°C.

It was stated that the brine thawing did not significantly affect the microbiological safety of chicken carcass meat compared to samples thawed in air. A Conline's predictive model was applied to illustrate the growth of microorganisms in thawed meat during its storage. On the basis of the results of microbiological analysis (OLD), the shelf life of chicken carcass meat thawed using the two thawing methods was assessed (averagely as 3-4 days).

It was also stated that the microbiological status of chicken meat after thawing in brine and in air did not statistically significantly differ. Thus, the method of brine thawing did not significantly affect the microbiological safety of chicken carcass meat compared to meat of carcasses thawed in air.

**Key words:** chicken meat, microbiological safety, brine thawing, thawing in air ☒



MAGDALENA WIRKOWSKA, JOANNA BRYŚ, BOLESŁAW KOWALSKI

## **STABILNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA PRZEESTRYFIKOWANYCH MIESZANIN TŁUSZCZU MLEKOWEGO Z OLEJEM RZEPAKOWYM**

### Streszczenie

Przeestryfikowanie to jedna z metod modyfikacji właściwości tłuszczów. Pozwala ona uzyskać produkty o z góry założonej strukturze lipidów. Proces przeestryfikowania może wpływać na odporność na utlenianie, a tym samym na trwałość produktu tłuszczowego. Najbardziej znaną i najczęściej stosowaną metodą badania stabilności tłuszczów jest test Rancimat, który zastosowano w niniejszej pracy. Badano, w jaki sposób rodzaj użytego w trakcie procesu katalizatora i warunki reakcji wpływają na odporność na utlenianie przeestryfikowanych mieszanin oleju rzepakowego z tłuszczem mlekowym.

Przedmiotem badań były mieszaniny oleju rzepakowego i tłuszczu mlekowego o składzie wagowym 1:1, które poddano przeestryfikowaniu chemicznemu w obecności metanolanu sodu jako katalizatora oraz przeestryfikowaniu enzymatycznemu z zastosowaniem preparatów enzymatycznych zawierających lipazy o różnej specyficzności. Przeestryfikowanie chemiczne prowadzono w temp. 90°C przez 1,5 h, natomiast enzymatyczne w temp. 70°C przez 8 h.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że proces przeestryfikowania wpływa na obniżenie stabilności przeciwutleniającej analizowanych tłuszczów. Triacyloglicerole wyodrębnione z produktów przeestryfikowania charakteryzowały się najniższą stabilnością przeciwutleniającą.

**Słowa kluczowe:** olej rzepakowy, tłuszcz mlekowy, przeestryfikowanie, test Rancimat, stabilność przeciwutleniająca

### **Wprowadzenie**

Rosnące wymagania konsumentów powodują, że przemysł spożywczy poszukuje nowych rozwiązań technologicznych w produkcji tłuszczów o ulepszonych właściwościach funkcjonalnych i zdrowotnych [29, 30].

Wśród metod mających na celu polepszenie właściwości tłuszczów, na skalę przemysłową wykorzystuje się uwodornienie, frakcjonowanie, przeestryfikowanie [8]. Wymienione metody modyfikacji tłuszczów cechują się tym, że mają specyficzne zastosowanie. Wykorzystanie lipaz w procesie przeestryfikowania, zwłaszcza tych, które wykazują różną specyficzność w stosunku do struktury kwasów tłuszczowych

---

*Mgr inż. M. Wirkowska, mgr inż. J. Bryś, dr hab. B. Kowalski prof. SGGW, Zakład Chemii Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa*

czy też położenia wiązania estrowego w cząsteczkach triacylogliceroli, umożliwia uzyskanie produktów o z góry założonej strukturze lipidów [6, 17]. Proces ten polega na wymianie grup acylowych zarówno wewnątrz cząsteczek triacylogliceroli, jak i pomiędzy różnymi cząsteczkami [9, 11, 20]. Przeestryfikowanie powoduje zmianę w strukturze triacylogliceroli, a cenne biologicznie aktywne kwasy tłuszczowe pozostają nienaruszone [5, 6]. Proces przeestryfikowania może być katalizowany obecnością katalizatorów chemicznych i biologicznych [6, 12].

W procesie enzymatycznego przeestryfikowania tłuszczów zachodzą jednocześnie dwie reakcje: częściowa hydroliza triacylogliceroli i ponowna estryfikacja niepełnych acylogliceroli. Decydujące znaczenie ma zawartość wody. Ograniczenie jej w układzie powoduje dominację reakcji przeestryfikowania nad reakcją hydrolizy. Jednak pewna, minimalna ilość wody jest niezbędna do prawidłowej pracy enzymu, ponieważ działa on na granicy faz olej-woda. Nadmierna ilość wody w układzie reakcyjnym może spowodować dominację hydrolizy nad estryfikacją, czego skutkiem jest zwiększona zawartość wolnych kwasów tłuszczowych, diacylogliceroli i monoacylogliceroli, stanowiących frakcję polarną [15, 18, 31]. Zwiększona zawartość frakcji nietriacyloglicerolowej może obniżyć odporność tłuszczu na utlenianie, a także jest przyczyną strat substancji tłuszczowej [14].

W żywieniu człowieka ważne miejsce wśród tłuszczów jadalnych zajmuje tłuszcz mlekowy. Stanowi on mieszaninę ponad stu tysięcy różnych triacylogliceroli. Unikalną cechą tłuszczu mlekowego jest wysoka zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [1, 3]. Smarowność i żywieniowe właściwości tłuszczu mlekowego można poprawić na drodze mieszania lub przeestryfikowania z olejem roślinnym [21].

Tłuszcze należą do związków wyjątkowo labilnych i szczególnie mało odpornych na działanie czynników utleniających. Proces przeestryfikowania może wpływać na odporność na utlenianie, a tym samym na trwałość produktu tłuszczowego. Przemiany nienasyconych lipidów spowodowane utlenianiem tlenem atmosferycznym są główną przyczyną niepożądanych zmian wielu artykułów spożywczych, dlatego badanie odporności na utlenianie powinno być wykonywane obok innych podstawowych analiz właściwości tłuszczów [4]. Najbardziej znaną i najczęściej stosowaną metodą badania stabilności tłuszczów jest test Rancimat [10, 22, 32].

Celem pracy było określenie, w jaki sposób rodzaj użytego w trakcie procesu przeestryfikowania katalizatora i warunki reakcji wpływają na odporność na utlenianie przeestryfikowanych mieszanin tłuszczu mlekowego z olejem rzepakowym.

### **Materiał i metody badań**

Przedmiotem badań były mieszaniny oleju rzepakowego z tłuszczem mlekowym o składzie wagowym 1:1 (RSO : MF 1:1), które poddano przeestryfikowaniu chemicznemu oraz enzymatycznemu. Wykonano jedną próbę każdego przeestryfikowania.

### Przeestryfikowanie chemiczne

Stosowany katalizator to metanolan sodu ( $\text{CH}_3\text{ONa}$ ). Jest on łatwy w użyciu, aktywny w stosunkowo niskich zakresach temperatury ( $50\text{--}90^\circ\text{C}$ ), a do katalizowania reakcji jest stosowany w małych ilościach. Metanolan sodu jest bardzo wrażliwy na działanie wilgoci, dlatego tłuszcze i oleje poddawane przeestryfikowaniu powinny zawierać  $<0,01\%$  wody [6]. Przeestryfikowanie chemiczne prowadzono w temp.  $90^\circ\text{C}$  przez 1,5 h. Ilość katalizatora w stosunku do masy mieszaniny wynosiła 1% (RSO: MF- $90^\circ\text{C}$ /1,5 h - metanolan).

### Przeestryfikowanie enzymatyczne

Katalizatorami reakcji enzymatycznego przeestryfikowania są enzymy lipolityczne zwane lipazami, które według międzynarodowej normy są sklasyfikowane jako *triacyloglicerolowe acylohydrolazy*. W procesie tym reakcje przebiegają z dostateczną szybkością w łagodnych warunkach, co umożliwia łatwiejsze sterowanie tym procesem i przerywanie go na z góry założonym etapie [20].

Użyte katalizatory to preparaty Lipozyme RM IM i Novozym 435.

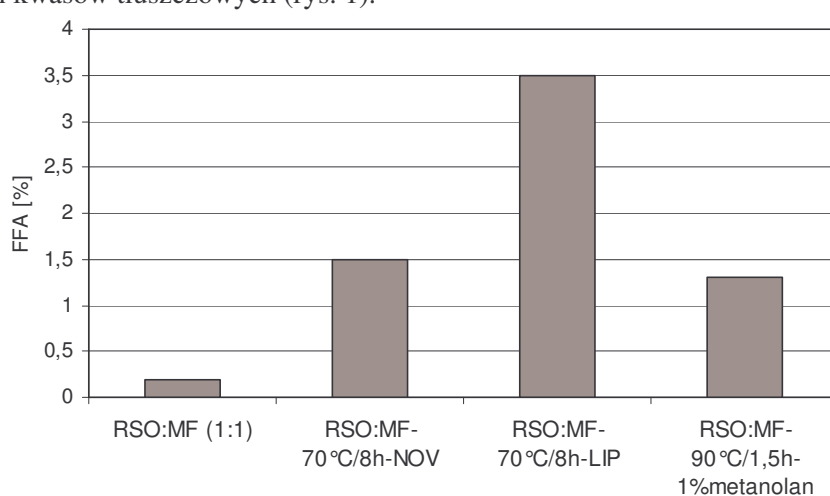
- Lipozyme RM IM duńskiej firmy Novo-Nordisk – lipaza otrzymywana z *Rhizomucor miehei* i osadzona (immobilizowana) na makroporowatej żywicy jonowymiennej, specyficzna w stosunku do wiązań estrowych w pozycji *sn*-1,3 triacylogliceroli, o fabrycznej zawartości wody w preparacie – 4% (m/m);
- Novozym 435 duńskiej firmy Novo-Nordisk – lipaza otrzymywana z *Candida antarctica*, immobilizowana na makroporowatej żywicy akrylowej, wykazująca pozycyjną niespecyficzność, o fabrycznej zawartości wody w preparacie – 2% (m/m).

Przeestryfikowanie enzymatyczne prowadzono w temp.  $70^\circ\text{C}$  przez 8 h. Ilość katalizatora w stosunku do masy mieszaniny 8% (RSO : MF- $70^\circ\text{C}$ /8 h-NOV, RSO : MF- $70^\circ\text{C}$ /8 h-LIP). W mieszaninach przed i po przeestryfikowaniu oznaczano liczbę kwasową metodą miareczkową [27], zawartość frakcji polarnej metodą chromatografii kolumnowej [26] oraz stabilność przeciwutleniającą metodą Rancimat [24]. W wyizolowanych z mieszanin fizycznych i produktów ich przeestryfikowania frakcjach triacylogliceroli oznaczano temperaturę mięknięcia metodą kapilary otwartej [28], zawartość fazy stałej metodą pulsacyjnego protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego [25], stabilność przeciwutleniającą metodą Rancimat. Określano również skład kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej [23]. Na podstawie oznaczeń liczby kwasowej, zawartości fazy stałej i składu kwasów tłuszczowych obliczano zawartość wolnych kwasów tłuszczowych.

### Wyniki i dyskusja

Po przeestryfikowaniu obok głównego produktu reakcji, jakim jest frakcja triacylogliceroli pojawiają się również pewne ilości wolnych kwasów tłuszczowych,

diacylogliceroli i monoacylogliceroli [13]. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w surowcach, mieszaninach fizycznych oraz w produktach ich przeestryfikowania została obliczona na podstawie liczb kwasowych oraz wyników oznaczeń GLC. Bezwzględna różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wolnych kwasów tłuszczowych nie przekraczała 3% średniej arytmetycznej tych wyników, co jest zgodne z Polską Normą [27]. Przeestryfikowanie spowodowało wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych (rys. 1).



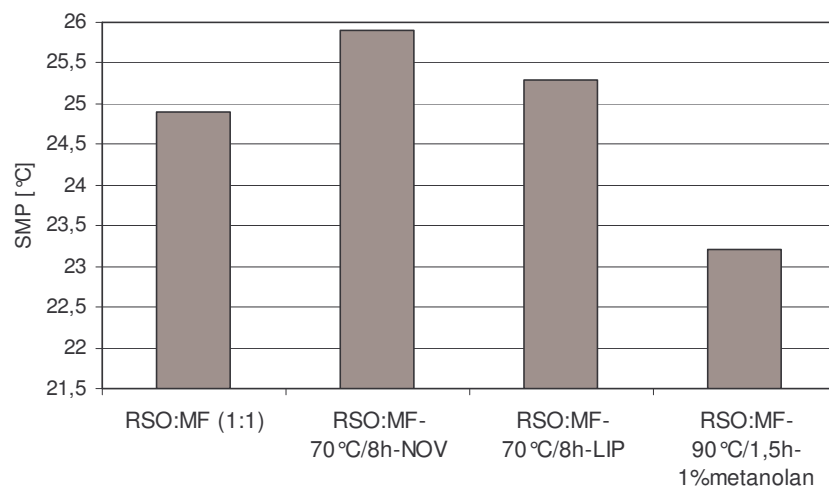
Rys. 1. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w mieszaninie oleju rzepakowego z tłuszczem mlekowym (RSO : MF) przed i po przeestryfikowaniu.

Fig 1. Content of free fatty acids (FFA) in blends made of rapeseed oil and milkfat (RSO : MF) before and after the interesterification accomplished.

Najmniejszy wzrost tej frakcji zaobserwowano w przypadku mieszanin przeestryfikowanych w obecności katalizatora chemicznego. Porównując działanie poszczególnych enzymów można stwierdzić, że większa zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mieszaninach przeestryfikowanych preparatem Lipozyme RM IM może być skutkiem większej zawartości wody w tym preparacie (4%), a tym samym w układzie reakcyjnym.

Jednym z parametrów określających przydatność użytkową tłuszczu jest jego konsystencja, która zależy m.in. od składu triacylogliceroli występujących w tłuszczu oraz od ich formy krystalicznej [8]. Najbardziej rozpowszechnionym wskaźnikiem konsystencji tłuszczów jest temperatura mięknięcia. Wykonywano dwa równoległe oznaczenia temperatury mięknięcia. Bezwzględne różnice pomiędzy wynikami nie przekraczały 0,5°C. Analizując wartości tego parametru (rys. 2), po przeestryfikowaniu chemicznym stwierdzono spadek temperatury mięknięcia, natomiast po przeestryfikowaniu enzymatycznym zaobserwowano niewielki wzrost. Innym wskaźnikiem konsystencji tłuszczu jest zawartość fazy stałej (rys. 3). Wykonywano po dwa równoległe oznaczenia zawartości fazy stałej. Bezwzględne różnice pomiędzy wynikami nie przekraczały wartości zamieszczonych w Polskiej Normie [25].

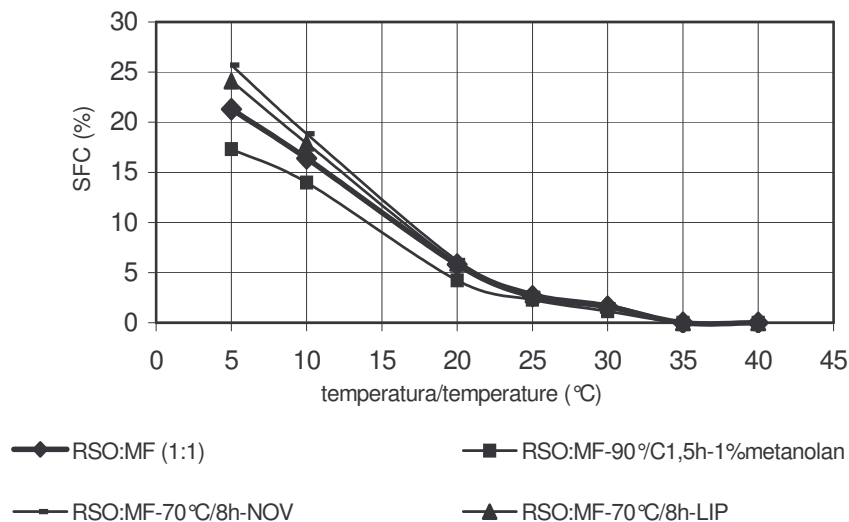
Przeestryfikowanie chemiczne tłuszczu mlekowego olejem rzepakowym spowodowało otrzymanie triacylogliceroli wyizolowanych z produktów przeestryfikowania o mniejszych zawartościach fazy stałej niż w odpowiadającej im mieszaninie wyjściowej. Po procesie przeestryfikowania enzymatycznego nastąpił wzrost zawartości fazy stałej w zakresie temp. 5–20°C. Od 25 do 40°C nie odnotowano wyraźnej zmiany zawartości fazy stałej w porównaniu z mieszaniną fizyczną.



Rys. 2. Temperatura mięknięcia (SMP) triacylogliceroli mieszanin oleju rzepakowego z tłuszczem mlekowym (RSO : MF) przed i po przeestryfikowaniu.

Fig. 2. Slip melting points (SMP) of triacylglycerols in blends made of rapeseed oil and milkfat (RSO : MF) before and after the interesterification accomplished.

Jedną z bardzo ważnych funkcjonalnych właściwości produktu tłuszczowego jest jego stabilność przeciwutleniająca, czyli odporność na utlenianie. Stabilność przeciwutleniająca zależy od składu i struktury kwasów tłuszczowych oraz od struktury cząsteczek triacylogliceroli, a także od ilości i jakości substancji towarzyszących triacyloglicerolom [22]. Im bardziej nienasycony jest kwas tłuszczowy, tym łatwiej ulega on utlenianiu, dlatego niezmiernie ważna jest liczba i rozmieszczenie w cząsteczce triacylogliceroli kwasów polienowych, podatnych na utlenianie [14]. W badanych układach przed i po przeestryfikowaniu oznaczano skład kwasów tłuszczowych (tab. 1). W oleju rzepakowym kwasem występującym w przeważającej ilości jest kwas oleinowy (około 60%). Obok kwasu oleinowego w znacznej ilości jest także kwas linolowy (około 17%). W tłuszczu mlekowym w największej ilości występują kwasy palmitynowy (około 30%) oraz oleinowy (około 21%).



Rys. 3. Zawartość fazy stałej (SFC) w triacyloglicerolach mieszanin oleju rzepakowego z tłuszczem mlekowym (RSO : MF) w funkcji temperatury, przed i po przeestryfikowaniu.

Fig. 3. Solid Fat Content (SFC) as a function of temperature in triacylglycerols contained in blends made of rapeseed oil and milkfat (RSO : MF) before and after the interesterification accomplished.

Przeestryfikowanie nie powoduje zmian składu kwasów tłuszczowych. W trakcie przeestryfikowania zmienia się natomiast rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-2 i *sn*-1,3 triacylogliceroli. Zmiana struktury triacylogliceroli powoduje zmianę konsystencji i właściwości krystalizacyjnych tłuszczu. Przeestryfikowanie nie narusza natomiast struktury kwasów tłuszczowych, w tym również polienowych należących do NNKT, co jest bardzo istotne pod względem żywieniowym [7].

Na skutek przeestryfikowania stabilność przeciwutleniająca wszystkich badanych mieszanin zmniejszyła się bez względu na użyty katalizator (rys. 4).

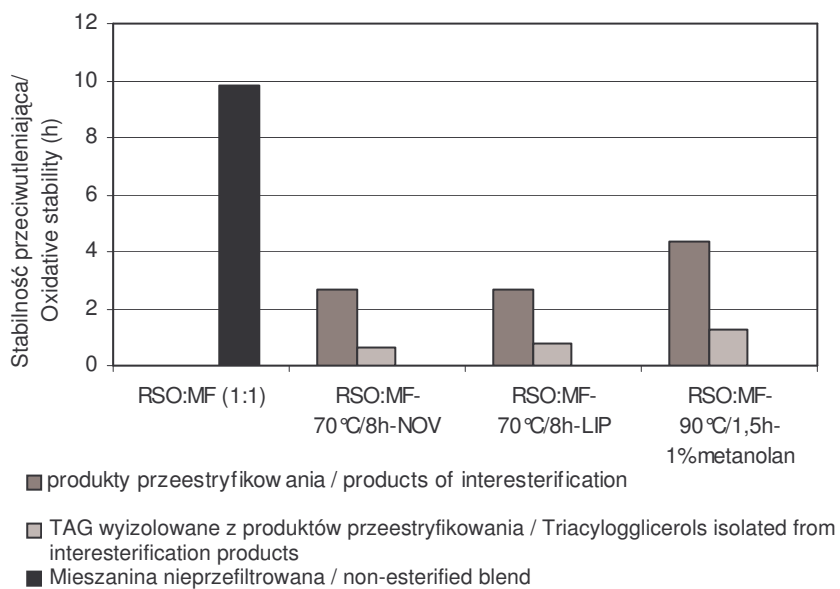
Przeestryfikowanie z użyciem biokatalizatorów trwało o wiele dłużej niż reakcja z zastosowaniem katalizatora chemicznego. Przeestryfikowanie enzymatyczne powodowało zatem większy spadek stabilności przeciwutleniającej w porównaniu z przeestryfikowaniem chemicznym.

Oleje roślinne są bardziej podatne na utlenianie w porównaniu z tłuszczami zwierzęcymi ze względu na większą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Tabela 1

Skład głównych kwasów tłuszczowych surowców wyjściowych oraz badanych mieszanin.  
Composition of major fatty acids as contained in initial raw materials and in blends investigated.

Kwas tłuszczowy Fatty acid	Zawartość kwasów tłuszczowych / Content of fatty acids			
	MF	RSO	RSO : MF (1:1)	RSO : MF- 70°C/8h-LIP
10:0	2,4	0,0	1,3	1,2
14:0	10,9	0,0	5,6	5,5
16:0	29,9	4,5	17,3	17,8
18:0	10,6	1,6	5,3	5,5
18:1 trans	3,3	0,0	1,4	1,5
18:1 cis9	20,9	61,1	41,8	41,1
18:2	1,3	16,9	9,3	9,1
18:3	0,7	8,5	4,2	4,5
20:0	0,2	0,6	0,4	0,6
CLA	1,2	0,0	0,1	0,1



Rys. 4. Stabilność przeciwutleniająca mieszanin oleju rzepakowego z tłuszczem mlekowym przed i po przeestryfikowaniu.

Fig. 4. Antioxidant stability of blends made of rapeseed oil and milkfat (RSO : MF) before and after the interesterification accomplished.

Według Brockerhoffa [2], w olejach roślinnych nienasycone kwasy tłuszczowe są zlokalizowane w pozycji *sn-2* triacylogliceroli, podczas gdy nasycone kwasy tłuszczowe rozmieszczone są w pozycjach *sn-1,3* triacylogliceroli. Metanolan sodu jest katalizatorem wykazującym pozycyjną niespecyficzność, zatem rozmieszczenie kwasów tłuszczowych pomiędzy pozycje *sn-2* i *sn-1,3* triacylogliceroli mieszanin przeestryfikowanych powinno być bliskie statystycznemu. W trakcie przeestryfikowania w obecności katalizatorów niespecyficznych następuje uwolnienie nienasyconych kwasów tłuszczowych z pozycji wewnętrznej triacylogliceroli olejów roślinnych i łatwy dostęp tlenu do tych kwasów [16]. Duża zawartość witaminy E (ok. 30 mg%) oraz stosunkowo niewielka zawartość kwasów polienowych (ok. 30%) sprawiają jednak, że niskoerukowy olej rzepakowy jest odporny na degradację w procesie obróbki termicznej [33]. Triacyloglicerole wyizolowane z produktów przeestryfikowania charakteryzują się najniższą stabilnością przeciwutleniającą, ponieważ są pozbawione tokoferoli i karotenów wykazujących działanie przeciwutleniające [19].

### Wnioski

1. Przeestryfikowanie spowodowało wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w badanych mieszaninach.
2. Triacyloglicerole wyizolowane z produktów przeestryfikowanych chemicznie wykazują spadek temperatury mięknienia i zmniejszenie zawartości fazy stałej w porównaniu z mieszaniną fizyczną.
3. Wzrost temperatury mięknienia i zawartości fazy stałej można uzyskać, poddając mieszaninę tłuszczu mlekowego z olejem rzepakowym przeestryfikowaniu enzymatycznemu.
4. Na skutek procesu przeestryfikowania, bez względu na rodzaj użytego katalizatora, stabilność przeciwutleniająca wszystkich badanych mieszanin zmalała.
5. Triacyloglicerole wyodrębnione z produktów przeestryfikowania charakteryzują się najniższą stabilnością przeciwutleniającą.

### Literatura

- [1] Balcao V. M., Malcata F. X.: Lipase catalyzed modification of milkfat. *Biotechnol. Adv.*, 1998, **16**, 309-341.
- [2] Brockerhoff H.: Stereospecific analysis of triglycerides, *Lipids*, 1971, **6**, 942-956.
- [3] Chmura M., Staniewski B.: Przeestryfikowanie enzymatyczne jako metoda modyfikacji składu i właściwości tłuszczu mlekowego. *Przegl. Mlecz.*, 2001, **6**, 271-275.
- [4] Drozdowski B.: *Lipidy*. W: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. WNT. Warszawa 1994, s. 167-188; 206-229.
- [5] Gruczyńska E., Kowalski B., Tarnowska K., Dziurosz J., Kowalska M., Bekas W.: Modification of beef tallow and its mixtures with rapeseed oil by chemical interesterification. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 2002, **79**, 391-394.



- [6] Gruczyńska E., Maciaszek K.: Przeestryfikowanie jako metoda modyfikacji właściwości lipidów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **24** (3), 31-38.
- [7] Haumann B. F.: Tools: hydrogenation, interesterification. *INFORM*, 1994, **5** (6), 668-678.
- [8] Jakubowski A.: Przeestryfikowanie jako metoda modyfikacji konsystencji tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, 1990, **28** (2), 21-29.
- [9] Kowalski B., Tarnowska K., Gruczyńska E., Bekas W.: Chemical and enzymatic interesterification of beef tallow and rapeseed oil blend with low content of tallow. *J. Oleo Sci.* 2004, **53** (10), 479-488.
- [10] Kowalski B., Ratusz K., Kowalska D., Bekas W.: Determination of the oxidative stability of vegetable oils by Differential Scanning Calorimetry and Rancimat methods. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2004, **106**, 165-169.
- [11] Ledóchowska E.: Zastosowanie enzymatycznego przeestryfikowania do modyfikacji tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, 1995, **30** (2), 43-48.
- [12] Ledóchowska E., Datta I.: Enzymatyczne i chemiczne przeestryfikowanie mieszaniny oleju rzepakowego i stearyny palmowej. *Tłuszcze Jadalne*, 1995, **30** (4), 169-183.
- [13] Ledóchowska E., Datta I.: Optimization of enzymatic interesterification of fats to increase the content of triacylglycerols in the reaction product. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1998, **7/48** (4), 683-690.
- [14] Ledóchowska E., Datta I.: Wpływ frakcji nietriacyloglicerolowej na stabilność oksydacyjną tłuszczu przeestryfikowanego chemicznie i enzymatycznie. *Żywność. Technologia. Jakość*, 1999, **1**, 15-24.
- [15] Ledóchowska E., Kurzyńska A.: Wpływ ilości wody obecnej w enzymie na proces enzymatycznego przeestryfikowania tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, 1995, **30** (4), 159-163.
- [16] Ledóchowska E., Wilczyńska E.: Comparison of the oxidative stability of chemically and enzymatically interesterified fats. *Food/Lipid*, 1998, **100**, 343-348.
- [17] Liu L., Lampert D.: Monitoring chemical interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, **76** (7), 783-787.
- [18] Macrae A. R.: Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1983, **60** (2), 243-246.
- [19] Małecka M.: Składniki frakcji nietriacyloglicerolowej olejów roślinnych jako przeciwutleniacze. *Tłuszcze Jadalne*, 1995, **30** (3), 123-130.
- [20] Marangoni A. G., Rousseau D.: Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends Food Sci. Tech.*, 1995, **6** (10), 329-335.
- [21] Marangoni A. G., Rousseau D.: Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. *Food Res. Inter.*, 1998, **31** (8), 595-599.
- [22] Płatek T.: Metoda określania stabilności oksydacyjnej olejów i tłuszczów w aparacie Rancimat. *Tłuszcze Jadalne*, 1995, **30** (1), 25-34.
- [23] PN-EN ISO 5508: 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- [24] PN-ISO 6886: 1997. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie stabilności oksydacyjnej (test przyspieszonego utleniania).
- [25] PN-EN ISO 8292: 1999. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości fazy stałej. Metoda pulsacyjnego magnetycznego rezonansu jądrowego.
- [26] PN-EN ISO 8420: 1999. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości związków polarnych.
- [27] PN-ISO 660: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości.
- [28] PN-ISO 6321: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie punktu topnienia w kapilarze otwartej (punkt płynięcia).

- [29] Rodrigues J. N., Gioielli L. A.: Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. *Food Res. Inter.*, 2003, **36** (2), 149-159.
- [30] Rousseau D., Forestiere K., Hill A. R., Marangoni A. G.: Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behavior and triacylglycerol modifications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73** (8), 963972.
- [31] Rozenaal A.: Interesterification of oils and fats. *International News on Fats, Oils and Related Materials*, 1992, **3** (11), 12321237.
- [32] Szukalska E., Drozdowski B.: Metoda manostatyczna badania stabilności oksydatywnej tłuszczów. *Przem. Spoż.*, 1993, **4**, 108110.
- [33] Ziemiański Ś., Budzyńska-Topolowska J.: *Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe*. PWN. Warszawa 1991.

### ANTIOXIDANT STABILITY OF INTERESTERIFIED BLEND MADE OF RAPESEED OIL AND MILKFAT

#### S u m m a r y

Intesterification is one of the methods for modifying fat properties. With this method, it is possible to make products of a predetermined structure of lipids. The interesterification process may affect oxidation resistance, thus, the stability of a fat product. A Rancimat test is a method that is both the most popular and the most frequently applied to investigate the stability of fats; this Rancimat test was applied to the investigation as presented in this paper. It was studied in what manner the type of catalyst used during the process, and the conditions of reaction affected the oxidation of interesterified blends made of rapeseed oil and milkfat.

Blends of rapeseed oil and milkfat, their composition by weight being 1:1, constituted the material for the investigation. The aforesaid blends were chemically interesterified in the presence of sodium methoxide as catalyst, and, then, enzymatically interesterified using enzymatic preparations with lipases of various specificity. The chemical interesterification was accomplished at a temperature of 90°C, during a period of 1.5 hours, and the enzymatic interesterification: at a temperature of 70°C, during 8 hours.

The results of the investigation performed prove that the interesterification process has an impact on reducing the antioxidant stability of fats. Triacylglycerols isolated from the interesterification products were characterized by the lowest antioxidant stability.

**Key words:** interesterification, milkfat, antioxidant stability, rapeseed oil, Rancimat test ☒

MARTA ZAKRZEWSKA, JOLANTA KOWALSKA

## **JAKOŚĆ SENSORYCZNA KAKAO INSTANT W KOŃCOWYM OKRESIE (III KWARTAŁ) PRZYDATNOŚCI DO SPOŻYCIA**

### Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu czasu i temperatury przechowywania na jakość sensoryczną kakao instant, w końcowym okresie (III kwartał) jego przydatności do spożycia.

Materiał do badań stanowiły trzy proszki kakaowe instant, zakupione po dwóch kwartałach składowania w jednym sklepie, lecz pochodzące od różnych producentów. Podczas badań produkty przechowywano w zamkniętych opakowaniach polietylenowych, bez dostępu światła, w temp. 7, 15 i 27°C.

Analizie sensorycznej poddano próbki proszków oraz napojów kakaowych sporządzonych z tych proszków. Charakterystykę sensoryczną produktów przeprowadził przeszkolony 13-osobowy zespół oceniający, przy użyciu metody ilościowej analizy opisowej. Proszek oceniano z uwzględnieniem 7 wyróżników jakościowych (barwa, wyróżniki zapachu, jednorodność), natomiast napój według 12 wyróżników (barwa, wyróżniki zapachu i smaku). Przeprowadzono 4 niezależne sesje ocen. Ostatnią serię badań wykonano po 3. miesiącu (III kwartał) składowania produktów - na kilka dni przed upływem ich terminu przydatności do spożycia.

Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu temperatury i czasu przechowywania (w okresie trzech miesięcy III kwartału składowania produktów) na najbardziej charakterystyczne i pozytywne cechy sensoryczne proszków kakaowych oraz napojów z nich sporządzonych. Wykazano zaś statystycznie istotny wpływ temperatury i czasu przechowywania w badanym okresie na intensywność negatywnych cech proszków oraz napojów kakaowych. Zaobserwowany wpływ analizowanych czynników był prawdopodobnie skutkiem bardzo niskiego natężenia negatywnych cech każdego z produktów. Badania potwierdziły stabilność sensoryczną kakao instant pod koniec wydłużonego do 9 miesięcy terminu przydatności do spożycia, w stosunku do 6-miesięcznego okresu normatywnego. W czasie przechowywania nie zanotowano bowiem znaczących zmian jakościowych zarówno proszków jak i napojów. Zaobserwowano zaś zróżnicowanie początkowej jakości sensorycznej proszków kakaowych w przeciwieństwie do sporządzonych z nich napojów.

**Słowa kluczowe:** kakao instant, jakość sensoryczna, przechowywanie

### **Wprowadzenie**

Kakao instant definiowane jest jako koncentrat mieszaniny kakao oraz dodatków, otrzymany w procesie instantyzacji, o szybkiej rozpuszczalności w wodzie lub w mleku, umożliwiający przyrządzenie gotowego do spożycia napoju [8]. Podstawowym i najprostszym napojem kakaowym jest mieszanka proszku kakaowego

oraz cukru, dodatków takich, jak: lecytyna, mleko w proszku i aromaty [6]. Często stosuje się wzbogacanie w witaminy oraz składniki mineralne (wapń, magnez, żelazo). Ze względu na swoją dużą funkcjonalność wyroby te cieszą się dużym zainteresowaniem konsumentów, a docelową grupą odbiorców są głównie dzieci.

Na jakość wyrobów kakaowych, w tym głównie na jakość sensoryczną, ogromny wpływ ma jakość surowca, prawidłowo przeprowadzona fermentacja ziarna kakaowego oraz proces technologiczny uzyskania proszku kakaowego [2, 13, 16, 19]. Podczas fermentacji w wyniku biochemicznego utleniania flawanoli i tanin zawartych w ziarnie zmniejsza się jego cierpkość, a na skutek przemian antocyjanów do związków guidynowych powstaje typowo brązowa barwa ziarna kakaowego [15, 17]. Proces suszenia redukuje zaś zawartość wody w ziarnie, zatrzymuje hydrolityczne jęłczenie tłuszczu kakaowego oraz hamuje rozwój mikroorganizmów [12, 18]. Podczas prażenia ziarna na skutek reakcji Maillarda powstają związki odpowiedzialne za finalny aromat ziarna kakaowego [12, 20]. W wyniku przeprowadzonej alkalizacji możliwe jest ponadto uzyskanie odpowiedniej barwy proszku kakaowego o różnej intensywności aromatu [3]. Według Świderskiego [13] i Wyczańskiego [19], jakość kakao determinują również warunki przechowywania i transportu.

Zgodnie z PN-A-74859:1994 [9] oraz PN-A-74859:1994/Az1:2001 [10] wyroby cukiernicze trwałe, w tym również kakao instant, należy przechowywać w temp. poniżej 18°C i wilgotności względnej powietrza poniżej 75%. Proponowany w normach okres przechowywania kakao instant w tych warunkach wynosi 6 miesięcy. Jednak termin ten nie jest obligatoryjny, gdyż stosowanie Polskich Norm od 2003 roku nie jest obowiązujące. Producent może więc zadeklarować dłuższy termin ważności wyrobu kakaowego aczkolwiek pod warunkiem, że produkt w okresie przydatności do spożycia nie stworzy zagrożenia dla zdrowia konsumentów. W przypadku kakao instant, producenci, na podstawie badań przechowalniczych, określili okres przydatności do spożycia tego produktu na 9 miesięcy. Zachowanie parametrów chemicznych w czasie całego okresu przechowywania na odpowiednim poziomie niekoniecznie musi skutkować utrzymaniem dobrej jakości sensorycznej kakao instant. Jak wiadomo, kakao jest produktem silnie higroskopijnym i łatwo pochłaniającym obce zapachy [2, 13], dlatego warunki i wydłużony okres przechowywania mogą w znacznym stopniu determinować jego końcową jakość sensoryczną.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu czasu i temperatury przechowywania na jakość sensoryczną kakao instant w końcowym okresie jego przydatności do spożycia (III kwartał) oraz do określenia jego stabilności sensorycznej.

## **Materiał i metody badań**

### *Materiał badawczy*

Materiał badawczy stanowiły 3 proszki kakaowe instant dostępne na rynku, pochodzące od różnych producentów. Zostały zakupione w jednym sklepie, tak aby zapewnić możliwie analogiczne warunki składowania każdego z nich w punkcie sprzedaży. Do momentu zakupu kakao instant znajdowało się na półce sklepowej przez okres około 6 miesięcy. Sklep był klimatyzowany (temp. 18°C), a kakao instant wraz z innymi proszkami spożywczymi znajdowało się blisko lad chłodniczych, dzięki czemu temp. jego składowania wynosiła około 15°C. Analizowane produkty charakteryzowały się takim samym, 9-miesięcznym terminem przydatności do spożycia. Założeniem pracy było przebadanie produktów pod koniec ich terminu przydatności, dlatego zakupiono je dopiero na 3 miesiące przed jego upływem. Zostały oznaczone jako proszek kakaowy A, B oraz C. Po otwarciu i podzieleniu na próby przechowywano je przez 3 miesiące w szczelnie zamkniętych opakowaniach (pojemniki z ciemnego polietylenu) w temp. 7, 15 i 27°C, tj. odpowiednio w komorze chłodniczej KO-3,5 (PPUCh Tarczyn) z wymuszonym obiegiem powietrza, klimatyzowanym pomieszczeniu o stałej temp. 15°C, zgodnej z zaleceniami PN-A-74859:1994 [9], PN-A-74859:1994/Az1:2001 [10] oraz w cieplarni Memmert typ BE400 – w temperaturze, w jakiej produkt może być składowany w zwykłym sklepie, np. w okresie letnim. Dobór temp. 7°C wynikał z możliwości przechowywania wyrobów przez konsumenta w warunkach chłodniczych.

### *Przygotowanie i prezentacja próbek do ocen sensorycznych*

Ocnom sensorycznym poddawano próbki proszków A, B, C oraz napojów kakaowych sporządzonych z tych proszków.

Próbki proszku kakaowego w ilości 1,5 g (1 płaska łyżeczka) odważano do bezwonnych jednorazowych pojemniczków (o pojemności 100 ml) i przykrywano przykrywką.

W celu sporządzenia próbek napoju kakaowego rozpuszczano 40 g proszku kakaowego w 400 ml świeżo destylowanej wody (o temp. 20°C) i mieszano bagietką do całkowitego rozpuszczenia. Przygotowany napój (w ilości około 25 ml) rozlewano do bezwonnych pojemniczków jednorazowego użycia o pojemności 50 ml i przykrywano małymi płytkami Petriego.

W sesjach przechowalniczych oceniający otrzymywali do oceny próbki proszków składowanych w 3 wartościach temperatury oraz napojów sporządzonych z tych proszków. W każdej z tych sesji zespół oceniający otrzymywał również próbkę standardową. W tym celu po badaniach wstępnych zamrożono (w temp. -18°C) 240 g każdego z proszków kakaowych A, B, C (po 80 g proszku na każdą sesję przechowalniczą). Akredytowane laboratoria sensoryczne wykorzystują mrożenie proszków spożywczych jako metodę zapewnienia ich standardu. Zakłada się bowiem,

że zamrażanie jest najbardziej skuteczną metodą utrzymania cech produktu bez zmian mających istotne znaczenie dla prowadzonych badań, w szczególności sensorycznych.

W poszczególnych sesjach każdy z 13 oceniających otrzymywał po 4 próbki każdego z proszków A, B, C (próbki standardową oraz próbki przechowywane w temp. 7, 15 i 27°C), a więc łącznie 12 próbek proszków oraz analogicznie 12 próbek napojów kakaowych. W pierwszej kolejności oceniano proszki, zaś w drugim etapie napoje kakaowe. Zakodowane próbki proszków oraz napojów kakaowych podawano do ocen w losowej kolejności - innej dla każdego oceniającego.

#### *Zespół oceniający i warunki ocen sensorycznych*

Charakterystykę sensoryczną przeprowadził przeszkolony 13-osobowy zespół oceniający, mający przygotowanie metodyczne (teoretyczne i praktyczne) w zakresie metod sensorycznych. Sesje ocen odbywały się w laboratorium analiz sensorycznych Katedry Dietetyki i Żywności Funkcjonalnej SGGW, spełniającym wymagania określone normą PN-ISO 8589:1988 [11].

Do przygotowania testów, zbierania indywidualnych ocen oraz zestawienia wyników indywidualnych i wyników średnich zastosowano skomputeryzowany system wspomaganie analiz sensorycznych (ANALSENS NT).

#### *Metoda badań*

Charakterystykę jakościowo-ilościową proszków oraz napojów kakaowych przeprowadzono przy użyciu metody ilościowej analizy opisowej (Quantitative Descriptive Analysis – QDA), wykorzystywanej m. in. w badaniach trwałości produktów spożywczych [7] i nazywanej również metodą profilową. Próbkę kontrolną (standardową) stanowił produkt bezpośrednio po nabyciu oraz ten sam produkt zamrożony, z którym porównywano przechowywane próbki. Koncepcja metody QDA polega na założeniu, że zapach, smakowość lub tekstura nie są pojedynczymi cechami jakości sensorycznej, lecz kompleksem wielu jednostkowych cech ustalanych według określonej procedury [1]. Zgodnie z procedurą metody QDA [5] przeprowadzono wybór jakościowych wyróżników proszków i napojów kakaowych oraz ustalono ich listę wraz z definicjami:

- barwa – odpowiadająca barwie kakao z dodatkami, od jasnobrązowej do ciemnobrązowej,
- zapach czekoladowy – zapach łagodny, charakterystyczny zapach mlecznej czekolady,
- zapach kakaowy – charakterystyczny zapach gorzkiej czekolady i kakao,
- zapach słodki – zapach łagodny, charakterystyczny zapach lekko przypalonego cukru lub waty cukrowej,
- zapach ostry – zapach wywołujący wrażenie drażnienia przy wężaniu,
- zapach obcy – nietypowy, mało charakterystyczny,
- jednorodność – stopień jednorodności pod względem wielkości cząsteczek proszku,



- smak czekoladowy – smak łagodny, charakterystyczny smak mlecznej czekolady,
- smak kakaowy – charakterystyczny smak gorzkiej czekolady i kakao,
- smak słodki – podstawowa jakość smaku, nie wymaga definicji,
- smak gorzki – podstawowa jakość smaku, nie wymaga definicji,
- smak cierpki – wrażenie ściągające na powierzchni języka,
- smak obcy – nietypowy, mało charakterystyczny.

Proszek oceniano z uwzględnieniem 7 wyróżników jakościowych (barwa, wyróżniki zapachu, jednorodność), natomiast napój według 12 wyróżników (barwa, wyróżniki zapachu i smaku). Przeprowadzono 4 niezależne sesje właściwe ocen (sesja wstępna – przed przechowywaniem i 3 sesje przechowalnicze). Ostatnią z 3 serii badań przechowalniczych wykonano po 3. miesiącu przechowywania produktów, na kilka dni przed upływem ich terminu przydatności do spożycia. Intensywność wyróżników zaznaczano na niestrukturowanej skali liniowej o określeniach brzegowych w przypadku barwy: jasnobrązowa – ciemnobrązowa, zapachu i smaku: niewyczuwalny – bardzo intensywny, zaś w przypadku jednorodności proszku: niejednorodny – jednorodny. Wyniki ocen podlegały konwersji do wartości liczbowych wyrażanych w jednostkach umownych (zakres skali – 10 jednostek umownych – 10 j.u.).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu komputerowego Statgraphics plus 2.1, stosując analizę wariancji.

### **Wyniki i dyskusja**

Próbki proszków i napojów kakaowych oceniane bezpośrednio po zakupie oraz próbki sporządzone z tych proszków (uprzednio zamrożonych) i podawane do oceny w trzech sesjach badań przechowalniczych cechowały się bardzo zbliżonym profilem jakościowym. Stąd wartości ich oceny profilowej uśredniono i nazwano próbkami standardowymi proszków lub napojów kakaowych. W celu zbadania trwałości analizowanych produktów profile jakościowe proszków oraz napojów porównywano z próbką standardową.

Proszki kakaowe A po 1., 2. oraz 3. miesiącu (III kwartału) przechowywania w różnej temperaturze (tab. 1) oraz proszek A standardowy charakteryzowały się zbliżoną jakością sensoryczną. Proszki B (tab. 2) oraz proszki C (tab. 3) wykazały analogiczną zależność.

Zaobserwowano natomiast zróżnicowanie jakości sensorycznej pomiędzy badanymi proszkami A, B i C (tab. 1–3). Różnice w profilu jakościowym dotyczyły stopnia jednorodności oraz barwy. Proszek kakaowy B odznaczał się wysokim stopniem jednorodności i ciemnobrązową barwą, podczas gdy proszek kakaowy C cechował się niskim stopniem jednorodności oraz barwą jasnobrązową. Proszek A uzyskał niższe noty w stosunku do proszku B, a wyższe od proszku C. Zaobserwowane różnice pomiędzy proszkami mogły być spowodowane różnicami w ich technologii produkcji, w zależności od których spotykane są proszki kakaowe o barwie od jasnego

złota aż po ciemne brązy, o różnym stopniu rozdrobnienia oraz intensywności aromatu [2, 3].

Tabela 1

Wpływ czasu i temperatury przechowywania na jakość sensoryczną proszku kakaowego A.  
The effect of storage time and temperature on the sensory quality of 'A' cocoa powder.

Wyróżnik jakości sensorycznej Sensory quality factor	Czynnik zmienności / Factors of variability					
	Czas [miesiąc] Period [month]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value	Temperatura [°C] Temperature [°C]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value
Barwa Colour	1	4,83 ± 0,09	0,15	7°C	4,82 ± 0,16	0,27
	2	4,75 ± 0,17		15°C	4,75 ± 0,26	
	3	4,78 ± 0,27		27°C	4,79 ± 0,13	
Zapach czekoladowy Chocolate smell	1	3,33 ± 0,36	0,38	7°C	3,19 ± 0,45	0,29
	2	3,19 ± 0,46		15°C	3,27 ± 0,46	
	3	3,27 ± 0,46		27°C	3,34 ± 0,37	
Zapach kakaowy Cocoa smell	1	2,91 ± 0,73	0,15	7°C	2,97 ± 0,67	0,54
	2	3,06 ± 0,46		15°C	3,06 ± 0,65	
	3	3,19 ± 0,64		27°C	3,13 ± 0,56	
Zapach słodki Sweet smell	1	1,49 ± 0,20	0,20	7°C	1,49 ± 0,21	0,16
	2	1,58 ± 0,26		15°C	1,57 ± 0,22	
	3	1,55 ± 0,14		27°C	1,56 ± 0,19	
Zapach ostry Sharp smell	1	1,30 ± 0,53 <sup>b</sup>	0,04	7°C	1,15 ± 0,54 <sup>AB</sup>	0,02
	2	1,12 ± 0,47 <sup>ab</sup>		15°C	0,99 ± 0,42 <sup>A</sup>	
	3	1,03 ± 0,44 <sup>a</sup>		27°C	1,30 ± 0,47 <sup>B</sup>	
Zapach obcy Strange smell	1	0,45 ± 0,29 <sup>c</sup>	0,01	7°C	0,27 ± 0,18 <sup>C</sup>	0,00
	2	0,29 ± 0,19 <sup>d</sup>		15°C	0,47 ± 0,29 <sup>D</sup>	
	3	0,37 ± 0,20 <sup>cd</sup>		27°C	0,37 ± 0,20 <sup>CD</sup>	
Jednorodność Homogeneity	1	6,31 ± 0,63	0,11	7°C	6,57 ± 0,42	0,17
	2	6,30 ± 0,89		15°C	6,36 ± 0,75	
	3	6,60 ± 0,51		27°C	6,28 ± 0,85	

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation

Wartość P-Value  $\geq \alpha$  ( $\alpha = 0,05$ ) wskazuje na brak statystycznie istotnego wpływu czasu i temperatury przechowywania (w III kwartale składowania produktu) na wyróżniki jakości sensorycznej proszku kakaowego;

P-Value  $\geq \alpha$ , ( $\alpha = 0,05$ ) indicates that there is no statistically significant effect of storage life and temperature on quality factors of cocoa powder;

Wartość P-Value  $< \alpha$  ( $\alpha = 0,05$ ) oraz wartości średnie oznaczone różnymi literami wskazują na statystycznie istotny wpływ, odpowiednio czasu (małe litery) lub temperatury (duże litery) przechowywania (w III kwartale składowania produktu) na wyróżniki jakości sensorycznej proszku kakaowego;

P-Value  $< \alpha$ , ( $\alpha = 0,05$ ) and mean values, which are designed by different small or capital letters, indicates that there is a statistically significant effect of storage life (small letters) or storage temperature (capital letters) in the 3<sup>rd</sup> quarter of the whole storage period) on quality factors of the cocoa powder.



Tabela 2

Wpływ czasu i temperatury przechowywania na jakość sensoryczną proszku kakaowego B.  
The effect of storage time and temperature on the sensory quality of 'B' cocoa powder.

Wyróżnik jakości sensorycznej Sensory quality factor	Czynnik zmienności / Factor of variability					
	Czas [miesiąc] Period [month]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value	Temperatura [°C] Temperature [°C]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value
Barwa Colour	1	7,50 ± 0,28	0,15	7°C	7,41 ± 0,29	0,51
	2	7,38 ± 0,24		15°C	7,44 ± 0,23	
	3	7,45 ± 0,23		27°C	7,48 ± 0,24	
Zapach czekoladowy Chocolate smell	1	3,13 ± 0,18	0,24	7°C	3,09 ± 0,14	0,46
	2	3,09 ± 0,16		15°C	3,12 ± 0,20	
	3	3,06 ± 0,23		27°C	3,07 ± 0,23	
Zapach kakaowy Cocoa smell	1	4,05 ± 0,44	0,19	7°C	3,90 ± 0,41	0,48
	2	3,88 ± 0,40		15°C	3,95 ± 0,37	
	3	3,94 ± 0,41		27°C	4,01 ± 0,48	
Zapach słodki Sweet smell	1	1,53 ± 0,14	0,36	7°C	1,51 ± 0,20	0,38
	2	1,58 ± 0,26		15°C	1,57 ± 0,22	
	3	1,51 ± 0,19		27°C	1,54 ± 0,19	
Zapach ostry Sharp smell	1	0,96 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,04	7°C	0,96 ± 0,31 <sup>A</sup>	0,04
	2	1,18 ± 0,40 <sup>b</sup>		15°C	1,18 ± 0,41 <sup>B</sup>	
	3	1,10 ± 0,39 <sup>ab</sup>		27°C	1,09 ± 0,41 <sup>AB</sup>	
Zapach obcy Strange smell	1	0,80 ± 0,32 <sup>d</sup>	0,01	7°C	0,63 ± 0,21 <sup>C</sup>	0,03
	2	0,64 ± 0,16 <sup>c</sup>		15°C	0,73 ± 0,20 <sup>D</sup>	
	3	0,68 ± 0,18 <sup>c</sup>		27°C	0,76 ± 0,28 <sup>D</sup>	
Jednorodność Homogeneity	1	7,84 ± 0,56	0,15	7°C	7,99 ± 0,56	0,56
	2	7,93 ± 0,32		15°C	7,93 ± 0,42	
	3	8,04 ± 0,45		27°C	7,88 ± 0,39	

Objaśnienia jak w tab. 1 / Explanatory notes as in Tab. 1

Każdy z proszków odznaczał się ponadto umiarkowaną intensywnością pozytywnych wyróżników zapachowych (zapach czekoladowy, kakaowy i słodki) oraz bardzo niską intensywnością negatywnych wyróżników (zapach ostry, obcy).

Serra Bonvehi i Ventura Coll [12] wykazali, że stopień akceptacji sensorycznej proszków kakaowych instant związany jest z zawartością polifenoli, tanin i epikatechin w kakao użytym do jego produkcji. Stąd wysoka lub umiarkowana zawartość wymienionych składników determinuje wysoki czy też umiarkowany poziom akceptacji kakao instant [12].

Po 1., 2., oraz 3. miesiącu przechowywania (III kwartał) wszystkie trzy napoje kakaowe (tab. 4 - 6) (sporządzone z proszków składowanych w różnych wartościach temperatury), jak również odpowiadające im napoje standardowe charakteryzowały się zbliżoną jakością sensoryczną.

Tabela 3

Wpływ czasu i temperatury przechowywania na jakość sensoryczną proszku kakaowego C.  
The effect of storage time and temperature on the sensory quality of 'C' cocoa powder.

Wyróżnik jakości sensorycznej Sensory quality factor	Czynnik zmienności / Factor of variability					
	Czas [miesiąc] Time [month]	$\bar{X} \pm SD$	P-Value	Temperatura [°C] Temperature [°C]	$\bar{X} \pm SD$	P-Value
Barwa Colour	1	2,51 ± 0,51	0,27	7°C	2,59 ± 0,44	0,17
	2	2,60 ± 0,40		15°C	2,50 ± 0,52	
	3	2,68 ± 0,48		27°C	2,70 ± 0,42	
Zapach czekoladowy Chocolate smell	1	2,96 ± 0,32	0,18	7°C	3,02 ± 0,19	0,20
	2	3,03 ± 0,19		15°C	2,97 ± 0,28	
	3	3,07 ± 0,27		27°C	3,08 ± 0,32	
Zapach kakaowy Cocoa smell	1	3,37 ± 0,14	0,15	7°C	3,37 ± 0,14	0,21
	2	3,34 ± 0,11		15°C	3,41 ± 0,15	
	3	3,41 ± 0,21		27°C	3,34 ± 0,18	
Zapach słodki Sweet smell	1	1,54 ± 0,16	0,26	7°C	1,48 ± 0,22	0,16
	2	1,49 ± 0,29		15°C	1,59 ± 0,24	
	3	1,59 ± 0,28		27°C	1,54 ± 0,28	
Zapach ostry Sharp smell	1	0,77 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,03	7°C	0,91 ± 0,28 <sup>B</sup>	0,04
	2	0,92 ± 0,27 <sup>b</sup>		15°C	0,84 ± 0,24 <sup>AB</sup>	
	3	0,83 ± 0,24 <sup>ab</sup>		27°C	0,77 ± 0,21 <sup>A</sup>	
Zapach obcy Strange smell	1	0,43 ± 0,20 <sup>d</sup>	0,04	7°C	0,32 ± 0,17 <sup>C</sup>	0,02
	2	0,32 ± 0,17 <sup>c</sup>		15°C	0,44 ± 0,23 <sup>D</sup>	
	3	0,38 ± 0,21 <sup>cd</sup>		27°C	0,36 ± 0,16 <sup>CD</sup>	
Jednorodność Homogeneity	1	1,89 ± 0,26	0,17	7°C	1,89 ± 0,28	0,24
	2	1,95 ± 0,23		15°C	2,00 ± 0,28	
	3	2,00 ± 0,31		27°C	1,96 ± 0,25	

Objaśnienia jak w tab. 1 / Explanatory notes as in Tab. 1

Pomimo zaobserwowanego zróżnicowania jakości sensorycznej pomiędzy proszkami A, B, C, w przypadku napojów nie zanotowano większych różnic w intensywności poszczególnych wyróżników. Napoje cechowały się ciemnobrązową barwą oraz umiarkowaną intensywnością smaku i zapachu kakaowego, czekoladowego oraz słodkiego. Wykazywały bardzo niskie natężenie not negatywnych – zapachu ostrego i obcego oraz smaku gorzkiego, cierpkiego i obcego (tab. 4–6).

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała brak istotnego wpływu czasu i temperatury przechowywania na najbardziej charakterystyczne, a jednocześnie dominujące oraz pozytywne wyróżniki profilu jakości sensorycznej proszków i napojów kakaowych (barwa, jednorodność, zapach oraz smak czekoladowy, kakaowy, słodki). Zaobserwowano zaś statystycznie istotny wpływ czasu i temperatury

Wpływ czasu i temperatury przechowywania na jakość sensoryczną napoju kakaowego A.

The effect of storage time and temperature on the sensory quality of 'A' cocoa drink.

Wyróżnik jakości sensorycznej Sensory quality factor	Czynnik zmienności / Factor of variability					
	Czas [miesiąc] Period [month]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value	Temperatura [°C] Temperature [°C]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value
Barwa Colour	1	6,29 ± 0,89	0,16	7°C	6,59 ± 0,42	0,16
	2	6,60 ± 0,51		15°C	6,29 ± 0,82	
	3	6,44 ± 0,62		27°C	6,45 ± 0,77	
Zapach czekoladowy Chocolate smell	1	2,95 ± 0,33	0,15	7°C	2,95 ± 0,30	0,17
	2	3,09 ± 0,33		15°C	3,02 ± 0,32	
	3	3,03 ± 0,29		27°C	3,09 ± 0,34	
Zapach kakaowy Cocoa smell	1	2,81 ± 0,48	0,28	7°C	2,89 ± 0,42	0,16
	2	2,91 ± 0,41		15°C	3,00 ± 0,43	
	3	2,97 ± 0,48		27°C	2,80 ± 0,51	
Zapach słodki Sweet smell	1	1,65 ± 0,16	0,19	7°C	1,68 ± 0,25	0,13
	2	1,68 ± 0,28		15°C	1,59 ± 0,21	
	3	1,59 ± 0,20		27°C	1,65 ± 0,18	
Zapach ostry Sharp smell	1	0,30 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,00	7°C	0,31 ± 0,19 <sup>A</sup>	0,01
	2	0,38 ± 0,19 <sup>ab</sup>		15°C	0,46 ± 0,25 <sup>B</sup>	
	3	0,46 ± 0,24 <sup>b</sup>		27°C	0,37 ± 0,16 <sup>AB</sup>	
Zapach obcy Strange smell	1	0,28 ± 0,16 <sup>c</sup>	0,01	7°C	0,37 ± 0,18 <sup>D</sup>	0,02
	2	0,37 ± 0,17 <sup>d</sup>		15°C	0,30 ± 0,14 <sup>CD</sup>	
	3	0,29 ± 0,12 <sup>c</sup>		27°C	0,27 ± 0,15 <sup>C</sup>	
Smak czekoladowy Chocolate taste	1	3,36 ± 0,13	0,19	7°C	3,40 ± 0,15	0,21
	2	3,38 ± 0,14		15°C	3,41 ± 0,15	
	3	3,42 ± 0,20		27°C	3,35 ± 0,17	
Smak kakaowy Cocoa taste	1	2,20 ± 0,49	0,19	7°C	2,29 ± 0,35	0,16
	2	2,29 ± 0,30		15°C	2,20 ± 0,46	
	3	2,36 ± 0,34		27°C	2,37 ± 0,34	
Smak słodki Sweet taste	1	3,77 ± 0,22	0,16	7°C	3,83 ± 0,20	0,19
	2	3,85 ± 0,23		15°C	3,88 ± 0,28	
	3	3,87 ± 0,26		27°C	3,78 ± 0,23	
Smak gorzki Bitter taste	1	0,48 ± 0,29 <sup>e</sup>	0,01	7°C	0,49 ± 0,28 <sup>E</sup>	0,04
	2	0,59 ± 0,31 <sup>ef</sup>		15°C	0,60 ± 0,33 <sup>EF</sup>	
	3	0,71 ± 0,38 <sup>f</sup>		27°C	0,69 ± 0,38 <sup>F</sup>	
Smak cierpki Tart taste	1	0,21 ± 0,11 <sup>g</sup>	0,00	7°C	0,18 ± 0,10 <sup>G</sup>	0,00
	2	0,35 ± 0,19 <sup>h</sup>		15°C	0,28 ± 0,18 <sup>H</sup>	
	3	0,29 ± 0,19 <sup>h</sup>		27°C	0,38 ± 0,17 <sup>I</sup>	
Smak obcy Strange taste	1	0,67 ± 0,17 <sup>k</sup>	0,00	7°C	0,54 ± 0,22 <sup>J</sup>	0,01
	2	0,62 ± 0,15 <sup>k</sup>		15°C	0,65 ± 0,16 <sup>K</sup>	
	3	0,43 ± 0,20 <sup>j</sup>		27°C	0,52 ± 0,20 <sup>J</sup>	

Objaśnienia jak w tab. 1 / Explanatory notes as in Tab. 1.

Wpływ czasu i temperatury przechowywania na jakość sensoryczną napoju kakaowego B.

The effect of storage time and temperature on the sensory quality of 'B' cocoa drink.

Wyróżnik jakości sensorycznej Sensory quality factor	Czynnik zmienności / Factor of variability					
	Czas [miesiąc] Period [month]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value	Temperatura [°C] Temperature [°C]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value
Barwa Colour	1	7,32 ± 0,38	0,15	7°C	7,33 ± 0,39	0,18
	2	7,25 ± 0,36		15°C	7,24 ± 0,27	
	3	7,17 ± 0,29		27°C	7,18 ± 0,36	
Zapach czekoladowy Chocolate smell	1	4,38 ± 0,40	0,22	7°C	4,30 ± 0,45	0,33
	2	4,20 ± 0,55		15°C	4,36 ± 0,45	
	3	4,29 ± 0,40		27°C	4,21 ± 0,46	
Zapach kakaowy Cocoa smell	1	2,32 ± 0,33	0,15	7°C	2,40 ± 0,34	0,14
	2	2,38 ± 0,34		15°C	2,22 ± 0,45	
	3	2,21 ± 0,47		27°C	2,28 ± 0,36	
Zapach słodki Sweet smell	1	2,58 ± 0,40	0,22	7°C	2,49 ± 0,42	0,26
	2	2,41 ± 0,51		15°C	2,57 ± 0,35	
	3	2,49 ± 0,35		27°C	2,42 ± 0,49	
Zapach ostry Sharp smell	1	0,52 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,02	7°C	0,63 ± 0,22 <sup>B</sup>	0,03
	2	0,57 ± 0,20 <sup>ab</sup>		15°C	0,51 ± 0,16 <sup>A</sup>	
	3	0,65 ± 0,23 <sup>b</sup>		27°C	0,60 ± 0,22 <sup>AB</sup>	
Zapach obcy Strange smell	1	0,25 ± 0,21 <sup>c</sup>	0,03	7°C	0,33 ± 0,21 <sup>CD</sup>	0,02
	2	0,35 ± 0,24 <sup>cd</sup>		15°C	0,40 ± 0,27 <sup>D</sup>	
	3	0,38 ± 0,23 <sup>d</sup>		27°C	0,25 ± 0,20 <sup>C</sup>	
Smak czekoladowy Chocolate taste	1	4,18 ± 0,60	0,15	7°C	4,19 ± 0,48	0,20
	2	4,40 ± 0,40		15°C	4,30 ± 0,47	
	3	4,30 ± 0,41		27°C	4,39 ± 0,49	
Smak kakaowy Cocoa taste	1	2,50 ± 0,54	0,21	7°C	2,61 ± 0,48	0,16
	2	2,61 ± 0,42		15°C	2,49 ± 0,54	
	3	2,70 ± 0,51		27°C	2,71 ± 0,45	
Smak słodki Sweet taste	1	3,95 ± 0,37	0,17	7°C	3,96 ± 0,34	0,25
	2	4,10 ± 0,41		15°C	4,09 ± 0,37	
	3	4,03 ± 0,29		27°C	4,02 ± 0,37	
Smak gorzki Bitter taste	1	0,51 ± 0,37 <sup>e</sup>	0,04	7°C	0,73 ± 0,30 <sup>F</sup>	0,01
	2	0,62 ± 0,31 <sup>ef</sup>		15°C	0,62 ± 0,33 <sup>EF</sup>	
	3	0,71 ± 0,33 <sup>f</sup>		27°C	0,50 ± 0,36 <sup>E</sup>	
Smak cierpki Tart taste	1	0,39 ± 0,19 <sup>h</sup>	0,01	7°C	0,32 ± 0,16 <sup>GH</sup>	0,02
	2	0,28 ± 0,18 <sup>g</sup>		15°C	0,38 ± 0,18 <sup>H</sup>	
	3	0,30 ± 0,13 <sup>g</sup>		27°C	0,27 ± 0,17 <sup>G</sup>	
Smak obcy Strange taste	1	0,38 ± 0,26 <sup>i</sup>	0,04	7°C	0,39 ± 0,24 <sup>I</sup>	0,03
	2	0,53 ± 0,27 <sup>j</sup>		15°C	0,54 ± 0,28 <sup>J</sup>	
	3	0,48 ± 0,24 <sup>ij</sup>		27°C	0,46 ± 0,24 <sup>IJ</sup>	

Objaśnienia jak w tab. 1 / Explanatory notes as in Tab. 1.

Tabela 6

Wpływ czasu i temperatury przechowywania na jakość sensoryczną napoju kakaowego C.  
The effect of storage time and temperature on the sensory quality of 'C' cocoa drink.

Wyróżnik jakości sensorycznej Sensory quality factor	Czynnik zmienności / Factor of variability					
	Czas [miesiąc] Period [month]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value	Temperatura [°C] Temperature [°C]	$\bar{x} \pm SD$	P-Value
Barwa Colour	1	6,90 ± 0,85	0,11	7°C	7,18 ± 0,43	0,13
	2	6,94 ± 0,60		15°C	6,96 ± 0,77	
	3	7,19 ± 0,49		27°C	6,89 ± 0,78	
Zapach czekoladowy Chocolate smell	1	2,58 ± 0,50	0,28	7°C	2,57 ± 0,47	0,16
	2	2,67 ± 0,38		15°C	2,66 ± 0,46	
	3	2,75 ± 0,47		27°C	2,77 ± 0,43	
Zapach kakaowy Cocoa smell	1	3,38 ± 0,40	0,20	7°C	3,20 ± 0,46	0,27
	2	3,21 ± 0,45		15°C	3,31 ± 0,47	
	3	3,29 ± 0,47		27°C	3,36 ± 0,38	
Zapach słodki Sweet smell	1	1,09 ± 0,30	0,19	7°C	1,08 ± 0,27	0,15
	2	1,20 ± 0,28		15°C	1,17 ± 0,26	
	3	1,14 ± 0,18		27°C	1,19 ± 0,25	
Zapach ostry Sharp smell	1	0,60 ± 0,30 <sup>b</sup>	0,00	7°C	0,47 ± 0,27 <sup>AB</sup>	0,01
	2	0,25 ± 0,20 <sup>a</sup>		15°C	0,35 ± 0,30 <sup>A</sup>	
	3	0,52 ± 0,33 <sup>b</sup>		27°C	0,56 ± 0,35 <sup>B</sup>	
Zapach obcy Strange smell	1	0,25 ± 0,15 <sup>cd</sup>	0,00	7°C	0,19 ± 0,17 <sup>C</sup>	0,04
	2	0,32 ± 0,22 <sup>d</sup>		15°C	0,24 ± 0,20 <sup>CD</sup>	
	3	0,16 ± 0,14 <sup>c</sup>		27°C	0,30 ± 0,18 <sup>D</sup>	
Smak czekoladowy Chocolate taste	1	3,26 ± 0,49	0,27	7°C	3,08 ± 0,47	0,15
	2	3,18 ± 0,42		15°C	3,29 ± 0,42	
	3	3,09 ± 0,47		27°C	3,16 ± 0,50	
Smak kakaowy Cocoa taste	1	3,26 ± 0,50	0,35	7°C	3,16 ± 0,46	0,17
	2	3,19 ± 0,47		15°C	3,35 ± 0,41	
	3	3,34 ± 0,40		27°C	3,27 ± 0,48	
Smak słodki Sweet taste	1	4,00 ± 0,41	0,17	7°C	3,99 ± 0,41	0,18
	2	4,19 ± 0,49		15°C	4,17 ± 0,44	
	3	4,07 ± 0,39		27°C	4,10 ± 0,44	
Smak gorzki Bitter taste	1	0,71 ± 0,32 <sup>f</sup>	0,04	7°C	0,81 ± 0,34 <sup>G</sup>	0,00
	2	0,51 ± 0,37 <sup>e</sup>		15°C	0,60 ± 0,36 <sup>F</sup>	
	3	0,63 ± 0,37 <sup>ef</sup>		27°C	0,45 ± 0,31 <sup>E</sup>	
Smak cierpki Tart taste	1	0,17 ± 0,13 <sup>h</sup>	0,00	7°C	0,39 ± 0,29 <sup>I</sup>	0,00
	2	0,44 ± 0,29 <sup>j</sup>		15°C	0,20 ± 0,18 <sup>H</sup>	
	3	0,28 ± 0,21 <sup>i</sup>		27°C	0,30 ± 0,22 <sup>HI</sup>	
Smak obcy Strange taste	1	0,52 ± 0,41 <sup>k</sup>	0,00	7°C	0,47 ± 0,41 <sup>K</sup>	0,04
	2	0,81 ± 0,38 <sup>l</sup>		15°C	0,59 ± 0,41 <sup>KL</sup>	
	3	0,42 ± 0,32 <sup>k</sup>		27°C	0,70 ± 0,37 <sup>L</sup>	

Objaśnienia jak w tab. 1 / Explanatory notes as in Tab. 1

składowania na intensywność negatywnych cech proszków oraz napojów z nich sporządzonych (zapach ostry, obcy oraz smak gorzki, cierpki i obcy) (tab. 1–6).

Generalnie jednak, zarówno w przypadku proszków, jak i napojów, nie stwierdzono jednoznacznie, w której temperaturze przechowywania, a także po którym z etapów składowania uzyskano istotnie najwyższą intensywność tych cech jakościowych. Można domniemywać, że statystycznie istotne różnice w natężeniach negatywnych cech nie były więc wynikiem wpływu analizowanych czynników, zaś głównie tego, że każdy z badanych produktów charakteryzował się bardzo niską intensywnością wyżej wymienionych wyróżników. W ocenie sensorycznej, przy tak minimalnym poziomie not byłoby bowiem mało prawdopodobne, aby nie stwierdzono chociażby najmniejszych, lecz statystycznie istotnych różnic w intensywnościach.

Zdaniem Wyczańskiego [19] wadą kakao niewłaściwie przechowywanego (nieprawidłowe warunki składowania oraz sposób zamknięcia opakowania) jest przede wszystkim pojawienie się obcego smaku i zapachu. Zgodnie z nadmienionymi powyżej spostrzeżeniami, analizowane w ramach badań produkty wykazały bardzo niskie natężenia tych wyróżników. Ponadto wraz z upływem czasu ich składowania nie zaobserwowano znaczącego wzrostu intensywności zarówno smaku, jak i zapachu obcego.

Reasumując, można stwierdzić, że analizowane czynniki zmienności (temperatura i czas przechowywania) nie wpłynęły na znaczące zmiany jakościowe zarówno proszków, jak i napojów z nich sporządzonych w okresie 3 miesięcy III kwartału składowania. Proszki oraz napoje z nich sporządzone wykazały więc stabilność sensoryczną pod koniec terminu ich przydatności do spożycia, co mogło być związane z dobrą jakością ziarna użytego do produkcji tych proszków. Haslam i wsp. [4] oraz Thorngate i Noble[15] stwierdzili, że spośród polifenoli i flawonoidów zawartych w kakao, za jego stabilność odpowiedzialne są: grupa flawan-3-oli oraz antocyjany.

## **Wnioski**

1. Czas i temperatura przechowywania (w okresie trzech miesięcy III kwartału składowania produktów) nie wpłynęły statystycznie istotnie na najbardziej charakterystyczne oraz pozytywne cechy sensoryczne proszków kakaowych oraz napojów z nich sporządzonych.
2. Stwierdzono statystycznie istotny wpływ temperatury i czasu przechowywania w badanym okresie na intensywność negatywnych wyróżników sensorycznych proszków oraz napojów. Można sądzić, że zaobserwowany wpływ tych czynników był jednak wyłącznie skutkiem bardzo niskiego natężenia negatywnych cech każdego z analizowanych produktów.
3. Potwierdzono stabilność sensoryczną kakao instant pod koniec wydłużonego do 9 miesięcy okresu ich przydatności do spożycia, w stosunku do 6-miesięcznego okresu normatywnego.
4. Badane proszki kakaowe wykazały zróżnicowanie wyjściowej jakości sensorycznej, natomiast napoje z nich sporządzone charakteryzowały się zbliżonym profilem jakościowym.

### Literatura

- [1] Baryłko-Pikielna N.: Sensoryczna analiza profilowa i ocena konsumencka w opracowaniu nowych produktów żywnościowych. Food Product Development. Wyd. AR. Poznań 1995.
- [2] Gasparska R.: Kluczowe parametry produktów kakaowych w różnych zastosowaniach. Przegł. Piek. Cuk., 2005, **2**, 48-49.
- [3] Groot H.: Najważniejsze cechy proszku kakaowego. Przegł. Piek. Cuk., 2001, **9**, 82-84.
- [4] Haslam E., Lilley T. H., Warminsky E., Ziao H., Cai Y.: Polyphenol complexation. Phenolic compounds in food and their effects on health. Analysis Occurrence and Chemistry, 1992, 8-50.
- [5] ISO 13299.2:1998. Sensory analysis. Methodology. General guidance for establishing a sensory profile.
- [6] Kowalska J., Lenart A.: Influence of coating on sorption properties of cocoa drink powder. 14<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering. Praha 2000, p. 244.
- [7] Matuszewska I.: Sensoryczne metody ocen konsumenckich - charakterystyka i zastosowanie. Przem. Spoż., 1992, **7**, 166-169.
- [8] PN-A-88103:1998. Wyroby cukiernicze. Kakao.
- [9] PN-A-74859:1994. Wyroby cukiernicze. Pakowanie, przechowywanie i transport.
- [10] PN-A-74859:1994/Az1:2001. Wyroby cukiernicze trwałe. Pakowanie, przechowywanie i transport.
- [11] PN-ISO 8589:1988. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne projektowania pracowni analizy sensorycznej.
- [12] Serra Bonvehi J., Ventura Coll F.: Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. Food Chem., 1997, **3**, 365-370.
- [13] Świdorski F. (red.): Towaroznawstwo produktów spożywczych. Wyd. SGGW. Warszawa 1998, s. 340-345.
- [14] Świętochowski Cz.: Prażenie ziarna kakaowego. Przegł. Piek. Cuk., 1994, **11**, 20-22.
- [15] Thorngate J. H., Noble A. C.: Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-)-epicatechin and 3S(+)-catechin. J. Sci. Food Agric., 1995, **67**, 531-535.
- [16] Trojanowska K., Trojan E.: Aspekty surowcowe, technologiczne i mikrobiologiczne produkcji proszku kakaowego. Przem. Spoż., 1999, **12**, 42-45.
- [17] Villeneuve F., Cros E., Vincent J. E., Macheix J. J.: Recherche d'un indice de fermentation du cacao. Estimation des flavan-3-ols de la feve. Café. Cacao. The, 1989, **3**, 165-170.
- [18] Wong M. K., Dimick P. S., Hammerstedt R. H.: Extraction and high performance liquid chromatography enrichment of polyphenol oxidase from Theobroma cacao seeds. J. Food Sci., 1990, **55**, 1108-1111.
- [19] Wyczański S.: Cukiernictwo. WSiP. Warszawa 1990, s. 37-38, 315-321.
- [20] Ziegler G.: Composition of flavor extracts of raw and roasted cocoas. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1991, **192**, 521-525.

### SENSORY QUALITY OF INSTANT COCOA IN THE FINAL PERIOD (THE THIRD QUARTER OF A YEAR) OF ITS USEFULNESS FOR CONSUMPTION

#### S u m m a r y

The objective of this work was to determine the effect of storage period and temperature on the sensory quality of instant cocoa in the final period (the third quarter of a year) of its usefulness for consumption.

The material investigated were three instant cocoa powders purchased in one shop after they had been stored for two quarters of the year; the instant cocoa powders investigated were manufactured by three

various manufacturers. During the investigation, the products were stored in closed polyethylene packages, under no light conditions, and in a temperature of 7°C, 15°C, and 27°C.

The sensory analysis included samples of instant cocoa powders and cocoa drinks made of them. A team of 13 trained persons carried out the sensory profile of the products investigated using a method of quantitative descriptive analysis (QDA). The cocoa powder was assessed with regard to its 7 quality factors (colour, attributes of smell, and homogeneity), whereas the cocoa drink was assessed according to its 12 quality factors (colour, attributes of smell and taste). The products were accessed during four independent sessions. The last investigation series was performed after the 3<sup>rd</sup> month of storing the products (the third quarter of the year), a few days before the end of the instant cocoa's expire date.

No statistically significant effect of storage time and temperature on the most characteristic and approving characteristics of both the cocoa powders and the cocoa drinks made of them were stated. However, it was proved that the storage duration during the period investigated, and the temperature had a statistically significant effect on the intensity of negative properties of the cocoa powders and drinks investigated. The impact of factors analysed as stated during the investigation could be probably attributed to a very low intensity of negative properties of each individual product. The investigation also confirmed the sensory stability of the instant cocoa analysed by the end of a period prolonged by 9 months after the cocoa's date compared to the cocoa's standard 6-month shelf life. During storage, no significant qualitative changes in cocoa powders and drinks were stated. However, it was stated that the initial sensory quality of cocoa powders varied whereas the initial quality of cocoa drinks did not.

**Key words:** instant cacao, sensory quality, storage ☒



DOROTA ZIELIŃSKA

## DOBÓR SZCZEPÓW BAKTERII *LACTOBACILLUS* I USTALENIE WARUNKÓW FERMENTACJI NAPOJU SOJOWEGO

### Streszczenie

Celem badań było opracowanie sposobu fermentacji napoju sojowego, o właściwościach probiotycznych, dobór warunków fermentacji oraz określenie liczby żywych bakterii podczas 16 dni przechowywania fermentowanego napoju sojowego w temp. 10°C. Oceniono ponadto cechy sensoryczne produktu.

Napój sojowy szczepiono dziesięcioma różnymi kulturami bakterii potencjalnie probiotycznych w liczbie  $7,5 \times 10^7$  jtk/ml i poddawano fermentacji: w temp. 32°C przez 9 godz. lub w temp. 37°C przez 6 godz. Stwierdzono, że lepsze warunki fermentacji zapewnia 6-godzinny proces w temp. 37°C. Wykazano, że pomiędzy pięcioma napojami sojowymi, fermentowanymi wcześniej wybranymi szczepami, nie ma istotnych statystycznie różnic pod względem smakowitości. Liczba bakterii w napoju sojowym zaszczeplonym *Lactobacillus casei* KN291, fermentowanym przez 6 godz. w temp. 37°C i przechowywanym w temp. 10°C, wzrastała z 8,87 log jtk/ml tuż po fermentacji do 9,29 log jtk/ml po 12 dniach, i utrzymywała się na stałym poziomie do 16. dnia. W tym czasie jakość sensoryczna napoju pogorszyła się, wzrosła intensywność smaku kwaśnego i gorzkiego oraz niekorzystnie zmieniła się konsystencja.

**Słowa kluczowe:** bakterie probiotyczne, napój sojowy, żywność fermentowana

### Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się intensywny rozwój produkcji nowych rodzajów żywności fermentowanej i to zarówno pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego. Do fermentacji surowców pochodzenia roślinnego można stosować specjalnie wyselekcjonowane, o potwierdzonych naukowo właściwościach probiotycznych, szczepy bakterii fermentacji mlekowej, głównie z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* [5].

W celu wywierania efektu prozdrowotnego produkty probiotyczne powinny zawierać dużą liczbę żywych komórek bakterii, rzędu  $10^7$ – $10^9$  jtk/cm<sup>3</sup>(g) produktu. Opisane, najważniejsze efekty zdrowotne szczepów probiotycznych to: modulacja

systemu immunologicznego, utrzymywanie równowagi mikroflory jelitowej, redukcja aktywności enzymów fekalnych, działanie antynowotworowe, zapobieganie biegunkom „podróżnych”, rotawirusowym i innym, działanie antycholesterolowe, zmniejszenie defektu laktazowego [7].

Zastosowanie bakterii, spełniających powyższe wymagania, do fermentacji produktów roślinnych może poszerzyć listę szeroko dostępnych produktów spożywczych z udziałem probiotyków oraz poprawić wartość odżywczą i dietetyczną żywności fermentowanej. Warzywno-fermentowane, w postaci soków czy sałatek mogą stanowić alternatywę uzupełnienia mikroflory przewodu pokarmowego dla ludzi nietolerujących laktozy i białek mleka, u których rozwój i obecność bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym zostały zachwiane poprzez działanie różnych czynników [3].

W ostatnich latach, m.in. w Instytucie Biotechnologii Żywności (UWM w Olsztynie), podjęto próby fermentowania soków i sałatek warzywnych bakteriami probiotycznymi, stosując szczepy z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* [8]. Innymi interesującymi produktami są fermentowane napoje z soi i ryżu, cechujące się bezpośrednio po wytworzeniu wysoką liczebnością bakterii kwasu mlekowego [14].

Soja jest ważnym surowcem spożywczym, szeroko wykorzystywanym w wielu krajach i na różnych kontynentach. Przykładowo indonezyjskie tempe, chińskie sufu czy indyjskie kinema to sojowe produkty fermentowane. Tempe i sufu to produkty fermentacji wywołanej przez pleśnie (*Rhizopus oligosporus*, *Actinomucor elegans*). Kinema to produkt fermentowany przez bakterie *Bacillus subtilis*. Proces fermentacji prowadzi do uwolnienia aminokwasów i syntezy witamin z grupy B. Antyodżywcze czynniki, takie jak: inhibitory tripsyny, fityniany, hemaglutyniny, oligosacharydy, zostają inaktywowane przez wysoką temperaturę (inhibitory tripsyny), lub przez enzymy (fityniany, oligosacharydy) [9].

Zaobserwowano, że po fermentacji produkty sojowe tracą swoje właściwości alergenne, np. sos sojowy fermentowany, w porównaniu z niefermentowaną mączką sojową, wykazuje o 70–90% niższą alergenicność [4]. Stwierdzono również, że fermentacja soi poprawia przyswajalność genisteiny, białka, które ma właściwości przeciwutleniające, co wpływa zarówno na regulację gospodarki lipidowej, jak i na zmniejszenie ryzyka zachorowań na nowotwory [2]. Właściwości białek soi, w szczególności genisteiny, polegające na regulacji gęstości kości, są przedmiotem badań wielu uczonych. Przypuszcza się, że mogą mieć duże znaczenie w walce z osteoporozą [6].

Zastosowanie bakterii mlekowych do produkcji fermentowanego napoju sojowego może stanowić nowe wyzwanie dla producentów żywności.

Celem niniejszych badań było opracowanie sposobu fermentacji napoju sojowego o właściwościach potencjalnie probiotycznych, z uwzględnieniem cech sensorycznych, wybór właściwych warunków fermentacji oraz określenie przeżywalności bakterii w fermentowanym napoju sojowym.

### **Materiał i metody badań**

Materiałem do badań był napój sojowy naturalny firmy Polgrunt. Zastosowano 10 szczepów bakterii o właściwościach potencjalnie probiotycznych, z kolekcji szczepów Politechniki Łódzkiej, z rodzaju *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei*. Do napoju dodawano 24-godzinne hodowle bakterii, tak aby po zaszczepieniu liczba komórek wynosiła  $7,5 \log \text{ jtk/cm}^3$  i poddawano procesowi fermentacji przez 6 lub 9 godz. w temp. 32°C lub 37°C. W celu dokonania wyboru najbardziej odpowiedniego szczepu oraz właściwych warunków fermentacji zastosowano ocenę sensoryczną – metodę szeregowania, w której brało udział każdorazowo od 28 do 45 osób. Przeprowadzono 2–3 powtórzenia oceny [1]. Oceniający mieli za zadanie uszeregować próbki napoju pod względem preferencji smakowitości. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu Friedmana [12], przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

Wybrany optymalny szczep i ustalone warunki fermentacji zostały zastosowane do produkcji napoju sojowego poddanego próbom przechowalniczym w temp. 10°C przez 16 dni. Oznaczano liczbę bakterii kwasu mlekowego oraz pH bezpośrednio po fermentacji, a następnie co 4 dni.

Liczbę bakterii kwasu mlekowego określano metodą wglębną, stosując podłoże wybiórcze – agar MRS firmy Biokar Diagnostic. Na płytki Petriego wlewano po  $1 \text{ cm}^3$  z trzech kolejnych rozcieńczeń, w dwóch powtórzeniach. Próbkę inkubowano przez 72 godz. w temp. 30°C [13]. Pomiar pH dokonywano aparatem ELMETRON CP551, z uwzględnieniem temperatury napoju.

Wyniki badań przechowalniczych posłużyły do przeprowadzenia jednozynnkowej analizy wariancji. Hipoteza pierwotna brzmiała, że liczba bakterii podczas przechowywania nie zmieni się istotnie, czyli, że nie istnieje związek (korelacja) między liczbą bakterii a czasem przechowywania.

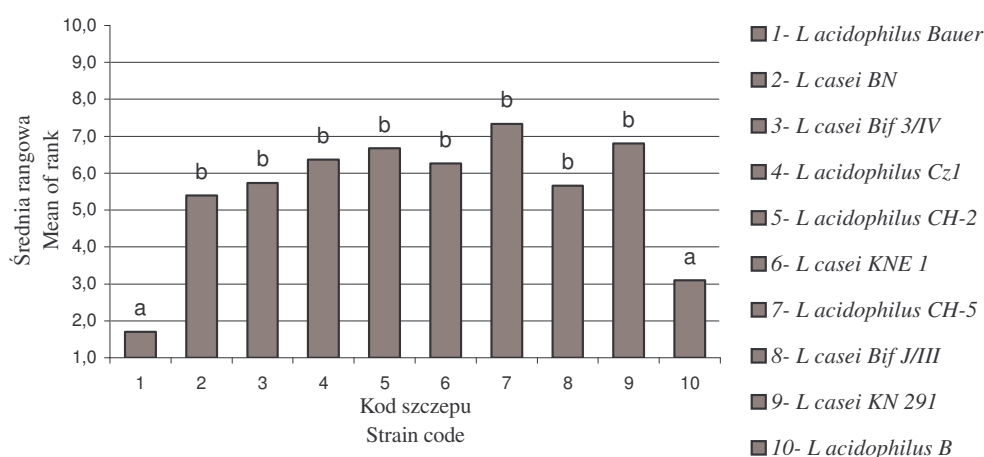
W trakcie przechowywania pobierano próby do oceny sensorycznej napoju sojowego: bezpośrednio po fermentacji, po 7 dniach przechowywania oraz napoju sojowego niefermentowanego. Zastosowano metodę profilową [11], przy czym dokonano wyboru wyróżników jakości i przeszkolono panel osób oceniających. Zdefiniowano cztery wyróżniki zapachu (waniliowy, słodki, fermentacji mlekowej, mleczny), trzy wyróżniki konsystencji (gęstość, gładkość, lepkość), pięć wyróżników smaku (fermentacji mlekowej, kwaśny, słodki, gorzki, mączny) oraz jakość ogólną.

Analizę statystyczną wykonano stosując analizę wariancji jednozynnkowej oraz test Tukey'a.

### **Wyniki i dyskusja**

W pierwszym etapie badań przeprowadzono trzy doświadczenia w celu wybrania najbardziej odpowiedniego szczepu do fermentacji oraz najlepszych warunków fermentacji napoju sojowego. W wyniku pierwszego doświadczenia stwierdzono, że

istnieją istotne różnice w akceptowalności sensorycznej napoju sojowego fermentowanego przy użyciu dziesięciu różnych szczepów bakterii potencjalnie probiotycznych (rys. 1). Wykazano, że jakość sensoryczna napoju sojowego zaszczerpionego hodowlą szczepów zakodowanych jako 1 i 10 (*Lactobacillus acidophilus* Bauer, *Lactobacillus acidophilus* B) jest istotnie gorsza. Natomiast jakość sensoryczna napojów fermentowanych z wykorzystaniem pozostałych szczepów nie różni się między sobą statystycznie istotnie. Do dalszych doświadczeń zdecydowano pozostawić 5 szczepów, przy użyciu których otrzymano napoje o najlepszej smakowitości (średnia rangowa powyżej 6,0).



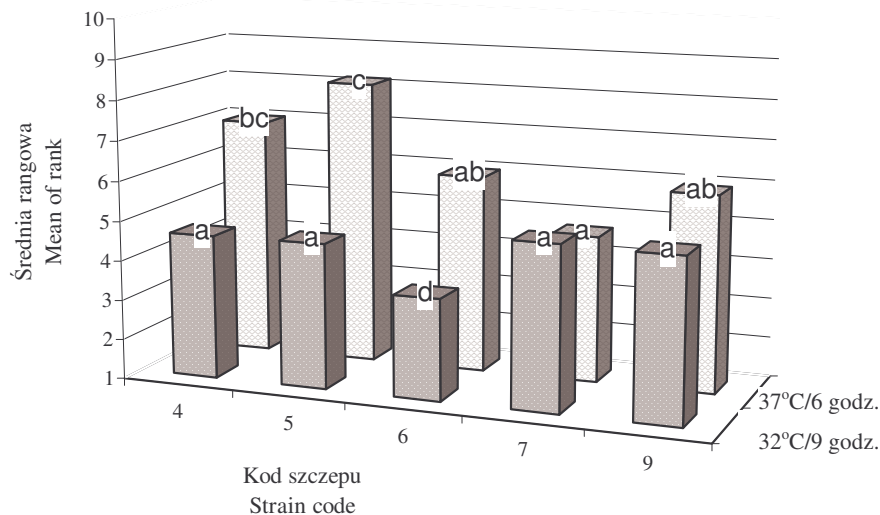
Objaśnienia:/ Explanatory notes:

a; b – wartości średnie oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ( $\alpha = 0,05$ ) / mean values denoted by the same superscripts do not differ statistically significantly from each other ( $\alpha = 0,05$ ).

Rys. 1. Ocena sensoryczna napoju sojowego fermentowanego przez 9 godz. w temp. 32°C z użyciem 10 szczepów bakterii probiotycznych (n = 2); metoda szeregowania.

Fig. 1. Sensory evaluation of a soya drink being 9 hrs fermented using 10 probiotic bacteria strains at a temperature of 32°C (n = 2); a succession method was applied.

W wyniku drugiego doświadczenia wskazano temp. 37°C i okres 6 godz. jako właściwe warunki fermentacji (rys. 2). Stwierdzono, że jakość sensoryczna napojów sojowych fermentowanych w temp. 37°C szczepami zakodowanymi: 4, 5 i 6 (*Lactobacillus acidophilus* Cz 1, *Lactobacillus acidophilus* CH-2, *Lactobacillus casei* KNE1) była istotnie wyższa od jakości napojów fermentowanych tymi samymi szczepami w temp. 32°C. Jakość sensoryczna napojów sojowych fermentowanych w temp. 37°C szczepami zakodowanymi: 7 i 9 (*Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus casei* KN 291) nie różniła się statystycznie od jakości napojów fermentowanych tymi samymi szczepami w temp. 32°C. W dalszych doświadczeniach zdecydowano przeprowadzać fermentację napoju sojowego przez 6 godz. w temp. 37°C.



Objaśnienia:/ Explanatory notes:

- oznaczenia kodu szczepów takie jak na rys. 1. / strain code marks are the same like on fig. 1

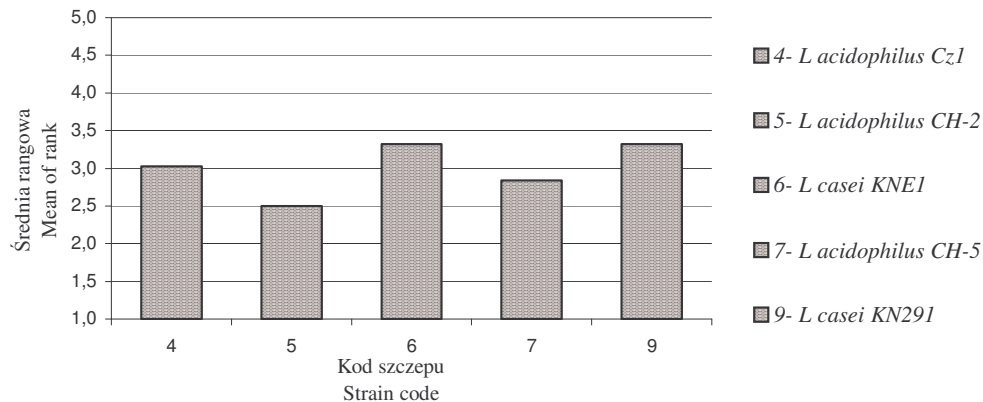
a-d – wartości średnie oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ( $\alpha = 0,05$ ) / mean values denoted by the same superscripts do not differ statistically significantly from each other ( $\alpha = 0,05$ )

Rys. 2. Ocena sensoryczna napoju sojowego fermentowanego w różnych warunkach, z użyciem 5 szczepów bakterii probiotycznych; metoda szeregowania (n = 2).

Fig. 2. Sensory evaluation of a soya drink fermented using with 5 probiotic bacteria strains under varying fermentation conditions; a succession method was applied (n = 2).

W kolejnym doświadczeniu (n = 3), wykazano, że nie ma statystycznie istotnych różnic pomiędzy jakością sensoryczną pięciu napojów sojowych fermentowanych w temp. 37°C przez 6 godz., z wykorzystaniem wcześniej wybranych szczepów (rys. 3).

Do dalszych badań wybrano szczep *Lactobacillus casei* KN291. Napój sojowy poddawano fermentacji w temp. 37°C przez 6 godz. i przechowywano 16 dni w temp. 10°C. Stwierdzono, że w czasie przechowywania następował ciągły wzrost liczby żywych bakterii do 12. dnia (rys. 4), przy równoczesnym spadku pH, a następnie liczba bakterii utrzymywała się na stałym poziomie (tab. 1). Istotny wzrost liczby bakterii zaobserwowano 4. dnia przechowywania (z 8,88 log jtk/ml tuż po fermentacji do 9,19 log jtk/ml). Po 16 dniach przechowywania fermentowanego napoju sojowego liczba żywych bakterii *Lactobacillus* wynosiła 9,28 log jtk/ml.



Rys. 3. Ocena sensoryczna fermentowanego napoju sojowego w temp. 37°C przez 6 godz., z użyciem 5 szczepów bakterii probiotycznych (n=3); metodą szeregowania.

Fig. 3. Sensory evaluation of a soya drink being 6 hours fermented using 5 probiotic bacteria strains at a temperature of 37°C (n=3); a succession method was applied

Tabela 1

Wartości średnie liczby bakterii *L. casei KN291* [log jtk/ml] i pH w trakcie przechowywania fermentowanego napoju sojowego.

Mean values of CFU *L. casei KN291* strains [log cfu/ml] and pH while storing the fermented soya drink.

Dni przechowywania Storage days	Wartości średnie [log jtk/ml] Mean values [log cfu/ml] $\bar{x} \pm SD$	Wartości średnie pH Mean values pH $\bar{x} \pm SD$
0	8,88 ± 0,210	5,5 ± 0,07
4	9,19 ± 0,297	4,8 ± 0,05
8	9,14 ± 0,213	4,6 ± 0,02
12	9,29 ± 0,113	4,3 ± 0,02
16	9,28 ± 0,127	4,2 ± 0,02

Objaśnienia:/ Explanatory notes:

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

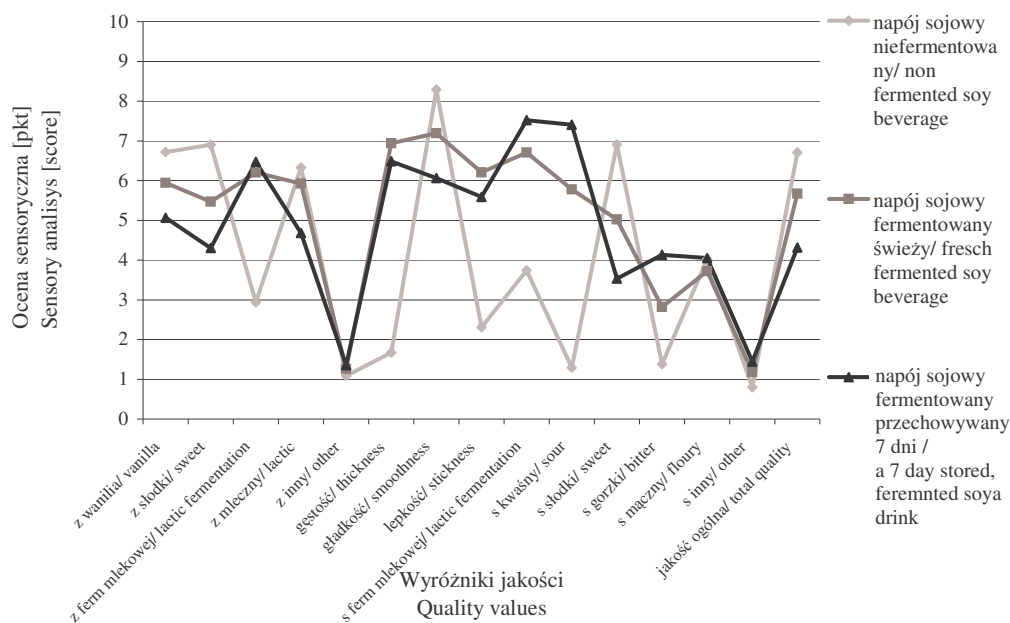
Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji odrzucono hipotezę pierwotną, ponieważ  $p = 0,00001$  i  $p < 0,05$ . Oznacza to, że istnieje związek pomiędzy czasem przechowywania w temp. 10°C a liczbą bakterii potencjalnie probiotycznych w napoju sojowym.

W badaniach sałatek warzywnych, przeprowadzonych przez Warmińską-Radyko i Łaniewską-Moroz [15] w Instytucie Biotechnologii Żywności AR-T w Olsztynie, uzyskano odmienne wyniki: spadek liczby bakterii *Lactobacillus acidophilus* o dwa rzędy logarytmiczne podczas przechowywania przez 14 dni w temp. 8°C.

Z badań przeprowadzonych na mleku zaszczepionym bifidobakteriami i przechowywanym w różnych warunkach (tj. temp. 5, 18, 30°C) wynika, że im wyższa

jest temperatura przechowywania, tym szybciej zmniejsza się liczba bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, przy jednoczesnym pogorszeniu jakości ogólnej [10].

Analiza zmian smaku napoju sojowego fermentowanego podczas przechowywania wykazała, że dłuższy czas przechowywania wpływał na zwiększenie intensywności wyczuwania smaku gorzkiego, kwaśnego oraz zmniejszenie intensywności wyczuwania smaku słodkiego (rys. 5). Przechowywanie napoju w temp. 10°C przez 7 dni wpłynęło również na zmianę konsystencji. Napój stał się mniej gładki, pojawiło się uczucie niejednorodności w ocenie, co może być powodem dyskwalifikacji napoju. Jakość ogólna napoju fermentowanego przechowywanego przez 7 dni została oceniona na poziomie 4,32 pkt, co jest oceną istotnie niższą w porównaniu z jakością napoju fermentowanego świeżego, nieprzechowywanego, (ogólna ocena -5,67 pkt) (rys. 5).



Objaśnienia: / Explanatory notes:  
z – zapach / smell; s – smak / taste

Rys. 5. Jakość sensoryczna napojów sojowych oceniana metodą profilowania.

Fig. 5. Sensory quality of soya drink assess using a method of profiling.

W ocenie sensorycznej wykazano, że napoje fermentowane w porównaniu z niefermentowanym charakteryzowały się innymi cechami sensorycznymi. Przede wszystkim napój niefermentowany miał inną konsystencję: mniejszą gęstość i lepkość. Gęstość oceniono na poziomie 1,67 pkt, lepkość na poziomie 2,3 pkt w skali 10-punktowej, co w porównaniu z oceną napojów fermentowanych stanowiło statystycznie istotną różnicę. Gęstość napoju fermentowanego nieprzechowywanego oceniono na poziomie 6,94 pkt, lepkość na poziomie 6,21 pkt. Kolejną różnicą



sensoryczną, wynikającą z procesu fermentacji, był smak napojów. Napój niefermentowany charakteryzował się wysoką intensywnością smaku słodkiego, małą smaku kwaśnego, gorzkiego i smaku charakterystycznego dla fermentacji mlekowej, w porównaniu z napojami fermentowanymi. Jakość ogólną napoju sojowego niefermentowanego oceniono na poziomie 6,70 pkt.

Mleczny i waniliowy zapach napoju był bardziej intensywny w przypadku napojów: niefermentowanego i świeżo fermentowanego w porównaniu z napojem fermentowanym przechowywanym 7 dni. Napój przechowywany miał zdecydowanie mniej intensywny zapach słodki oraz istotnie bardziej wyczuwalny zapach charakterystyczny dla fermentacji mlekowej.

### Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych badań wybrano temp. 37°C i okres 6 godz. jako właściwe warunki fermentacji napoju sojowego, niezależnie od zastosowanego szczepu bakterii (*Lactobacillus acidophilus* Cz1, CH-2, CH-5 i *Lactobacillus casei* KNE1, KN291).
2. Po 7 dniach przechowywania w temp. 10°C napoju sojowego fermentowanego szczepem *Lactobacillus casei* KN 291, następuje pogorszenie jego cech sensorycznych, co jest prawdopodobnie związane ze wzrostem liczby bakterii i obniżeniem wartości pH.
3. Wykazano, że możliwe jest otrzymanie fermentowanego napoju sojowego o akceptowanej jakości sensorycznej, ale należy opracować warunki przechowywania, umożliwiające stabilizację cech jakościowych.

*Praca wykonana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej*

### Literatura

- [1] Baryłko-Pikielna N.: Zarys analizy sensorycznej żywności. WNT. Warszawa 1975.
- [2] Fitzpatrick L. A.: Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas* 2003, **44 Suppl. 1**, 21s-29s.
- [3] Goderska K., Czarnecka M., Czarnecki Z.: Przeżywalność wybranych szczepów bakterii potencjalnie probiotycznych w sokach warzywnych. W: Bakterie fermentacji mlekowej. Metabolizm. Genetyka. Wykorzystanie. Wyd. Politechniki Łódzkiej, 2003, s. 124-128.
- [4] Hefle S. L., Lambrecht D. M., Nordlee J. A.: Soy sauce allergenicity through the fermentation/production process. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, **128**, 32.
- [5] Kołożyn-Krajewska D.: Żywność probiotyczna w aspekcie bezpieczeństwa zdrowotnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **4 (29)** Supl., 93-105.
- [6] Lee Alekel D.: Isoflavone- rich soy- protein isolate exerts significant bone sparing in the lumbar spine of peri-menopausal woman. Third international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease – conference review. *Nutrition Volume* 2001, **17**, 1.
- [7] Libudzisz Z.: Mikrobiologiczne i technologiczne aspekty probiotyków. W: Probiotyki. Wyd. Nauk. PTTŻ, 2002, s. 11-22.
- [8] Łaniewska-Moroz Ł.: Fermentowane soki warzywne. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1999, **10 (43)**, 25.



- [9] Messina M., Gardner C., Barnes S.: Gaining insight into the health effects of soya but a long way still to go: commentary on the fourth international symposium on the role of soya in preventing and treating chronic disease. *J. Nutr.* 2002, **132**, 547s-551s.
- [10] Motyl I., Libudzisz Z.: Zmiany wybranych cech jakościowych podczas przechowywania nieukwaszonego i ukwaszonego mleka bifidusowego, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **3 (38)** Supl., 107-118.
- [11] ISO 6564: 1985 Sensory analysis – Methodology - Flavour profile methods.
- [12] ISO 8587: 1988 Sensory analysis – Methodology- Ranking.
- [13] PN-ISO: 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C.
- [14] Owczarek L., Osińska M., Mączyńska D.: Produkty pochodzenia roślinnego a żywność funkcjonalna. *Przem. Spoż.*, 1999, **1 (53)**, 13.
- [15] Warmińska-Radyko I., Łaniewska-Moroz Ł., Kujawa K.: Bakterie propionowe w fermentowanych sałatkach warzywnych, *Przem. Spoż.*, 1997, **7**, 38-39.

#### SELECTING SUITABLE BACTERIAL STRAINS OF *LACTOBACILLUS* AND IDENTIFYING SOYA DRINK FERMENTATION CONDITIONS

##### S u m m a r y

The objective of this study was: to develop a special soya drink fermentation technique in order to obtain a soya drink with special probiotic properties, to identify and select fermentation conditions, and to determine the number of live bacteria during a 16 day period of storing the fermented soya drink at a temperature of 10°C. Furthermore, sensory qualities of the product were evaluated.

The soya drink was inoculated using ten different, potentially probiotic bacterial strains, their initial number being  $7,5 \times 10^7$  cfu/ml; next, the drink was fermented at a temperature of 32°C during 9 hours or at 37°C during 6 hours. It was stated that the better fermentation conditions were created when the fermentation time was 6 hours, and the fermentation temperature was 37°C. It was proved that there were no statistically significant differences regarding the palatability of the product. The number of bacteria in the soya drink inoculated using *Lactobacillus casei* KN291, fermented during 6 hrs at a temperature of 37°C, and stored at a temperature of 10°C, increased from the initial number of 8,87 log cfu/ml just after the fermentation process accomplished to 9,29 log cfu/ml on the 12<sup>th</sup> day, and remained at the same level until the 16<sup>th</sup> day. During this period, the sensory quality of the soya drink worsened, the intensity of sour and bitter taste increased, and consistency of the drink unfavourably changed.

**Key words:** probiotics, soya drink, fermented food 

ANNA ŻBIKOWSKA, MAŁGORZATA KOWALSKA,  
KATARZYNA MARCINIAK-ŁUKASIAK, KRZYSZTOF KRYGIER

## **WPŁYW ZAWARTOŚCI IZOMERÓW TRANS W TŁUSZCZACH PIEKARSKICH NA ZMIANY ICH JAKOŚCI W CZASIE PRZECHOWYWANIA CIASTEK FRANCUSKICH**

### **Streszczenie**

Celem pracy było określenie zależności pomiędzy składem kwasowym, zwłaszcza zawartością izomerów trans (TFA), a zmianami chemicznymi zachodzącymi w tłuszczach podczas przechowywania ciastek francuskich, wyprodukowanych z dodatkiem tych tłuszczów.

Zakres pracy obejmował: ocenę właściwości chemicznych siedmiu roślinnych tłuszczów piekarskich, różniących się szczególnie zawartością izomerów trans (od 4,1 do 54,2%) oraz ocenę zmian hydrolitycznych i oksydacyjnych zachodzących w tłuszczach zawartych w ciastkach francuskich, podczas 49-dniowego przechowywania tych produktów. W tłuszczach oznaczono skład kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej. Tłuszcz ekstrahowano metodą Katesa i oznaczano w nim liczbę kwasową i nadtlenkową.

Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono znaczących zależności pomiędzy zawartością izomerów trans kwasów tłuszczowych a zmianami hydrolitycznymi i oksydacyjnymi w tłuszczach w czasie przechowywania ciastek francuskich. Zaobserwowano jednak, że ilość wolnych kwasów tłuszczowych w tłuszczach o największej zawartości izomerów trans (36 i 54%) rosła relatywnie najwolniej.

**Słowa kluczowe:** izomery trans kwasów tłuszczowych, liczba kwasowa, liczba nadtlenkowa, przechowywanie, ciastka francuskie

### **Wprowadzenie**

Do produkcji ciast, zwłaszcza tzw. wysokotłuszczowych (ciasta kruche, półkruche, francuskie i półfrancuskie), stosowane są często bardzo duże dodatki tłuszczów, które mogą sięgać nawet do 40% składu recepturowego [4, 5, 12]. Wyroby

---

*Dr inż. A. Żbikowska, dr inż. K. Marciniak-Łukasiak, prof. dr hab. K. Krygier, Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C 02-776 Warszawa, dr inż. M. Kowalska, Politechnika Radomska, ul. B. Chrobrego 31, 26-600 Radom*

ciastkarskie wytwarzane są najczęściej z udziałem 100-procentowych tłuszczów stałych i margaryn twardych. Znacząca grupa tych tłuszczów wytwarzana jest w Polsce na bazie oleju rzepakowego poddanego procesowi częściowego uwodornienia, na skutek którego powstają izomery trans kwasów tłuszczowych [8]. Określając przydatność tłuszczu do produkcji ciastkarskiej, należy uwzględnić nie tylko jego właściwości technologiczne [12], ale również walory żywieniowe [3]. Tłuszcze i produkty wytworzone z ich udziałem stanowią istotne źródło izomerów trans kwasów tłuszczowych, jak również nasyconych kwasów tłuszczowych, które mogą zwiększać ryzyko powstawania chorób serca [1, 9]. Ponadto izomery trans nienasyconych kwasów tłuszczowych mogą przeszkadzać w metabolizmie innych cennych żywieniowo kwasów tłuszczowych (NNKT) [20]. Izomery trans łatwo są wbudowywane w błony fosfolipidowe, wówczas funkcje tych błon mogą się zmieniać, prowadząc m.in. do powstawania nowotworów. Nie ma jednak jednoznacznych dowodów na potwierdzenie właściwości kancerogennych tych izomerów [3].

Producenci dążą do ustanawiania jak najdłuższych terminów trwałości wyrobów ciastkarskich, jednak przy ich ustalaniu powinni mieć świadomość zmian chemicznych, jakie mogą zachodzić w tłuszczach w czasie przechowywania produktów powstałych z ich udziałem.

Celem pracy było określenie zależności pomiędzy składem kwasowym, zwłaszcza zawartością izomerów trans, a zmianami chemicznymi zachodzącymi w tłuszczach podczas przechowywania ciastek francuskich, wyprodukowanych z udziałem tych tłuszczów.

### **Materiał i metody badań**

Praca swym zakresem obejmowała ocenę właściwości chemicznych siedmiu roślinnych tłuszczów piekarskich, różniących się szczególnie zawartością izomerów trans (od 4,1 do 54,2%) oraz ocenę zmian hydrolitycznych i oksydacyjnych zachodzących w tłuszczach podczas 49-dniowego przechowywania ciastek francuskich.

W badaniach użyto 100-procentowych tłuszczów o konsystencji stałej. Były to tłuszcze wytwarzane w skali przemysłowej, w Zakładach Przemysłu Tłuszczowego w Warszawie (1, 2, 4, 6, 7):

- 1 – palmowy, o zawartości 70% frakcji ciekłej i 30 % utwardzonej frakcji stałej,
- 2 – palmowo-kokosowy,
- 4 – roślinny „Wars”,
- 6 – częściowo uwodorniony palmowo-rzepakowy,
- 7 – uwodorniony rzepakowy,

oraz tłuszcze importowane ze Szwecji:

- 3 – roślinny „Akobake M”,

- 5 – roślinny „Akobake K”.

Numeracja tłuszczów została tak dobrana, aby wyższy numer oznaczał jednocześnie wyższą zawartość izomerów trans kwasów tłuszczowych.

Ciasto francuskie przygotowano wg zaleceń Ambroziaka [18]. Ciasto podstawowe sporządzono z mąki pszennej – 287,5 g; jaj – 31,3 g; wody – 125 g i soli – 1,8 g. Dodatek tłuszczu wynosił 250 g i stanowił 36% składu recepturowego. Ciastka były wypiekane w piecu konwekcyjno-parowym (Electrolux AR 85) w temp. 200°C przez 15 min.

W tłuszczach oznaczano:

- skład kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej (GLC), zgodnie z zaleceniem norm [13, 14]. Analizę wykonano przy użyciu chromatografu gazowego HP 6890, wyposażonego w kolumnę kapilarną o długości 60 m i średnicy zewnętrznej 0,22 mm,
- liczbę kwasową wg PN-ISO 660, wyniki podano w mg KOH/g [15],
- liczbę nadtlenkową wg PN-ISO 3960, wyniki podano w milirównoważnikach O<sub>2</sub>/kg [16],

Ciastka francuskie przechowywano w temp. 23°C bez opakowania, przez 7 tygodni – orientacyjny okres przydatności do spożycia. Tłuszcz z ciastek ekstrahowano metodą Katesa [19], przy zastosowaniu układu rozpuszczalników (chloroform: metanol: woda).

Wyniki opracowano statystycznie (analiza wariancji, analiza regresji) przy użyciu programu komputerowego Statgraphics plus 4.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy średnimi (n = 3) wykonano testem Duncana przy p < 0,05.

## Wyniki i ich omówienie

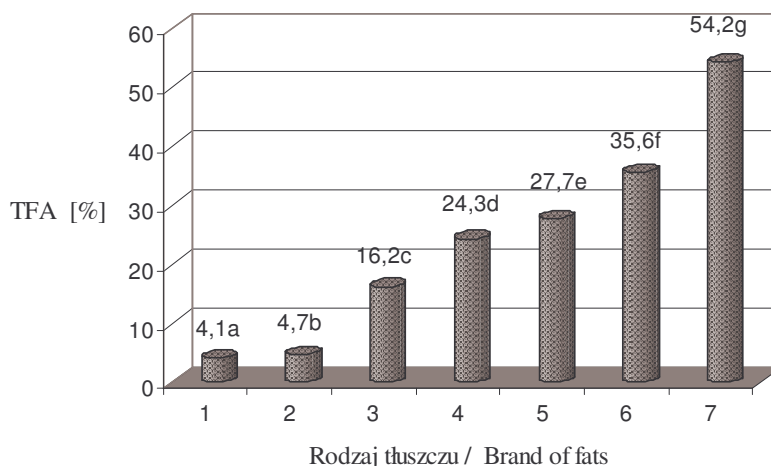
### *Charakterystyka surowca tłuszczowego*

Zgodnie z założeniami pracy wszystkie tłuszcze zastosowane do wytworzenia ciast francuskich różniły się statystycznie istotnie pod względem zawartości izomerów trans nienasyconych kwasów tłuszczowych (TFA) przy p < 0,05. Analizowane tłuszcze zawierały od 4,1 do 54,2% TFA (rys. 1). Wśród izomerów trans kwasów tłuszczowych prawie wyłącznie występował kwas elaidynowy. Tak duże zróżnicowanie ilości izomerów trans w tłuszczach stosowanych do wyrobów ciastkarskich jest typowe zarówno w kraju, jak i za granicą [2, 7].

Ze względu na przypuszczalnie niekorzystne oddziaływanie żywieniowe izomerów trans [3, 9] zdecydowanie najlepsze (o najmniejszej zawartości tych związków) były tłuszcze 1 i 2.

Zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) w analizowanym materiale badawczym również była bardzo zróżnicowana. Wszystkie tłuszcze różniły się

statystycznie istotnie pod tym względem ( $p < 0,05$ ). Największą zawartością SFA 53,9 i 49,5% (tab. 1) charakteryzowały się tłuszcze (1, 2) o najmniejszej zawartości TFA.



Rys. 1. Zawartość izomerów trans.

Fig. 1. Content of trans isomers.

Tabela 1

Średnia zawartość grup kwasów tłuszczowych w badanych tłuszczach [%].

Mean content of fatty acid categories in fats under investigation [%].

Grupy kwasów tłuszczowych Categories of fatty acids	Rodzaj tłuszczu / Brand of fat						
	1	2	3	4	5	6	7
SFA [%] NIR = 0,50	49,5 <sup>f</sup>	53,9 <sup>g</sup>	36,4 <sup>d</sup>	26,0 <sup>b</sup>	27,6 <sup>c</sup>	44,0 <sup>e</sup>	18,7 <sup>a</sup>
NNNKT [%]-EFA NIR = 0,12	9,1 <sup>f</sup>	8,3 <sup>e</sup>	3,5 <sup>d</sup>	9,0 <sup>f</sup>	1,8 <sup>c</sup>	0,5 <sup>a</sup>	1,6 <sup>b</sup>
Monoenowe cis (MUFA) NIR = 0,48	37,3 <sup>d</sup>	33,1 <sup>c</sup>	43,9 <sup>g</sup>	40,1 <sup>e</sup>	42,9 <sup>f</sup>	19,9 <sup>a</sup>	25,3 <sup>b</sup>

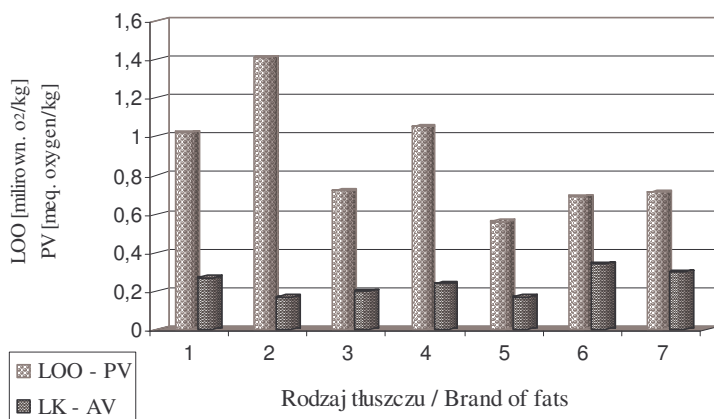
Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami, różnią się między sobą w sposób statystycznie istotny / a, b, c – mean values in lines, denoted by various letters, differ statistically significantly among each other.

Średnia zawartość kwasów monoenowych (MUFA) występujących łącznie w aktywnej biologicznie formie cis w tłuszczach wynosiła od 19,9% do 43,9% (tab. 1). Głównym przedstawicielem MUFA był kwas oleinowy C 18:1. Największą zawartością izomeru cis kwasu oleinowego cechowały się tłuszcze nr 3, 5, 4, o zawartości TFA od 16,2 (tłuszcz 3) do 27,7% (tłuszcz 5).

Średnią zawartość niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) oznaczono jako sumę kwasu linolowego (C18:2) i kwasu linolenowego (C18:3). Stwierdzono, że w badanych tłuszczach zawartość NNKT była niewielka i wynosiła od 0,5 (6) do 9,1% (1). Z wyjątkiem tłuszczów 1 i 4 wszystkie pozostałe różniły się statystycznie istotnie (tab. 1).

Wartości liczby kwasowej (LK) były stosunkowo niskie i wahały się od 0,18 do 0,33 (rys. 2). Porównując uzyskane wyniki z wartościami podanymi przez Polską Normę, odnoszącymi się do tłuszczów cukierniczych i piekarskich [17], stwierdzono, że w żadnym przypadku nie przekroczyły one wartości zalecanych jako dopuszczalne przez tę normę – 0,5 mg KOH/g. Wyższe wartości LK mogłyby świadczyć o większej zawartości mono- i diacylogliceroli, będących naturalnymi emulgatorami w badanych tłuszczach.



Rys. 2. Liczba nadtlenkowa i liczba kwasowa surowców tłuszczowych.

Fig. 2. Peroxide value and acid value of fatty raw materials.

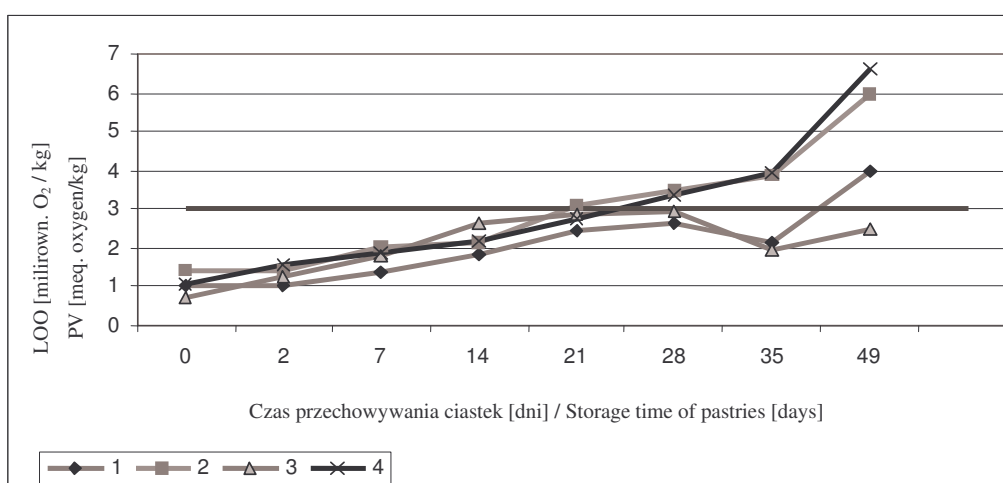
Oznaczone liczby nadtlenkowe (LOO) były stosunkowo niskie i wynosiły od 0,52 do 1,38 (rys. 2). W żadnym z badanych tłuszczów LOO nie przekroczyła wartości zalecanych jako dopuszczalne przez Polską Normę w tłuszczach cukierniczych i piekarskich – 3,0 milirównoważniki O<sub>2</sub>/kg [17].

#### *Charakterystyka tłuszczów ekstrahowanych z ciastek o różnym okresie przechowywania*

Dotychczas nie zostały opracowane krajowe zalecenia normatywne określające maksymalne zawartości nadtlenków i wolnych kwasów tłuszczowych w tłuszczu zawartym w różnych produktach spożywczych, m.in. w wyrobach ciastkarskich. Fakt ten utrudnia interpretację wyników i zmusza do porównywania uzyskanych wartości

liczby kwasowej i nadtlenkowej z wartościami podanymi przez Polską Normę w tłuszczach piekarskich i cukierniczych.

Wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych, jak i produktów utleniania, teoretycznie mógłby nastąpić na skutek ogrzewania ciastek w czasie wypieku, gdyż temperatura jest czynnikiem przyspieszającym niekorzystne zmiany zachodzące w tłuszczach [6]. W tłuszczach wyekstrahowanych z ciastek francuskich tuż po wypieku stwierdzono bardzo mały wzrost pierwotnych produktów utleniania (LOO), nie przekraczający 0,08 jednostki, co świadczy o niewielkim wpływie samego wypieku na utlenianie tłuszczu (rys. 3 i 4).



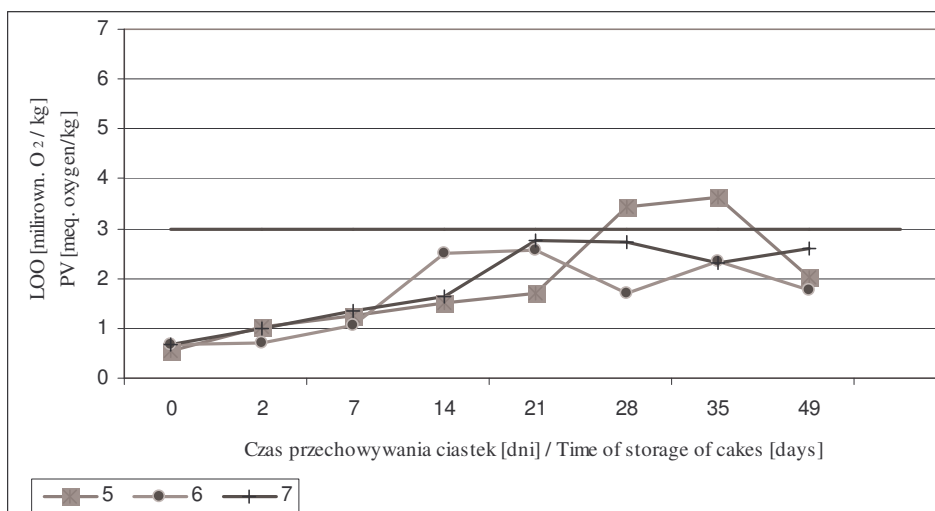
Rys. 3. Kształtowanie się LOO w tłuszczach o niższej zawartości TFA, wyekstrahowanych z ciastek o różnym okresie przechowywania.

Fig. 3. Changes in LOO in fats with a lower TFA level, extracted from puff-pastries showing various periods of storing them.

Do 21 dni przechowywania ciastek, z wyjątkiem tłuszczu 2, o małej zawartości TFA (4,7%), LOO tłuszczów nie przekroczyła wartości 3 milirówn. O<sub>2</sub>/kg, która to wartość wyraża maksymalną ilość nadtlenków dopuszczalną w tłuszczach piekarskich i cukierniczych [17]. W tłuszczach nr 1 i 3, z ciastek po 35 dniach przechowywania, nastąpił spadek wartości LOO (rys. 3), co może świadczyć o rozpadzie nadtlenków i wodoronadtlenków nienasyconych kwasów tłuszczowych do związków karbonylowych i dlatego nawet tłuszcze o dużym stopniu degradacji oksydacyjnej mogą charakteryzować się niskimi wartościami LOO [10]. W przypadku tłuszczów o zawartości TFA powyżej 27% (rys. 4) widoczny był zarówno wzrost, jak i spadek LOO, już po 28 dniach przechowywania produktów. Po 49 dniach przechowywania

zaobserwowano szybki wzrost wartości LOO w tłuszczach o mniejszych zawartościach TFA (rys. 3).

Na podstawie wyników analizy statystycznej ( $p < 0,05$ ) wykazano brak istotnych zależności pomiędzy zawartością izomerów trans w surowcu tłuszczowym a wartościami liczby kwasowej tłuszczów ekstrahowanych z ciastek w okresie 49-dniowego przechowywania (współczynnik korelacji  $r = -0,16$ ).



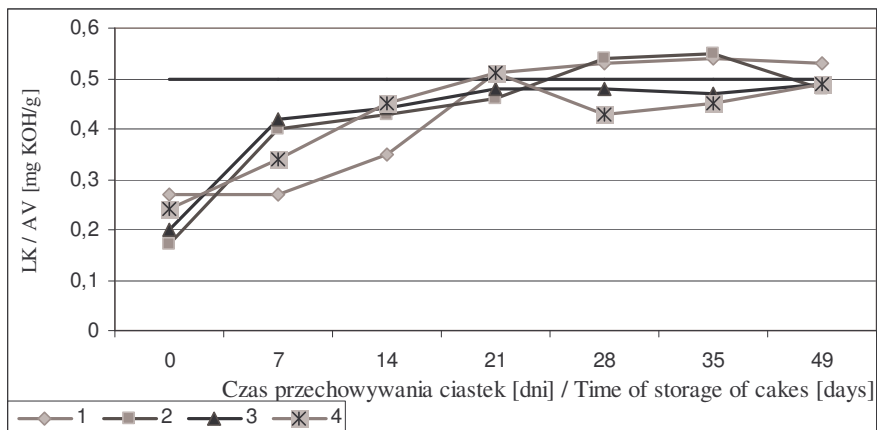
Rys. 4. Kształtowanie się LOO w tłuszczach o niższej zawartości TFA, wyekstrahowanych z ciastek o różnym okresie przechowywania

Fig. 4. Changes in LOO in fats with a lower TFA level, extracted from puff-pastries showing various periods of storing them

Liczby kwasowe (LK) tłuszczów wyekstrahowanych z ciastek tuż po wypieku (rys. 5, 6) oraz tłuszczów dodawanych do ciast były do siebie zbliżone (rys. 2), co świadczy o bardzo małym wzroście zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w tłuszczach na skutek wypieku ciastek francuskich.

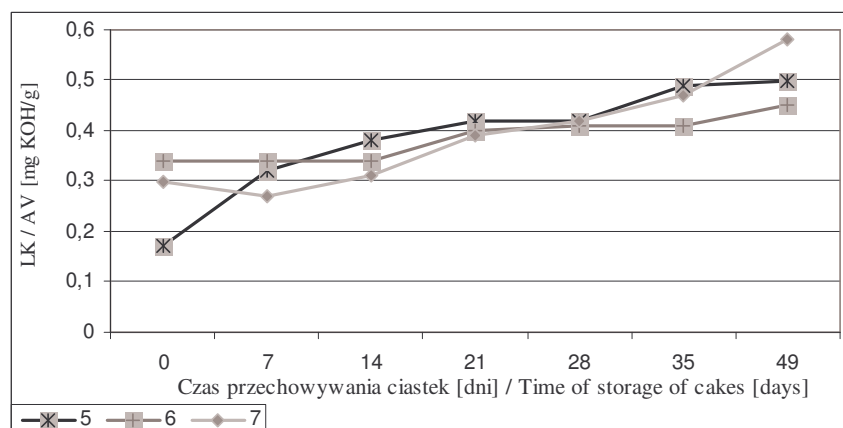
Na rys. 5. przedstawiono zmiany wartości liczby kwasowej w tłuszczach charakteryzujących się mniejszymi zawartościami izomerów trans (od 4,1 do 24,3%). Natomiast na rys. 6. przedstawiono zmiany LK w tłuszczach o większej zawartości TFA (powyżej 27%). Do 21 dni przechowywania ciastek francuskich, w zdecydowanej większości tłuszczów LK nie przekroczyła wartości 0,50 mg KOH/g. Jedynie tłuszcz nr 4, o zawartości TFA 24,3%, po 21 dniach przechowywania ciastek charakteryzował się LK wynoszącą 0,51. W tłuszczu nr 2, z ciastek po 21 dniach przechowywania, zaobserwowano relatywnie największy wzrost LK, o 0,31 jednostki – z wartości tuż po wypieku 0,17 do wartości 0,46, czyli o 206%.





Rys. 5. Kształtowanie się LK w tłuszczach o niższej zawartości TFA, wyekstrahowanych z ciastek o różnym okresie przechowywania.

Fig. 5. Changes in the Acid Value in fats with a lower content of TFA, extracted from puff-pastries showing various periods of storing them.



Rys. 6. Kształtowanie się LOO w tłuszczach o mniejszej zawartości TFA, wyekstrahowanych z ciastek o różnym okresie przechowywania.

Fig. 6. Changes in LOO in fats with a lower content of TFA, extracted from puff-pastries showing a various time of storing them.

Zaobserwowano, że w przypadku tłuszczów nr 6 (35,5% TFA) i 7 (54,2%TFA) w czasie całego okresu przechowywania ciastek przyrost wolnych kwasów tłuszczowych był najwolniejszy. Po 21 dniach o 21% a po 49 dniach o 37,9%.

Statystycznie nie stwierdzono istotnych korelacji ( $r = -0,20$ ) pomiędzy zawartością izomerów trans nienasyconych kwasów tłuszczowych w surowcu

tłuszczowym a wzrostem liczby kwasowej w tłuszczach wyekstrahowanych z ciastek francuskich w okresie ich przechowywania.

### Wnioski

1. Nie stwierdzono statystycznie istotnych zależności pomiędzy zawartością izomerów trans kwasów tłuszczowych a zmianami hydrolitycznymi i oksydacyjnymi w tłuszczach w czasie przechowywania ciastek francuskich.
2. Zaobserwowano jednak, że zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w tłuszczach o największej zawartością izomerów trans (36 i 54%) rosła relatywnie najwolniej.

### Literatura

- [1] Ackman R.G.: Canola fatty acids – an ideal mixture for health, nutritional food use. Chapter 6 in Canola and Rapeseed. Production Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Ed. F. Shahidi: Published by Van Nostrand Reinhold, New York 1999.
- [2] Balas J.: Kwasy tłuszczowe w rynkowych produktach spożywczych Cz. I. Bezpieczna Żywność, 2001, **1**, 20-21
- [3] Bartnikowska E., Obiedziński M.: Unsaturated trans fatty acids - nutritional problem? Pol. J. Food Nutr. Sci., 1997, **6 (47)**, 1-20.
- [4] Brzozowska E.: Technologia ciast o strukturze gąbczastej, rozdz. 21. Technologia ciast o strukturze kruchej, rozdz. 22. W: Podstawy technologii gastronomicznej - red. Zalewski S. WNT, Warszawa 1997.
- [5] Dojutrek Cz., Pietrzyk A.: Ciastkarstwo. WSiP, Warszawa 1991.
- [6] Drozdowski B.: Lipidy. W: Chemia żywności – red. Z. E. Sikorski. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2002.
- [7] Erp-Baart M.A., Couet C., Cuadrado C., Kafatos A., Stanley J., Poppel G.: Trans fatty acids in bakery products from 14 European countries. J. Food Comp. Analy., 1998, **11**, 161-169.
- [8] Jakubowski A.: Wpływ procesów przetwarzania tłuszczów na ich skład i cechy. Tłuszcze Jadalne, 1995, **2 (30)**, 70-79.
- [9] Juttelstad A.: The marketing of trans fat- free foods. Food Technology, 2004, **1 (58)**, 20.
- [10] Kafel S.: Znaczenie tłuszczów nienasyconych w karcynogenezie. Żyw. Człow. Metab., 1987, **14**, 117-120.
- [11] Krygier K.: Polski konsensus tłuszczowy. Przem. Spoż., 2001, **2 (55)**, 40.
- [12] Pisarek S: Ciasto francuskie. Przegl. Piek. Cuk., 2001, **10**, 48-51.
- [13] PN-EN ISO 5508: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- [14] PN-ISO 5509: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych.
- [15] PN-ISO 660: 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby kwasowej i kwasowości.
- [16] PN-ISO 3960: 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby nadtlenkowej.
- [17] PN-A-86902: 1997. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Tłuszcze cukiernicze i piekarskie.

- [18] Praca zbiorowa.: Ciastkarstwo także dla piekarzy. Receptury, normy, porady i przepisy prawne, red. Ambroziak Z. Wyd. Spółdzielcze. Warszawa 1994.
- [19] Rutkowski A., Krygier K.: Technologia i analiza tłuszczów jadalnych. Wyd. SGGW. Warszawa 1979.
- [20] Verschuren P.M., Zevenbergen J.L.: Safety evaluation of hydrogenated oils. Food and Chem. Toxicol., 1990, **11 (28)**, 755-757.

### EFFECT OF TRANS ISOMERS IN BAKERY FATS ON CHANGES IN THEIR QUALITY DURING STORAGE OF PUFF-PASTRIES

#### S u m m a r y

The objective of the investigation was to determine the relationship between the content of acids, in particular of trans isomers (TFA) and chemical changes occurring in fats during storage of puff-pastries manufactured with those fats added.

The range of the investigation involved two assessments: the assessment of chemical properties of seven bakery vegetable fats which differed, specifically, in the content of trans isomers (from 4,1 to 54,2%), and the assessment of hydrolytic and oxidative changes occurring in fats contained in puff-pastries during a 49-day storage of these products. The fatty acid content in fats was determined using a gas chromatography. The fat was extracted using a Kates method, and an acid value and peroxide value in extracted fats were determined.

On the basis of the investigation accomplished, no significant relationship was stated between the content of trans isomers of fatty acids and the hydrolytic and oxidative changes in fats occurring during storage of puff pastries. However, it was noted that the rate of increase in the quantity of free fatty acids in fats containing the highest level of trans isomers (36,54%) was, relatively, the slowest.

**Key words:** trans isomers of fatty acids, acid value, peroxide value, storage, puff-pastries ☒

DOMINIK KMIECIK, JOANNA KOBUS

## **BADANIE POSTAW KONSUMENTÓW WOBEC PRZECIWUTLENIACZY**

### Streszczenie

Przeciwutleniacze są przedmiotem badań naukowych, zarówno klinicznych, jak i żywieniowych. Obecnie stanowią one jeden z czynników utrwalania żywności oraz zapobiegania niekorzystnym procesom jęlczenia tłuszczów.

Przedmiotem niniejszej pracy było określenie poziomu wiedzy konsumentów na temat przeciwutleniaczy oraz postaw respondentów wobec stosowania tych substancji w produktach spożywczych. Badania ankietowe przeprowadzono w roku 2000 oraz 2005, każdorazowo wśród 150 osób na terenie województwa Wielkopolskiego. Badania przeprowadzono, posługując się ankietą zawierającą 15 pytań. Respondenci mieli możliwość wyboru jednej lub kilku odpowiedzi. Czynniki różnicującymi była płeć, wiek oraz wykształcenie badanych osób.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że pojęcie „przeciwutleniacz” było znane dużej części respondentów (77% w 2000 r. i 75% w 2005 r.) i w ciągu porównywanych lat populacja ta nie uległa zmianie. Jako główne źródła przeciwutleniaczy respondenci, odpowiednio w roku 2000 i 2005, wskazywali oleje roślinne (30 i 36%), zarodki pszenne (30 i 25%) oraz przyprawy (11 i 26%). Mimo tego, że znaczny odsetek respondentów deklarował znajomość pojęcia „przeciwutleniacz”, aż 44% w roku 2000 i 45% w 2005 nie potrafiło prawidłowo wskazać źródeł tych substancji. Ankietowani wykazali się także dobrą znajomością celu dodawania przeciwutleniaczy do żywności, wskazując głównie na ich funkcje ochronne i przeciwdziałające jęlczeniu tłuszczów - odpowiednio 67% odpowiedzi w roku 2000 r. i 64% w 2005. Badając nastawienie konsumentów do przeciwutleniaczy obserwowano zmniejszenie się niechęci konsumentów do produktów zawierających w swoim składzie związki oznaczone symbolem „E”, w tym przeciwutleniacze.

Uzyskane wyniki wskazują, że poziom wiedzy na temat przeciwutleniaczy nie uległ zmianie w przeciągu 5 lat.

**Słowa kluczowe:** przeciwutleniacze, żywność, konsument, badania ankietowe

## Wstęp

Tłuszcze występujące w pożywieniu są najbardziej skoncentrowanym źródłem energii, jak również są nośnikiem witamin rozpuszczalnych w tłuszczach oraz polienowych niezbędnych kwasów tłuszczowych (NNKT). Stanowią materiał, z którego organizm człowieka czerpie składniki do budowy własnych tkanek oraz syntezy wielu związków biologicznie czynnych. Zaleca się spożywanie tłuszczów na poziomie 30% energii diety [12, 19]. Jednak tłuszcze jako nietrwałe składniki żywności ulegają różnym przemianom podczas przechowywania. Zmiany te, określane popularnie jełczeniem, stanowią główną przyczynę ograniczonej trwałości produktów tłuszczowych, które nie są narażone na rozwój drobnoustrojów [1, 2, 8, 11]. Dlatego stosowanie przeciwutleniaczy jest nieodzowne. Ich główna funkcja biochemiczna polega na ochronie polienowych kwasów tłuszczowych przed utlenianiem [7, 5]. W przemyśle spożywczym stosowane są syntetyczne przeciwutleniacze (pochodne fenolu) o dużej skuteczności. Jednak ich użycie ogranicza się ze względu na doniesienia o szkodliwości tych związków dla organizmu człowieka [16]. W to miejsce coraz częściej wprowadzane są przeciwutleniacze naturalne lub wyciągi z produktów naturalnych, np. niektórych przypraw, które są źródłem przeciwutleniaczy. Substancje te uważane są za skuteczne w działaniu, a równocześnie za bardziej bezpieczne.

Błędy żywieniowe mogą być przyczyną niedożywienia i prowadzić do zachwiania prawidłowego rozwoju fizycznego i psychicznego [4, 13]. Przyczyn takiego stanu rzeczy można upatrywać nie tylko w niewłaściwej organizacji gospodarstw domowych czy też w wydłużaniu czasu przebywania poza domem, ale także w niedostatecznej wiedzy żywieniowej konsumentów [4, 6, 13]. Promocja zdrowego stylu życia przyczyniła się już do postępujących zmian modelu konsumpcji żywności i wzrostu zainteresowania konsumentów korzystną dietą, pozwalającą na utrzymanie prawidłowej sylwetki i dobrego stanu zdrowia, a tym samym zainteresowania składem spożywanej żywności. Konsument uświadomiony, ale będący w mniejszości, zwraca uwagę na wartość odżywczą, zawartość poszczególnych składników oraz dodatki do żywności, które zostały zastosowane w procesie technologicznym. Taki konsument jest skłonny wybierać produkty o bardziej naturalnym składzie, z naturalnymi dodatkami, w tym przeciwutleniaczami. Poziom wiedzy większości konsumentów w naszym kraju, o funkcjonowaniu i potrzebach żywieniowych organizmu człowieka, jest nadal niewystarczający i najczęściej kształtowany przez, sensacyjne niekiedy, doniesienia środków masowego przekazu. Nadal brak jest zorganizowanej i systematycznej edukacji żywieniowej, w tym z zakresu stosowania dodatków funkcjonalnych do żywności. Jednak działania edukacyjne spowodują określony skutek tylko wówczas, gdy zostaną poprzedzone określeniem stanu wiedzy żywieniowej polskich konsumentów i poznaniem ich postaw wobec tak ważnego zagadnienia, jak powszechne stosowanie dodatków do żywności. W przeprowadzonych badaniach konsumenckich skupiono się na przeciwutleniaczach,

jako ważnych dodatkach do żywności o funkcji ochronnej, których znaczenie przedstawiono powyżej.

Celem niniejszej pracy było określenie i ocena zmian postaw konsumentów wobec przeciwutleniaczy stosowanych w przemyśle spożywczym. Badania konsumenckie przeprowadzono w roku 2000 i 2005.

### **Materiał i metody badań**

Przeprowadzono dwuetapowe badania ankietowe, które zrealizowano w roku 2000 oraz 2005, każdorazowo wśród 150 respondentów z terenu Wielkopolski. Charakterystykę populacji ankietowanych przedstawiono w tab. 1. Dobór respondentów był losowy. Badania przeprowadzono, posługując się kwestionariuszem zawierającym 15 standaryzowanych odpowiedzi do wyboru. Spośród wszystkich pytań, 7 miało charakter wielokrotnego wyboru, pozostałe 8 umożliwiało wybór tylko jednej odpowiedzi. Większość pytań, głównie typu zamkniętego, dotyczyła stosunku respondentów do przeciwutleniaczy. Zarówno w roku 2000 jak i w 2005 użyto tego samego kwestionariusza ankietowego. Za pomocą ankiety starano się ustalić aktualny stan wiedzy na temat podstawowych składników zawartych w żywności, a przede wszystkim na temat stosowanych przeciwutleniaczy..

Czynnikami różnicującymi badanych była płeć, wiek oraz wykształcenie.

### **Wyniki i ich omówienie**

Zarówno w roku 2000, jak i 2005 roku, większy odsetek respondentów stanowiły kobiety, odpowiednio 54 i 59%. Dobór ankietowanych był losowy, dlatego badana populacja była zróżnicowana pod względem wieku i wykształcenia. Największą grupą respondentów były osoby z wykształceniem niepełnym wyższym (studiujące), które stanowiły 32% w roku 2000 i 41% w 2005. Najmniej liczną grupą wg tego kryterium były osoby z wykształceniem podstawowym, stanowiące 2 i 6% badanych w analizowanych latach. Ze względu na wiek najwięcej było osób w przedziale wiekowym 18–30, które stanowiły 47 i 63% badanych. (tab. 1).

Po upływie pięciu lat wśród respondentów zanotowano wzrost ogólnego zainteresowania zawartością dodatków do żywności. Zainteresowanie to wzrosło zarówno wśród mężczyzn, jak i kobiet, a dotyczyło dodatków oznaczonych na etykiecie symbolem E (tab. 2). Mężczyźni w 2000 i 2005 roku, w porównaniu do kobiet, przywiązywali mniejszą wagę do zawartości tłuszczu, witamin czy wartości kalorycznej produktów, ale ich zainteresowanie dodatkami było większe. Z wcześniejszych badań [9, 10, 14, 15, 18] wynika, że skład kupowanych produktów miał istotne znaczenie dla konsumentów, a uwidocznienie na etykiecie zastosowanych dodatków, w tym przeciwutleniaczy, było ważną informacją, kolejną po terminie przydatności do spożycia. Jak stwierdzono w badaniach CBOS w roku 2000 [17], świadomy wybór żywności ze względu na zawarte w niej składniki w największym stopniu wiązał się z wykształceniem. Badani z wykształceniem wyższym i średnim

wykazywali większe zainteresowanie składem kupowanych produktów niż osoby mniej wykształcone [17].

Tabela 1

Charakterystyka badanej populacji respondentów  
Profile of the respondent population polled

Rok Year	Płeć Sex	Respondenci Respondents		Wiek [lata] / Age [years]			Wykształcenie / Education				
				18-30	31-45	46-60	Podstawowe Primary	Zawodowe Vocational	Średnie Secondary school	Niepełne wyższe University	Wyższe University
		n	[%]	[%]			[%]				
2000	Kobiety Women	81	54	47	25	28	2	10	22	36	30
	Mężczyźni Men	69	46	46	32	22	1	22	30	27	20
	Ogółem Total	150	100	47	28	25	2	15	25	32	26
2005	Kobiety Women	88	59	63	18	19	2	5	30	47	16
	Mężczyźni Men	62	41	62	16	22	11	11	24	32	22
	Ogółem Total	150	100	63	17	20	6	7	28	41	18

Znaczna liczba ankietowanych w obu etapach prowadzonych badań wykazała niechętny stosunek do stosowania przeciwutleniaczy w produktach spożywczych. W badaniach przeprowadzonych przez CBOS w roku 2001 [18] stwierdzono, że czynnikiem decydującym o wyborze tłuszczu do smarowania pieczywa była jego trwałość (66% ankietowanych). Trwałość tłuszczu uwarunkowana jest m.in. zawartością w nich przeciwutleniaczy, toteż sprzeczność uzyskanych wyników można tłumaczyć jedynie brakiem świadomości konsumentów o występującej zależności.

W drugim etapie badań, a mianowicie w roku 2005 wzrosło zainteresowanie składem kupowanej żywności, przy czym należy zwrócić uwagę, że tendencja ta dotyczyła głównie kobiet. Ankietowani odpowiadali, zarówno w roku 2000, jak i w 2005, że pojęcie „przeciwutleniacz” nie jest im obce (77% odpowiedzi w roku 2000 i 75% w 2005) natomiast odsetek osób widzących konieczność stosowania ich w produkcji żywności był jednak znacznie mniejszy (31% w roku 2000 i 36% w 2005). Znaczna część respondentów (45% w roku 2000 i 41% w 2005) nie miała zdania na ten temat. Nie odnotowano różnic w liczbie osób akceptujących stosowanie przeciwutleniaczy w roku 2000 i 2005. Ponad połowa ankietowanych nie umiała wskazać naturalnego występowania przeciwutleniaczy w żywności, a większość respondentów nie wiedziało o istnieniu innych metod bądź środków alternatywnie je

zastępujących (75% w roku 2000 i 79% w 2005). W roku 2000 22% ankietowanych osób potwierdziło, że zna inne metody utrwalania żywności, natomiast pięć lat później odsetek takich osób wyniósł już tylko 13%.

Tabela 2

Stan wiedzy respondentów na temat przeciwutleniaczy [% odpowiedzi]  
The respondents' knowledge of antioxidants [% of the answers]

Pytanie Question	2000			2005		
	Tak Yes	Nie No	Nie wiem I don't know	Tak Yes	Nie No	Nie wiem I don't know
Czy spotkała się Pani/Pan z pojęciem „Przeciwutleniacz”? Have you ever come across a term of an antioxidant?	77	23	–	75	25	–
Czy zawartość nieznanach Pani/Panu związków oznaczonych kodem „E” w produkcie zniechęca Pana/Panią do zakupu? Does a content of unknown compounds denoted by 'E' code in a food product discourage you from buying it?	50	11	39	37	29	34
Czy według Pani/Pana powinno się dodawać przeciwutleniacze do żywności? Do you think antioxidants should be added to food products?	31	24	45	36	23	41
Czy przeciwutleniacze występują w sposób naturalny w produktach spożywczych? Do the antioxidants naturally occur in food products?	33	13	54	41	9	50
Czy sądzi Pani/Pan, że istnieją metody mogące zastąpić działanie przeciwutleniaczy w żywności? Do you know whether or not there are methods able to replace effects of the antioxidant in food products?	22	3	75	13	8	79

Ankietowani zapytani o produkty będące naturalnym źródłem przeciwutleniaczy trafnie wskazali oleje roślinne – 30% odpowiedzi w roku 2000 i 36% w 2005. Respondenci także właściwie wybrali zarodki pszenne (30% w roku 2000 i 25% w 2005) oraz przyprawy, przy czym w roku 2005 produkty te wybrało 26% ankietowanych, co stanowiło ponad dwukrotnie większą grupę osób niż w roku 2000. Jednak nadal prawie połowa badanych nie wiedziała, który z proponowanych produktów jest naturalnym źródłem przeciwutleniaczy i nie potrafiła wskazać żadnego z wymienionych produktów. Respondenci, którzy zakreślili odpowiedź „nie wiem” stanowili odpowiednio 44 i 45% badanej populacji (tab. 3).

Tabela 3

Stan wiedzy respondentów na temat przeciwutleniaczy [% odpowiedzi].



The respondents' knowledge of antioxidants [% of answers].

Rok / Year	2000			2005		
Płeć / Sex	K	M	O	K	M	O
	[%]			[%]		
W jakich produktach naturalnie występują przeciwutleniacze? What food products contain antioxidants as a natural compound?						
Oleje roślinne / Vegetable oils	31	29	30	47	25	36
Zarodki pszenne / Wheat germs	33	28	30	34	16	25
Masło / Butter	20	6	13	24	19	21
Mięso / Meat	1	6	4	13	16	15
Przyprawy / Spices	10	13	11	29	24	26
Inne / Other	1	6	4	10	6	8
Nie wiem / I don't know	41	48	44	35	44	45
Które naturalne przeciwutleniacze są dodawane do żywności. What natural antioxidants are added to food products?						
Witamina E / Vitamin E	43	29	36	58	49	54
Witamina C / Vitamin C	54	43	49	56	54	55
Sól / Salt	30	38	34	15	27	21
Mąka / Flour	0	3	1	6	11	8
Benzoosan sodu Sodium benzoate	14	16	15	10	22	16
Nie znam / I don't know	7	12	10	11	3	7
Na co zwraca Pani/Pan uwagę, czytając etykietę wybranego produktu? What are the elements in the contents of a product label you pay attention to when reading a label on the product?						
Zawartość tłuszczu / Fat content	53	39	46	57	37	47
Zawartość witamin / Vitamins	56	41	48	54	56	55
Wartość kaloryczna / Calories	54	41	47	54	25	40
Obecność nieznanymi związków oznaczonych kodem E / Presence of unknown substances denoted by 'E'	41	49	45	46	52	49
Nie czytam etykiet I don't read labels	1	13	7	1	2	1
W jakim celu, Pani/Pana zdaniem, stosuje się przeciwutleniacze w żywności? According to you, for what reason the antioxidants are used in food products?						
Chronią produkt przed zjełczeniem / They protect fats contained in the food product against becoming rancid	69	65	67	72	56	64
Podnoszą walory odżywcze / They increase nutritious values of food	17	12	14	24	19	21
Poprawiają smak i zapach produktów / They improve the taste and smell of food products	20	25	22	24	21	22
W innym celu / For some other purposes	2	7	5	10	5	7
Nie wiem / I don't know	20	26	23	20	30	25

c.d. tab. 3

Z jakim podstawowym składnikiem żywności kojarzy Pani/Pan pojęcie „Przeciwutleniacz”?						
What basic food component makes you think of antioxidants?						
Tłuszcze / Fats	67	51	59	61	43	52

Białka / Protein	15	16	15	15	13	14
Cukry / Carbohydrates	5	12	8	9	13	11
Nie wiem / I don't know	27	41	34	30	49	40

Objaśnienia: / Explanatory notes:

K – kobiety / women; M – mężczyźni / men.

Analizując odpowiedzi na kolejne pytanie dotyczące naturalnych przeciwutleniaczy dodawanych do żywności stwierdzono, że odpowiedzi udzielone w roku 2005 mogłyby świadczyć o poprawie stanu wiedzy wśród respondentów na temat przeciwutleniaczy. Zarówno większy odsetek kobiet, jak i mężczyzn, wskazał witaminę E jako jeden z dodatków o właściwościach przeciwutleniających. Podobnie w przypadku witaminy C, została ona w drugim etapie badań wskazana przez zdecydowaną większość respondentów (55%). W roku 2000 liczba osób, które nie potrafiły wskazać żadnego przeciwutleniacza była większa niż w roku 2005 (odpowiednio 10 i 7%).

Na kolejne pytanie, dotyczące celu stosowania przeciwutleniaczy w przemyśle spożywczym, większość ankietowanych udzieliła poprawnej odpowiedzi, wskazując „chronią produkt przed jełczeniem”. W roku 2000 aż 69% ankietowanych kobiet wskazała tę odpowiedź, a pięć lat później ich odsetek wzrósł do 72%. Mężczyźni, podobnie jak kobiety, udzielali tej odpowiedzi w zdecydowanej większości. Jednak w przeciwieństwie do kobiet odsetek mężczyzn udzielających tej odpowiedzi zmalał z 65% w 2000 do 56% w 2005 roku. Mniej ankietowanych wskazywało pozostałe odpowiedzi: „podnoszą walory odżywcze” – 14% w roku 2000 i 21% w 2005, „poprawiają smak i zapach” – jednakowo w obu porównywanych etapach – 22%, „w innym celu” – 5% w roku 2000 i 7% w 2005. Osób, które nie wiedziały, w jakim celu stosuje się przeciwutleniacze w żywności było 23% w roku 2000 i 25% w 2005.

Zarówno w roku 2000, jak i 2005, większość ankietowanych poprawnie kojarzyła przeciwutleniacze z tłuszczową frakcją żywności (odpowiednio 59 i 52%). Białka wskazało 15% ogółu badanych, natomiast cukry 10%. Znaczna liczba ankietowanych zakreśliła odpowiedź „nie wiem” (34% w roku 2000 i 40% w 2005).

W roku 2005 ankietę poszerzono o dwa dodatkowe pytania (tab. 4). Zapytano ankietowanych czy wzbogacają swoją dietę w produkty farmaceutyczne będące nośnikami przeciwutleniaczy oraz jakie produkty dostępne na rynku spożywają ze względu na ich prozdrowotne właściwości. W rezultacie ustalono, że 89% badanych nie stosowało żadnych preparatów farmaceutycznych. Tylko 11% respondentów uzupełniało swoją dietę suplementami zawierającymi przeciwutleniacze, z czego większość stanowiły kobiety. Spośród produktów o właściwościach prozdrowotnych, czerwone wino wśród ogółu badanych było najbardziej preferowanym środkiem spożywczym, które konsumowano ze względu na jego prozdrowotne działanie (79%). Gorzka czekolada, podobnie jak zielona herbata, były również spożywane ze względu na ich korzystny wpływ na organizm, lecz w mniejszym stopniu (18 i 4%). Najrzadziej

wskazywanymi przez respondentów produktami były sok marchwiowy, olej z pestek winogron oraz oliwa z oliwek.

Tabela 4

Spożycie produktów spożywczych i preparatów farmaceutycznych zawierających przeciwutleniacze.  
The consumption rate of food products and pharmaceutical products containing antioxidants.

Rok / Year	2005		
Płeć / Sex	K	M	O
	[%]		
Czy wzbogaca Pani/Pan swoją dietę preparatami farmaceutycznymi zawierającymi przeciwutleniacze? Do you enrich your diet by pharmaceutical products containing antioxidants?			
Tak / Yes	4	4	11
Nie / No	52	38	89
Jakie artykuły spożywcze spożywa Pani/Pan ze względu na ich prozdrowotne właściwości? What food products do you eat because of their pro-health qualities?			
Czerwone wino Red wine	47	32	79
Zielona herbata Green tea	2	2	4
Czekolada gorzka Bitter chocolate	9	9	18
Sok marchwiowy Carrot juice	0	1	1
Oliwa z oliwek Olive Oil	0	0	0
Olej z pestek winogron Grape seeds oil	1	0	1

Objaśnienia: / Explanatory notes:

K – kobiety / women; M – mężczyźni / men; O – ogółem / total

## Wnioski

1. Pomimo, że zagadnienie przeciwutleniaczy było bardzo popularne w ciągu ostatnich lat, postawy konsumentów oraz wiedza na ich temat nie uległa dużym zmianom. W wielu przypadkach ankietowani w roku 2005 mieli mniejszy zakres wiedzy niż w roku 2000 – odpowiadali nieprawidłowo lub wybierali odpowiedź „nie wiem”.
2. Ankietowani zarówno w roku 2000, jak i w 2005 znali pojęcie „przeciwutleniacz” (77% ankietowanych w roku 2000 i 75% w 2005), potrafili prawidłowo wskazać cel ich stosowania w produktach oraz główny składnik żywności – tłuszcze, jako podstawowy składnik kojarzony z przeciwutleniaczami. Wśród wszystkich ankietowanych 54% w roku 2000 i 50% w 2005 potrafiła prawidłowo odpowiedzieć na pytanie o występowanie przeciwutleniaczy naturalnie w produktach spożywczych oraz prawidłowo wskazała ich źródła.
3. Tylko 11% ankietowanych w roku 2005 deklarowało wzbogacanie własnej diety w naturalne przeciwutleniacze za pomocą preparatów farmakologicznych, a

najczęściej wymienianymi produktami spożywanymi ze względu na właściwości prozdrowotne były: czerwone wino (77% odpowiedzi) oraz sok marchwiowy (17% odpowiedzi). Inne produkty, których znaczenie prozdrowotne często podkreśla się w literaturze przedmiotu, m.in. zielona herbata czy też olej z pestek winogron, były spożywane bardzo sporadycznie.

### Literatura

- [1] Ahn D.U. Nam K.C.: Use antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat Sci.*, 2003, **63**, 1-8.
- [2] Beltran E., Pla r., Yuste J, Mor-Mur M.: Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Sci.*, 2003, **64**, 19-25.
- [4] Czaczelewski J.: Częstość spożywania pierwszych i drugich śniadań przez uczniów klas IV-VI na przykładzie szkół podstawowych miasta Biała Podlaska. *Roczn. PZH*, 2001, **52**, 4, 321-328.
- [5] Gutierrez F., Villafranca M., Castellano J.: Changes in the main components and quality indices of virgin olive oil during oxidation. *JAOCS*, 2002, **79**, 669-676.
- [6] Hamułka J., Gronowska-Senger A., Witkowska K.: Częstość spożywania i wartość energetyczna śniadań uczniów wybranych szkół podstawowych w Warszawie. *Roczn. PZH*, 2000, **51**, 279-290.
- [7] Kamal-Eldin A., Andersson R.: A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *JAOCS*, 1997, **74**, 375-380.
- [8] Korczak J.: Procesy zachodzące podczas przechowywania tłuszczów. W: Gawęcki J.: Prawda o tłuszczach, Instytut Danone – Fundacja Promocji Zdrowego Żywienia. Warszawa 1997, s. 43-46.
- [9] Kowrygo B., Górka-Warsewicz H., Ługowska K.: Ocena preferencji konsumenckich w zakresie żywności i żywienia. *Żywność. Technologia. Jakość*, 1997, **2**, 51-60.
- [10] Krupa J., Majka A.: Badanie preferencji konsumenckich mięsa i jego przetworów w południowo-wschodnim makroregionie Polski. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **2**, 91- 99.
- [11] Kuti J. O., Konuru H. B.: Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidoscolus* spp.), *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 117-121.
- [12] Marciniak- Łukasiak K., Krygier K.: Charakterystyka kwasów omega-3 i ich zastosowanie w żywności funkcjonalnej. *Przem. Spoż.*, 2004, **12**, 32-36
- [13] Międzobrodzka A.: Błędy żywieniowe społeczeństwa polskiego. *Żywność. Technol. Jakość*, 1994, **1**, 37-40.
- [14] Ozimek I.: Opinie konsumentów na temat istniejących zagrożeń związanych z żywnością. *Żyw. Człow. Met.*, 2003, **3/4**, 30.
- [15] Świda J., Sikora T.: Preferencje konsumenckie cech jakości produktów mleczarskich w Polsce południowo-wschodniej. *Żywność. Technologia. Jakość*, 1999, **1**, 60-71.
- [16] Wang H., Provan G.J., Helliwell K.: Tea Flavonoids : Their functions, utilization and analysis. *J. Food Sci. Techn.*, 2000, **11**, 152-160.
- [17] [www.cbos.com.pl](http://www.cbos.com.pl), Nawyki żywieniowe i upodobania kulinarne Polaków. Badanie CBOS 2000 <http://www.cbos.com.pl>
- [18] [www.cbos.com.pl](http://www.cbos.com.pl), Bezpieczna żywność a integracja europejska – opinie respondentów z niektórych krajów Europy Środkowej i Wschodniej. Badanie CBOS 2001. Internet: <http://www.cbos.com.pl>
- [19] Ziemiański Ś., Bułhak- Jachymczyk B., Budzyńska-Topolewska J.: Normy żywienia dla ludności w Polsce. *Nowa Medycyna*, 1998, **5**, 4.

### S u m m a r y

Antioxidants are the objective of scientific, both clinical and nutritional, investigations. Presently, they constitute one of the methods to fix food, and to prevent unfavourable rancid processes of fats.

The objective of this paper was to determine a level of the consumer knowledge on antioxidants, and approaches of the respondents to the application of antioxidants in food products. The opinion polling was conducted in the Province of Wielkopolska, twice: in 2000 and 2005. Each time, 150 people were polled. The poll was conducted using a questionnaire consisting of fifteen (15) questions. The respondents were asked to choose one or several answers. Distinguishing factors were: sex, age and education of the people polled.

On the basis of the survey performed, it was stated that the significant majority of the respondents was familiar with the term 'antioxidant' (77% of people in 2000, and 75% of people in 2005), and their number did not change in the two years being compared. They usually pointed out the following products as main sources of antioxidants: vegetable oil (30% in 2000, and 36% in 2005), wheat nucleus (30%, and 25%), spices (11% in 2000, and 26% in 2005). Despite the fact that the majority of respondents declared they knew the term "antioxidant", as many as 44% (in 2000), and 45% (in 2005) could not properly indicate the sources of antioxidants. Furthermore, the people polled proved to correctly know purposes of adding antioxidants to food products; they mainly emphasized their protective and fat-rancid process preventing functions - 67% in 2000, and 64% in 2005, respectively. While surveying the consumers' approach to antioxidants, it was also stated that the consumers polled were less negatively disposed towards the food products containing compounds, denoted by 'E', including the antioxidants.

**Key words:** antioxidants, food, consumer, polling ☒

ANNA FABISIAK, LI SHENG, JAN STAWCZYK,  
DOROTA WITROWA-RAJCHERT

**WPŁYW METODY I TEMPERATURY SUSZENIA JABŁEK  
NA AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCĄ OTRZYMANYCH  
Z NICH EKSTRAKTÓW**

**Streszczenie**

Celem pracy było określenie wpływu różnych metod suszenia i temperatury procesu na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów otrzymanych z suszonych jabłek.

Najwyższą zdolnością neutralizacji wolnych rodników charakteryzował się ekstrakt z suszu sublimacyjnego. Stwierdzono statystycznie istotną, mniejszą jego aktywność przeciwutleniającą w stosunku do surowego jabłka (zmniejszenie aktywności wyniosło około 9%) jedynie w przypadku zastosowania temperatury półki wynoszącej 40°C. Jednocześnie, mimo nieznacznego zmniejszenia, zawartość polifenoli w tych suszach nie różniła się istotnie od ich zawartości w surowcu przed suszeniem. Podczas suszenia konwekcyjnego aktywność przeciwutleniająca jabłek zmniejszyła się znacząco, osiągając 60–80% aktywności surowca przed suszeniem. Podobnie zawartość polifenoli uległa około 30–35-procentowej redukcji. Suszenie niskotemperaturowe również spowodowało zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej i zawartości polifenoli, jednak nie było ono tak istotne, jak w przypadku suszenia w wysokiej temperaturze, ale większe niż suszu sublimacyjnego. Aktywność przeciwutleniająca zmniejszyła się o około 8-27%, zaś zawartość polifenoli – w granicach 5–29%. Nie stwierdzono jednoznacznego wpływu poziomu temperatury na badane wskaźniki jakości suszu, niezależnie od zastosowanej metody suszenia.

**Słowa kluczowe:** suszenie konwekcyjne, suszenie sublimacyjne, suszenie niskotemperaturowe, aktywność przeciwutleniająca, polifenole

---

*Mgr. inż. A. Fabisiak, dr hab. D. Witrowa-Rajchert, prof. SGGW, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, mgr Sheng Li, dr J. Stawczyk, Katedra Procesów Ciepłych i Dyfuzyjnych, Wydz. Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 215, 90-924 Łódź*

## **Wprowadzenie**

Wolne rodniki i inne czynniki utleniające są niepożądanymi produktami wielu reakcji zachodzących w organizmie człowieka. Reagują z cząsteczkami białek i węglowodanów, przekształcając je w formy o budowie rodnikowej, zapoczątkowując reakcje łańcuchowe. Reakcjom tym przeciwdziałają związki o charakterze przeciwutleniającym [11]. Zaburzenie równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu i aktywnością przeciwutleniaczy jest określane mianem stresu oksydacyjnego, który towarzyszy wielu chorobom. Udowodnienie udziału wolnych rodników w patogenezie wielu chorób stworzyło potrzebę poszerzenia grupy przeciwutleniaczy, głównie fitozwiązków z naturalnych źródeł, jakimi są owoce i warzywa [5, 12].

Rodnikowe reakcje utleniania w znacznym stopniu obniżają jakość żywności. Inaktywacja wolnych rodników na różnych poziomach utleniania jest metodą przedłużania trwałości i polepszania jakości żywności. Związki fenolowe, z uwagi na zawartość grup hydroksylowych, wykazują wysoką aktywność w wiązaniu wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Aktywność ta wynika z łatwości oddawania wolnego wodoru, a utworzone formy rodników są stabilne [4, 12].

Owoce i warzywa wykazują działanie przeciwutleniające. Zawartość związków przeciwutleniających zależy od gatunku i rodzaju rośliny, z której pochodzą i jest pośrednio związana z występowaniem naturalnych barwników [13]. Właściwości przeciwutleniające zależą od składu chemicznego tkanki i nawet w obrębie tego samego gatunku mogą występować znaczne różnice, wynikające zarówno z cech odmianowych, warunków uprawy surowca, jak i sposobu oznaczania związków decydujących o tych właściwościach [10]. Na właściwości przeciwutleniające surowca ma także wpływ sposób jego przetwarzania. Suszenie owoców wpływa na ogół destrukcyjnie na zawartość polifenoli i związków decydujących o aktywności tego surowca [3, 13].

Celem pracy było określenie wpływu różnych metod suszenia jabłek: konwekcyjnej, sublimacyjnej i suszenia niskotemperaturowego pod ciśnieniem atmosferycznym, oraz temperatury procesu na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów uzyskanych z suszonego materiału.

## **Materiał i metody badań**

Surowcem do badań były jabłka odmiany Idared. Materiał krojono w kostki o boku 1cm i poddawano suszeniu. Suszenie konwekcyjne prowadzono w suszarce laboratoryjnej, stosując temp. powietrza 60, 70 i 80°C oraz prędkość przepływu powietrza wzdłuż warstwy materiału 2 m/s. Suszenie sublimacyjne wykonano w suszarce Christ LOC-1m firmy ALPHA1-4, w której kontaktowo ogrzewano próbki w temp. pólki 20, 30 oraz 40°C pod ciśnieniem 63 Pa (przed suszeniem materiał



zamrożono konwekcyjnie w powietrzu o temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  przez 24 h). Suszenie niskotemperaturowe polegało na suszeniu zamrożonego materiału pod ciśnieniem atmosferycznym w układzie z pompą ciepła, stosując temp. powietrza  $-4$ ,  $-8$ ,  $-12$  i  $-16^{\circ}\text{C}$ . Pompa ciepła była używana do schładzania wilgotnego powietrza poniżej temperatury punktu lodu/rosy i usuwania wilgoci z obiegu. Aparatura, zasada metody i sposób suszenia zastały przedstawione przez Żyłę i Witrową-Rajchert [15].

W materiale surowym oraz w suszu oznaczano zawartość suchej substancji zgodnie z PN-90/A-75101/03.

Właściwości przeciwutleniające surowych jabłek i suszu oznaczano metodą, która polega na określeniu stopnia neutralizowania wolnych rodników DPPH<sup>•</sup> przez przeciwutleniacze. W celu sporządzenia ekstraktu do analiz odważano 5 g rozdrobnionego miąższu surowych jabłek i dodawano 50 ml 80-procentowego etanolu. W przypadku suszu ilość gramów próbki potrzebną do analizy obliczano przy założeniu, że masa suchej substancji w suszu ma być równa masie suchej substancji zawartej w 5 g surowego jabłka. Do odważonego suszu dodawano taką ilość wody, aby sumaryczna masa wynosiła 5 g, a następnie 50 ml 80-procentowego etanolu. Próbę homogenizowano przez 10 min, po czym gotowano pod przykryciem przez 15 min. Tak przygotowany roztwór sączono. W ekstrakcie oznaczano aktywność przeciwutleniającą zgodnie z metodyką podaną przez Brand-Williams i wsp. [1]. Pomiar polegał na określeniu absorbancji, przy długości fali 515 nm, sześciu roztworów zawierających taką samą objętość roztworu DPPH<sup>•</sup>, ale różne objętości ekstraktu. Na tej podstawie wykreślono zależność liniową pomiędzy objętością ekstraktu a stopniem neutralizacji rodników DPPH<sup>•</sup>. Z równania linii prostej obliczano objętość ekstraktu, powodującą 50-procentową redukcję rodników. Wartość tę przeliczano na masę suchej substancji odpowiadającą danej objętości ekstraktu. Tak więc efektywność neutralizacji wolnych rodników przez badane susze wyrażano w formie współczynnika  $\text{IC}_{50}$ , określającego ilość potrzebnego suszu do 50-procentowej redukcji wolnych rodników.

Zawartość związków polifenolowych oznaczano metodą Folina-Ciocalteu'a [9], stosując jako wzorzec kwas chlorogenowy.

Do analiz wykorzystano ekstrakt przygotowany do oznaczania stopnia neutralizacji wolnych rodników. Analizy wykonano na dwóch partiach surowca (tab.1), powtarzając dwukrotnie każdy proces suszenia oraz ekstrakcji.

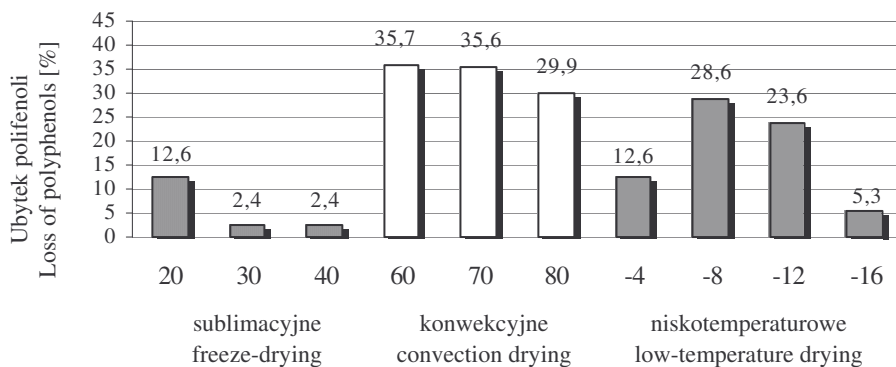
## Wyniki i ich omówienie

Aktywność przeciwutleniająca jest jedną z najlepiej zbadanych aktywności biologicznych surowców roślinnych [11]. Czynnikiem decydującym o efektywności przeciwutleniającej jest skład owoców, jak również warunki prowadzenia procesów technologicznych [11, 14].



Owoce i warzywa na skalę przemysłową suszy się metodą konwekcyjną. Proces suszenia konwekcyjnego zachodzi w podwyższonej temperaturze przy silnym napowietrzaniu materiału. Prowadzi to do znacznych strat polifenoli, niekiedy sięgających nawet 50% [5]. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że w wyniku suszenia konwekcyjnego w temp. 60 i 70°C zawartość polifenoli uległa ok. 35%-procentowej redukcji (rys. 1, tab. 1), co potwierdza negatywny wpływ działania wysokiej temperatury [2, 8].

Suszone konwekcyjnie owoce są pozbawione w dużym stopniu aktywnych biologicznie niskocząsteczkowych polifenoli. Przypuszcza się, że przyczyną strat polifenoli może być obecność oksydazy polifenolowej, która uczestniczy w utlenianiu substancji zawierających związki polifenolowe. Optimum termiczne działania tego enzymu to temp. 40°C. Suszenie konwekcyjne jabłek w temp. powietrza 60 i 70°C prowadziło do zmniejszenia zawartości związków polifenolowych, choć statystycznie istotnych różnic w zawartościach polifenoli w jabłkach suszonych w trzech wartościach temperatury nie stwierdzono (tab. 1). Niższa temperatura suszenia, związana jest z dłuższym czasem całego procesu (60°C – 3,5 h i 70°C – 3 h; 80°C – 2,5 h), a więc przypuszczalnie również z dłuższym czasem przebywania tkanki jabłka w temperaturze zbliżonej do optymalnej temperatury działania oksydazy polifenolowej. To w efekcie mogło spowodować większe straty polifenoli w niższych wartościach temperatury suszenia.



Rys. 1. Ubytek polifenoli w jabłkach suszonych różnymi metodami, wyrażony jako procent ich zawartości w jabłkach surowych.

Fig. 1. The loss of polyphenols (expressed as a percentage of their content in raw apples).

Suszone konwekcyjnie owoce są pozbawione w dużym stopniu aktywnych biologicznie niskocząsteczkowych polifenoli. Przypuszcza się, że przyczyną ubytku polifenoli może być obecność oksydazy polifenolowej, która uczestniczy w utlenianiu substancji zawierających związki polifenolowe. Optimum działania tego enzymu to temp. 40°C. Suszenie konwekcyjne jabłek w temp. powietrza 60 i 70°C prowadziło do

zmniejszenia zawartości związków polifenolowych, choć statystycznie istotnych różnic zawartościach polifenoli w jabłkach suszonych w trzech wartościach temperatury nie stwierdzono (tab. 1). Niższa temperatura suszenia związana jest z dłuższym trwaniem całego procesu (60°C – 3,5 h i 70°C – 3 h; 80°C – 2,5 h), a więc przypuszczalnie również z dłuższym okresem utrzymywania się wewnątrz kostek jabłka temperatury zbliżonej do optymalnej temperatury działania oksydazy polifenolowej (temperatura wewnątrz materiału w czasie suszenia – w drugim okresie procesu – rośnie stopniowo od temperatury termometru mokrego powietrza suszącego, osiągając co najwyżej temperaturę powietrza suszącego pod koniec suszenia). To w efekcie mogło spowodować większe straty polifenoli w niższej temperaturze suszenia.

Tabela 1

Aktywność przeciwutleniająca oraz zawartość polifenoli w ekstraktach z surowych i suszonych jabłek.  
The antioxidant activity and content of polyphenols in the extracts produced from raw and dried apples.

Rodzaj badanego materiału The type of material under investigation	Temp. suszenia Drying temperature [°C]	Aktywność przeciwutleniająca (IC <sub>50</sub> ) [mg s.s] Antioxidant activity		Zawartość polifenoli [mg / 100g s.s] Content of polyphenols	
		$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Jabłka surowe / Raw apples	-	1,75 <sup>a</sup>	± 0,016	1493,0 <sup>A</sup>	± 90,54
Jabłka surowe* / Raw apples*	-	*2,13 <sup>b</sup>	± 0,064	*1784,0 <sup>B</sup>	± 94,54
Jabłka suszone sublimacyjnie (po zamrożeniu) / Freeze-dried apples (after freezing)	20	1,73 <sup>a</sup>	± 0,007	1304,7 <sup>A</sup>	± 26,63
	30	1,88 <sup>a</sup>	± 0,262	1457,3 <sup>A</sup>	± 2,656
	40	1,91 <sup>c</sup>	± 0,040	1457,3 <sup>A</sup>	± 29,28
Jabłka suszone konwekcyjnie Convective-dried apples	60	*2,97 <sup>d</sup>	± 0,322	*1146,5 <sup>C</sup>	± 26,64
	70	*2,53 <sup>e</sup>	± 0,086	*1148,6 <sup>C</sup>	± 45,29
	80	*2,82 <sup>d</sup>	± 0,045	*1250,1 <sup>C</sup>	± 23,96
Jabłka suszone w niskiej temperaturze Apples dried at a low temperature	-4	2,09 <sup>f</sup>	± 0,014	1304,7 <sup>A</sup>	± 37,29
	-8	2,21 <sup>f</sup>	± 0,063	1065,5 <sup>D</sup>	± 18,64
	-12	*2,29 <sup>b</sup>	± 0,301	*1357,4 <sup>E</sup>	± 122,5
	-16	*2,57 <sup>c</sup>	± 0,084	*1688,9 <sup>B</sup>	± 63,78

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\* – jabłka surowe i susze pochodzące z innej partii surowca / raw apples and dried apples originating from different batches of raw material;

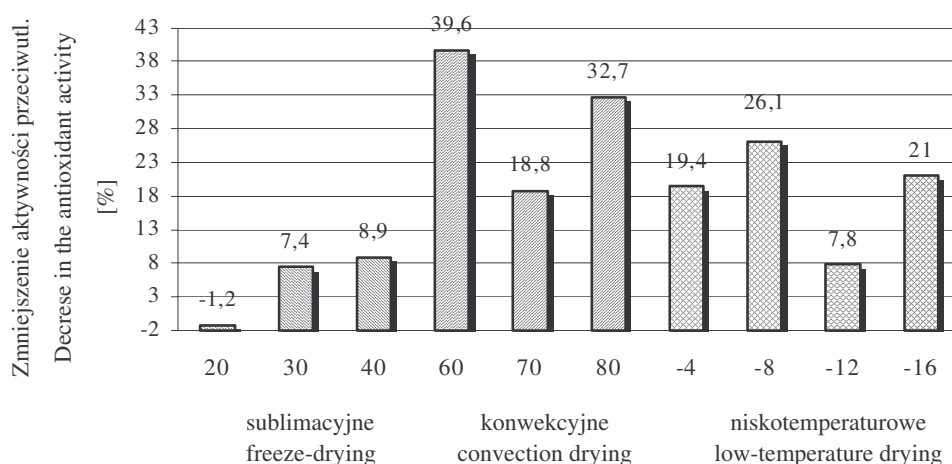
a, A. – wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie / mean values denoted by the same letter do not differ statistically significantly;

$\bar{x}$  – wartość średnia / mean value; SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

Zależności występujące pomiędzy aktywnością utleniającą i zawartością polifenoli nie są do końca poznane. Procesy cieplne mogą powodować zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej (do ponad 40%) i zawartości związków polifenolowych (do ponad 50%) [6, 7]. Ubytek związków fenolowych może być

przyczyną zmniejszenia aktywności przeciwutleniającej. W prezentowanych badaniach stwierdzono zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej suszonych konwekcyjnie jabłek o 20–40% w porównaniu z jabłkami surowymi (rys. 2, tab. 1).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy zdolnością neutralizacji wolnych rodników suszy otrzymanych w temp. 60 i 80°C. Można przypuszczać, że zarówno długi okres przebywania suszonego materiału w niższej temperaturze (60°C –



Rys. 2. Zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej jabłek suszonych różnymi metodami, wyrażone jako procent aktywności surowych jabłek.

Fig. 2. Decrease in the antioxidant activity of apples dried using various methods, and expressed as a per cent rate of the antioxidant activity of raw apples.

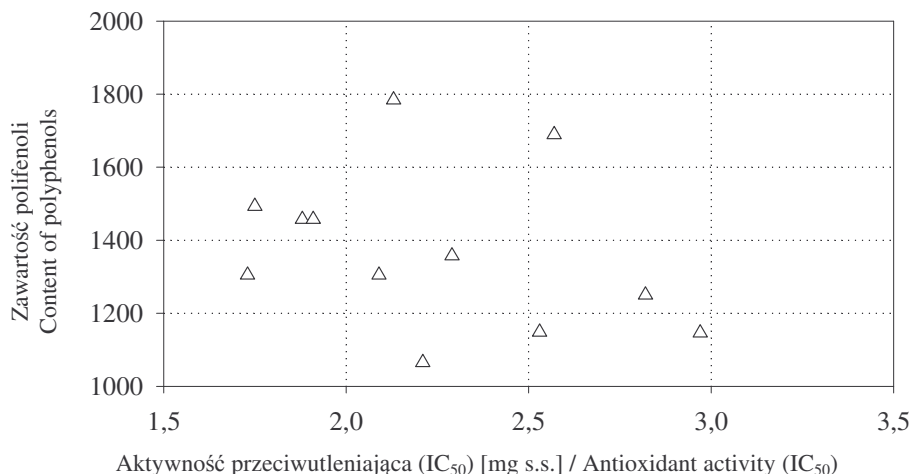
3,5 h), jak i krótkotrwałe działanie wysokiej temperatury (80°C – 2,5 h) prowadzą do zmian aktywności przeciwutleniającej wyekstrahowanych z suszonej tkanki jabłka związków. Soong i Barlow [10] stwierdzili, że mniejsza aktywność przeciwutleniająca związana jest z niższą temperaturą prowadzenia procesu suszenia. Owoce mango suszone w temp. 35°C wykazały aktywność wynoszącą 1571  $\mu\text{mol/g}$  w przeliczeniu na kwas askorbinowy, natomiast gdy zastosowano temp. 105°C aktywność była równa 1888  $\mu\text{mol/g}$ , czyli zwiększyła się o około 20%. Natomiast wysoka temperatura (85°C) suszenia śliwek 'President' spowodowała zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej o około 50%, w porównaniu suszeniem w temp. 60°C. Jednak w przypadku tych owoców bardzo znacząca okazała się odmiana, ponieważ w przypadku śliwek 'Sugar' nie stwierdzono wpływu zróżnicowanej temperatury na badaną aktywność [2].

Brak dostępu tlenu i niższa temperatura suszenia sublimacyjnego jest przyczyną lepszego zachowania wskaźników jakościowych suszu, ponieważ w takich warunkach reakcje biochemiczne przebiegają wolniej. Znaczenie ma również mniejsze uszkodzenie

przepuszczalności błon komórkowych z uwagi na usuwanie wody poprzez stopniowe przesuwanie się frontu lodowego od powierzchni do wnętrza. Przez puste pory powstałe w materiale w czasie sublimacji para wodna przedostaje się na powierzchnię produktu bez uszkodzenia jego struktury. Tak więc niektóre właściwości suszu sublimacyjnego w niewielkim stopniu odbiegają od właściwości materiału surowego. Potwierdzają to przeprowadzone eksperymenty, w których najlepszą zdolność wiązania wolnych rodników uzyskano w przypadku suszy sublimacyjnych. Statystycznie istotne zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej w stosunku do surowego jabłka stwierdzono jedynie w przypadku prowadzenia procesu suszenia w temp. półki 40°C (rys. 2, tab. 1).

Zaobserwowano również nieznaczne zmniejszenie zawartości polifenoli w jabłkach suszonych sublimacyjnie (rys. 1, tab. 1.). Największy ubytek polifenoli odnotowano w temp. półki 20°C, jednak analiza statystyczna nie potwierdziła statystycznie istotnych różnic pomiędzy wszystkimi suszami otrzymanymi sublimacyjnie i jabłkami surowymi.

Od wielu lat trwają badania nad opracowaniem techniki odwadniania, która będzie łączyła zalety zarówno liofilizacji (wysoka jakość produktu), jak i konwekcyjnych metod suszenia (niskie koszty procesu). Jedną z takich metod może być zastosowanie mieszanej techniki suszenia, polegającej na „płytkim” zamrożeniu (do około -10÷ -15°C) i suszeniu pod ciśnieniem atmosferycznym (określaną jako suszenie niskotemperaturowe). W metodzie tej prowadzi się suszenie produktu w temperze ujemnej do osiągnięcia przez materiał wilgotności krytycznej (odpowiadającej powstaniu sztywnego produktu, co ogranicza lub likwiduje skurcz), a następnie zwiększa się temperaturę procesu do kilku lub kilkunastu stopni Celsjusza i suszy produkt do osiągnięcia żądanej wilgotności końcowej [15]. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki wstępnych badań suszenia niskotemperaturowego, podczas których cały proces usuwania wody prowadzono w ujemnych wartościach temperatury. Suszenie niskotemperaturowe spowodowało zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej i zawartości polifenoli, jednak było ono nie tak istotne jak w przypadku suszenia konwekcyjnego, ale większe niż w suszu sublimacyjnym. Aktywność przeciwutleniająca obniżyła się o około 8–26%, zaś zawartość polifenoli w granicach 5–29%.



Rys. 3. Zależność między aktywnością przeciwutleniającą i zawartością polifenoli.

Fig. 3. Dependence between the antioxidant activity and the content of polyphenols.

W prezentowanej pracy we wszystkich metodach suszenia nie stwierdzono jednoznacznego wpływu wysokości temperatury na badane wskaźniki, co świadczy prawdopodobnie o tym, że poza temperaturą również czas procesu oraz stan wody w materiale odgrywają ważną rolę podczas przemian prowadzących do obniżenia zawartości polifenoli i związków decydujących o aktywności przeciwutleniającej ekstraktu otrzymanego z suszonych jabłek.

Przedstawione wyniki świadczą o tym, że w przypadku suszonych jabłek nie można stwierdzić istnienia korelacji pomiędzy zawartością związków polifenolowych a aktywnością przeciwutleniającą badanych materiałów (rys. 3).

## Wnioski

1. Najlepszą zdolność neutralizacji rodników wykazał ekstrakt z suszu sublimacyjnego. Zawartość związków polifenolowych oraz aktywność przeciwutleniająca, chociaż uległy nieznacznemu zmniejszeniu, były porównywalne do ekstraktów z materiału surowego.
2. Podczas suszenia konwekcyjnego aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z jabłek zmniejszyła się znacząco, osiągając 60–80% aktywności w surowcu przed suszeniem. Podobnie zawartość polifenoli uległa około 30–35% zmniejszeniu.
3. Suszenie niskotemperaturowe spowodowało zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej i zawartości polifenoli, jednak nie było ono tak istotne, jak w przypadku suszenia konwekcyjnego.
4. We wszystkich metodach suszenia nie stwierdzono jednoznacznego wpływu poziomu temperatury na badane wskaźniki jakości suszu.

Praca została wykonana w ramach grantu 4T 09C 04823, finansowanego przez KBN.

### Literatura

- [1] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset, C.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [2] Caro A., Piga A., Pinna I., Fenu P. M., Agabbio M.: Effect of drying conditions and storage and ascorbic acid of prunes. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 4780-4784.
- [3] Chin-Lin H., Weniung Ch., Yin-Ming W., Chin-Yin T.: Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as different drying methods. *Food Chem.*, 2003, **83**, 85-92.
- [4] Garcia-Alonso M., Pascual S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo C.: Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.*, 2004, **44**, 13-18.
- [5] Horubała A.: Pojemność przeciwutleniająca i jej zmiany w procesach przetwarzania owoców i warzyw. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1999, **3**, 30-32.
- [6] Leja M., Marecyek A., Ben J.: Antioxidant properties of apple cultivars during long-term storage. *Food Chem.*, 2003, **80**, 303-307.
- [7] Nindo C.I., Sun T., Wang S.W., Tang J., Powers J.R.: Evaluation of drying technologies for retention of physical quality and antioxidants in asparagus (*Asparagus officinalis*, L.). *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 2003, **36**, 507-516.
- [8] Raynal J., Moutounet M., Souquet J-M.: Intervention of phenolic compounds in plum technology. 1.Changes during drying. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **37**, 1046-1050.
- [9] Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventions R.M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 1999, **299**, 152-178.
- [10] Soong Y-Y., Barlow P.J.: Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.*, 2004, **88**, 411-417.
- [11] Sosnowska D., Wilska-Jeszka J.: Ocena aktywności antyoksydacyjnej flawonoidów w zależności do metody oznaczania. IV Konferencja Naukowa „Flawonoidy i ich zastosowanie” Rzeszów, 2002, s.159-165.
- [12] Sun J., Yi-Fang Ch., Xianzhong Wu: Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 7449-7454.
- [13] Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D.: Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4113-4117.
- [14] Wang H., Cao G., Prior R.L.: Total antioxidant captivity of fruits. *J. Agric. Chem.*, 1996, **44**, 701-705.
- [15] Żyła R., Witrowa- Rajchert D.: Niskotemperaturowe suszenie produktów spożywczych pod ciśnieniem atmosferycznym. *Inż. Apar. Chem.*, 2004, **43** (1), 3-6.

**THE INFLUENCE OF METHOD AND APPLES DRYING TEMPERATURE  
ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS PRODUCED  
FROM THOSE DRIED APPLES**

S u m m a r y

The objective of this paper was to determine the influence of different types of drying methods and of the apples drying temperatures on the antioxidant activity of extracts made from those dried apples. The highest capacity to neutralize free radicals was stated in the case of an extract produced from freeze-dried apples. A statistically significantly lower antioxidant activity of them, comparing to raw apples (the antioxidant activity was by 9% lower) was found only when a drying temperature at a shelf was 40°C. At the same time, the content of polyphenols in the dried apples, though irrelevantly decreased, did not statistically significantly differ from their content in the raw apples prior to drying. During the convective process of drying, the antioxidant activity of apples significantly decreased, and reached a level of 60 to 80% of the raw material activity. Similarly, the decrease in the content of polyphenols was approximately 30-35%. A low-temperature drying process also caused a decrease in the antioxidant activity, as well as in the content of polyphenols, however, this decrease was not as significant as in the case of drying at high temperatures, though, it was higher than in the case of a freeze-drying process. The antioxidant activity was reduced by about 8 to 27%, and the content of polyphenols by 5 to 9%. No unambiguous influence of the drying temperature level on the dried apples' quality factors was determined, irrespective of a drying method applied.

**Key words:** convective drying, freeze-drying, low-temperature drying, antioxidant activity, polyphenols 