



ŻYWNOŚĆ

Nauka Technologia Jakość

FOOD

Science Technology Quality

Nr 1 (92)

Kraków 2014

Rok 21

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Tadeusz Sikora; tel./fax. 12 293-50-54; e-mail: sikorat@uek.krakow.pl

Sekretarz redakcji (kontakt z autorami): dr Ewa Ślawska; tel. 12 662-48-30; e-mail: wnpttz@wp.pl

Redaktorzy: prof. dr hab. Włodzimierz Grajek (biotechnologia), prof. dr hab. Grażyna Jaworska (żywność pochodzenia roślinnego), prof. dr hab. Danuta Kolożyn-Krajewska (mikrobiologia, bezpieczeństwo i higiena żywności, żywność pochodzenia zwierzęcego), prof. dr hab. Bogusław Król (analiza i ocena żywności), prof. dr hab. Krzysztof Krygier (technologia tłuszczów, żywność funkcjonalna), prof. dr hab. Mieczysław Pałasiński (technologia węglowodanów), prof. dr hab. Tadeusz Sikora (jakość i bezpieczeństwo żywności, zarządzanie jakością, żywność pochodzenia zwierzęcego i towaroznawstwo żywności), prof. dr hab. Stefan Ziajka (technologia mleczarstwa, zarządzanie jakością)

Redaktor językowy (język polski): dr Anna Piechnik-Dębiec

Redaktor językowy (język angielski): mgr Teresa Tarkowska-Adi

Redaktor statystyczny: dr Antoni Goryl

Stali współpracownicy: dr Grażyna Morkis (Warszawa), dr inż. Magdalena Niewczas (Kraków), prof. dr hab. Maria Soral-Śmietana (Olsztyn)

Rada Naukowa: prof. dr Antoni Rutkowski (przewodniczący), dr hab. Kazimierz Dąbrowski (sekretarz), prof. dr hab. Barbara Baraniak, prof. dr hab. Nina Baryko-Pikielna, prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski, prof. dr hab. Józefa Chrzanowska, prof. dr hab. Janusz Czapski, prof. dr hab. Zbigniew Czarnecki, prof. dr Henryk Daun (USA), prof. dr hab. Teresa Fortuna, prof. dr hab. Mariola Friedrich, prof. dr hab. Jan Gawęcki, prof. dr hab. Stanisław Gwiazda, prof. dr Jerzy Jankun (USA), prof. dr hab. Józef Korolczuk (Francja), prof. dr hab. Henryk Kostyra, prof. dr hab. Andrzej Lenart, prof. dr hab. Zdzisława Libudzisz, prof. dr Marian Naczka (Kanada), prof. dr hab. Małgorzata Nogala-Kałucka, prof. dr hab. Jan Oszmiański, prof. dr Jan Pokorny (Czechy), prof. dr Roman Przybylski (Kanada), prof. dr hab. Piotr Przybyłowski, prof. dr hab. Bogusław Staniewski, dr Alina Surmacka-Szcześniak (USA), prof. dr hab. Krzysztof Surówka, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, dr Andrzej Sośnicki (USA), prof. dr hab. Zdzisław Targoński, prof. dr hab. Tadeusz Trziszka, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz, prof. dr hab. Erwin Wąsowicz, prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, dr John Wojciak (Kanada), prof. dr hab. Maria Wojtatowicz

Konsultanci naukowci: prof. dr hab. Zbigniew Duda, prof. dr hab. Adolf Horubała, prof. dr hab. Jan Kiszka, prof. dr hab. Helena Oberman

WYDAWCA: POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI, WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994 - 1999 wydawcą kwartalnika był Oddział Małopolski PTTŻ

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2014
Printed in Poland

Wydawanie publikacji dofinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

ISSN 1425-6959

Czasopismo w postaci wydrukowanej jest wersją główną (pierwotną)

ADRES REDAKCJI: 30-149 KRAKÓW, ul. Balicka 122

Projekt okładki: Jolanta Czarnecka
Zdjęcie na okładce: © mikelaptev-Fotolia.com

Nakład: 550 egz.

SKŁAD I DRUK:



Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków
tel./fax (012) 280-71-51; kom. 608 024 572
e-mail: wn@akapit.krakow.pl; www.akapit.krakow.pl

ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość

Organ naukowy PTTŻ – dwumiesięcznik

Nr 1 (92)

Kraków 2014

Rok 21

SPIS TREŚCI

Od Redakcji.....	3
ANNA WLAŻŁY, ZDZISŁAW TARGOŃSKI: Wykorzystanie oznaczeń stosunków stabilnych izotopów wybranych pierwiastków w ocenie autentyczności produktów pochodzących z upraw ekologicznych	5
MAREK SIWULSKI, KRZYSZTOF SOBIERALSKI, IWONA SAS-GOLAK: Wartość odżywcza i prozdrowotna grzybów	16
MONIKA WSZOŁEK, MAGDA FILIPCZAK-FIUTAK, JACEK DOMAGAŁA: Skład i właściwości mleka oślego.....	29
BEATA PASZCZYK, MARIA CZERNIEWICZ, WALDEMAR BRANDT: Skład kwasów tłuszczowych, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości kwasu <i>cis9trans11</i> C18:2 (CLA) oraz izomerów trans kwasu C18:1 i C18:2 w mleku oraz wyprodukowanych z niego kefirach i jogurtach	41
BARTOSZ SOŁOWIEJ, AGNIESZKA DYLEWSKA, MARTA TOMCZYŃSKA-MLEKO, STANISŁAW MLEKO: Wpływ skrobi modyfikowanych na teksturę i topliwość analogów serów topionych	52
JAROSŁAW KOWALIK, KAMIL ADAMCZEWSKI, STEFAN ZIAJKA: Szacowanie wzrostu liczby komórek <i>Listeria monocytogenes</i> w serze mozzarella z wykorzystaniem urządzenia impedymetrycznego	66
MAŁGORZATA KOWALSKA, ANNA ŻBIKOWSKA, KRZYSZTOF ŚMIECHOWSKI, KATARZYNA MARCINIAK-ŁUKASIAK: Wpływ ilości lecytyny słonecznikowej i czasu homogenizacji na stabilność emulsji spożywczej zawierającej olej z orzechów włoskich	78
ANNA ZADERNOWSKA, WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, LUCYNA KLĘBUKOWSKA: Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> jako alternatywna metoda oznaczania obecności pałeczek <i>Salmonella</i> sp. w mięsie drobiowym	92
BARBARA SIOŃEK, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, IZABELA PASTEROK: Przeżywalność bakterii o właściwościach probiotycznych w kielbasach surowo dojrzewających w czasie chłodniczego przechowywania	103
EWA JABŁOŃSKA-RYŚ, WALDEMAR GUSTAW, AGNIESZKA LATOCH: Ocena przydatności technologicznej wybranych odmian jabłek pod względem potencjału brązowienia	114
PAULINA NOWICKA, MIROŚŁAWA TELESZKO, ANETA WOJDYŁO, JAN OSZMIANSKI: Ocena walorów sensorycznych i wartości żywieniowej przecieru aroniowego z dodatkiem wyłtoków z lnu i suszonych liści stewii.....	124
AGNIESZKA SZPARAGA, ADAM KOPEĆ, EWA CZERWIŃSKA: Wpływ odwadniania osmotycznego i zamrażalniczego przechowywania na stan mikrobiologiczny śliwek rozmrażanych w komorze próżniowo-parowej	137
MAGDALENA JESZKA-SKOWRON, EWA FLACZYK, JOANNA KOBUS-CISOWSKA, ALICJA KOŚMIDER, DANUTA GÓRECKA: Optymalizacja procesu ekstrakcji związków fenolowych o aktywności przeciwnadciśnieniowej z liści morwy białej za pomocą metody płaszczyzny odpowiedzi (RSM)	148
BARTOSZ KRUSZEWSKI, ALEKSANDRA JEDLIŃSKA, MICHAŁ ANTCZAK, EDYTA LIPIŃSKA, DOROTA WITROWA-RAJCHERT: Nowa metoda otrzymywania proszków miodowych oraz ocena ich aktywności biologicznej	160
MAGDALENA FUJARCZUK, ANNA CZUBASZEK, AGATA WOJCIECHOWICZ-BUDZISZ, MIROŚŁAW ŻMIJEWSKI: Wpływ preparatów enzymatycznych i metody wypieku na wybrane cechy chleba pszenno-owsianego	173
STANISŁAW KOWALSKI, MARCIN LUKASIEWICZ: Wpływ warunków wypieku kruchych ciastek na powstawanie wybranych pochodnych furanowych oraz zmianę potencjału antyoksydacyjnego.....	187
DARIUSZ KIKUT-LIGAJ: Prognozowanie smaku gorzkiego chromonów i furochromonów na podstawie prostego modelu farmakoforowego (SPM)	200
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Interakcje składników żywności	215
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym	218
MAGDALENA NIEWCZAS: Nowe książki.....	220
Twórcy polskiej nauki o żywności.....	222
Technolog Żywności.....	226

Zamieszczone artykuły są recenzowane

Czasopismo jest referowane przez: Chemical Abstracts Service, IFIS, Scopus, Journal Citation Reports / Science Edition; Citation Index Expanded, AGRO, BazEkon, Index Copernicus

FOOD. Science. Technology. Quality

The Scientific Organ of Polish Food Technologists' Society (PTTŻ) – bimonthly

No 1 (92)

Kraków 2014

Vol. 21

CONTENTS

From the Editor.....	3
ANNA WLAZŁY, ZDZISŁAW TARGOŃSKI: Applying determined ratios of stable isotopes ratios in selected elements to evaluate authenticity of organically grown products	5
MAREK SIWULSKI, KRZYSZTOF SOBIERALSKI, IWONA SAS-GOLAK: Nutritive and health-promoting value of mushrooms	16
MONIKA WSZOŁEK, MAGD FILIPCZAK-FIUTAK, JACEK DOMAGAŁA: Composition and properties of donkey's milk.....	29
BEATA PASZCZYK, MARIA CZERNIEWICZ, WALDEMAR BRANDT: Fatty acid composition, with particular focus on content of <i>cis9trans11</i> C18:2 acid (CLA) and trans isomers of C18:1 i C18:2 acid, in milk and kefir & yoghurts produced from it	41
BARTOSZ SOŁOWIEJ, AGNIESZKA DYLEWSKA, MARTA TOMCZYŃSKA-MLEKO, STANISŁAW MLEKO: Effect of modified starches on texture and meltability of processed cheese analogues	52
JAROSŁAW KOWALIK, KAMIL ADAMCZEWSKI, STEFAN ZIAJKA: Estimating cell growth of <i>Listeria monocytogenes</i> in mozzarella cheese using impedimetric device.....	66
MAŁGORZATA KOWALSKA, ANNA ŻBIKOWSKA, KRZYSZTOF ŚMIECHOWSKI, KATARZYNA MARCINIAK-ŁUKASIAK: Effect of sunflower lecithin quantity and homogenization time on stability of food emulsion containing walnut oil.....	78
ANNA ZADERNOWSKA, WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, LUCYNA KLĘBUKOWSKA: Fluorescence <i>in situ</i> hybridization as alternative screening method for determining presence of <i>Salmonella</i> sp. in chicken meat	92
BARBARA SIOŃEK, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, IZABELA PASTERŃOK: Survival of bacteria with probiotic properties in dry fermented sausages during refrigerated storage.....	103
EWA JABŁOŃSKA-RYŚ, WALDEMAR GUSTAW, AGNIESZKA LATOCH: Assessing technological usefulness of selected apples varieties in terms of browning potential.....	114
PAULINA NOWICKA, MIROSŁAWA TELESZKO, ANETA WOJDYŁO, JAN OSZMIĄŃSKI: Assessment of sensory qualities and nutritional value of chokeberry puree with added flax pomace and dried leaves of stevia	124
AGNIESZKA SZPARAGA, ADAM KOPEĆ, EWA CZERWIŃSKA: Effect of osmotic dehydration and frozen storage on microbiological condition of plums defrosted in vacuum-steam chamber	137
MAGDALENA JESZKA-SKOWRON, EWA FLACZYK, JOANNA KOBUS-CISOWSKA, ALICJA KOŚMIDER, DANUTA GÓRECKA: Optimizing process of extracting phenolic compounds having antiradical activity from white mulberry leaves by means of response surface methodology (RSM).....	148
BARTOSZ KRUSZEWSKI, ALEKSANDRA JEDLIŃSKA, MICHAŁ ANT CZAK, EDYTA LIPIŃSKA, DOROTA WITROWA-RAJCHERT: Novel method of producing honey powders and assessment of their biological activity.....	160
MAGDALENA FUJARCZUK, ANNA CZUBASZEK, AGATA WOJCIECHOWICZ-BUDZISZ, MIROSŁAW ŻMIJEWSKI: Effect of enzymatic preparations and baking methods on selected parameters of wheat-oat bread.....	173
STANISŁAW KOWALSKI, MARCIN LUKASIEWICZ: Effect of baking conditions of shortbread-biscuits on formation of furan derivatives and on changes in antioxidant capacity.....	187
DARIUSZ KIKUT-LIGAJ: Predicting bitter taste of chromones and furochromones on the basis of simple pharmacophore model (SPM).....	200
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Interactions among food components.....	215
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish and EU legislation	218
MAGDALENA NIEWCZAS: Book reviews	220
Creators of the Polish food science.....	222
The Food Technologist.....	226

Only reviewed papers are published

*Covered by: Chemical Abstracts Service, and IFIS, and Scopus,
Journal Citation Reports / Science Edition; Citation Index Expanded, AGRO, BazEkon, Index Copernicus*

OD REDAKCJI

Szanowni Czytelnicy,

przekazujemy Państwu numer **1 (92)** dwumiesięcznika **Żywność. Nauka. Technologia. Jakość**, w którym zamieściliśmy różnorodnie tematycznie artykuły naukowe, prezentujące dorobek kilku krajowych ośrodków nauki o żywności. Jak w każdym numerze, zamieściliśmy także interesujące informacje w stałych działach.

Biorąc do ręki ten numer naszego czasopisma zauważyliście Państwo nową szatę graficzną okładki. Mam nadzieję, że będzie zaakceptowana przez naszych Czytelników.


W ramach ułatwiania dostępu do publikacji, na stronie internetowej czasopisma zamieściliśmy wyszukiwarkę, która umożliwi odszukanie interesujących Państwa artykułów, opublikowanych w **Żywności** od 2004 r.

Informujemy również, że podjęliśmy kolejne działania nad zwiększeniem zasięgu naszego czasopisma. Od bieżącego roku wprowadziliśmy **Żywność** do bazy Publisher International Linking Association/CrossRef (USA), dzięki czemu artykuły będą miały nadawany identyfikator dokumentu elektronicznego tzw. DOI.

Powtarzamy apel, w dobrze pojętym naszym wspólnym interesie: **cytujmy polskich autorów publikujących w Żywności** w artykułach kierowanych do czasopism zagranicznych! Zwracajmy także większą uwagę na cytowanie artykułów wcześniej opublikowanych w **Żywności**, w opracowaniach nadsyłanych do redakcji.

Kraków, luty 2014 r.

Redaktor Naczelny



Tadeusz Sikora

ANNA WLAZŁY, ZDZISŁAW TARGOŃSKI

WYKORZYSTANIE OZNACZEŃ STOSUNKÓW STABILNYCH IZOTOPÓW WYBRANYCH PIERWIASTKÓW W OCENIE AUTENTYCZNOŚCI PRODUKTÓW POCHODZĄCYCH Z UPRAW EKOLOGICZNYCH

Streszczenie

W artykule przedstawiono stan badań dotyczący stosunków stabilnych izotopów węgla i azotu w różnych artykułach spożywczych (warzywach, owocach, mięsie, mleku), które były produkowane metodami tradycyjnymi i ekologicznymi. Miara ilości ciężkiego i lekkiego izotopu w próbce oznaczana jest jako wartość δ . Na wartość $\delta^{15}\text{N}$ w warzywach i owocach ma wpływ między innymi rodzaj gleby, rodzaj nawożenia, poprzedni sposób użytkowania pola. Metody polegające na oznaczaniu wartości $\delta^{15}\text{N}$ lub $\delta^{13}\text{C}$ mogą być przydatne do odróżniania żywności ekologicznej i tradycyjnej, nie jest to jednak zasada, która dotyczy wszystkich produktów.

Słowa kluczowe: izotopy, ^{15}N , ^{13}C , uprawa ekologiczna, autentyczność produktów

Wprowadzenie

Wzrasta zainteresowanie żywnością ekologiczną, uznawaną za bardziej bezpieczną dla zdrowia człowieka [5, 12, 25]. Produkcja żywności ekologicznej wyklucza możliwość stosowania pestycydów i nawozów mineralnych, a dopuszcza stosowanie nawozów organicznych [20]. Poszukuje się więc bardziej nowoczesnych metod umożliwiających sprawdzanie autentyczności produktów żywnościowych deklarowanych jako ekologiczne. Coraz większe zastosowanie zyskują metody bazujące na wyznaczeniu stosunków stałych izotopów pierwiastków w celu m.in. kontroli autentyczności produktów spożywczych, w tym także ich pochodzenia [24]. Wyznaczanie stosunków stabilnych izotopów węgla i azotu w różnych warzywach, mięsie i mleku jest również wykorzystywane do odróżnienia żywności produkowanej w warunkach ekologicznych od produkowanej metodami tradycyjnymi.

Mgr inż. A. Wlazły, prof. dr hab. Z. Targoński, Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-950 Lublin. Kontakt: a.wlazly75@wp.eu

W przedstawionym przeglądzie piśmiennictwa omówiono stan badań nad oznaczeniami stosunków stabilnych izotopów węgla i azotu w artykułach żywnościowych, które były produkowane w różnych warunkach środowiska. Ponadto oceniono przydatność wyznaczania stosunków stabilnych izotopów pierwiastków do odróżniania żywności ekologicznej od tradycyjnej.

Izotopy to odmiany pierwiastka chemicznego, które różnią się liczbą neutronów w jądrze atomu, natomiast liczba protonów pozostaje taka sama, co powoduje różnicę w wartości liczby masowej. Izotopy danego pierwiastka chemicznego zazwyczaj mają podobne właściwości fizyczne i chemiczne. Ze względu na stabilność izotopy dzieli się na trwałe (stabilne) i nietrwałe (niestabilne). Izotopy trwałe nie będą ulegały samorzutnej przemianie do izotopów innego pierwiastka lub tego samego, natomiast izotopy nietrwałe (promieniotwórcze) ulegają przemianie do innych izotopów. Do najczęściej wykorzystywanych izotopów pierwiastków w badaniach żywności należą izotopy wodoru (H), tlenu (O), azotu (N), węgla (C) i siarki (S). Pierwiastki te mają następujące izotopy : ^1H , ^2H , ^3H , ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{14}N , ^{15}N , ^{12}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S [10].

Pierwiastki i ich izotopy występują w różnych stężeniach zarówno w biosferze, jak również w roślinach, zwierzętach i w glebie [13]. W badaniach nad rozkładem izotopów w przyrodzie ważnym pojęciem jest ich frakcjonowanie. Każda roślina ma swój jedyny układ naturalnie występujących izotopów węgla, azotu, wodoru i tlenu, na którego rozmieszczenie wpływają fizyczne i biochemiczne właściwości oraz warunki klimatyczne [19]. Ze względu na niewielkie różnice stosunków izotopów w analizowanych próbkach materiału organicznego, zamiast prostych stosunków wprowadzono określenie zależności w stosunku do międzynarodowego standardu tzw. PDB – standard otrzymany z próbki *Belemnite* z Karoliny (USA). Ponieważ oryginalna próbka nie jest dostępna, zastąpiono ją próbką wiedeńską VPDB.

Wartość $\delta^{15}\text{N}$ (‰) oblicza się z równania [1]:

$$\delta^{15}\text{N} \left(\text{‰} \right) = \left[\frac{R_{\text{próbki}}}{R_{\text{standardu}}} - 1 \right] \cdot 1000$$

gdzie: R oznacza $\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$, a standardem jest azot atmosferyczny ze stosunkiem $\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} = 0,00368$ i $\delta^{15}\text{N} = 0 \text{ ‰}$

Wartość $\delta^{13}\text{C}$ (‰) obliczana jest również z tego równania, przy czym $R = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$,

a standardem jest VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite).

Wartości δ są miarą zawartości ciężkiego i lekkiego izotopu w próbce. Wzrost tej wartości oznacza wzrost ilości ciężkiego izotopu, natomiast obniżenie wartości δ oznacza zmniejszenie zawartości ciężkiego izotopu. Wiele czynników ma wpływ na stosunki ciężkiego do lekkiego izotopu, są to na ogół zmiany małe, rzędu kilku promili, chociaż możliwe są też duże zmiany rzędu 100 ‰. Do wyznaczania wartości δ wykorzystywane są spektrometry masowe, a próbki trzeba przeprowadzić w stan gazowy.

Wyznaczenie $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{13}\text{C}$ w produktach z upraw ekologicznych i tradycyjnych

Wyznaczanie stosunków stabilnych izotopów węgla tj. ^{12}C i ^{13}C wykorzystuje się do odróżnienia składników roślin C-3 od roślin C-4. Rośliny C-4 charakteryzują się wartościami $\delta^{13}\text{C}$ mieszczącymi się w przedziale 9 - 14 ‰, zaś rośliny C-3 w zakresie 20 - 35 ‰. Do pierwszej grupy roślin zalicza się m.in. kukurydzę i trzcinę cukrową, a do drugiej m.in. pszenicę i buraki cukrowe.

Stosunek izotopów azotu w atmosferze przyjęto jako równy 0 ‰. Jest on jednak różny dla różnych roślin. Rośliny nasion strączkowych żyjące w symbiozie z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny charakteryzuje niższy stosunek izotopów azotu niż rośliny wykorzystujące nieorganiczne związki azotowe. Zróżnicowane zawartości izotopów w tych roślinach przekładają się na odmienne zawartości izotopów azotu u zwierząt spożywających pasze składające się w głównej mierze z nasion roślin strączkowych w stosunku do pasz zbożowych.

Istnieje wiele czynników, które mogą wpływać na wartość $\delta^{15}\text{N}$ w warzywach czy owocach, należą do nich m.in. rodzaj gleby, sposób poprzedniego użytkowania pola, zmiany w praktykach rolniczych [2]. Na wartość $\delta^{15}\text{N}$ w glebie ma także wpływ poziom jej wilgotności, o czym informują Choi i wsp. [9].

W przypadku produkcji roślin metodami konwencjonalnymi najczęściej stosuje się nawozy mineralne, które nie są używane w produkcji ekologicznej. Nawozy te charakteryzują się wartością $\delta^{15}\text{N}$ bliską zeru, zazwyczaj są to wartości pomiędzy -2 a 2 ‰ [2]. Natomiast w produkcji organicznej stosuje się kompost, nawóz pochodzący od zwierząt, nawóz zielony, który jest bardziej zasobny w ^{15}N i wyznaczone wartości $\delta^{15}\text{N}$ najczęściej wahają się pomiędzy 6 a 15 ‰ [8, 15]. Ze względu na te różnice w wielu krajach podjęto badania w celu odpowiedzi na pytanie, czy rodzaj zastosowanego nawozu (o różnym poziomie $\delta^{15}\text{N}$) będzie przenosił się na wartości $\delta^{15}\text{N}$ w roślinach.

Bateman i wsp. [2] oznaczyli zawartości $\delta^{15}\text{N}$ w pomidorach, sałacie i marchwi pochodzących z komercyjnych upraw konwencjonalnych, jak i z upraw, w których stosowano tylko nawozy organiczne. Sałata, która rosła w warunkach konwencjonalnych wykazywała niższy poziom $\delta^{15}\text{N}$ w porównaniu z sałatą nawożoną organicznie, dla której najniższa wartość wynosiła 0,8 ‰. W 30 % sałaty produkowanej w sposób konwencjonalny wyznaczone wartości $\delta^{15}\text{N}$ były poniżej tej wartości. $\delta^{15}\text{N}$ w przypadku sałaty nawożonej nawozami organicznymi wynosił 7,6 ‰, a nawożonej chemicznie

– 2,9 ‰. Natomiast pomidory pochodzące z upraw nawożonych nawozami organicznymi charakteryzowały się większą wartością $\delta^{15}\text{N} = 8,1$ ‰ niż produkowane metodami tradycyjnymi, gdzie średnia wartość wynosiła -0,1 ‰. Pomimo różnic w średnich wartościach $\delta^{15}\text{N}$ w uprawach pomidorów i sałaty w odmiennych systemach, występowała zgodność w poziomie wartości $\delta^{15}\text{N}$ zarówno w przypadku upraw konwencjonalnych, jak i organicznych. W przypadku marchwi z upraw nawożonych organicznie, w porównaniu z nawożonymi konwencjonalnie, nie stwierdzono różnic w wartości $\delta^{15}\text{N}$. Wyniki te uzasadniano wyższym zapotrzebowaniem marchwi na azot [2, 16] w porównaniu z sałatą i pomidorami oraz różnicami w uprawie, gdyż sałata i pomidory były najpierw kielkowane i flancowane, zanim zostały przesadzone do uprawy właściwej.

Šturm i wsp. [23] oceniali, jak rodzaj nawożenia wpływa na poziom $\delta^{15}\text{N}$ w warzywach. Poletka z sałatą nawożono różnymi sposobami, używając: tylko nawozu organicznego (O) w jednej dawce, tylko nawozu mineralnego (S) w jednej dawce oraz rozdzielono podanie nawozu na dwie części w konfiguracjach – S+S, O+O, S+O, O+S. Najwyższą wartość $\delta^{15}\text{N}$ (po 50 dniach wzrostu) stwierdzono w próbce sałaty, do uprawy której zastosowano tylko pojedynczą dawkę nawozu organicznego, a najniższą w próbce z zastosowaniem nawozu mineralnego podzielonego na dwie dawki (S+S) i podobnie, gdy użyto pojedynczej dawki nawozu mineralnego. Uzyskano więc wynik potwierdzający tezę, że rodzaj nawożenia ma wpływ na wartość $\delta^{15}\text{N}$. Zainteresowanie naukowców zostało również skierowane na problematykę poziomu $\delta^{15}\text{N}$ w zależności od czasu, jaki upłynął od momentu posadzenia sałaty do jej zbioru. Określono wartości $\delta^{15}\text{N}$ po 20, 30 i 50 dniach od przesadzenia sałaty. Zauważono, że czas zbioru również wpływa na $\delta^{15}\text{N}$, gdyż próbki sałaty nawożone w układach O, O+O, O+S wykazywały niższe wartości z upływem czasu, natomiast w układach S, S+S, S+O wartość $\delta^{15}\text{N}$ była na zbliżonym poziomie. Wnioski te po części są zbieżne z obserwacjami Rogersa [21], który określał wartości $\delta^{15}\text{N}$ w ośmiu warzywach (ziemniakach, ogórkach, cukinii, pomidorach, groszku, brokułach, dyni, bakłażanach) pochodzących ze sklepów z żywnością produkowaną z zastosowaniem nawozów organicznych i ich odpowiednikami z upraw konwencjonalnych, pochodzących z masowej produkcji. Obliczone wartości $\Delta^{15}\text{N}_{[\text{org-nieorg}]}$ wahały się w przedziale od 0,1 do 9,6 ‰. Najniższą wartością $\Delta^{15}\text{N}$ charakteryzował się groszek, zaś najwyższą – ogórek. Na tej podstawie sformułowano wniosek, że różnice te mają związek z zastosowanym nawozem [21, 26]. Podczas prowadzonych analiz zauważono też, że rośliny, które mają krótszy okres wegetacji charakteryzują się wyższą wartością $\Delta^{15}\text{N}_{[\text{org-nieorg}]}$ (z wyłączeniem groszku), co wynika z tego, że rośliny te szybko przyswajają azot z podłoża. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że oznaczenie stabilnego izotopu azotu może służyć do rozróżnienia warzyw z plantacji organicznych i konwencjonalnych, jeżeli nie są to rośliny

wiążące azot atmosferyczny (np. groszek), bo czerpią one azot bardziej z powietrza niż z gleby.

Na zawartość azotu w roślinie wpływa zawartość azotu w glebie, a ta z kolei jest powiązana z zastosowanym nawożeniem [8, 23, 27, 28]. Ilość zastosowanego nawozu również wpływała na wartość $\delta^{15}\text{N}$, co wykazali Georgi i wsp. [14]. Skupili się oni na oznaczeniu wartości $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{13}\text{C}$ w warzywach (sałacie, cebuli, kapuście), stosując optymalne i zredukowane (stanowiące 65 % optymalnej wartości) dawki nawozu. Plantacje organiczne nawożone były nawozem zielonym i mączką z rogów zwierząt, natomiast plantacje zintegrowane nawożone były azotanem(V) amonu, związkami fosforu i potasu. Warzywa z produkcji organicznej charakteryzowały się wyższymi wartościami $\delta^{15}\text{N}$, a różnica ta była największa, gdy zastosowano optymalną dawkę nawozu, jeżeli zaś dawka azotu była obniżona, różnice te były mniejsze. W przypadku kapusty chińskiej nie wykazano różnic. Po przeanalizowaniu wartości $\delta^{13}\text{C}$ poszczególnych warzyw zauważono, że sposób produkcji nie wpływał znacząco na oznaczanie wartości $\delta^{13}\text{C}$, chociaż warzywa z produkcji organicznej charakteryzowały się nieznacznie niższymi wartościami.

Choi i wsp. [8] potwierdzają również większą zawartość $\delta^{15}\text{N}$ w warzywach nawożonych nawozami organicznymi. Były to różnice rzędu 3,85 - 10,1 % w zależności od warzywa. Oznaczenia przeprowadzono w sałacie, kapuście, bakłażanach, papryce, szpinaku i ogórkach. Wartości $\delta^{15}\text{N}$ papryki z produkcji organicznej zawierały się w zakresie 13,6 - 15,3 ‰, a nawożonej nawozami mineralnymi – od 3,7 do 5,3 ‰. Różnice te tłumaczą wyższą wartością $\delta^{15}\text{N}$ w glebie nawożonej organicznie.

Nakano i wsp. [18] nawozili pomidory trzema sposobami, przy użyciu: 1) tylko nawozu mineralnego granulowanego, 2) tylko płynnego nawozu nieorganicznego, 3) organicznego nawozu otrzymanego z kukurydzy (CLS-corn steep liquor). Rodzaj zastosowanego nawozu nie miał znaczącego wpływu na wielkość plonu, gdyż na każdym z pól uzyskano zbliżoną masę warzyw. Natomiast wartość $\delta^{15}\text{N}$ w owocach pomidorów rosnących w warunkach nawożenia nawozami organicznymi była najwyższa i wynosiła 7 ‰. Wartości $\delta^{13}\text{C}$ oznaczone w pomidorach we wszystkich przypadkach były bardzo zbliżone do siebie. Na tej podstawie sformułowano wnioski, że roślina czerpie węgiel z węgla atmosferycznego, a nie z gleby czy z zastosowanego nawozu, a wartość $\delta^{15}\text{N}$ może być wskaźnikiem do odróżniania rodzaju produkcji warzyw.

Oznaczeń izotopów ^{15}N , i ^{13}C podjęli się również Camin i wsp. [6] oraz Flores i wsp. [11]. W pierwszym przypadku oznaczeniom poddano ziemniaki pochodzące z profesjonalnych upraw organicznych według określonych zasad (rozporządzenie Rady UE 2092/91) i upraw konwencjonalnych, ale takich, w produkcji których uwzględniano przestrzeganie określonych procedur (rozporządzenie Rady WE nr 2200/96). Ziemniaki z upraw organicznych zawsze charakteryzowały się wyższymi wartościami $\delta^{15}\text{N}$ niż z upraw konwencjonalnych. Różnice te wynosiły od 1,57 do

6,58 ‰ w zależności od odmiany i roku badań. Wartość $\delta^{13}\text{C}$ nie była natomiast uzależniona od rodzaju uprawy. W drugim przypadku przeprowadzono eksperyment polegający na nawożeniu jednej części papryki tylko nawozami organicznymi, a drugiej tylko nawozami mineralnymi, przy czym obie części były tak samo podlewane. Owoce papryki nawożone chemicznie wykazywały niższe wartości $\delta^{15}\text{N}$ niż nawożone organicznie, co koreluje z wartościami $\delta^{15}\text{N}$ w nawozie, wyższymi w przypadku nawozu organicznego niż syntetycznego.

Na wartości $\delta^{15}\text{N}$ wyznaczone w warzywach wpływ miał rodzaj wody użytej do podlewania, a także rodzaj podłoża, na którym rosły warzywa, co wykazali Bateman i wsp. [1]. Zbadano wpływ rodzaju podłoża do uprawy (torf lub kora przerobiona na kompost) na wartość $\delta^{15}\text{N}$. Stwierdzono, że rodzaj podłoża miał wpływ na wartości $\delta^{15}\text{N}$, gdyż w przypadku braku nawożenia pomidory uprawiane w torfie miały wartość $\delta^{15}\text{N}$ przeciętnie o 5 ‰ niższe niż uprawiane w korze przerobionej na kompost. Również rodzaj zastosowanego nawozu wpływał na wielkość $\delta^{15}\text{N}$, która była wyższa w przypadku nawożenia nawozami organicznymi, niezależnie od tego, na jakim podłożu rosły pomidory, przy czym różnica ta była wyższa w przypadku upraw w podłożu z kompostowanej kory. Rodzaj wody (wodociągowa i dejonizowana) miał wpływ na poziom $\delta^{15}\text{N}$ w przypadku, gdy do uprawy sałaty nie użyto żadnego nawozu lub gdy stosowano nawóz organiczny, czego nie zauważono przy zastosowaniu nawozu sztucznego. Potwierdzeniem różnic pod względem wartości $\delta^{15}\text{N}$ w zależności od zastosowanego nawożenia były wyniki uzyskane w przypadku marchwi, gdzie $\delta^{15}\text{N}$ była niższa o od 3,2 do 4 ‰ w marchwi z uprawy nawożonej azotanem(V) amonu, w porównaniu z marchwią nawożoną organicznie (*pelleted chicken manure*).

We Włoszech podjęto badania mające na celu charakterystykę składu izotopowego azotu owoców z produkcji organicznych [7, 20]. Prace te dotyczyły pomarańczy [7, 20] oraz truskawek, mandarynek i brzoskwiń [7]. Wartości $\delta^{15}\text{N}$ oznaczono w białku z mięszu owoców i w aminokwasach w soku [20]. Prace prowadzono przez 3 lata. Gospodarstwa dobrano tak, aby warunki środowiskowe były takie same zarówno w przypadku upraw organicznych, jak i konwencjonalnych. We wszystkich wariantach $\delta^{15}\text{N}$ była statystycznie wyższa w owocach pochodzących z upraw nawożonych organicznie. Stwierdzono, że takie wyniki badań związane są z tym, że nawozy organiczne powodują zwiększenie poziomu ^{15}N w glebie, a to sprzyja wzrostowi $\delta^{15}\text{N}$ w owocach. Różnice $\delta^{15}\text{N}$ w przypadku pomarańczy wahały się w zakresie od 1,06 do 1,78 ‰ w zależności od odmiany oraz oznaczania $\delta^{15}\text{N}$ w soku czy też w mięszu. Po przeprowadzeniu analiz składu izotopowego azotu truskawek, pomarańczy, brzoskwiń i mandarynek w latach 2006 - 2008 we Włoszech [7] sformułowano wniosek, że wartość $\delta^{15}\text{N}$ może być wykorzystana przy ocenie ww. owoców z gospodarstw ekologicznych oraz tradycyjnych i że jest najmniej zależna od roku produkcji i miejsca położenia upraw. Wskaźnik ten może być jednak używany, jeżeli do upraw konwencjo-

nalnych nie będzie stosowany nawóz organiczny (co nie jest zabronione), a uprawy organiczne nie będą nawożone nawozem uzyskanym z roślin strączkowych. Na podstawie wartości $\delta^{13}\text{C}$ można było rozróżnić jedynie uprawy brzoskwiń i truskawek, gdzie znacząco niższe wartości uzyskano tylko w przypadku brzoskwiń w 2007 i 2008 roku z upraw organicznych. Przyczynę niższej wartości wyjaśniano tym, że gleby w uprawach organicznych mają wyższą aktywność mikrobiologiczną, co opisywano wcześniej w literaturze [14]. Ostatecznie stwierdzono, że wartość $\delta^{13}\text{C}$ nie jest dobrym wskaźnikiem odróżniającym owoce z produkcji organicznej od tradycyjnej, a w dużej mierze zależy ona od miejsca produkcji.

Oznaczenia izotopowe mleka

Oznaczenie stabilnych izotopów węgla i azotu w celu odróżnienia mleka z hodowli konwencjonalnej i ekologicznej zostały przeprowadzone przez Molentina i wsp. [17]. Oznaczone wartości $\delta^{13}\text{C}$ w próbkach mleka ze sprzedaży detalicznej wykazywały różnice w zależności od rodzaju mleka. Wartości $\delta^{13}\text{C}$ mleka pochodzącego z produkcji konwencjonalnej wynosiły $-26,6\text{‰}$ lub wyżej, natomiast z produkcji organicznej $\delta^{13}\text{C}$ była niższa, a maksimum było równe -28‰ . Różnice te wynikają z proporcji roślin typu C_3 i C_4 w karmie dla krów. W konwencjonalnej produkcji podstawowa pasza dla krów składa się w 60 % z kukurydzy (która jest rośliną typu C_4), natomiast w organicznej produkcji używa się jedynie niewielkiej ilości kukurydzy. Dlatego też oznaczenie wartości $\delta^{13}\text{C}$ może stanowić podstawę dla odróżnienia pochodzenia mleka.

Wartości $\delta^{15}\text{N}$ mleka pochodzącego od krów karmionych paszą z upraw konwencjonalnych i z produkcji organicznej pokrywały się, chociaż spodziewano się, że mleko z produkcji organicznej będzie wykazywało wyższe wartości $\delta^{15}\text{N}$ ze względu na użyte nawozy do produkcji paszy. W mleku tym zaobserwowano jednak niższą wartość $\delta^{15}\text{N}$, co tłumaczono spożywaniem przez krowy większej ilości roślin strączkowych czy koniczyny, a rośliny te wiążą azot atmosferyczny, w którym wartość $\delta^{15}\text{N} = 0$, natomiast inne rośliny wiążą azot z gleby. Dlatego też sama wartość $\delta^{15}\text{N}$ nie umożliwia odróżnienia mleka z produkcji konwencjonalnej od mleka z produkcji organicznej.

Oznaczenia izotopowe mięsa

Oznaczenia stabilnych izotopów węgla, azotu i siarki dokonano w celu sprawdzenia przydatności tej metody do odróżnienia wołowiny pochodzącej z produkcji organicznej od konwencjonalnej [4, 22], a także określenia pochodzenia geograficznego [22]. Porównując wołowinę amerykańską i europejską zauważono duże różnice w wartości $\delta^{13}\text{C}$. Wołowina pochodząca z Irlandii miała wartość $\delta^{13}\text{C} = -24,5\text{‰}$, a pozostała europejska wołowina – $\delta^{13}\text{C} = -21,6\text{‰}$. Natomiast wołowina pochodząca ze Stanów Zjednoczonych wykazywała wartość $\delta^{13}\text{C} = -12,3\text{‰}$, a z Brazylii $\delta^{13}\text{C} = -10\text{‰}$. Róż-

nice te wynikają z rodzaju paszy, którą były karmione zwierzęta. W Europie pasza zawierała więcej roślin typu C₃, natomiast w Ameryce więcej było w paszy roślin typu C₄ (np. kukurydzy). Schmidt i wsp. [22] zbadali możliwości odróżnienia wołowiny

Tabela 1. Wartości $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{13}\text{C}$ wybranych produktów z produkcji organicznej i konwencjonalnej.
Table 1. Values of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in some products from organic and conventional production.

Produkt Product	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]		$\delta^{13}\text{C}$ [‰]		Źródło Reference
	Produkcja organiczna Organic production	Produkcja nieorganiczna Non-organic production	Produkcja organiczna Organic production	Produkcja nieorganiczna Non-organic production	
Ogórek Cucumber	12,3	2,7	-26	-28,1	[21]
	13,3	3,25	-	-	[8]
Groszek Peas	0,3	0,2	-25,7	-28,1	[21]
Ziemniak Potato	4,3	0,9	-27,0	-24,5	[21]
	5,68 - 10,34	2,23 - 4,13	-	-	[6]
Brokuł Broccoli	12,2	4,3	-27,3	-28,6	[21]
Cebula Onion	7,0	6,4	-26,1	-26,1	[14]
Sałata Lettuce	6,7	6,7	-26,0	-26,2	[14]
	13,4	3,25	-	-	[8]
Kapusta Cabbage	6,7	6,4	-25,3	-26,4	[14]
Papryka Pepper	14,45	4,7	-	-	[8]
	11,3	6,7	-27,49	-26,8	[11]
Szpinak Spinach	9,5	5,6	-	-	[8]
Pomidor Tomato	7,09	0,3	-	-	[18]
Pomarańcza Orange	8,0	7,1	-26,4	-26,3	[7]
Brzoskwinia Peach	2,4	0,9	-25,9	-25,6	[7]
Truskawka Strawberry	1,2	0,6	-24,4	-24,6	[7]
Mleko Milk	-	-	-28	-26,6	[17]
Wołowina Beef	6,6	7,8	-26,0	-24,5	[22]

z produkcji konwencjonalnej od wołowiny z produkcji organicznej na podstawie oznaczeń stosunku stabilnych izotopów C, N, i S. Wartość $\delta^{13}\text{C}$ była niższa w przypadku wołowiny z produkcji organicznej (wynosiła -26‰) niż z produkcji konwencjonalnej ($\delta^{13}\text{C} = -24,5\text{‰}$). Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że w hodowli organicznej stosowano więcej trawy jako paszy, która ma niższą wartość $\delta^{13}\text{C}$ niż inna pasza. Natomiast wartość $\delta^{15}\text{N}$ była również niższa w przypadku wołowiny z produkcji organicznej i wynosiła $6,6\text{‰}$, podczas gdy wołowina pochodząca z produkcji konwencjonalnej miała wartość $\delta^{15}\text{N} = 7,8\text{‰}$. Różnice w wartości $\delta^{34}\text{S}$ były bardzo niewielkie. Wołowina produkowana organicznie miała wartość $\delta^{34}\text{S} = 7,9\text{‰}$, a produkowana konwencjonalnie $-7,2\text{‰}$.

Oznaczenia przeprowadzane przez Bonera i wsp. [4] potwierdzają, że wartość $\delta^{13}\text{C}$ może służyć do odróżnienia mięsa z hodowli ekologicznych od mięsa z hodowli konwencjonalnych. Rolnictwo konwencjonalne stosuje głównie kukurydzę jako paszę dla zwierząt, aby uzyskać szybszy wzrost, natomiast w rolnictwie organicznym kukurydzę stosuje się bardzo rzadko lub nie stosuje jej się wcale. Dlatego też mięso ekologiczne wykazuje niższą wartość $\delta^{13}\text{C}$ niż mięso konwencjonalne.

Uzyskane dotychczas wybrane wyniki oznaczeń izotopowych na świecie przedstawiono w tab. 1.

Podsumowanie

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa można stwierdzić, że metody pomiaru stosunków stabilnych izotopów węgla i azotu w żywności mogą być wykorzystane do odróżnienia żywności pochodzącej z gospodarstw ekologicznych od żywności pochodzącej z upraw tradycyjnych. Nie jest to jednak zasada dotycząca wszystkich warzyw i owoców. Dlatego też są konieczne szczegółowe badania każdego produktu w różnych warunkach uprawy, by dokonać oceny przydatności ww. metody do sprawdzenia czy żywność deklarowana jako ekologiczna rzeczywiście nią jest. Istnieje potrzeba dalszych badań potwierdzających uzyskane dotychczas wyniki. W Polsce zostały wdrożone uznane metody izotopowej kontroli win, miodów i soków [3], natomiast brakuje badań nad oznaczeniami izotopów N i C w warzywach czy owocach.

Literatura

- [1] Bateman A.S., Kelly S.D., Jickells T.D.: Nitrogen isotope relationships between crops and fertilizer: implications for using nitrogen isotope analysis as an indicator of agricultural regime. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 5760-5765.
- [2] Bateman S.A., Kelly S.D., Woolfe M.: Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 2664-2670.
- [3] Bezpieczna Żywność. [online]. Inst. Chemii i Techn. Jądrowej.. Dostępne w Internecie [27.08.2012]: www.ichtj.waw.pl/drupal/?q=node/357


- [4] Boner M., Förstel H.: Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 301-310.
- [5] Brandt K., Molgaard J.P.: Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? *J. Sci. Food Agric.*, 2001, **81**, 924-931.
- [6] Camin F., Moschella A., Miselli F., Parisi B., Versini G., Ranalli P., Bagnaresi P.: Evaluation of markers for the traceability of potato tubers grown in an organic **versus** conventional regime. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **87**, 1330-1336.
- [7] Camin F., Perini M., Bontempo L., Fabroni S., Faedi W., Magnani S., Baruzzi G., Bonoli M., Tabilio M.R., Musmeci S., Rossmann A., Kelly S.D., Rapisarda P.: Potential isotopic and chemical markers for characterising organic fruits. *Food Chemistry*, 2011, **125**, 1072-1082.
- [8] Choi W.J., Ro H.M., Hobbie E.A.: Patterns of natural ^{15}N in soils and plants from chemically and organically fertilized uplands. *Soil Biol. Biochem.*, 2003, **35**, 1493-1500.
- [9] Choi W.J., Ro H.M., Lee S.M.: Natural ^{15}N abundances of inorganic nitrogen in soil treated with fertilizer and compost under changing soil moisture regimes. *Soil Biol. Biochem.*, 2003, **35**, 1289-1298.
- [10] Czerwiński A.: *Energia jądrowa i promieniotwórczość*. Oficyna Edukacyjna, Warszawa 1998.
- [11] Flores P., Fenoll J., Hellín P.: The feasibility of using $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for discriminating between conventionally and organically fertilized pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 5740-5745.
- [12] Förstel H.: The natural fingerprint of stable isotopes use of IRMS to test food authenticity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 541-544.
- [13] Fry B.: *Stable Isotope Ecology*. Ed. Springer, New York, USA, 2006.
- [14] Georgi M., Voerkelius S., Rossmann A., Graßmann J., Schnitzler W.H.: Multielement isotope ratios of vegetables from integrated and organic production. *Plant and Soil*, 2005, **275**, 93-100.
- [15] Hübner H.: Isotope effects of nitrogen in the soil and biosphere. In *Handbook of Environment* Eds. P. Fritz and J. C. Fontes. Elsevier Science Publisher, Amsterdam 1986, pp. 361-425.
- [16] Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Fertiliser Recommendations for Agricultural and Horticultural Crops. (RB 209) The Stationery Office: London, UK, 2000.
- [17] Molkontin J., Giesemann A.: Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acid analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 297-305.
- [18] Nakano A., Uehara Y., Yamauchi A.: Effect of organic and inorganic fertigation on yields, $\delta^{15}\text{N}$ values, and $\delta^{13}\text{C}$ values of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Saturn). *Plant and Soil*, 2003, **255**, 343-349.
- [19] Ogrinc N., Košir I.J., Spangenberg J.E., Kidrič J.: The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit Juices and olive oil. A review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 424-430.
- [20] Rapisarda P., Calabretta M.L., Romano G., Intrigliolo F.: Nitrogen metabolism components as a tool to discriminate between organic and conventional citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 2664-2669.
- [21] Rogers K.M.: Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from New Zealand. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 4078-4083.
- [22] Schmidt O., Quilter J.M., Bahar B., Moloney A.P., Scrimgeour C.M., Begley I.S., Monahan F.J.: Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. *Food Chem.*, 2005, **91**, 545-545.
- [23] Šturm M., Kacjan-Maršič N., Lojen S.: Can $\delta^{15}\text{N}$ in lettuce tissues reveal the use of synthetic nitrogen fertiliser in organic production? *J. Sci. Food Agric.*, 2011, **91**, 262-267.
- [24] Wierzchnicki R.: Żywność pod kontrolą izotopową. *Przem. Spoż.*, 2008, **6**, 39-41.

- [25] Woese K., Lange D., Boess C., Bogl 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.
- [26] Vitòria L., Otero N., Soler A., Canals A.: Fertilizer characterization: isotopic data (N, S, O, C, and Sr). *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 3254-3262.
- [27] Yoneyama T., Omata T., Nakata S., Yazaki J.: Fractionation of nitrogen isotopes during the uptake and assimilation of ammonia by plants. *Plant Cell Physiol.*, 1991, **32**, 1211-1217.
- [28] Yun S.I., Ro H.M., Choi W.J., Chang S.X.: Interactive effects of N fertilizer source and timing of fertilization leave specific N isotopic signatures in Chinese cabbage and soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2006, **38**, 1682-1689.

APPLYING DETERMINED RATIOS OF STABLE ISOTOPES RATIOS IN SELECTED ELEMENTS TO EVALUATE AUTHENTICITY OF ORGANICALLY GROWN PRODUCTS

S u m m a r y

In the paper, the current state of research is presented with reference to carbon and nitrogen stable isotopes ratios (δ) in various food products (vegetables, fruits, meat, and milk) produced using conventional and organic farming methods. The δ value denotes an amount of heavy and light isotopes in a sample. The $\delta^{15}\text{N}$ value in vegetables and fruits is affected, among other thing, by a soil and fertigation type, as well as by a farming method used previously in the field. The methods consisting in the determination of $\delta^{15}\text{N}$ or $\delta^{13}\text{C}$ values can be a useful tool to distinguish between organic and conventional food products; though, this principle does not involve all food products.

Key words: isotopes, ^{15}N , ^{13}C , organic farming, and authenticity of products 

MAREK SIWULSKI, KRZYSZTOF SOBIERALSKI, IWONA SAS-GOLAK

WARTOŚĆ ODŻYWCZA I PROZDROWOTNA GRZYBÓW

Streszczenie

Wartość odżywcza grzybów wynika z zawartości w nich białek o dużej przyswajalności, polisacharydów, niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, a także składników mineralnych oraz witamin. Wiele gatunków uprawnych oraz dziko rosnących wykazuje również właściwości prozdrowotne. Związane są one z obecnością składników bioaktywnych, głównie polisacharydów, triterpenoidów oraz związków fenolowych. Udokumentowano działanie immunostymulujące, antybakteryjne, antywirusowe, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe oraz przeciwalergiczne różnych gatunków grzybów. Substancje pozyskiwane z grzybów mają również zdolność obniżania poziomu cholesterolu i triacylogliceroli we krwi, normalizują ciśnienie, a także działają ochronnie na wątrobę. Obecnie grzyby uznawane są za żywność funkcjonalną. Pozytywny wpływ na zdrowie można uzyskać poprzez bezpośrednie spożywanie owocników lub stosowanie suplementów diety w postaci preparatów zawierających ekstrakty grzybowe.

Słowa kluczowe: grzyby dziko rosnące, grzyby uprawne, składniki odżywcze, substancje bioaktywne, żywność funkcjonalna

Wprowadzenie

Grzyby ceniono głównie za smak i aromat, wykorzystywano również w medycynie ludowej [88]. Jednak świadomość, że grzyby są żywnością prozdrowotną, zawierającą wiele substancji bioaktywnych, jest stosunkowo nowa [93]. Publikacje naukowe poświęcone wartości odżywczej i właściwościom prozdrowotnym grzybów pochodzą głównie z ostatniego dwudziestolecia [19, 25]. Obecnie grzyby uznawane są za żywność funkcjonalną, gdyż wykazują udokumentowany korzystny wpływ na zdrowie człowieka [1, 63].

Do królestwa *Fungi* zaliczanych jest około 14 000 gatunków grzybów wielkoowocnikowych [42], spośród których co najmniej 2 000 to gatunki jadalne [11]. Szacuje się, że na świecie występuje obecnie 150 000 gatunków grzybów wyższych, z których

Dr hab. M. Siwulski, prof. nadzw., dr hab. K. Sobieralski, mgr inż. I. Sas-Golak, Katedra Warzywnictwa, Wydz. Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań. Kontakt: fungus@up.poznan.pl

opisano mniej niż 10 %. Około 700 gatunków grzybów wykazuje właściwości prozdrowotne [66]. Około 200 gatunków grzybów pozyskiwanych jest ze stanowisk naturalnych, głównie w krajach Dalekiego Wschodu i wykorzystywanych do celów kulinarnych oraz leczniczych [70]. W Europie grzyby są zbierane najczęściej przez narody słowiańskie [38].

Uprawa grzybów ma wielowiekową tradycję w krajach azjatyckich, głównie w Chinach. W Europie uprawa pieczarki została zapoczątkowana w pierwszej połowie XVII w. we Francji. Obecnie uprawianych jest około 35 gatunków grzybów, z czego 20 na skalę przemysłową. Do głównych gatunków uprawnych należy pieczarka dwuzarodnikowa (*Agaricus bisporus*), twarząk jadalny (*Lentinula edodes*), bocznik (*Pleurotus* spp.), uszak bżowy (*Auricularia auricula*), zimówka aksamitnotrzonowa (*Flammulina velutipes*) oraz pochwiak pochwiasty (*Volvariella volvacea*). Największym producentem grzybów na świecie są Chiny, gdzie produkcja w 2007 roku wyniosła 1,6 mln ton [24].

Celem pracy była charakterystyka wartości odżywczej grzybów, ze szczególnym uwzględnieniem substancji bioaktywnych decydujących o właściwościach prozdrowotnych poszczególnych gatunków, na podstawie wyników najnowszych badań naukowych.

Wartość odżywcza grzybów

Wartość odżywcza grzybów wynika z występowania w owocnikach białek, sacharydów, kwasów tłuszczowych, witamin i składników mineralnych oraz błonnika pokarmowego [5, 61, 62]. Zawartość białka w grzybach jest duża i zależna od gatunku oraz stadium rozwoju owocnika [2]. Powszechnie spożywane gatunki zawierają ok. 1,5 - 3,6 % białka w św.m., co odpowiada 10 - 40 % w przeliczeniu na suchą masę [5]. Białko grzybów charakteryzuje się dobrą przyswajalnością, sięgającą 90 %. Niektóre gatunki występujące dziko, np. borowik szlachetny (*Boletus edulis*) oraz kozłarz czerwony (*Leccinum rufum*), przewyższają zawartością białka gatunki uprawne, takie jak pieczarka dwuzarodnikowa i bocznik ostrygowaty (*P. ostreatus*) [39, 62].

O wartości białek pochodzących z grzybów decyduje zestaw aminokwasów, w tym obecność wszystkich aminokwasów egzogennych tj. lizyny, metioniny, tryptofanu, treoniny, waliny, leucyny, izoleucyny, i fenyloalaniny oraz względnie egzogennej histydyny [6, 9, 10]. Zawartość w grzybach takich aminokwasów, jak: treonina, arginina i tyrozyna jest wyższa niż w warzywach, takich jak kalafior i marchew [53].

Owocniki grzybów zawierają 4,7 - 6,9 % sacharydów ogółem (około 50 % s. m.), z czego 2,7 - 3,9 % stanowi błonnik pokarmowy [62]. Najczęściej występują monosacharydy, disacharydy, polisacharydy oraz kompleksy polisacharydowo-białkowe. Szczególna rola przypisywana jest polisacharydom, które wykazują silną aktywność biologiczną. W skład błonnika pokarmowego wchodzi włókna nierozpuszczalne

w wodzie, w tym chityna, celuloza i ligniny oraz włókna rozpuszczalne w wodzie, głównie β -glukany [50].

Zawartość kwasów tłuszczowych w owocnikach grzybów jest niewielka i wynosi 2 - 8 % s.m. Korzystny jest jednak stosunek kwasów tłuszczowych wielonienasyconych do kwasów nasyconych. Około 75 % całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych stanowią niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe, wśród których największe znaczenie mają kwasy oleinowy i linolenowy. Głównym kwasem tłuszczowym nasyconym jest kwas palmitynowy [67].

Grzyby są dobrym źródłem składników mineralnych, głównie potasu, fosforu, wapnia i magnezu [52, 64]. Szczególnie zasobnym w wapń gatunkiem jest twardziak jadalny. W owocnikach różnych gatunków grzybów stwierdzono również obecność pierwiastków śladowych, takich jak: miedź, cynk, żelazo, mangan, molibden i selen. Grzyby z rodzaju bocznika przewyższają pod względem zawartości miedzi inne gatunki uprawne. Spośród gatunków występujących dziko największą zawartością potasu charakteryzują się: borowik szlachetny, koźlarz babka (*L. scabrum*) oraz pieprznik jadalny (*Cantharellus cibarius*) [5].

Grzyby stanowią dobre źródło wielu witamin, zwłaszcza ryboflawiny (B_2), niacyny (B_3) i folacyny (B_9). Zawartość witaminy B_2 w grzybach jest większa niż w warzywach. Ponadto grzyby zawierają niewielkie ilości witaminy C, B_1 , a także śladowe ilości witaminy B_{12} , D_2 oraz E [31, 65]. Niektóre gatunki o zabarwieniu pomarańczowym, np. pieprznik jadalny, są źródłem prowitaminy A [52]. Spośród gatunków uprawnych szczególnie zasobna w witaminy z grupy B jest pieczarka dwuzarodnikowa, bocznik ostrygowaty, zimówka aksamitnotrzonowa i twardziak jadalny [27]. Wśród gatunków dziko rosnących dużą zawartością witamin wyróżnia się maślak zwyczajny (*Suillus luteus*) [72].

Grzyby jako źródło substancji bioaktywnych

Najliczniejszą grupę związków zawartych w ścianie komórkowej grzybów stanowią polisacharydy oraz kompleksy białkowo-cukrowe. Pozostałe biologicznie aktywne substancje występujące w grzybach dzielą się na związki o wysokiej masie cząsteczkowej, głównie ligniny oraz o niskiej masie cząsteczkowej, w tym triterpenoidy i fenole [16].

Polisacharydom zawartym w ścianie komórkowej grzybów przypisuje się działania prozdrowotne, w tym immunostymulujące, przeciwnowotworowe, hipoglikemiczne i antyoksydacyjne [59, 77, 88, 94]. Mechanizm działania tych związków nie jest w pełni poznany. Polisacharydy to bardzo liczna grupa związków, w której szczególne miejsce zajmują β -glukany. Lakownica lśniaca (*Ganoderma lucidum*) jest wyjątkowo zasobna w polisacharydy, które stanowią od 10 do 50 % s.m. owocników [74]. Z tego gatunku wyizolowano ponad 200 różnych polisacharydów [89]. Liczne badania wska-

zują na obecność β -glukanów także w innych gatunkach grzybów, np. w borowiku szlachetnym [51].

β -glukany zawarte w grzybach różnią się budową, rozpuszczalnością w wodzie, wielkością cząsteczki i masą cząsteczkową. Wymienione cechy powodują, że poszczególne β -glukany różnią się działaniem prozdrowotnym [14]. Jak podaje Wasser [88], najsilniejszy efekt prozdrowotny wywołują β -glukany o większej masie cząsteczkowej. Do najważniejszych polisacharydów pochodzenia grzybowego należą: lentinan wyizolowany z twardziaka jadalnego, pleuran (bocznik ostrygowaty), schizofilan (rozszczepka pospolita *Schizophyllum commune*), skleroglukan (grzyby z rodzaju *Sclerotium*) i grifolan (żagwica listkowata *Grifola frondosa*). Do kompleksów polisacharydowo-białkowych zaliczany jest krestin, wyekstrahowany z wrośniaka różnobarwnego (*Coriolus versicolor*) oraz ganoderan (lakownica lśniąca) [90].

Bardzo ważną grupą substancji aktywnych pochodzenia grzybowego są triterpenoidy. Stwierdzono, że wykazują one działanie przeciwko wirusowi HIV1 oraz wirusowi opryszczki [57]. Inne badania potwierdziły zdolność triterpenoidów do hamowania syntezy cholesterolu, obniżania ciśnienia krwi oraz zmniejszania agregacji płytek krwi, przez co wpływają na zmniejszenie ryzyka chorób sercowo-naczyniowych [8]. Bogatym źródłem tych związków jest lakownica lśniąca, z której wyizolowano ponad 120 różnych terpenoidów, m.in. kwas ganodermy, kwas ganodermadowy, ganodermediol [47]. Triterpenoidy z lakownicy lśniącej hamują bezpośrednio wzrost komórek rakowych i zmniejszają ich inwazyjność [75].

Związki fenolowe zawarte w owocnikach grzybów decydują o ich właściwościach antyoksydacyjnych. Kwasy fenolowe, w tym hydroksybenzoesowy, protokatechinowy i kawowy wyizolowano z pieczarki dwuzarodnikowej i twardziaka jadalnego [52]. Ekstrakty z różnych gatunków grzybów, m.in. zimówki aksamitnotrzonowej, żagwicy listkowej, soplówki jeżowatej, twardziaka jadalnego oraz bocznika ostrygowatego są bogate w związki fenolowe o silnej aktywności przeciwutleniającej [15, 22]. Związki fenolowe zawarte w grzybach wykazują również działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [60].

Do biologicznie aktywnych związków o wysokiej masie cząsteczkowej należą lektyny, czyli połączenia białkowo-cukrowe. Mają one zdolność wpływania na układ immunologiczny człowieka poprzez stymulowanie dojrzewania komórek odpornościowych [46].

Prozdrowotne działanie grzybów

W wielu ośrodkach naukowych prowadzono badania dotyczące właściwości prozdrowotnych zarówno uprawnych, jak i dzikich gatunków grzybów [30, 85]. Opisano szczegółowo ich działanie przeciwnowotworowe, immunostymulujące, przeciwoksydacyjne, ochronne dla serca i naczyń, obniżające poziom cholesterolu we krwi,

przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwcukrzycowe oraz ochraniające wątrobę [18, 63, 90].

Do najlepiej udokumentowanych i najbardziej obiecujących należy przeciwnowotworowe działanie grzybów. W tradycyjnej medycynie chińskiej przez długi czas do leczenia pacjentów z nowotworami stosowano jeden gatunek, maczuźnik bojowy (*Cordyceps militaria*). W medycynie ludowej wschodniej Europy już w XVI - XVII w. w terapii nowotworów wykorzystywano owocniki włóknouszka ukośnego (*Inonotus obliquus*). Antynowotworowe właściwości borowika szlachetnego potwierdzono w połowie XX w. [49]. Według Wassera [88] istnieje około 650 gatunków grzybów wyższych wykazujących potencjał przeciwnowotworowy. Thekkuttuparambil i wsp. [80] wykazali właściwości przeciwnowotworowe lakownicy lśniącej, czyrenia (*Phellinus rimosus*), bocznika florydzkiego (*P. florida*) i bocznika łyżkowatego (*P. pulmonarius*). Obecnie potwierdzono naukowo aktywność przeciwnowotworową ponad 30 gatunków grzybów leczniczych [90].

Grzyby lecznicze są nie tylko źródłem bezpośrednio działających czynników przeciwnowotworowych, lecz pełnią rolę tzw. immunomodulatorów, które stymulują układ odpornościowy człowieka do zwalczania komórek nowotworowych [19]. Aktywne substancje zawarte w grzybach pobudzają makrofagi, limfocyty T oraz komórki NK do produkcji cytokin, m.in. TNF- α , IFN-g, Il-1b, które hamują proliferację komórek nowotworowych, a także indukują ich apoptozę [66]. Lentinan, schizophyllan, frakcja MD z żagwicy listkowatej oraz PSK i PSP z wrośniaka różnobarwnego stosowane są w Japonii i Chinach w immunoterapii nowotworów żołądka, jelita grubego oraz piersi [63]. Ww. związki stosowane są równolegle z tradycyjną terapią nowotworów. Pozwala to wydłużyć czas przeżycia oraz poprawić jakość życia pacjentów w porównaniu z samym leczeniem konwencjonalnym.

Antyoksydacyjne właściwości grzybów są bardzo dobrze udokumentowane [3, 43, 60, 83]. Etanolowe ekstrakty ze 150 gatunków grzybów wykazują aktywność przeciwutleniającą [12]. Potwierdzono antyoksydacyjne działanie ekstraktów z: żagwicy listkowatej, soplówki jeżowatej (*Hericium erinaceus*), zimówki aksamitnotrzonowej, twardziaka jadalnego, bocznika ostrygowatego [86], polówki wiązkowej (*Agrocybe aegerita*), pieczarki brazylijskiej (*Agaricus blazei*), borowika szlachetnego i czernidłaka kołpakowatego (*Coprinus comatus*) [54, 81, 82, 84]. Stwierdzono również, że metanolowe i wodne ekstrakty z twardziaka jadalnego, bocznika (*P. tuber-regium*), pochwiaka pochwiastego i z polówki wiązkowej wykazują potencjał antyoksydacyjny [45]. Lo i Cheung [48] określili aktywność antyoksydacyjną metanolowych ekstraktów z siedmiu gatunków grzybów dziko rosnących, wynikającą z zawartości fenoli, β -tokoferolu i β -karotenu. Potwierdzono, że aktywność antyoksydacyjna jest skorelowana z ogólną zawartością związków fenolowych w ekstraktach grzybowych [63]. Cheung i wsp. [17] wykazali również, że aktywność antyoksydacyjna kompleksów

polisacharydowo-białkowych z grzybów zależy od zastosowanej metody ekstrakcji tych związków.

Z uwagi na dużą zawartość błonnika oraz małą zawartość tłuszczu grzyby mogą stanowić element diety przeciwdziałającej miażdżycy [63]. Dodatkowo, są one źródłem substancji wykazujących zdolność zmniejszenia syntezy cholesterolu LDL oraz triacylogliceroli, nie wpływając na stężenie frakcji HDL [32]. Do takich substancji należą eritadenina wyizolowana z twardziaka jadalnego oraz lowastatyna obecna w gatunkach boczniaka [73]. Eritadenina wykazuje także zdolność zmniejszenia produkcji homocysteiny, będącej czynnikiem ryzyka chorób serca [26]. Ekstrakty z twardziaka jadalnego oraz boczniaka florydzkiego zapobiegają również agregacji płytek krwi [37]. Zdolność obniżania ciśnienia krwi wykazuje wiele gatunków, m.in. twardziak jadalny, lakownica lśniąca, bocznik (*P. nebrodensis*) oraz żagwica listkowata [56, 79]. Wymienione wyżej właściwości grzybów decydują o możliwości ich zastosowania w profilaktyce oraz leczeniu chorób sercowo-naczyniowych.

Grzyby zawierają substancje o działaniu hipoglikemicznym, w tym polisacharydy i lektyny [34, 40]. Wykazano zdolność do obniżania poziomu glukozy we krwi przez żagwicę listkowatą [44], lakownicę lśniącą [29] oraz maczuźnika [35]. Udokumentowano działanie hipoglikemiczne czernidłaka kołpakowatego [33]. Działanie hipoglikemiczne wykazuje komatyna wyizolowana z kultury płynnej czernidłaka kołpakowatego [20]. Stwierdzono, że czernidłak kołpakowaty działa osłaniająco na komórki trzustki i może być stosowany w zapobieganiu powikłaniom cukrzycowym.

Grzyby stanowią bogate źródło naturalnych antybiotyków. Związki wyizolowane z grzybów wykazują działanie przeciwrzybowe i przeciwbakteryjne, zwalczając *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*. Hamują również wzrost mikroorganizmów odpowiedzialnych za problemy skórne, m.in. *Pityrosporum ovale*, *Staphylococcus epidermidis* i *Propionibacterium acnes* [63]. Wzrost *S. aureus* i innych opornych bakterii jest hamowany przez związek o budowie seskwiterpenowej zawarty w ganodermie czerwonej (*G. pfeifferi*) [57]. Steroidy wyizolowane z ganodermy spłaszczonej (*G. applanatum*) wykazują aktywność przeciwko wielu bakteriom gram(+) i gram(-) [76]. Kwas oksalowy odpowiada za antibakteryjny efekt twardziaka jadalnego przeciwko *S. aureus* i innym bakteriom [7]. Białka pochodzące z grzybów, np. pleurostrina z boczniaka ostrygowatego, agrocybina z polówki wiązkowej, eryngina z boczniaka mikołajkowego (*P. eryngii*) oraz ganodermina z lakownicy lśniącej wykazują aktywność przeciwrzybiczną. Pleurostrina hamuje wzrost grzybnicy *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* oraz *Physalospora pyricola*. Inhibitorem *F. oxysporum* jest również eryngina i ganodermina [92].

W literaturze szeroko opisano antywirusowe działanie ekstraktów z całych grzybów, jak również wyizolowanych z nich związków. Efekt przeciwwirusowy wykazują substancje o małej masie cząsteczkowej, np. triterpeny. Ganoderiol, ganodermanontriol

i kwas ganodermy z lakownicy lśniacej są aktywne przeciwko wirusowi HIV-1 [23], natomiast ganodermiol i lucidadiol otrzymane z ganodermy czerwonej wykazują efekt przeciwko wirusowi grypy typu A. Ganodermiol zwalcza również wirusa opryszczki HSV-1 [58]. Związki fenolowe z włókniuszka szczotkowatego (*I. hispidus*) wykazują aktywność przeciwko wirusom grypy typu A i B [4].

Grzyby działają również przeciwalergicznie. Kwasy ganodermy C i D otrzymane z lakownicy lśniacej hamują reakcję histaminową. Działanie antyalergiczne wykazywały również etanolowe ekstrakty z *Hypsizygus marmoreus*, zimówki aksamitnotrzonowej, łuskwiaka nameko (*Pholiota nameko*) i bocznika mikołajkowego [71].

Wiele gatunków grzybów charakteryzuje się działaniem przeciwzapalnym, np. w zapaleniu stawów [41]. Kwasy ganodermy A, B, H z *G. lucidum* wykazują silniejsze działanie przeciwzapalne w porównaniu z kwasem acetylosalicylowym, natomiast metanolowe ekstrakty z bocznika łyżkowego wywołują efekt podobny do diklofenaku [36]. Metanolowy ekstrakt z bocznika florydzkiego hamuje stan zapalny naczyń krwionośnych [37].

Ekstrakty z grzybów działają ochronnie na wątrobę. Etanolowy ekstrakt z lakownicy lśniacej zawierający trieterpenoidy zapobiegał niszczeniu hepatocytów przez chloroform. Efekt ochronny był związany ze zdolnością wygaszania wolnych rodników w wątrobie [87]. Preparat z lakownicy lśniacej zawierający frakcję polisacharydową, testowany w badaniach klinicznych z udziałem pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B, powodował normalizację poziomu aminotransferaz [28].

Ekstrakty grzybowe oraz wyizolowane z nich związki wywierają wpływ na centralny układ nerwowy. Związki fenolowe otrzymane z soplówki jeżowatej (hericenony C, D, E, F, G i H) indukują syntezę czynnika wzrostu nerwu (NGF), co umożliwia ich wykorzystanie w leczeniu choroby Alzheimera [55]. Erinacina E wyizolowana z soplówki gałęzistej (*H. coralloides*) wykazywała znaczący efekt przeciwbólowy, nie wywołując skutków ubocznych, charakterystycznych dla morfiny [69].

Grzyby jako element żywności funkcjonalnej

Obecnie istnieje wiele definicji żywności funkcjonalnej. Według koncepcji zaproponowanej przez amerykańskich i europejskich ekspertów, powinna ona być elementem normalnej diety, czyli być spożywana regularnie i w normalnych ilościach, a poza tym obniżać ryzyko konkretnych chorób lub wykazywać dodatkowy korzystny efekt poza podstawową wartością odżywczą [21]. Na rynku znajduje się wiele produktów zaliczanych do żywności funkcjonalnej [68].

Prebiotyki są definiowane jako składniki żywności nieulegające trawieniu w przewodzie pokarmowym, a mające zdolność stymulowania wzrostu i aktywności pożytecznych bakterii w przewodzie pokarmowym, głównie w jelicie grubym. Owocniki grzybów mogą spełniać te kryteria ze względu na zawartość polisacharydów, ta-

kich jak: chityna, hemiceluloza, α - i β -glukany, mannany, ksylany oraz galaktany [1]. Synytsya i wsp. [78] wykazali, że ekstrakty z bocznika ostrygowatego oraz mikołajkowego stymulują wzrost bakterii probiotycznych – *Lactobacillus* ssp., *Bifidobacterium* ssp. oraz *Enterococcus faecium*.

Grzyby mogą być spożywane bezpośrednio i traktowane jako element żywności funkcjonalnej [13]. Pozytywny efekt ich stosowania wynika wówczas ze współdziałania różnych składników aktywnych zawartych w owocnikach. Profilaktycznie można również stosować gotowe preparaty pochodzenia grzybowego w postaci kapsułek lub tabletek. Zawierają one oczyszczone ekstrakty grzybowe i są traktowane jako suplementy diety [91]. Najczęściej są stosowane jako preparaty wzmacniające układ odpornościowy oraz przeciwdziałające nowotworom [89]. Preparaty produkowane są przede wszystkim z takich gatunków grzybów leczniczych, jak: lakownica lśniąca, twardziak jadalny, żagwica listkowata, wrośniak różnobarwny, maczuźnik chiński. Dostępne są także preparaty zawierające ekstrakty z różnych gatunków grzybów [19].

Podsumowanie

Mechanizm wpływu różnych gatunków grzybów oraz poszczególnych substancji w nich zawartych na organizm człowieka nie jest do końca wyjaśniony. Istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań ze szczególnym uwzględnieniem nowych gatunków oraz izolowanych z nich składników aktywnych. Należałoby szczegółowo określić, które z ekstraktów grzybowych lub aktywnych składników są rekomendowane w celu osiągnięcia określonego efektu prozdrowotnego. Niezbędna jest także edukacja konsumentów w dziedzinie korzyści zdrowotnych, które można uzyskać poprzez spożywanie grzybów.

Literatura

- [1] Aida F.M.N.A., Shuhaimi M., Yazid M., Maaruf A.G.: Mushrooms as a potential source of prebiotics, a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2009, **20**, 567-575.
- [2] Alam N., Amin R., Khan A., Ara I., Shim M.J., Lee M. W., Lee T.S.: Nutritional analysis of cultivated mushrooms in Bangladesh – *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Colocybe indica*. *Mycobiol.*, 2008, **36** (4), 228-232.
- [3] Asatiani M.D., Elisashvili V., Songulashvili G., Reznick A.Z., Wasser S.P.: Higher *Basidiomycetes* mushrooms as a source of antioxidants. In: *Progress in Mycology*. Eds. M. Rai, G. Kovics. Scientific Publishers India, 2010, pp. 311-326.
- [4] Awadh N.A.A., Mothana R.A.A., Lesnau A., Pilgrim H., Lindequist U.: Antiviral activity of extracts and compounds from *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia*, 2003, **74**, 483-485.
- [5] Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L.M., Ferreira I.C.F.R.: Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **46**, 2742-2747.
- [6] Beluhan S. Ranogajec A.: Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chem.*, 2011, **124**, 1076-1082.

- [7] Bender S., Dumitrache C.N., Backhaus J., Christie G., Cross R.F., Lonergan G.T.: A case for caution in assessing the antibiotic activity of extracts of culinary-medicinal Shiitake mushroom (*Lentinula edodes* Berk. Singer) (*Agaricomycetidae*). *Int. J. Med. Mushrooms*, 2003, **5**, 31-35.
- [8] Berger A., Rein D., Kratky E., Monnard I., Hajjaj H., Meirim I., Piguët-Welsch C., Hauser J., Mace K., Niederberger P.: Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* *in vitro*, *ex vivo*, and in hamsters and minipigs. *Lipids in Health and Disease*, 2004, **3**, 2.
- [9] Bernaś E., Jaworska G., Lisiewska Z.: Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2006, **5** (1), 5-20.
- [10] Bernaś E., Jaworska G.: Zawartość aminokwasów w mrożonkach i konserwach sterylizowanych z borowika szlachetnego (*Boletus edulis* (Bull. Fr.)). *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **6** (73), 134-145.
- [11] Chang S.T.: Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21 century, non-green revolution. *Int. J. Med. Mush.*, 1999, **1**, 1-7.
- [12] Chang S-T, Miles P.G.: *Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact*. Second edition, CRC Press, Boca Raton, London 2004, p. 6.
- [13] Chang S.T., Wasser S.P.: The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2012, **14** (2), 95-134.
- [14] Chen J., Seviour R.: Medicinal importance of fungal β -(1-3), (1-6)-glucans. *Mycol. Res.*, 2007, **111**, 635-652.
- [15] Cheung L.M., Cheung P.C.K., Ooi V.E.C.: Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.*, 2003, **81**, 249-255.
- [16] Cheung P.C.K.: The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 2010, **35**, 292-299.
- [17] Cheung Y-C., Siu K-C., Liu Y-S., Wu J-Y.: Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide-protein complex from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction. *Process Biochemistry*, 2012, **47**, 892-895.
- [18] Dai Y-Ch., Yang Z-L., Ui B-K., Yu Ch-J., Zhou L-W.: Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review). *Int. J. Med. Mushrooms*, 2009, **11**, 287-302.
- [19] De Silva D.D., Rapior S., Fons F., Bahkali A.H., Hyde K.D.: Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies, an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*, 2012, DOI 10.1007/s13225-012-0151-3.
- [20] Ding Z., Lu Y., Lu Z., Lv F., Wang Y., Bie X., Wang F., Zhang K.: Hypoglycaemic effect of comatin, an anti-diabetic substance separated from *Coprinus comatus* broth, on alloxan-induced-diabetic rats. *Food Chem.*, 2010, **121**, 39-43.
- [21] Doyon M., Labrecque J.A.: Functional foods, a conceptual definition. *Br. Food J.*, 2008, **110** (11), 1133-1149.
- [22] Elmastas M., Isidac O., Turkekul I., Temur N.: Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J. Food Comp. Anal.*, 2007, **20**, 337-345.
- [23] El-Mekkawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N.: Anti-HIV-1 and Anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 1998, **49**, 1651-1657.
- [24] FAO Statistical Yearbook. Production and trade [on-line], 2009. Dostępne w Internecie [20.09.2012]: <http://www.fao.org/corp/statistics/en>.
- [25] Ferreira I.C.F.R., Vaz J.A., Vasconcelos M.H., Martins A.: Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2010, **10**, 424-436.
- [26] Fukada S.I., Setoue M., Morita T., Sugiyama K.: Dietary eritadenine suppresses guanidinoacetic acid - induced hyperhomocysteinemia in rats. *J. Nutr.*, 2006, **136**, 2797-2802.
- [27] Furlani R.P. Z., Godoy H.T.: Vitamins B₁ and B₂ contents in cultivated mushrooms. *Food Chem.*, 2008, **106**, 816-819.

- [28] Gao Y., Zhou S., Chen G., Dai X., Ye J., Gao H.: A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.,Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) extract in patients with chronic hepatitis B. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2002, **4**, 2321-2327.
- [29] Gao Y., Lan J., Dai X., Ye J., Zhou S.: A phase I/II study of ling zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.,Fr.)Lloyd (*Aphyllphoromycetidae*) extract in patients with type II diabetes mellitus. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2004, **6**, 33-39.
- [30] Ganeshpurkar A., Rai G., Jain A.P.: Medicinal mushrooms, Towards a new horizon. *Pharmacogn. Rev.*, 2010, **4** (8), 127-135.
- [31] Grangeia C., Heleno S.A., Barros L., Martins A., Ferreira I.C.F.R.: Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Res. Int.*, 2011, **44** (4), 1029-1035.
- [32] Guillamon E., Garcia-Lafuente A., Lozano M., D'Arrigo M., Moro C., Rostagno M.A., Villares A., Martínez J.A.: Edible mushrooms, Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 2010, **81**, 715-723.
- [33] Han C., Cui B., Wang. Y.: Vanadium uptake by biomass of *Coprinus comatus* and their effect on hyperglycemic mice. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2008, **124**, 35-39.
- [34] Horio H., Ohtsuru M.: Maitake (*Grifola frondosa*) improve glucose tolerance of experimental diabetic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2001, **47**, 57-63.
- [35] Hsu T.H., Lo H.C.: Biological activity of *Cordyceps* (Fr.) Link species (*Ascomycetes*) derived from a natural source and from fermented mycelia on diabetes in STZ-induced rats. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2002, **4**, 111-125.
- [36] Jose N., Ajith T.A., Janardhanan K.K.: Antioxidant, antiinflammatory and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. (*Agaricomycetidae*). *Int. J. Med. Mushrooms*, 2002, **4**, 329-335.
- [37] Jose N., Janardhanan K.K.: Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytother. Res.*, 2004, **18**, 43-46.
- [38] Kalac P.: Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms, A review. *Food Chem.*, 2009, **113**, 9-16.
- [39] Kalbarczyk J., Radzki W.: Uprawiane grzyby wyższe jako cenny składnik diety oraz źródło substancji aktywnych biologicznie. *Herba Polonica*, 2009, **55** (4), 224-232.
- [40] Kiho T., Kochi M., Usui S., Hirano K., Aizawa K., Inakuma T.: Antidiabetic effect of an acidic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia* Schw., Fr. (*Heterobasidiomycetes*) in genetically diabetic KK-Ay mice. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2002, **4**, 291-297.
- [41] Kim G.Y., Kim S.H., Hwang S.Y. Kim H.Y., Park Y.M., Park S.K.: Oral administration of proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* in the prevention and treatment of collagen-induced arthritis in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 2003, **26**, 823-831.
- [42] Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A.: Ainsworth & Brisby's dictionary of the fungi, 10th edn. CAB International, Wallingford 2008.
- [43] Kozarski M., Klaus A., Nikisic M., Jakovljevic D., Helsper J.P.F.G., van Griensven L.J.L.D.: Antioxidative and immuno-modulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chem.*, 2011, **129**, 1667-1675.
- [44] Kurushima H., Kodama N., Nanba H.: Activities of polysaccharides obtained from *Grifola frondosa* on insulin-dependent diabetes mellitus induced by streptozotocin in mice. *Mycosci.*, 2000, **41**, 473-480.
- [45] Lee Y.L., Yen M.T., Mau J.L.: Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. *Food Chem.*, 2007, **104**, 1-9.

- [46] Lin Y.L., Liang Y.C., Tseng Y.S., Huang H.Y., Chou S.Y., Hseu R.S. et al.: An immuno-modulatory protein Ling Zhi-8, induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-KB and MAPK pathways. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, **86**, 877-889.
- [47] Liu J., Shimizu K., Konishi F., Noda K., Kumamoto S., Kurashiki K., Kondo R.: Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chem.*, 2007, **100**, 1691-1696.
- [48] Lo K.M., Cheung P.C.K.: Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chem.*, 2005, **89**, 533-539.
- [49] Lucas E.H.: Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other *Holobasidiomycete*. *Antibiot. Chemotherapy*, 1957, **7**, 1-4.
- [50] Manzi P., Aguzzi A., Pizzoferrato L.: Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem.*, 2001, **73**, 321-325.
- [51] Manzi P., Marconi S., Aguzzi A., Pizzoferrato L.: Commercial mushrooms, nutritional quality and effect of cooking. *Food Chem.*, 2004, **84**, 201-206.
- [52] Mattila P., Könkö K., Eurola M., Pihlava J.A., Astola J., Vahteisto L., Hieraniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Pironen V.: Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 2343-2348.
- [53] Matilla P., Konko K.: Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 6419-6422.
- [54] Mau J.L., Lin H.C., Song S.F.: Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res. Int.*, 2002, **35**, 519-526.
- [55] Mizuno T.: Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull.,Fr.) Pers (Yamabushitake), and its medicinal utilization. *Int. J. Med. Mushrooms*, 1999, **1**, 105-119.
- [56] Miyazawa N., Okazaki M., Ohga S.: Antihypertensive Effect of *Pleurotus nebrodensis* in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Oleo. Sci.*, 2008, **57**, 675-681.
- [57] Mothana R.A.A., Jansen R., Julich W.D., Lindequist U.: Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 416-418.
- [58] Mothana R.A.A., Awadh N.A.A., Jansen R., Wegner U., Mentel R., Lindequist U.: Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* Bres. *Fitoterapia*, 2003, **74**, 177-180.
- [59] Ooi V.E.C.: Antitumor and immunomodulatory activities of mushroom polysaccharides. In.: *Mushrooms as functional foods*. Ed.P.C.K. Cheung. Hoboken. Wiley, NJ., 2008, pp. 147-198.
- [60] Palacios I., Lozano M., Moro C., D'Arrigo M., Rostagno M.A., Martinez J.A., Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A.: Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushroom. *Food Chem.*, 2011, **128**, 674-678.
- [61] Pereira E., Barros L., Martins A., Ferreira I.C.F.R.: Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chem.*, 2012, **130**, 394-403.
- [62] Rajewska J., Bałasińska B.: Związki biologicznie aktywne zawarte w grzybach jadalnych i ich korzystny wpływ na zdrowie. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004, **58**, 352-357.
- [63] Rathee S., Rathee D., Rathee D., Kumar V., Rathee P.: Mushrooms as therapeutic agents. *Braz. J. Pharmacog.*, 2012, **22** (2), 459-474.
- [64] Reguła J., Siwulski M.: Dried shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2007, **6** (4), 135-142.
- [65] Reis F.S., Barros L., Martins A., Ferreira I.C.F.R.: Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms. An inter-species comparative study. *Food Chem. Toxicol.*, 2012, **50**, 191-197.
- [66] Reshetnikov S.V., Wasser S.P., Tan K.K.: Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2001, **3**, 361-394.

- [67] Ribeiro B., Pinhoa P.G., Andrade P.B., Baptista P., Valentao P.: Fatty acid composition of wild edible mushroom species. A comparative study. *Microchem. J.*, 2009, **93**, 29-35.
- [68] Roberfroid M.B.: Global view on functional foods. European perspectives. *Br. J. Nutr.*, 2002, **88**, 133-138.
- [69] Saito T., Aoki F., Hirai H., Inagaki T., Matsunaga Y., Sakakibara T.: Erinacine E as a kappa opioid receptor agonist and its new analogs from a basidiomycete, *Hericium ramosum*. *J. Antibiot.*, 1998, **51**, 983-990.
- [70] Sanchez C.: Mini-review, modern aspects of mushroom culture technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **64**, 759-762.
- [71] Sano M., Yoshino K., Matsuzawa T., Ikekawa T.: Inhibitory effects of edible higher basidiomycetes mushrooms extracts on mouse type IV allergy. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2002, **4**, 37-41.
- [72] Sas-Golak I., Sobieralski K., Siwulski M., Lisiecka J.: Skład, wartość odżywcza oraz właściwości zdrowotne grzybów pozyskiwanych ze stanowisk naturalnych. *Kosmos*, 2011, **60 (3-4)**, 292-293, 483-490.
- [73] Shimada Y., Yamakawa A., Morita T., Sugiyama K.: Effects of dietary eritadenine on the liver microsomal 1,6-desaturase activity and its mRNA in rats. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 2003, **67**, 1258-1266.
- [74] Skalicka-Woźniak K., Szypowski J., Łoś R., Siwulski M., Sobieralski K., Głowniak K., Malm A.: Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 2012, **81 (1)**, 17-21.
- [75] Sliva D.: *Ganoderma lucidum* (Reishi) in cancer treatment. *Integr. Cancer Ther.*, 2003, **2**, 358-364.
- [76] Smania Jr A., Delle Monache F., Smania E.F.A., Cuneo R.S.: Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (*Aphyllphoromycetideae*) fruit body. *In. J. Med. Mushrooms*, 1999, **1**, 325-330.
- [77] Stachowiak B., Reguła J.: Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides, a review. *Eur. Food Res. Technol.*, 2012, **234**, 369-380.
- [78] Synytsya A., Mickova K., Synytsya A., Jablonsky I., Spevacek J., Erban V., Kovarikova E., Copikova J.: Glucans from fruit bodies of cultivated mushroom *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*, Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr. Polym.*, 2008, **76**, 548-556.
- [79] Talpur N.A., Echard B.W., Fan Y.A., Jaffari O., Bagchi D., Preuss H.G.: Antihypertensive and metabolic effects of whole maitake mushroom powder and its fractions in two rat strains. *Mol. Cell Biochem.*, 2002, **237**, 129-136.
- [80] Thekkuttuparambil A.A., Kainoor K.: Indian Medicinal Mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2007, **40**, 157-162.
- [81] Tsai S-Y., Tsai H-L., Mau J-L.: Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *LWT*, 2007, **40**, 1392-1402.
- [82] Tsai S-Y., Tsai H-L, Mau J-L.: Antioxidant properties of *Coprinus comatus*. *J. Food Bioch.*, 2009, **33**, 368-389.
- [83] Vaz J.A., Barros L., Martins A., Santos-Buelga C., Vasconcelos M.H., Ferreira I.C.F.R.: Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chem.*, 2011, **126**, 610-616.
- [84] Vidovic S.S., Mujic I.O., Zekovic Z.P., Lepojevic Z.D., Tumbas V.T., Mujic A.I.: Antioxidant properties of selected *Boletus* mushrooms. *Food Biophysics*, 2010, **5**, 49-58.
- [85] Vishwakarma M.P., Bhatt R.P., Gairola S.: Some medicinal mushrooms of Garhwal Himalaya, Uttarakhand, India. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2011, **1 (1)**, 33-40.
- [86] Yang J.H., Lin H.C., Mau J.L.: Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.*, 2002, **77**, 229-235.

- [87] Wang M.Y., Liu Q., Che Q.M., Lin Z.B.: Effects of total triterpenoids extract from *Ganoderma lucidum* (Curt.,Fr.) P. Karst. (Reishi mushroom) on experimental liver injury models induced by carbon tetrachloride or d-galactosamine in mice. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2002, **4**, 337-342.
- [88] Wasser S.P.: Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **3**, 258-274.
- [89] Wasser S.P.: Medicinal mushroom science, history, current status, future trends, and unsolved problems. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2010, **12 (1)**, 1-16.
- [90] Wasser S.P.: Current finding, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **89**, 1323-1332.
- [91] Wasser S.P., Akavia E.: Regulatory issues of mushrooms as functional foods and dietary supplements, safety and efficacy. In.: *Mushrooms as functional foods*. Ed. Cheung P.C.K. New York 2008, pp. 199-221.
- [92] Wong J.H., Ng T.B., Cheung R.C.F., Ye X.J., Wang H.X., Lam S.K., Lin P., Chan Y.S., Fang E.F., Ngai P.H.K., Xia L.X., Ye X.Y., Jiang Y., Liu F.: Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **87**, 1221-1235.
- [93] Zaidman B.Z., Yassin M., Mahajna J., Wasser S.P.: Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **67**, 453-468.
- [94] Zhang M., Cui S.W., Cheung P., Wang Q.: Antitumor polysaccharides from mushrooms, a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trend in Food Sci. Technol.*, 2007, **18 (1)**, 4-19.

NUTRITIVE AND HEALTH-PROMOTING VALUE OF MUSHROOMS

Summary

Health-promoting value of mushrooms is the effect of readily available proteins, carbohydrates, essential unsaturated fatty acids, as well as minerals and vitamins contained in them. Many cultivated and wild-growing species also exhibit salutogenic properties. They are to be attributed to the presence of bioactive substances, mainly polysaccharides, triterpenoids, and phenolic compounds. The immunostimulatory, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, anticarcinogenic, antidiabetic, and antiallergenic actions were documented for different mushroom species. Substances obtained from fungi are also capable of reducing blood cholesterol and triglyceride levels, they normalise blood pressure and protect the liver. At present, mushrooms are considered to be functional food. Beneficial health effects may be achieved through the direct consumption of fruiting bodies or the use of dietary supplements in the form of ready-to-use preparations containing mushroom extracts.

Key words: wild-growing mushrooms, cultivated mushrooms, bioactive substances, functional food ☒

MONIKA WSZOŁEK, MAGDA FILIPCZAK-FIUTAK,
JACEK DOMAGAŁA

SKŁAD I WŁAŚCIWOŚCI MLEKA OŚLEGO

Streszczenie

Wzrastająca liczba przypadków alergii na mleko krowie wśród niemowląt wywołała zainteresowanie mlekiem koniowatych (klaczy koni i osłów) z powodu podobieństwa składu tego mleka do mleka kobiecego. W badaniach klinicznych wykazano bardzo dobre tolerowanie tego rodzaju mleka przez organizm niemowląt i małych dzieci. Mleko ośle uważane jest za użyteczne w zapobieganiu arteriosklerozie i w regulowaniu reakcji immunologicznych ludzi w starszym wieku. Mimo podobieństwa do mleka kobyłego wyróżnia się ono szczególnie dużą zawartością lizozymu, dzięki któremu charakteryzuje się właściwościami antybakteryjnymi nawet po pasteryzacji, co między innymi sprawia, że jest szczególnie przydatne do produkcji napojów probiotycznych.

Słowa kluczowe: mleko ośle, lizozym, właściwości antyalergiczne, cechy funkcjonalne

Wprowadzenie

W ostatniej dekadzie wzrosło zainteresowanie mlekiem oślim ze względu na jego właściwości immunologiczne i podobieństwo do mleka kobiecego. Mleko to cechuje charakterystyczny skład chemiczny i unikatowe właściwości funkcjonalne oraz możliwość wykorzystania jako naturalnego substytutu mleka matki w żywieniu dzieci z CMPA (*cow's milk protein allergy*) [4, 19, 24, 31, 33]. Obecnie w niektórych krajach, zwłaszcza w Europie, mleko ośle dostępne jest na rynku i przeznaczone głównie dla noworodków oraz dla osób starszych i rekonwalescentów.

Skład chemiczny i wartość żywieniowa mleka oślego

Mleko ośle charakteryzuje się dużą zawartością laktozy i małą zawartością białka. Laktoza przekracza często 7 % i stanowi składnik charakterystyczny dla tego rodzaju mleka. Frakcja białek mleka jest szczególnie bogata w białka serwatkowe, które mogą

Dr hab. inż. M. Wszolek, mgr inż. M. Filipczak-Fiutak, prof. dr hab. inż. J. Domagała, Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków. Kontakt: rtwszole@cyf-kr.edu.pl

stanowić nawet 70 % całkowitej zawartości białka [23]. Te składniki mleka oślego najbardziej upodobniają je do mleka kobiecego.

Tabela 1. Podstawowe składniki mleka oślego, kobylego, krowiego i kobiecego.
Table 1. Basic components of donkey's, female horse's, cow's and human milk.

Gatunek mleka Variety of milk	Składniki [g/100 g] Components [g/100 g]					
	Sucha masa Dry matter	Laktoza Lactose	Tłuszcz Fat	Azot ogółem × 6,38 Total nitro- gen	Zw. miner. jako popiół Ash	Źródło Source
Mleko ośle Donkey's milk	8,86	7,14	0,30	1,46	0,34	[23, 32]
Mleko kobyle Female horse's milk	11,00	6,10	1,40	2,14	0,45	[16, 31]
Mleko krowie Cow's milk	12,50	4,80	3,70	3,20	0,70	[32]
Mleko kobiece Human milk	12,50	6,44	3,46	1,25	0,19	[21]

Przydatność technologiczna mleka i jego wartość odżywcza oceniana jest na podstawie zawartości głównego białka mleka, jakim jest kazeina. Pod tym względem najwyższą ocenianą jest mleko bawole, owcze i krowie, chociaż wykorzystywane jest również mleko kozie, mimo tego że przy jego przerobieniu występują już pewne trudności [39, 40], Mleko i produkty z niego wyprodukowane mają wprawdzie wysoką wartość odżywczą, ale są trudniej strawne dla osób z niewydolnym układem trawiennym, osób starszych, osób z nietolerancją pokarmową, czy też z alergiami na niektóre frakcje białkowe, a przede wszystkim dla niemowląt i małych dzieci.

Mleko ssaków koniowatych (klaczy osłów i koni) charakteryzuje się małą zawartością kazeiny. Najważniejsze białka serwatkowe to α -laktoalbumina, β -laktoglobulina i lizozym. Mleko ośle zawiera mniej β -laktoglobuliny i więcej α -laktoalbuminy niż mleko krowie. Frakcja proteoz i peptonów jest obecna w mleku oślim w większych ilościach niż w mleku krowim. Według Guo i wsp. [19] zawartość białek serwatkowych w mleku oślim wynosi od 0,49 do 0,80 g/100 g. Mleko to charakteryzuje się małą zawartością kazeiny: od 0,64 do 1,03 g/100 g. Według Innocente i wsp. [23] zawartość kazeiny jest jeszcze mniejsza i wynosi 0,53 %. Spośród mleka różnych gatunków ssaków mleko ośle jest najbardziej podobne do mleka kobiecego pod względem składu frakcji białkowych, zawiera niewiele kazeiny i stosunkowo dużo białek serwatkowych (35 do 57 % całkowitej ilości białka), podczas gdy w mleku

krowim wnosi on około 20 % [38]. Ponadto charakteryzuje go brak α_1 -kazeiny, inna struktura β -laktoglobuliny i wysoki poziom lizozymu. W mleku zwierząt z rodziny jednokopytnych β -laktoglobulina występuje w postaci monomeru bez wolnej grupy -SH nawet przy pH obojętnym, natomiast w mleku krowim β -laktoglobulina występuje w formie dimerycznej przy obojętnym pH i wolnej grupie -SH [2].

Tabela 2. Skład białek serwatkowych w mleku oślim, kobyli, krowim i kobiecym.

Table 2. Composition of whey protein in donkey's, female horse's, cow's, and human milk.

Gatunek mleka Variety of milk	Rodzaj białek serwatkowych [mg/ml] Type of whey proteins [mg/ml]						
	α -laktoalbumina α -lactoalbumin	Albumina serum Serum albumin	β -laktoglobulina β -lactoalbumin	Proteozy – peptony Proteose-peptone	Laktoferyna Lactoferrin	Lizozym Lisosome	Źródło Source
Mleko ośle Donkey's milk	1,543	0,423	2,034	2,270	0,306	1,434	[23, 32]
Mleko kobyłe Female horse's milk	2,370	-	2,552	-	0,821	0,547	[30]
Mleko krowie Cow's milk	1,093	0,381	4,432	1,221	0,101	ślady traces	[23, 32]
Mleko kobiece Human milk	2,490	0,486	0	-	1,646	0,340	[33]

Różnice pod względem zawartości poszczególnych aminokwasów związane są z inną zawartością białka w mleku poszczególnych gatunków zwierząt, jednak gdy wartości są wyrażane w gramach aminokwasów na 100 g białka mleka różnice nie są duże. Odnotowano większą zawartość seryny, kwasu glutaminowego, argininy i waliny oraz niższy poziom cysteiny w mleku oślim. Biorąc pod uwagę poziom 8 niezbędnych aminokwasów w białku mleka oślego jest on wyższy w porównaniu z mlekiem kobyli i krowim. Taka kompozycja aminokwasów sprawia, że mleko ośle jest lepiej przyswajalne przez człowieka niż mleko innych ssaków [6].

Tabela 3. Średni skład aminokwasów w czterech gatunkach mleka.
Table 3. Average composition of amino acids in four different milk varieties.

Zawartość aminokwasów [g AA/100 g białka] Amino acid concentration [g AA/100 g protein]	Gatunek mleka Variety of milk			
	Mleko ośle Donkey's milk	Mleko kobyle Female horse's milk	Mleko krowie Cow's milk	Mleko kobiece Human milk
Kwas asparaginowy Aspartic acid	8,9	10,4	7,8	9,2
Seryna / Serine	6,2	6,2	4,8	5,0
Kwas glutaminowy Glutamic acid	22,8	20,1	23,2	18,4
Glicyna / Glicine	1,2	1,9	1,8	2,3
Histydyna / Histidine	2,3	2,4	3,0	2,3
Arginina / Arginine	4,6	5,2	3,3	4,0
Treonina / Treonine	3,6	4,3	4,5	4,7
Alanina / Alanine	3,5	3,2	3,0	3,8
Prolina / Proline	8,8	8,4	9,6	8,5
Cysteina / Cysteine	0,4	0,6	0,6	2,2
Tyrozyna / Thyrosine	3,7	4,3	4,5	4,2
Walina / Valine	6,5	4,1	4,8	6,4
Metionina / Methionine	1,8	1,5	1,8	1,6
Lizyna / Lisine	7,3	8,0	8,1	6,8
Izoleucyna / Isoleucine	5,5	3,8	4,2	5,9
Leucyna / Leucine	8,6	9,7	8,7	9,7
Fenylalanina Phenylalanine	4,3	4,7	4,8	3,9
Tryptofan / Tryptophan	-	1,2	1,5	1,8
Niezbędne aminokwasy Essential amino acids	38,2	36,7	37,5	41,1
Źródło: / Source	[19]		[6]	[14]

Zawartość tłuszczu w mleku oślim jest najmniejsza ze wszystkich gatunków mleka i wynosi 0,3 %, ale jego frakcje są porównywalne do frakcji tłuszczu mleka kobiecego. Blasi i wsp. [3] twierdzą, że struktura triacylogliceroli wpływa na fizyczne i odżywcze właściwości tłuszczu mleka. W mleku krowim i kozim nasycone kwasy

tłuszczowe o krótkich łańcuchach najczęściej są zestryfikowane w pozycji *sn-3*-triacylogliceroli, natomiast w mleku oślim kwas kapronowy występuje w pozycji *sn-1*-, kwas mirystynowy zaś w pozycji *sn-2*-. Jednonienasycony kwas tłuszczowy – oleinowy w mleku oślim, krowim i kozim jest podobnie rozmieszczony w pozycji *sn-1*, w pozycji *sn-2*- ulega estryfikacji najczęściej w mleku kozim i owczym, a w *sn-3*- – we wszystkich trzech rodzajach mleka. Spośród wielonienasyconych kwasów tłuszczowych kwas linolowy najczęściej ulega estryfikacji w pozycji *sn-2*-, a w mleku krowim w *sn-3*-. Ponadto mleko ośle charakteryzuje się większą zawartością podstawowych kwasów tłuszczowych w pozycji *sn-2*- w porównaniu z innymi rodzajami mleka, co jest niezwykle ważne ze względu na to, że tłuszcze występujące w diecie są wchłaniane głównie, jako *sn-2* monoacyloglicerole i wolne kwasy tłuszczowe.

Wykazano, że mleko przeżuwaczy odznacza się dużą zawartością nasyconych kwasów tłuszczowych (ponad 70 %) w porównaniu z mlekiem oślim (59,6 %). Ponadto mleko ośle cechuje większa zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (14,6 %) w porównaniu z innymi gatunkami mleka. W mleku krowim wynosi 2,3%, w bawolim, kozim i owczym – do 3,9%. Nienasycone kwasy tłuszczowe są skuteczne w zapobieganiu chorobom serca i stanom zapalnym, dlatego tłuszcz mleka oślego jest bardziej korzystny dla zdrowia człowieka w stosunku do tłuszczu innych gatunków mleka. Do nasyconych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład tłuszczu mleka oślego należą głównie: kwas masłowy w ilości 2,1 % i kwas kapronowy w ilości 0,5 % [3]. Zawartość tych kwasów w mleku oślic jest najmniejsza, natomiast w mleku owczym kształtuje się na poziomie trzykrotnie wyższym. Z drugiej strony krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe pełnią szereg istotnych funkcji biologicznych, w tym regulują syntezę cholesterolu i triacylogliceroli w komórkach wątroby oraz wykazują terapeutyczne działanie na nabłonek jelita grubego [12]. Wśród długołańcuchowych kwasów tłuszczowych występujących w tłuszczu mleka oślego wyróżnia się przede wszystkim: kwas palmitynowy i kwas stearynowy. Kwas palmitynowy występuje w największej ilości zarówno w tłuszczach zwierzęcych, jak i roślinnych. Zawartość tego kwasu w mleku oślim jest o 10 % mniejsza niż w mleku krowim. Z kolei kwas stearynowy w mleku oślim kształtuje się na niskim poziomie (1,5 %), w mleku krowim jego udział jest czterokrotnie większy (6 %) a w pozostałych gatunkach mleka największy (10 %) [3].

W mleku oślim najczęściej występującym kwasem jednonienasyconym jest kwas oleinowy, a jego udział wynosi ok. 20 %, podobnie jak w innych gatunkach mleka. Kwas ten w organizmie człowieka obniża poziom LDL cholesterolu, wpływa na obniżenie ciśnienia krwi oraz blokuje wchłanianie cholesterolu pokarmowego [12]. Chiofalo i wsp. [10] wykazali, że mleko ośle może być efektywnie stosowane w terapii antymiażdżycowej, w czasie rehabilitacji pacjentów z chorobą niedokrwienną serca oraz w diecie antycholesterolowej. Tłuszcz mleka oślego charakteryzuje się największym

udziałem kwasu palmitooleinowego. Jest on 3 razy większy niż w mleku krowim oraz ponad 10 razy większy niż w mleku kozim.

Pod względem żywieniowym najważniejsze są kwasy tłuszczowe wielonienasycone zwane niezbędnymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (NNKT). Zalicza się do nich kwas linolowy, α -linolenowy oraz związki należące do ich rodzin, np. kwas arachidonowy, kwas eikozapentaenowy (EPA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA) [18]. Mleko ośle charakteryzuje się największym udziałem kwasów: linolowego i linolenowego (odpowiednio 9 i 5 %) w porównaniu z innymi gatunkami mleka, w których wynosi on średnio mniej niż 3 % i 1 %. Ponadto, mleko to pomimo bardzo małej zawartości tłuszczu charakteryzuje się zbliżoną zawartością kwasu linolenowego do wysokotłuszczowego mleka bawolego [3, 33]. Badania wykazały, że dodanie do diety kwasu linolowego może być pomocne w leczeniu niektórych atopowych zapaleń skóry, a mleko ośle może być doskonałym jego źródłem [20, 38]. Na uwagę zasługuje również skład triacylogliceroli (TAG) w mleku oślim, z 30 do 54 atomami węgla. Najczęściej występującymi kwasami tłuszczowymi w cząsteczce TAG są palmitynowy-oleinowy-linolowy (6,69 %), palmitynowy-oleinowy-oleinowy (6,62 %), palmitynowy-palmitynowy-oleinowy (5,25 %), kaprynowy-palmitynowy-oleinowy (4,63 %), palmitynowy-oleinowy-linolowy (4,48 %), i palmitynowy-palmitooleinowy-oleinowy (4,18 %) [9]. Mleko ośle wykazuje pewne podobieństwo jakościowe we frakcjach TAG do mleka krowiego, w którym występuje przewaga TAG palmitynowy-oleinowy-oleinowy (około 24 %), i palmitynowy-oleinowy-linolowy (około 19 %), następnie palmitynowy-palmitynowy-oleinowy, oleinowy-oleinowy-oleinowy, palmitynowy-palmitooleinowy-oleinowy, linolowy-oleinowy-oleinowy [26]. W porównaniu z mlekiem krowim w TAG, które występują najliczniej, nie ma wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a w większości występują masłowy-mirystynowy-palmitynowy, masłowy-palmitynowy-palmitynowy i masłowy-mirystynowy-palmitynowy [9].

W tłuszczu mleka oślego stosunek kwasów omega 6 : omega 3 wynosi 1,8 : 1, co jest bardzo korzystne dla wartości odżywczej tego mleka. Należy dodać, że proporcja ta jest od 2 do 6 razy mniejsza niż w mleku innych ssaków. W związku z tym, że pożądanym stosunek tych kwasów w diecie wynosi 4 : 1, podczas gdy obecnie wynosi on 10 : 1, poszukuje się nowych składników diety w celu podwyższenia jej wartości odżywczej. Takim składnikiem może być mleko ośle [3].

Sole mineralne i witaminy

Mleko jest bardzo ważnym źródłem substancji mineralnych, zwłaszcza wapnia, fosforu, potasu, sodu i jodu [1]. Największą zawartością składników mineralnych charakteryzuje się mleko owcze, natomiast mleko ośle i ludzkie zawiera ich najmniej [2]. Zawartość składników mineralnych w postaci popiołu mleka oślego zmniejsza się

w czasie laktacji – systematyczny spadek można tłumaczyć tym, że mleko w początkowym stadium laktacji, będące jedynym pokarmem źrebięcia, jest bardziej zasobne w związki mineralne niż później, gdy pobiera ono również inne pożywienie [19].

Tabela 4. Najważniejsze mikro- i makroelementy oraz witaminy w mleku oślim, kobylim, krowim i kobiecym.

Table 4. Essential micro-, macro-minerals, and vitamins in donkey's, female horse's, cow's, and human milk.

Składnik [mg/l] Component [mg/l]	Gatunek mleka Variety of milk			
	Mleko ośle Donkey's milk	Mleko kobyle Female horse's milk	Mleko krowie Cow's milk	Mleko kobiece Human milk
Ca	330 - 1140	500 - 1300	1120	278
P	320 - 650	200 - 1200	890	140
K	240 - 747	300 - 800	1360	530
Na	100 - 268	167 - 200	530	180
Mg	40 - 83	40 - 110	110	35
Ca/P	0,93 - 2,37	1,72	1,26	1,70
Fe	0,43 - 2,64	0,22 - 1,46	0,9	0,72
Zn	1,23 - 3,19	0,9 - 6,4	4,6	1 - 3
Cu	0,08 - 0,30	0,2 - 1,0	0,14	0,2 - 0,44
Mn	ślady / traces	0,010 - 0,050	0,030	0,003 - 0,006
Witamina / Vitamin A	0,017	0,093 - 0,34	0,38	0,30 - 0,70
Witamina / Vitamin D		0,003	0,0005	0,0004
Witamina / Vitamin E	0,051	0,26 - 1,13	1,0	3,0 - 8,0
Witamina / Vitamin K		0,029	0,035	0,003 - 0,015
Witamina / Vitamin C		17,2 - 147	15,0	50 - 100
Witamina/ Vitamin B ₂		0,37	1,8	0,4 - 0,6
Źródło / Source:		[33]	[7, 34, 36]	[33]

Zawartość związków mineralnych w oślim mleku jest bardzo zbliżona do mleka ludzkiego i mleka kłaczy, z wyjątkiem większej zawartości wapnia i potasu, ale stosunek Ca : P (0,93 - 2,37) [31] mleka oślego zawiera się w granicach między najniższą wartością charakterystyczną dla mleka krowiego, a najwyższą – odpowiadającą mleku ludzkiemu [28]. W porównaniu z mlekiem krowim (1340 mg/kg) i kozim

(1220 mg/kg) [29] mleko ośle charakteryzuje się mniejszą zawartością wapnia (330 - 1140 mg/kg) [33]. Duża zawartość laktozy odpowiedzialna jest za smakowitość tego rodzaju mleka oraz za poprawę wchłaniania wapnia w jelitach, co jest niezbędne w procesie mineralizacji kości noworodków [35]. Należy podkreślić, że obciążenie nerek niemowląt zależy głównie od zawartości białka i soli mineralnych w diecie i jest ono takie samo przy karmieniu mlekiem matki, jak i przy karmieniu mlekiem oślim.

Właściwości antybakteryjne

Mleko, ze względu na dużą zawartość składników odżywczych, jest bardzo dobrą pożywką sprzyjającą rozwojowi mikroorganizmów.

W mleku występuje ok. 60 rodzimych enzymów, których źródłem są leukocyty, osocze krwi oraz komórki gruczołu mlecznego. Ich rozmieszczenie jest nierównomierne i zależne od takich czynników, jak: gatunek ssaka, od którego pochodzi mleko, jego rasa, wiek, liczba i okres laktacji, stan zdrowotny oraz czynniki żywieniowe [17]. Enzymy mleka oślego charakteryzują unikatowe właściwości bakteriobójcze, które wyróżniają je spośród mleka innych ssaków [25]. Badania Zhanga i wsp. [41] dotyczące bezpieczeństwa żywności prowadzone wstępnie na 9 różnych mikroorganizmach w testach dyfuzyjnych, a następnie w badaniach *in situ*, gdy do mleka oślego wprowadzano *Salmonella choleraesuis* (CGMCC 1.1859) i *Shigella dysenteriae* (CGMCC 1.1869) oraz badano ich liczbę w czasie przechowywania w temp. 4 i 20 °C. Wyniki badania testów dyfuzyjnych wykazały, że bakterie *Salmonella choleraesuis* i *Shigella dysenteriae* są szczególnie wrażliwe na oddziaływanie antybakteryjne mleka oślego, natomiast badania *in situ* wykazały szczególne działanie na *Shigella dysenteriae*, gdyż po przechowywaniu mleka w 20 °C nie wykryto obecności tych bakterii.

Lizozym znany jest jako naturalny środek antybakteryjny, ponieważ katalizuje hydrolizę wiązań β -1,4-glikozydowych pomiędzy cząsteczkami kwasu N-acetylmuraminowego i N-glukozyaminą w ścianach komórkowych bakterii [8], w tym częstych patogenów żywności, jak *Staphylococcus* i *Streptococcus*. Enzym ten wraz z immunoglobulinami, laktorefiną i laktoperoksydazą może wspomagać układ pokarmowy, zmniejszając ryzyko występowania infekcji zapalnych żołądka i jelit u niemowląt [4]. W organizmie człowieka stanowi ponadto jeden z mechanizmów nieswoistej, humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Przypuszcza się, że stymuluje głównie produkcję limfocytów T, obecnych w tkankach limfoidalnych związanych z układem pokarmowym [cyt. za 15].

Jak podaje Malacarne i wsp. [25], zawartość laktoferyny w mleku oślim jest dwukrotnie większa niż w mleku krowim. Średnia zawartość lizozymu w mleku oślim (1 mg/ml) jest większa w stosunku do mleka kobiecego (0,12 mg/ml), krowiego i koziego, gdzie występują jego śladowe ilości. Jednakże zawartość lizozymu w mleku oślim jest zbliżona do zawartości tego związku w mleku klaczy (0,79 mg/ml) [37]. Tak

duża zawartość lizozymu w mleku oślim wpływa pozytywnie na efekty konserwacji surowego mleka i produktów z niego otrzymywanych, co potwierdzają Xiao-Ying Zhang i wsp. [41], którzy oznaczyli ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD) surowego mleka oślego na poziomie 4,34 log jtk/ml, podczas gdy OLD w przypadku mleka krowiego czy owczego w przybliżeniu wynosi odpowiednio 10^7 i $10^5 - 10^7$ jtk/ml [11, 27].

Niektórzy autorzy sugerują użycie mleka oślego do celów probiotycznych, ponieważ jest dobrym medium do wzrostu probiotycznych szczepów *Lactobacillus* z uwagi na dużą zawartość lizozymu oraz laktozy [13].

Ponadto Chiavari i wsp. [8] wykazali, że w napojach z mleka oślego pasteryzowanego w temp. 63 °C przez 30 min, fermentowanego przez pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*, aktywność lizozymu pozostała praktycznie bez zmian w stosunku do początkowej wartości, nawet po 30 dniach chłodniczego przechowywania.

Inne kierunki wykorzystania mleka oślego

Mleko ośle z uwagi na skład chemiczny zbliżony do mleka kobiecego może być rozważane jako surowiec do produkcji proszku mlecznego będącego alternatywą w systemie żywienia noworodków, u których występuje alergia pokarmowa. Zwraca się uwagę zwłaszcza na duże podobieństwo w profilu lipidowym i składzie białkowym tych rodzajów mleka. Badania kliniczne dowodzą, że odżywki dla niemowląt, które bazują na mleku krowim, są mniej akceptowane niż mleko ośle w przypadku żywienia osób cierpiących z powodu CMPA (*cow's milk protein allergy*) [5].

W krajach Europy Zachodniej, zarówno w Szwajcarii jak i Belgii, a także w Stanach Zjednoczonych ośle mleko jest butelkowane i sprzedawane, przy czym blisko połowa produkcji stanowi bazę do produkcji kosmetyków [22].

Podsumowanie

Najnowsze dowody badań klinicznych dotyczące tolerancji mleka oślego przez niemowlęta w przypadku alergii na białka mleka krowiego odnowiły zainteresowanie mlekiem koniowatych. Wprawdzie zostały dobrze dopracowane odżywki z białek wysoko zhydrolizowanych lub sojowych, lecz żywność alternatywna, w szczególności trudnych przypadkach alergii, jest bardzo ceniona. Mleko ośle ze względu na podobieństwo składu do mleka kobiecego i jego szczególną smakowitość odgrywa dużą rolę w Europie Zachodniej i w USA, chociaż zwraca uwagę konieczność uzupełnienia tłuszczu w diecie z tego mleka. Z kolei dzięki niewielkiej zawartości tłuszczu i unikalnemu składowi kwasów tłuszczowych mleko to i jego pochodne stają się wartościowym środkiem spożywczym dla starszych konsumentów.

Literatura

- [1] Al-Wabel NA.: Mineral contents of milk of cattle, camels, goats and sheep in the central region of Saudi Arabia. *Asian J. Biochem*, 2008, **3**, 373-375.
- [2] Barłowska J., Sz wajkowska M., Litwińczuk Z., Król J.: Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Compr. Rev. Food Sci. F*, 2011, **10**, 291-302.
- [3] Blasi F., Montesano D., Angelis M., Maurizi A., Ventura F., Cossignani L., Simonetti M.S., Damiani P.: Results of stereospecific analysis of triacylglycerol fraction from donkey, cow, ewe, goat and buffalo milk. *J. Food Comp. Anal.*, 2008, **21**, 1-7.
- [4] Buscino L., Gianpietro P.G., Lucenti P., Lucaroni F., Pini C., Di Felice G.: Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, **105**, 1031-1034.
- [5] Carroccio A., Cavataio F., Montalto G., D'Amico D., Alabrese, L.: Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clin. Exp. Allergy*, 2000, **18**, 1597-1603.
- [6] Casapo-Kiss Zs., J. Stefler, T.G. Martin, S. Makray, and J. Casapo.: Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and content of macro- and micro-elements. *Int. Dairy J.*, 1995, **5**, 403-415.
- [7] Cashman K.D.: Macroelements, Nutritional Significance. In: *Encyclopaedia of Dairy Science*. Eds. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox. Academic Press. London 2003, **vol. 3**, pp. 2051-2065.
- [8] Chiavari C., Coloretto F., Nanni M., Sorrentino E., Grazia L.: Use of donkey's milk for fermented beverage with lactobacilli. *Lait*, 2005, **85**, 481-490.
- [9] Chiofalo B., Drogoul C., Salimei E.: Other utilisation of mare's and ass's milk. In: *Nutrition and feeding of the broodmare*. Eds. N. Miraglia, W. Martin-Rosset. EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2006, **120**, pp. 133-147.
- [10] Chiofalo B., Salimei E., Chiofalo L.: Ass's milk: Exploitation of an alimentary resource. *Riv. Foli-umin*, 2001, **1 (Suppl. 3)**, 235-241.
- [11] Chye F.Y., Abdullah A., Ayob M.K.: Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol.*, 2004, **21**, 535-541.
- [12] Cichosz G.: Prozdrowotne właściwości tłuszczu mlekowego. *Przegl. Mlecz.*, 2007, **5**, 4-8.
- [13] Coppola R., Salimei E., Succi M., Sorrentino E., Nanni M., Ranieri P., Belliblanes R., Grazia L.: Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Annals Microbiol.*, 2002, **52**, 55-60.
- [14] Darragh A., Human milk. In: *Encyclopedia of Dairy Science*. Eds. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox Academic Press. London 2003, **vol. 3**, pp. 1350-1360.
- [15] Dembczyński R., Białas W., Jankowski T.: Wykorzystanie dwufazowej ekstrakcji wodnej do separacji lizozymu z białka jaja kurzego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **5 (66)**, 5-17.
- [16] Doreau M., Martuzzi F.: Fat content and composition in mare's milk. In: *Nutrition and feeding of the broodmare*. Eds. N. Miragli, W. Martin-Rosset. EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers Wageningen, The Netherlands, 2006, **120**, 77-87.
- [17] Dziuba J.: *Enzymy mleka*. W: *Mleczarstwo*. Red. S. Ziąjka. Wyd. UWM, Olszyn 2008.
- [18] Gawęcki J., Hryniewiecki L.: *Podstawy nauki o żywieniu*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2007.
- [19] Guo H.Y., Pang K., Zhang X.Y., Zhao L., Chen S.W., Dong M.L., Ren F.Z.: Composition physico-chemical properties, distribution, nitrogen fraction distribution and amino acid profile of donkey milk. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**, 1663-1643.
- [20] Horrobin, D. F.: Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am. J. Clinical Nutr.*, 2000, **71**, 367-372.
- [21] Hossi S., Honma K., Daimatsu T., Kiyokawa M., Aikawa T., Watanabe S.: Lower energy content of human milk than calculated using conversion factors. *Pediatrics Inter.*, 2005, **47**, 177-181.

- [22] Iacono G., Carroccio A., Cavataio F., Montaldo G., Soresi M., Balsamo V. Use of ass's milk in multiple food allergy. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.* 1992, **90**, 549-563.
- [23] Innocente N., Parpinel M., Biasutti M.: Composition and nutritional value of donkey milk. Proc. IDF International Symposium on Sheep and Goat and other non-Cow Milk, Athens, Greece, 16-18 May 2011.
- [24] Marshall K., Ali Z.: Gender issues in donkey use in rural Ethiopia. In: *Donkey's people and development*. Eds. P.Starkey, D. Fielding. Wageningen, The Netherlands, 1998, 62-68.
- [25] Malacarne M., Martuzzi F., Summer A., Mariani P.: Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *Int. Dairy J.*, 2002, **12**, 869-877.
- [26] Morera Pons S., Castellote A.I., Jauregui O., Casals I., Lopez Sabater M.C.: Triacylglycerol markers of mature human milk. *European J. Clinical Nutr.*, 2003, **57**, 1621-1626.
- [27] Morgan F., Massouras T., Barbosa M., Roseiro L., Ravasco F., Kandarakis I.: Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Rumin. Res.*, 2003, **47**, 39-49.
- [28] Pagliarini E., Solaroli G., Peri C.: Chemical and physical characteristics of mare's milk. *Ital. J. Food Sci.*, 1993, **4**, 323-332.
- [29] Park Y.W., Juarez M., Ramos M., Haenli G.F.W.: Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 2007, **68**, 88-113.
- [30] Potočnik K., Gantner V., Kuterovac K., Cividini A.: Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*, 2011, **61 (2)**, 107-113.
- [31] Salimei E., Fantuz F., Coppola R., Chiofalo B., Polidori P., Varisco G.: Composition and characteristic of ass's milk. *Animal Res.*, 2004, **53**, 67-78.
- [32] Salimei E.: Animals that produce dairy foods – Donkey. In: *Encyclopaedia of Dairy Sciences*. Eds. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney. 2nd ed. Academic Press. San Diego, CA, USA, 2011, **vol. 1**, pp. 365-373.
- [33] Salimei E., Fantuz F.: Equid milk for human consumption. *Int. Dairy J.*, 2012, **24**, 130-142.
- [34] Sanz Ceballos L., Ramos Morales E., Torre Advare G., Diaz Castro J., Perez Martinez L., Sanz Sampelayo M.: Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analysed by identical methodology. *J. Food Comp. Anal.*, 2009, **22**, 322-329.
- [35] Schaafsma, G.: Nutritional significance of lactose and lactose derivatives. In: *Encyclopaedia of Dairy Science*. Eds. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox. Academic Press, London 2003, **vol. 3**, pp. 1529-1533.
- [36] Schaafsma, G.: Vitamins. General Introduction. In: *Encyclopaedia of Dairy Science*. Eds. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox. Academic Press. London 2003, **vol. 4**, pp. 2653.
- [37] Stelwagen K.: Milk protein. In: *Encyclopaedia of Dairy Science*. Eds. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox. Academic Press, London 2003, **vol. 3**, pp. 1835-1842.
- [38] Vincenzetti S., Polidori P., Mariani P., Cammertoni N., Fantuz F., Vita A.: Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chem.*, 2008, **106**, 640-649.
- [39] Wszolek M.: Mleczne napoje fermentowane z mleka koziego. *Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków* 2006.
- [40] Wszolek M.: Przydatność technologiczna mleka koziego. *Przegl. Mlecz.*, 1997, **1**, 12-14.
- [41] Zhang X-Y., Zhao L., Jiang L., Dong M-L., Ren F-Z.: The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control*, 2008, **19**, 1191-1195.

COMPOSITION AND PROPERTIES OF DONKEY'S MILK

S u m m a r y

An increasing number of cases of cow's milk allergy in infants evoked interest in equine milk (milk from female horses and donkeys) owing to its composition similar to that of human milk. Clinical studies proved a very good tolerance of this kind of milk by the body of infants and young children. Milk is considered useful in preventing atherosclerosis and in controlling immune responses in elderly people. Although similar to mare's milk, donkey's milk has one distinctive characteristic: it contains a particularly high content of lysozyme. For that reason, it is characterized by antibacterial properties even after pasteurization and, therefore, among other things, it is particularly useable in the production of probiotic beverages.

Key words: donkey's milk, lysozyme, anti-allergic properties, functional characteristics ☒

BEATA PASZCZYK, MARIA CZERNIEWICZ, WALDEMAR BRANDT

**SKŁAD KWASÓW TŁUSZCZOWYCH, ZE SZCZEGÓLNYM
UWZGLĘDNIENIEM ZAWARTOŚCI KWASU *cis9trans11* C18:2 (CLA)
ORAZ IZOMERÓW TRANS KWASU C18:1 I C18:2 W MLEKU ORAZ
WYPRODUKOWANYCH Z NIEGO KEFIRACH I JOGURTACH**

Streszczenie

Przedmiotem badań było porównanie składu kwasów tłuszczowych, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości sprzężonego kwasu linolowego (*cis9trans11* C18:2) oraz izomerów *trans* kwasu C18:1 i C18:2, w mleku oraz wyprodukowanych z niego kefirach i jogurtach. Analizie poddano mleko surowe, mleko znormalizowane oraz wyprodukowane z niego kefir i jogurt. Oznaczenia przeprowadzono metodą GC w 100-metrowej kolumnie kapilarnej z fazą CP Sil 88.

Zastosowany w doświadczeniu proces technologiczny produkcji kefirów i jogurtów nie wpłynął na profil kwasów tłuszczowych ocenianych mlecznych napojów fermentowanych. Skład kwasów tłuszczowych tłuszczu kefiru i jogurtu był zbliżony do składu kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka. Zawartość sprzężonego kwasu linolowego *cis9trans11* C18:2 (CLA) oraz izomerów *trans* kwasu C18:1 i C18:2 w badanych napojach fermentowanych zależała od ich koncentracji w surowcu, z którego zostały wytworzone.

Słowa kluczowe: jogurt, kefir, kwasy tłuszczowe, izomery trans-kwasów tłuszczowych, CLA

Wprowadzenie

Mleko oraz fermentowane produkty mleczarskie, głównie kefir i jogurty, a także sery, są ważnymi składnikami diety człowieka. Mleczne napoje fermentowane polecane są również osobom o słabej aktywności enzymatycznej układu trawiennego i osobom z zaburzeniami pracy narządów układu trawiennego [26]. Głównym składnikiem energetycznym mleka jest tłuszcz. Tłuszcz mlekowy należy do najbardziej skomplikowanych tłuszczów naturalnych [7]. Dzięki specyficznemu składowi kwasów tłuszczowych jest jednym z najlepiej przyswajalnych tłuszczów jadalnych [12]. Charaktery-

Dr inż. B. Paszczyk, Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn,
dr inż. M. Czerniewicz, mgr inż. W Brandt, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, ul. Oczapowskiego 7,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 10-719 Olsztyn.
Kontakt: paszczyk@uwm.edu.pl

styczną cechą tłuszczu mlekowego jest bardzo duże zróżnicowanie składu kwasów tłuszczowych oraz wysoka zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Tłuszcz mlekowy jest bogaty w kwasy nasycone. W skład nienasyconych kwasów tłuszczowych tłuszczu mlekowego wchodzi kwas monoenowy i polienowy, które występują głównie w formie *cis*. W mniejszych ilościach spotykane są formy *trans* tych kwasów. W składzie kwasów tłuszczowych tłuszczu mlekowego występują kwasy, którym przypisuje się działanie biologicznie korzystne dla zdrowia człowieka, m.in. kwas masłowy, który charakteryzuje się właściwościami przeciwnowotworowymi, kwas oleinowy wykazujący właściwości przeciwmiażdżycowe, kwas wakcenyowy (*trans*11 C18:1) o właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwmiażdżycowych czy kwas linolowy ze sprzężonym układem podwójnych wiązań (CLA) o wielokierunkowym działaniu prozdrowotnym [3, 22, 23, 26]. W grupie sprzężnych dienów tłuszczu mlekowego najbardziej aktywny biologicznie i dominujący jest kwas *cis*9*trans*11 C18:2 – stanowi on od 83 do 93 % wszystkich izomerów CLA [2, 9, 13]. Przypisuje mu się m.in. właściwości przeciwutleniające, antykancerogenne, antyaterogenne i antymutagenne [17, 18, 19, 20, 22].

Ilościowy skład kwasów tłuszczowych tłuszczu mlekowego ulega zmianom pod wpływem różnych czynników, do których należą m.in. sposób żywienia zwierząt, rasa krów i cechy osobnicze, okres laktacji, warunki klimatyczne chowu, stan zdrowia i wiek bydła. Z wymienionych czynników najistotniejszy wpływ wywiera sposób żywienia. W sezonie żywienia krów paszą zieloną tłuszcz mlekowy zawiera znacznie więcej kwasów z grupy C18, w tym głównie kwasu C18:1 oraz znacznie mniej kwasu palmitynowego (C16:0) i mirystynowego (C14:0) niż w sezonie żywienia oborowego [8, 27]. Według Żegarskiej i wsp. [30] sumaryczna zawartość izomerów *trans* kwasu C18:1 w mleku pochodzącym z sezonu letniego kształtowała się w przedziale od 3,57 do 5,37 % w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych, w mleku pozyskiwanym zimą w przedziale od 1,26 do 1,84 %. Udział kwasu *cis*9*trans*11 C18:2 (CLA) w tłuszczu mlekowym z okresu letniego kształtował się na poziomie od 1,06 do 1,76 %, przy średniej 1,40 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych, a w tłuszczu mlekowym z okresu zimowego od 0,29 do 0,61 % (średnia 0,40 %).

Mleko i jego przetwory są bogatym źródłem kwasu *cis*9*trans*11 C18:2 w diecie człowieka. Na poziom CLA w produktach mleczarskich, tj. serach czy napojach fermentowanych, poza dietą zwierzęcia, a więc koncentracją CLA w surowcu, mogą wpływać także warunki panujące podczas prowadzenia procesów technologicznych oraz aktywność dodawanych kultur bakterii fermentacji mlekowej [1, 4, 10, 11, 14, 15, 24, 25].

Celem pracy było porównanie składu kwasów tłuszczowych, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości sprzężonego kwasu linolowego (*cis*9*trans*11 C18:2) oraz

izomerów *trans* kwasu C18:1 i C18:2 w mleku oraz wyprodukowanych z niego kefirach i jogurtach.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiło surowe mleko zbiorcze, znormalizowane mleko spasteryzowane, przygotowane do produkcji napojów fermentowanych oraz produkty finalne – kefir i jogurt. Napoje fermentowane zostały wyprodukowane w skali półtechnicznej w Centrum Edukacyjno-Badawczym Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Surowcem do ich produkcji było mleko zbiorcze, pochodzące z rejonu Olsztyna, dostarczone cysterną do hali technologicznej w kwietniu 2012 roku. Kefiry i jogurty produkowano metodą termostatową. Do produkcji jogurtu stosowano kulturę starterową firmy Chr. Hansen YC-X11 Yo-flex, zawierającą termofilne bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* oraz *Streptococcus thermophilus*. Z kolei do produkcji kefiru wykorzystano kulturę starterową firmy Danisco Kefir D, zawierającą grzybki kefirowe, będące zoogleą bakterii fermentacji mlekowej i drożdży.

Proces produkcyjny mlecznych napojów fermentowanych przebiegał zgodnie z poniżej opisanymi czynnościami technologicznymi. Po przyjęciu mleka surowego, ochładzano je do temp. 6 °C i magazynowano przez 4 h, a następnie po ogrzaniu do temp. 45 °C poddawano wirowaniu i odgazowaniu (80·10³ Pa; 60 °C) oraz pasteryzacji HTST (72 °C/15 s), po czym chłodzono do temp. 6 °C i składowano w tych warunkach 24 h. Mleko do produkcji jogurtu normalizowano do zawartości tłuszczu około 2 % (dodatek śmietanki spasteryzowanej) oraz do 15 % suchej masy (dodatek odtłuszczonego mleka w proszku – blender, temp. 55 °C, 1 h). Mleko przeznaczone do produkcji kefiru normalizowano do zawartości tłuszczu ok. 2 % (dodatek śmietanki spasteryzowanej). Znormalizowane mleko poddawano homogenizacji dwustopniowej (18/5 MPa, temp. 65 °C) i długotrwałej pasteryzacji VHT (90 °C/5 min), a po ochłodzeniu do odpowiedniej temperatury (jogurt do 45 °C; kefir do 22 °C) – zaszczepiano. Po napełnieniu opakowań jednostkowych (kubeczki z PP o obj. 0,5 dm³ zamykane wieczkiem aluminiowym za pomocą półautomatycznej zgrzewarki) prowadzono dojrzewanie w termostatach – jogurt w temp. 43,5 °C przez około 4,5 h, kefir w temp. 21 °C przez około 12 h – do osiągnięcia przez produkt pH równego 4,65. Następnie napoje chłodzono i analizowano. Wyprodukowano dwie partie kefiru i jedną jogurtu, każda po 80 dm³. Z każdej partii produkcyjnej pobierano po dwie próbki do badań analitycznych. Wszystkie oznaczenia wykonywano w dwóch równoległych powtórzeniach.

Tłuszcz z mleka oraz badanych jogurtów i kefirów wydzielano za pomocą metody Röse-Gottlieba [21]. Estry metylowe kwasów tłuszczowych przygotowano według metody IDF, stosując metanolowy roztwór KOH [6]. Rozdzielanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych wydzielonego tłuszczu prowadzono metodą chromatografii

gazowej (GC), przy użyciu chromatografu gazowego firmy HP 6890 z detektorem płomieniowo jonizacyjnym, kolumną kapilarną (producent Chrompack) dł. 100 m, $\varnothing = 0,25$ mm, grubość filmu 0,20 μm , faza stacjonarna CP Sil 88. Oznaczenia prowadzono w następujących warunkach: temp. kolumny 60 °C (1 min) – 180 °C, $\Delta t = 5$ °C/min, temp. detektora i dozownika odpowiednio 250 °C i 225 °C, gaz nośny: hel, przepływ 1,5 cm^3/min , split: 50 : 1.

Identyfikację pików kwasów tłuszczowych i izomerów *trans* kwasów tłuszczowych prowadzono przez porównanie z czasem retencji wzorców estrów metylowych kwasów tłuszczowych firmy Sigma i Supelco oraz na podstawie danych literaturowych. Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica PL, ver. 10.

Wyniki i dyskusja

Ogólny skład kwasów tłuszczowych tłuszczu wydzielonego z mleka surowego i znormalizowanego oraz wyprodukowanych z niego kefirów i jogurtów przedstawiono w tab. 1. Obok zawartości poszczególnych oznaczonych kwasów tłuszczowych przedstawiono sumaryczną zawartość wybranych grup kwasów tłuszczowych (lotnych od C4 do C10), wyższych nasyconych, monoenowych i polienowych).

W tłuszczu wydzielonym z mleka oraz z jogurtów i kefirów w największej ilości występowały nasycone kwasy tłuszczowe. W mleku surowym sumaryczna zawartość tych kwasów wynosiła 63,51 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych. Zbliżone ilości nasyconych kwasów tłuszczowych stwierdzono w mleku znormalizowanym (63,19 %), przygotowanym do produkcji kefirów, w mleku znormalizowanym (63,86 %), przygotowanym do produkcji jogurtów oraz w tłuszczu wydzielonym z jogurtów (63,53 %) – w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych. Tłuszcz wydzielony z kefirów charakteryzował się istotnie niższym ($p \leq 0,05$) udziałem kwasów nasyconych, wynoszącym 62,57 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych (tab. 1). W tej grupie kwasów tłuszczowych zarówno w tłuszczu mleka, jak i w tłuszczu wydzielonym z objętych badaniami mlecznych napojów fermentowanych występowały: kwas palmitynowy (C16:0) i stearynowy (C18:0). Kwas palmitynowy w mleku oraz jogurtach stanowił ponad 34 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych. Nieznacznie mniejszą zawartość tego kwasu stwierdzono w kefirach (33,80 %). Kwas stearynowy w mleku surowym występował w ilości 9,34 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych. W mleku znormalizowanym oraz jogurtach i kefirach udział tego kwasu był niższy (tab. 1). Zawartość lotnych kwasów tłuszczowych w tłuszczu wydzielonym z mleka surowego była na poziomie 9,92 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych. W mleku znormalizowanym przygotowanym do produkcji kefirów lotne kwasy tłuszczowe stanowiły 9,84 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych, a w mleku znormalizowanym przygotowanym do produkcji jogurtów – 10,48 %. Istotnie większe ilości tych kwasów niż w mleku stwierdzono w kefirach i jogurtach. W tłuszczu wydzielonym z kefirów

łączna ilość lotnych kwasów tłuszczowych wynosiła 10,72 %, a w tłuszczu pozyskanym z jogurtów 10,76 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych (tab. 1). Sumaryczna zawartość monoenowych oraz polienowych kwasów tłuszczowych w tłuszczu wydzielonym z mleka i z jogurtów czy kefirów była na zbliżonym poziomie. Monoenowe kwasy tłuszczowe w tłuszczu mleka oraz wyprodukowanych z niego jogurtów czy kefirów stanowiły ponad 23 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych. Łączna zawartość polienowych kwasów tłuszczowych w tłuszczu mleka i tłuszczu wydzielonym z mlecznych napojów fermentowanych ulegała niewielkim wahaniom (tab. 1).

W badaniach szczególną uwagę zwrócono na zawartość sprzężonego kwasu linolowego oraz izomerów *trans* kwasu C18:1 i C18:2 w mleku oraz w kefirach i jogurtach. Udział kwasu *cis9trans11* C18:2 (CLA) oraz izomerów *trans* kwasu C18:1 i C18:2 w tłuszczu wydzielonym z mleka surowego, mleka znormalizowanego oraz wyprodukowanych z niego kefirów i jogurtów przedstawiono w tab. 2.

Zawartość sprzężonego kwasu linolowego (*cis9trans11*) C18:2 w tłuszczu wydzielonym z mleka surowego oraz mleka znormalizowanego wynosiła 0,28 % w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych. Udział tego kwasu w tłuszczu wydzielonym z badanych kefirów i jogurtów był na tym samym poziomie (tab. 1 i 2). Według badań Żegarskiej i wsp. [29] zawartość sprzężonego kwasu linolowego w mleku pozyskiwanym zimą kształtowała się w przedziale od 0,22 do 0,44 % w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych. Z badań opublikowanych przez Żegarską i wsp. [30] w 2006 roku wynika, że poziom CLA w mleku kształtował się w przedziale od 0,30 do 0,52 % w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych. Z kolei Lipiński i wsp. [16] podają, że udział tego kwasu w tłuszczu mlekowym pochodzącym z kwietnia wynosił 0,38 % w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych.

Analiza składu kwasów tłuszczowych handlowych napojów fermentowanych przeprowadzona przez Żegarską i wsp. [28] wykazała, że zawartość sprzężonego kwasu linolowego w próbkach kefiru i jogurtu jest zróżnicowana i zależy od okresu roku, z jakiego one pochodzą. W kefirach i jogurtach zakupionych w styczniu i lutym zawartość CLA była mniejsza (kefiry zawierały od 0,39 % do 0,52 %, jogurty od 0,37 % do 0,49 % CLA w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych). Fermentowane produkty mleczarskie badane przez wymienionych autorów w czerwcu i lipcu charakteryzowały się większą zawartością CLA (odpowiednio kefiru od 0,55 do 0,86 %, a jogurty od 0,66 do 0,80 %). Wyższy poziom sprzężonego kwasu linolowego w jogurtach stwierdzili Fritsche i Steinhart [5]. W badanych przez autorów jogurtach średnia zawartość CLA wynosiła 0,69 %, a w jogurtach probiotycznych 1,05 % w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych. Autorzy badali produkty znajdujące się na rynku w okresie od kwietnia do grudnia i nie podali, z jakich miesięcy pochodziły jogurty.

Tabela 1. Skład kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka oraz wyprodukowanych z niego kefirów i jogurtów [% sumy kwasów tłuszczowych].
 Table 1. Composition of fatty acids in fat of milk and kefirs and yoghurts produced from it [% of total fatty acids].

Lp.	Kwas tłuszczowy Fatty acid $\bar{x} \pm s / SD$	Mleko surowe Raw milk $\bar{x} \pm s / SD$	Mleko normalizowane do produkcji kefirów Normalized milk to produce kefirs $\bar{x} \pm s / SD$	Kefir Kefir $\bar{x} \pm s / SD$	Mleko normalizowane do produkcji jogurtów Normalized milk to produce yoghurts $\bar{x} \pm s / SD$	Jogurt Yoghurt $\bar{x} \pm s / SD$
1	C4:0	3,06 ± 0,39	3,01 ± 0,07	3,61 ± 0,17	3,39 ± 0,08	3,47 ± 0,27
2	C6:0	2,21 ± 0,16	2,20 ± 0,05	2,39 ± 0,28	2,32 ± 0,03	2,40 ± 0,18
3	C8:0	1,42 ± 0,06	1,40 ± 0,04	1,46 ± 0,77	1,45 ± 0,01	1,50 ± 0,11
4	C10:0	3,24 ± 0,11	3,23 ± 0,14	3,27 ± 1,04	3,32 ± 0,00	3,39 ± 0,23
5	C10:1	0,29 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,31 ± 0,09	0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,22
6	C11:0	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 1,41	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01
7	C12:0	3,74 ± 0,13	3,73 ± 0,19	3,70 ± 1,31	3,86 ± 0,05	3,92 ± 0,23
8	C12:1	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,03
9	C13:0 iso	0,14 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,15 ± 0,05
10	C13:0	0,13 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,06
11	C14:0 iso	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,03
12	C14:0	11,92 ± 0,20	11,90 ± 0,33	11,80 ± 0,46	12,16 ± 0,10	12,24 ± 0,37
13	C15:0 iso	0,23 ± 0,00	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,00
14	C15:0 aiso	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,01
15	C14:1	0,91 ± 0,07	0,93 ± 0,05	0,94 ± 0,06	0,98 ± 0,01	0,99 ± 0,03
16	C15:0	1,03 ± 0,04	1,03 ± 0,04	1,02 ± 0,05	1,09 ± 0,01	1,08 ± 0,02
17	C16:0 iso	0,30 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,02
18	C16:0	34,26 ± 0,44	34,11 ± 0,47	33,80 ± 0,55	34,65 ± 0,06	34,25 ± 0,35
19	C17:0 iso	0,52 ± 0,10	0,48 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,48 ± 0,09
20	C17:0 aiso	0,39 ± 0,10	0,35 ± 0,14	0,37 ± 0,07	0,34 ± 0,00	0,29 ± 0,08
21	C16:1	1,76 ± 0,12	1,79 ± 0,08	1,81 ± 0,79	1,86 ± 0,01	1,93 ± 0,18
22	C17:0	0,67 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,66 ± 0,54	0,66 ± 0,00	0,66 ± 0,02
23	C17:1	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,20	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,02
24	C18:0	9,34 ± 0,32	9,25 ± 0,36	9,19 ± 0,45	8,92 ± 0,00	8,92 ± 0,39

25	t6 - t9 C18:1	0,34 ± 0,09	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,02
26	t10 + t11 C18:1	0,81 ± 0,05	0,79 ± 0,04	0,78 ± 0,05	0,76 ± 0,01	0,75 ± 0,04
27	t12 C18:1	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01
28	c9 C18:1	17,93 ± 0,61	17,96 ± 0,67	17,80 ± 0,82	17,42 ± 0,02	17,36 ± 0,69
29	c11 C18:1	0,65 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,65 ± 0,03	0,65 ± 0,02	0,64 ± 0,03
30	c12 C18:1	0,18 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01
31	c13 C18:1	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01
32	t16 C18:1	0,23 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01
33	19:0	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,01
34	c9 t13 C18:2	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,02
36	c9 t12 C18:2	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,23 ± 0,00
37	t9 c12 C18:2	0,06 ± 0,08	0,07 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
38	t11 c15 C18:2	0,03 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
39	c9 c12 C18:2	1,35 ± 0,08	1,37 ± 0,03	1,39 ± 0,05	1,36 ± 0,01	1,39 ± 0,05
40	C20:0	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01
41	C20:1	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,02
42	C18:3	0,35 ± 0,03	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,02
43	C18:2 (CLA)	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,00	0,28 ± 0,01
44	Σ lotne Σ volatile	9,92 ± 0,13^a	9,84 ± 0,06^a	10,72 ± 0,35^b	10,48 ± 0,12^{a,b}	10,76 ± 0,78^b
45	Σ nasycone Σ saturated	63,51 ± 0,45^{a,b}	63,19 ± 0,57^{a,b}	62,57 ± 0,39^c	63,86 ± 0,16^b	63,53 ± 0,03^{a,b}
46	Σ monoenoowe Σ monoenoic	23,76 ± 0,11^a	23,81 ± 0,67^a	23,62 ± 0,60^a	23,28 ± 0,04^a	23,28 ± 0,43^a
47	Σ polienowe Σ polyenoic	2,40 ± 0,03^a	2,43 ± 0,09^a	2,36 ± 0,11^a	2,41 ± 0,02^a	2,47 ± 0,10^a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s$ / SD – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; wartości oznaczone w wierszach tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / values in the rows and denoted by the same letter do not differ statistically significantly ($p > 0.05$).

Tabela 2. Zawartość CLA oraz izomerów *trans* kwasu C18:1 i C18:2 w tłuszczu mlekowym i wyprodukowanych kefirach i jogurtach [% sumy kwasów tłuszczowych].Table 2. Content of CLA and *trans* C18:1 and C18:2 isomers in milk fat and in kefir and yogurts produced [% of total fatty acids].

Izomery <i>trans</i> <i>Trans</i> Isomers	Mleko surowe Raw milk $\bar{x} \pm s / SD$	Mleko normalizowane do produkcji kefirów Normalized milk to produce kefir $\bar{x} \pm s / SD$	Kefir Kefir $\bar{x} \pm s / SD$	Mleko normalizowane do produkcji jogurtów Normalized milk to produce yoghurt $\bar{x} \pm s / SD$	Jogurt Yoghurt $\bar{x} \pm s / SD$
<i>cis</i> ⁹ <i>trans</i> ¹¹ C18:2(CLA)	0,28 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,01 ^a
<i>t</i> ₆ - <i>t</i> ₉	0,34 ± 0,09 ^b	0,30 ± 0,02 ^{a,b}	0,29 ± 0,02 ^{a,b}	0,27 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,02 ^a
<i>t</i> ₁₀ + <i>t</i> ₁₁	0,71 ± 0,02 ^b	0,79 ± 0,04 ^a	0,78 ± 0,05 ^a	0,76 ± 0,01 ^{a,b}	0,75 ± 0,04 ^{a,b}
<i>t</i> ₁₂ C18:1	0,17 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a
<i>t</i> ₁₆ C18:1	0,23 ± 0,02 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,01 ^a
Σ <i>trans</i> C18:1	1,45 ± 0,09 ^a	1,51 ± 0,06 ^a	1,46 ± 0,11 ^a	1,41 ± 0,01 ^a	1,38 ± 0,07 ^a
<i>c</i> ₉ <i>t</i> ₁₃	0,10 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,02 ^a
<i>c</i> ₉ <i>t</i> ₁₂	0,24 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,00 ^a	0,23 ± 0,01 ^a
<i>t</i> ₉ <i>c</i> ₁₂	0,06 ± 0,03 ^a	0,07 ± 0,04 ^a	0,09 ± 0,03 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^a
<i>t</i> ₁₁ <i>c</i> ₁₅	0,03 ± 0,02 ^a	0,05 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a
Σ <i>trans</i> C18:2	0,43 ± 0,04 ^a	0,44 ± 0,07 ^a	0,46 ± 0,07 ^a	0,42 ± 0,01 ^a	0,44 ± 0,03 ^a

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

Sumaryczna zawartość izomerów *trans* kwasu C18:1 w mleku surowym wynosiła 1,45 % i nie różniła się istotnie od sumarycznej zawartości tych izomerów w mleku znormalizowanym oraz w objętych badaniem mlecznych napojach fermentowanych (tab. 2). W mleku znormalizowanym przygotowanym do produkcji kefirów udział izomerów *trans* kwasu C18:1 wynosił 1,51 %, a w mleku przygotowanym do produkcji jogurtów – 1,41 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych. Zbliżony poziom tych izomerów w mleku pochodzącym z okresu zimowego stwierdzili Żegarska i wsp. [30]. Łączna zawartość izomerów *trans* kwasu C18:1 w tłuszczu mlekowym pochodzącym z okresu żywienia oborowego badanym przez tych autorów była w przedziale od 1,26 do 1,84 %, przy średniej 1,43 %.

W tłuszczu wydzielonym z kefirów i jogurtów sumaryczna zawartość izomerów *trans* kwasu C18:1 była nieznacznie mniejsza niż w mleku użytym do ich produkcji. W tłuszczu kefirów poziom tych izomerów wynosił 1,46 %, a w tłuszczu wydzielonym z jogurtów – 1,38 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych (tab. 2).

W grupie izomerów *trans* kwasu C18 : 1 zarówno w mleku, jak i wyprodukowanych z niego kefirach i jogurtach, w największej ilości występowały izomery *trans* 10 + *trans* 11 C18 : 1. Udział sumy tych izomerów w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych mleka surowego wynosił 0,71 %. Zawartość sumy tych izomerów w mleku znormalizowanym przygotowanym do produkcji jogurtów oraz w wyprodukowanych jogurtach była zbliżona do poziomu stwierdzonego w mleku surowym (tab. 1 i 2). Istotnie większą zawartość tych izomerów niż w mleku surowym stwierdzono w mleku znormalizowanym, przygotowanym do produkcji kefirów oraz w wyprodukowanych kefirach (tab. 2).

Sumaryczna zawartość oznaczonych izomerów *trans* kwasu C18:2 w mleku surowym, w mleku znormalizowanym oraz w wyprodukowanych kefirach i jogurtach kształtowała się na zbliżonym poziomie (tab. 2). W tłuszczu wydzielonym z mleka surowego zawartość sumy tych izomerów wynosiła 0,43 %, w mleku znormalizowanym przygotowanym do produkcji kefirów – 0,44 %, a w mleku znormalizowanym do produkcji jogurtu – 0,42 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych. W tłuszczu badanych kefirów izomery *trans* kwasu C18 : 2 stanowiły 0,46 %, a w tłuszczu jogurtów 0,44 % ogólnego składu kwasów tłuszczowych.

Żegarska i wsp. [30] po przebadaniu mleka z okresu zimowego stwierdzili zbliżone zawartości izomerów *trans* kwasu C18 : 2. Zawierało ono od 0,29 do 0,61 % sumy tych izomerów. Podobnie udział izomerów *trans* kwasu C18 : 2 w handlowych kefirach i jogurtach zakupionych zimą, badanych przez Żegarską i wsp. [28], był na zbliżonym poziomie. W tłuszczu wydzielonym z jogurtów poziom izomerów *trans* kwasu C18 : 2 kształtował się w przedziale od 0,38 do 0,51 % (średnia 0,47 %), a w tłuszczu wydzielonym z kefirów: od 0,39 do 0,52 % (średnio 0,47 %). Większe zawartości tych izomerów wymienieni autorzy oznaczyli w mlecznych napojach fermentowanych zakupionych w czerwcu i lipcu. W tłuszczu wydzielonym z kefirów izomery *trans* kwasu C18 : 2 stanowiły średnio 0,74 %, a w tłuszczu wydzielonym z jogurtów – 0,72 % w ogólnym składzie kwasów tłuszczowych.

Wnioski

1. Skład kwasów tłuszczowych tłuszczu kefiru i jogurtu był zbliżony do składu kwasów tłuszczowych w mleku stanowiącym surowiec do ich produkcji.
2. Zawartość sprzężonego kwasu linolowego *cis9trans11* C18:2 (CLA) oraz izomerów *trans* kwasu C18 : 1 i C18 : 2 w badanych kefirach i jogurtach zależała od zawartości tych izomerów w surowcu, z którego zostały one wytworzone.

Literatura

- [1] Bzducha-Wróbel A., Obiedziński M.: Zmiany zawartości CLA w składzie serów modelowych z dodatkiem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* i *Lactobacillus acidophilus*. Bromat. Chem. Toksykol., 2009, **XLII**, **3**, 241-246.
- [2] Chin S.F., Liu W., Storkson J.M., Ha Y.L., Pariza M.W.: Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. J. Food Compos. Anal., 1992, **5**, 185-197.
- [3] Cichosz G.: Prozdrowotne właściwości tłuszczu mlekowego. Przegl. Mlecz., 2007, **5**, 4-8.
- [4] Domagała J., Sady M., Najgebauer-Lejko D., Czernicka M., Witeska I.: The content of conjugated linoleic acid (CLA) in cream fermented using different starter cultures. Biotechnology in Animal Husbandry, 2009, **25** (5-6), 745-751.
- [5] Fritsche J., Steinhart H.: Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake, Z. Lebensm.Unters.Forsch. A., 1998, **206**, 77-82.
- [6] IDF standard 182:1999. Milkfat: Preparation of fatty acid methyl esters.
- [7] Jaworski J.: Skład tłuszczu mlekowego – uwarunkowania środowiskowe. Konf. Nauk. „Tuszcz mlekowy w żywieniu człowieka”. ART. Olsztyn. 22-23 września 1995, ss. 5-20.
- [8] Jaworski J.: Studia porównawcze składu kwasów tłuszczowych tłuszczu mlekowego. Zesz. Nauk. ART. Olszt. Technol. Żyw., 1978, **13**, 135-141.
- [9] Jiang J., Björck L., Fondén R.: Conjugated linoleic acid in Swedish dairy products with special reference to the manufacture of hard cheeses. Int. Dairy J., 1997, **7**, 863-867.
- [10] Jiang J., Björck L., Fondén R.: Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. J. Appl. Microbiol., 1998, **85**, 98-102.
- [11] Kim Y.J., Liu R.H.: Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. J. Food Sci., 2002, **67**, **5**, 1731-1737.
- [12] Kozikowski W., Przybyłowicz K.: Wartość żywieniowa składników mleka krowiego. Przegl. Mlecz. 1994, **10**, 256-261.
- [13] Lin H., Boylston T.D., Chang M.J., Luedecke L.D., Shultz T.D.: Survey of the CLA contents of dairy products. J. Dairy Sci., 1995, **78**, 2358-2365.
- [14] Lin H., Boylston T.D., Luedecke L.D., Shultz T.D.: Factors affecting the conjugated linoleic acid content of Cheddar cheese. J. Agric. Food Chem., 1998, **46**, **3**, 801-807.
- [15] Lin T.Y.: Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructo-oligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set jogurt. Aust. J. Dairy Technol., 2003, **58**, **1**, 11-14.
- [16] Lipiński K., Stasiewicz M., Rafałowski R., Kaliniewicz J., Purwin C.: Wpływ sezonu produkcji mleka na profil kwasów tłuszczowych tłuszczu mlekowego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2012, **1** (80), 72-80.
- [17] Molkenin J.: Bioactive lipids naturally occurring in bovine milk. Nahrung, 1999, **43** (3), 185- 189.
- [18] Pariza M.W.: CLA, a new cancer inhibitor in dairy products. Bull. IDF, 1991, **257**, 29-30.
- [19] Parodi P.W.: Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. Aust. J. Dairy Technol., 1994, **49**, 93-97.
- [20] Parodi P.W.: Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. J. Nutr., 1997, 1055-1059.
- [21] PN-75/A-/86130 Mleko i przetwory mleczarskie. Napoje mleczne.
- [22] Przybojewska B., Rafalski H.: Kwasy tłuszczowe występujące w mleku a zdrowie człowieka. Sprzężony kwas linolowy (CLA). Przegl. Mlecz., 2003, **5**, 173-175.
- [23] Przybojewska B., Rafalski H.: Kwasy tłuszczowe występujące w mleku a zdrowie człowieka (cz. 5). Skład izomerów pozycyjnych i geometrycznych nienasyconych kwasów tłuszczowych występujących w tłuszczu mlekowym. Przegl. Mlecz., 2004, **1**, 30-34.

- [24] Shantha N.C., Decker E.A., Ustunol Z.: Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. J. Am. Oil Chem. Soc., 1992, **69**, **5**, 425-428.
- [25] Sieber R., Collomb M., Aeschlimann A., Jelen P., Eyer H.: Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. Int. Dairy J., 2004, **14**, 1-15.
- [26] Żebrowska A., Bonczar G., Molik E.: Właściwości prozdrowotne tłuszczu mlekowego. Wiad. Zootech., R. XLVII, 2009, **2**, 19-23.
- [27] Żegarska Z.: Badania zależności między składem chemicznym a właściwościami fizycznymi tłuszczu mlekowego. Acta Acad. Agricult. Techn. Olszt. Technol. Aliment., 1988, 22 Sup. D: 1-46.
- [28] Żegarska Z., Paszczyk B., Borejszo Z.: Conjugated linoleic acid (CLA) and *trans* C18:1 and C18:2 isomers in fat of some commercial dairy products. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2008, **23** (**1**), 248-256.
- [29] Żegarska Z., Paszczyk B., Borejszo Z.: *Trans* fatty acids in milk fat. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1996, **3**, 89-97.
- [30] Żegarska Z., Paszczyk B., Rafałowski R., Borejszo Z.: Annual changes in the content of unsaturated fatty acids with 18 carbon atoms, including *cis9trans11* C18:2 (CLA) acid, in milk fat. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2006, **15/56** (**4**), 41-46.

FATTY ACID COMPOSITION, WITH PARTICULAR FOCUS ON CONTENT OF *cis9trans11* C18:2 ACID (CLA) AND *TRANS* ISOMERS OF C18:1 I C18:2 ACID, IN MILK AND KEFIRS & YOGHURTS PRODUCED FROM IT

S u m m a r y

The objective of the research study was to compare the composition of fatty acids, with particular focus on the content of conjugated linoleic acid (*cis9trans11* C18: 2) acid and *trans* C18:1 and C18:2, in milk as well as in kefir and yoghurts produced from it. The analysis performed comprised raw milk, normalized milk as well as kefir and yoghurts produced from it. A fatty acid profile was determined by a GC method using a 100-m capillary column with a CP Sil 88 phase.

The technological process of producing kefir and yogurt as applied to this experiment did not affect the profile of fatty acids in the fermented milk drinks under analysis. The composition of fatty acids in kefir and yoghurt was similar to the composition of fatty acids in milk fat. In the fermented drinks examined, the content of conjugated linoleic acid *cis9trans11* C18:2 (CLA) and *trans* isomers of C18:1 and C18:2 depended on their concentration in the raw material they were made of.

Key words: yoghurt, kefir, fatty acids, trans isomers – fatty acids, CLA ☒

BARTOSZ SOŁOWIEJ, AGNIESZKA DYLEWSKA,
MARTA TOMCZYŃSKA-MLEKO, STANISŁAW MLEKO

WPLYW SKROBI MODYFIKOWANYCH NA TEKSTURĘ I TOPLIWOŚĆ ANALOGÓW SERÓW TOPIONYCH

Streszczenie

Celem pracy było wyprodukowanie analogów serów topionych, w których kazeinę kwasową częściowo zastąpiono modyfikowaną skrobią z kukurydzy woskowej (CH20) lub skrobią modyfikowaną z tapioki (V60T i VA85T) oraz określenie tekstury i topliwości otrzymanych produktów. Teksturę analogów serów topionych oznaczono za pomocą analizatora tekstury TA-XT2i. Przy użyciu próbnika cylindrycznego o średnicy 15 mm wykonano profilową analizę tekstury (TPA), w której zmierzono przylegalność, spójność i sprężystość analogów serowych. Natomiast w teście przebijania analogów serów topionych zastosowano próbnik cylindryczny o średnicy 10 mm. Pomiary lepkości analogów wykonano za pomocą reometru rotacyjnego Brookfield DV II+ przy użyciu przystawki Helipath (F). Topliwość określono zmodyfikowanym testem Schreibera.

Zastosowanie skrobi modyfikowanych wpłynęło na teksturę i topliwość analogów serów topionych. Zwiększenie dodatku skrobi powodowało zwiększenie twardości oraz zmniejszenie topliwości w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Nie zaobserwowano istotnych różnic w spójności i sprężystości pomiędzy próbkami kontrolnymi a próbkami zawierającymi modyfikowaną skrobię z kukurydzy woskowej CH20 oraz próbkami z dodatkiem skrobi modyfikowanych z tapioki (z wyjątkiem analogu z 5-procentowym dodatkiem skrobi modyfikowanej z tapioki VA85T). Zdecydowanie największą lepkością spośród wszystkich analogów charakteryzowały się próbki otrzymane z dodatkiem modyfikowanej skrobi z kukurydzy woskowej CH20, a w szczególności analogi z 3- i 4-procentową zawartością tej skrobi. Lepkość próbek z dodatkiem skrobi z tapioki VA85T zmniejszała się w miarę zwiększania w nich zawartości skrobi.

Słowa kluczowe: analog sera topionego, kazeina kwasowa, skrobia modyfikowana, tekstura, topliwość

Wprowadzenie

Zwiększone spożycie produktów przetworzonych, w tym serów topionych, związane jest przede wszystkim ze zmianą nawyków żywieniowych konsumentów (m.in.

Dr inż. B. Sołowiej, mgr inż. A. Dylewska, prof. dr hab. S. Mleko, Katedra Biotechnologii, Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, ul. Skromna 8, dr M. Tomczyńska-Mleko, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, ul. Akademicka 15, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin.

Kontakt: bartosz.solowiej@up.lublin.pl

z popularnością żywności typu „fast food”). Ponadto, sery topione są bardziej akceptowane przez młodych konsumentów ze względu na ich łagodniejszy smak w porównaniu z tradycyjnymi serami dojrzewającymi. W związku z różnorodnością zastosowań oraz możliwością modyfikacji właściwości funkcjonalnych sery topione należą do produktów mleczarskich o szerokim zastosowaniu [7, 28]. Preferencjom i zapotrzebowaniu konsumentów odpowiadają także analogi serowe [17]. Produkcja analogów serowych polega na zastąpieniu naturalnych serów preparatami białkowymi oraz tłuszczami pochodzącymi z mleka i z innych źródeł, zachowując przy tym smak produktu oryginalnego. Zmieniając skład i parametry procesu produkcyjnego można otrzymać produkt atrakcyjny pod względem konsumenckim, o pożądanej teksturze i cechach sensorycznych. Źródła białka stosowane w produkcji analogów serów topionych stanowią głównie kazeiniany, kazeina podpuszczkowa oraz kwasowa, a także preparaty białek serwatkowych [9, 12, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 29]. Kazeina, poza kształtowaniem odpowiedniej struktury i konsystencji produktów, jest źródłem aminokwasów egzogennych i kwasu glutaminowego [16]. Tłuszcz mlekowy jest natomiast źródłem bioaktywnych składników, które intensyfikują metabolizm cholesterolu (kwas oleinowy n-9, WNKT n-6 i n-3 oraz fosfolipidy) i jednocześnie hamują syntezę cholesterolu endogennego w wątrobie człowieka [4]. Wyższe nienasycone kwasy tłuszczowe i kwas masłowy to najcenniejsze kwasy tłuszczowe w mleku o właściwościach prozdrowotnych [11]. Skrobia z kolei, jako szeroko dostępny składnik pożywienia człowieka, ma zastosowanie jako zagęstnik, środek stabilizujący i teksturotwórca w przemyśle spożywczym. Otrzymywana jest głównie z kukurydzy, tapioki, ziemniaków, pszenicy i ryżu [8]. Skrobia jest poddawana różnorodnym modyfikacjom w celu polepszenia jej właściwości reologicznych [19] i w konsekwencji zyskuje nowe właściwości fizykochemiczne oraz funkcjonalne, jakich natywne skrobie nie mają [20].

Celem pracy było wyprodukowanie analogów serów topionych, w których kazeinę kwasową częściowo zastąpiono modyfikowaną skrobią z kukurydzy woskowej CH20 i skrobią modyfikowaną z tapioki oraz określenie tekstury i topliwości otrzymanych produktów.

Material i metody badań

W badaniach zastosowano:

- kazeinę kwasową (KK) (83,41 %), (ZPK, Murowana Goślina),
- skrobię modyfikowaną z kukurydzy odmiany woskowej Pregeflo CH20 (E-1422 – acetylowany adypinian diskrobiowy) (Roquette, Lestrem, Francja),
- skrobię modyfikowaną z tapioki – Farinex V60T (E-1442 – hydroksypropylofosforan diskrobiowy o dużej lepkości) (Avebe, Veendam, Holandia),
- skrobię modyfikowaną z tapioki – Farinex VA85T (E-1442 – hydroksypropylofosforan diskrobiowy o małej lepkości) (Avebe, Veendam, Holandia),

- bezwodny tłuszcz mleczny (BTM) (SM Mlekovita, Wysokie Mazowieckie),
- bezwodny kwaśny fosforan dwusodowy (topnik), kwas cytrynowy (P.P.H. POCH, Gliwice).

Zawartość białka w preparacie kazeiny kwasowej oznaczano metodą Kjeldahla [1].

Proces produkcji analogu sera topionego

Sporządzano zawiesiny skrobi modyfikowanych (CH20, V60T i VA85T) o 3-, 4- i 5-procentowej zawartości w wodzie destylowanej, przy użyciu mieszadła magnetycznego Heidolph MR 3002S (Schwabach, Niemcy). Następnie dodawano bezwodny tłuszcz mleczny (30 %) roztopiony w temp. 45 °C i kazeinę (10 % – stała ilość w każdego rodzaju wytwarzanym analogu sera). Mieszaninę umieszczano w pojemniku homogenizatora H 500 (Pol-Eko Aparatura, Wodzisław Śląski). Mieszano przez 2 min przy 10000 obr./min. Następnie dodawano roztwór bezwodnego kwaśnego fosforanu dwusodowego jako topnika (2 %), ustalano pH na poziomie 6,2 za pomocą kwasu cytrynowego przy użyciu pH-metru CP-315 (Elmetron, Zabrze) i zanurzano w łaźni wodnej o temp. 80 °C. Całość homogenizowano przez 10 min przy 10000 obr./min. Gotowe analogi sera topionego wylewano do zlewek o pojemności 50 ml w ilości 40 ml oraz na płytki Petriego na wysokość 4,8 mm. Produkt pozostawiano do ostygnięcia w temp. 20 ± 2 °C przez 30 min, a następnie przechowywano przez 24 h w temp. 5 °C. Po tym czasie próbki wyjmowano z chłodziarki na 1 h przed pomiarem, w celu doprowadzenia analogu sera do temp. 20 °C. Z uwagi na konsystencję próbek pomiarów tekstury dokonywano w zlewkach. W analogiczny sposób przygotowano próbki kontrolne (wzorcowe) z samej 13-, 14- i 15-procentowej kazeiny kwasowej.

Test przebijania (puncture test)

Pomiarów dokonywano za pomocą teksturometru TA-XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Wielka Brytania). Otrzymane próbki (kształt cylindryczny, wymiary 40×40 mm) badano za pomocą próbnika cylindrycznego o Ø 10 mm, przy prędkości przesuwu głowicy 1 mm·s⁻¹ (okres przerw pomiędzy ruchami próbnika – 5 s), w temp. 20 °C. Uzyskane wyniki (z 3 pomiarów dla każdego z 3 powtórzeń) rejestrowano komputerowo w programie Texture Expert version 1.22. W punktowym badaniu tekstury określano siłę potrzebną do zagłębienia próbnika w próbkę analogu sera na 20 mm.

Profilowa analiza tekstury (TPA)

Pomiarów dokonywano za pomocą teksturometru TA-XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Wielka Brytania). Otrzymane próbki (kształt cylindryczny, wymiary 40×40 mm) badano za pomocą próbnika cylindrycznego o Ø 15 mm, przy prędkości

przesuwu głowicy $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (stopień zanurzenia próbnika – 20 mm, okres przerw pomiędzy ruchami próbnika – 5 s), w temp. 20 °C. Uzyskane wyniki (z 3 pomiarów dla każdego z 6 powtórzeń) rejestrowano komputerowo w programie Texture Expert version 1.22. W profilowej analizie tekstury (TPA) określano przylegalność, spójność i sprężystość analogów serów topionych.

Reometria rotacyjna

Lepkość analogów serów topionych mierzono za pomocą reometru rotacyjnego Brookfield DV II+ (Stoughton, MA, USA) przy użyciu przystawki Helipath (F). Podczas pomiaru wrzeczono było zanurzane w badanej próbce. Próbki analogu sera badano w stałej temp. 20 °C, przy stałej prędkości wrzeczona $V = 0,5 \text{ obr./min}$. Wyniki (z 3 pomiarów dla każdego z 3 powtórzeń) rejestrowano komputerowo w programie Win Gather V 1,0.

Pomiar topliwości (zmodyfikowany test Schreibera)

Metoda polega na roztopieniu próbki analogu sera topionego w postaci krążka o średnicy 41 mm i wysokości 4,8 mm na płytce Petriego w kuchence mikrofalowej o mocy 300 W, poprzez 30-sekundowe ogrzewanie. Roztopioną próbkę przykładano do wzorca, zliczano punkty w 6 miejscach (A-F) oznaczonych na teście Schreibera, sumowano je i dzieląc przez 6 otrzymywano średnią topliwość [12]. Wykonano 3 pomiary dla każdego z 3 powtórzeń. Zakres skali testu Schreibera wynosi od 0 do 10 jednostek. Wynik powyżej 4 oznacza dobrą topliwość, natomiast poniżej 4 – nieodpowiednią.

Analiza statystyczna

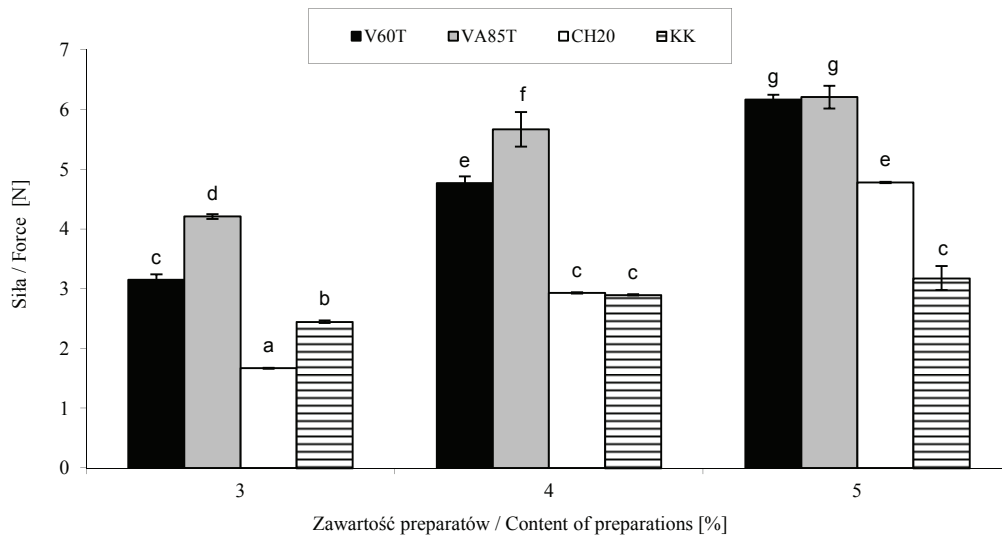
Otrzymane wyniki poddawano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 10.0 PL (StatSoft Polska Sp z o. o., Kraków). W celu określenia wpływu rodzaju skrobi modyfikowanej i jej ilości na cechy tekstury i topliwość analogów serów topionych zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Tukeya na poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Pierwszy etap badań miał na celu określenie cech tekstury analogów serów topionych za pomocą testu przebijania (*puncture test*), w którym określano twardość badanych próbek oraz analizy profilowej tekstury (TPA), za pomocą której określano przylegalność, spójność i sprężystość analogów serów topionych.

Na rys. 1. przedstawiono wpływ dodatku i rodzaju skrobi na twardość analogów serów topionych w odniesieniu do próbek kontrolnych (z samej kazeiny). W przypadku analogów serów topionych otrzymywanych z kazeiny i różnych rodzajów skrobi ich

twardość zwiększała się wraz ze zwiększaniem dodatku skrobi. Największą twardością charakteryzowały się próbki z 5-procentowym dodatkiem skrobi VA85T (6,21 N) oraz V60T (6,17 N). Próbki z dodatkiem skrobi modyfikowanych były twardsze niż próbki kontrolne otrzymane z samej kazeiny (KK), z wyjątkiem próbki z 3-procentowym dodatkiem skrobi CH20, w przypadku której siła potrzebna do przebicia wynosiła 1,67 N, tj. najmniej spośród badanych próbek ($p < 0,05$). W przypadku analogów kontrolnych KK największą twardością charakteryzowały się próbki o zawartości kazeiny na poziomie 15 i 14 % (do przebicia próbek analogów sera topionego o ww. stężeniu potrzebna była siła odpowiednio: 3,18 N i 2,9 N).



a - g – różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ($p < 0,05$) / differences among mean values denoted using different letters are statistically significant ($p < 0.05$).

Rys. 1. Wpływ rodzaju i dodatku skrobi na twardość analogów serów topionych w porównaniu z twardością analogów wyprodukowanych z samej kazeiny.

Fig. 1. Effect of type and addition of starch on hardness of processed cheese analogues compared to hardness of analogues produced from casein only.

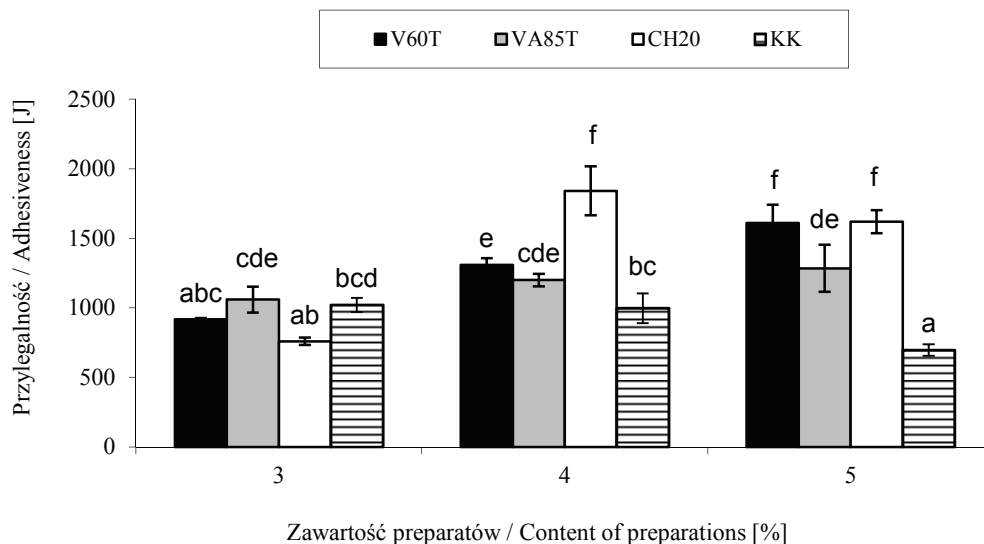
Mounsey i O’Riordan [15] analizowali imitacje serowe z 3-procentowym (m/m) dodatkiem skrobi pochodzących z kukurydzy natywnej i woskowej, pszenicy, ziemniaków oraz z ryżu i również otrzymali próbki zróżnicowane pod względem twardości. Dodatek natywnej skrobi z kukurydzy wpłynął na zwiększenie twardości próbek doświadczalnych (116,4 N) w porównaniu z próbką kontrolną (110,2 N). Z kolei imitacje zawierające skrobię z kukurydzy woskowej charakteryzowały się mniejszą twardością

(75,2 N) w porównaniu z próbką kontrolną. Sołowiej i wsp. [24] badali teksturę analogów serów topionych z dodatkiem koncentratu białek serwatkowych i także stwierdzili większą twardość produktów zawierających koncentraty białek serwatkowych (WPC 35 i 65) w porównaniu z próbkami otrzymanymi z samej kazeiny kwasowej. Inne badania cech tekstury wykazały, że analogi z 1-procentowym dodatkiem serwatki zdemineralizowanej charakteryzowały się znacznie większą twardością niż próbki z samą kazeiną kwasową [25]. Mounsey i O’Riordan [14, 15] badali skrobie modyfikowane różnego pochodzenia botanicznego oraz skrobie natywne i stwierdzili, że na właściwości fizykochemiczne otrzymanych imitacji serowych wpływ miała m.in. zawartość amylozy, zdolność pęcznienia oraz zawartość skrobi. Wymienieni autorzy stwierdzili, że większa zawartość amylozy w skrobi wpływa na zwiększenie twardości produktu końcowego, co ma również związek z procesem jej retrogradacji. Autorzy niniejszej pracy potwierdzili te spostrzeżenia. Skrobia pochodząca z tapioki zawiera naturalnie więcej amylozy w stosunku do skrobi kukurydzianej woskowej, która jej nie zawiera. Tym samym dodatki preparatów VA85T oraz V60T spowodowały znaczne zwiększenie twardości analogów serów topionych w porównaniu z preparatem CH20.

Przylegalność wpływa na smarowność, a więc zdolność produktu do przylegania do noża oraz łatwości jego rozsmarowania [6]. W przypadku serów topionych, jak również ich analogów, cecha jaką jest przylegalność nie jest pożądana przez konsumentów, którzy preferują wyroby łatwo oddzielające się od opakowania [27].

Wykazano, że analogi z dodatkiem skrobi modyfikowanych na poziomie 4 i 5 % charakteryzowały się o wiele większą przylegalnością niż próbki kontrolne zawierające samą kazeinę kwasową, które wykazywały statystycznie niższe wartości przylegalności (rys. 2). Zwiększenie dodatku skrobi modyfikowanych powodowało zwiększenie przylegalności próbek. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$) pomiędzy przylegalnością analogów z 4- i 5-procentowym dodatkiem skrobi modyfikowanej z kukurydzy woskowej CH20 oraz analogów z 5-procentowym dodatkiem skrobi modyfikowanej z tapioki V60T (odpowiednio: 1840,7, 1619,0 i 1609,0 J). W przypadku analogów kontrolnych najmniejszą przylegalnością charakteryzowały się próbki o zawartości kazeiny kwasowej na poziomie 15 % (696,9 J) ($p < 0,05$).

Thapa i Gupta [29] badali analogi serów topionych otrzymane na bazie kazeiny podpuszczkowej i dowiedli, że dodatek koncentratu białek serwatkowych również zwiększał ich przylegalność. We wcześniejszej pracy Sołowiej [27] analizował teksturę analogów serów topionych z dodatkiem preparatów serwatkowych i wykazał, że przylegalność badanych próbek zwiększała się w miarę zwiększania zawartości serwatki o zmniejszonej zawartości laktozy i serwatki zdemineralizowanej.



a - f – różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ($p < 0,05$) / differences among mean values denoted using different letters are statistically significant ($p < 0.05$).

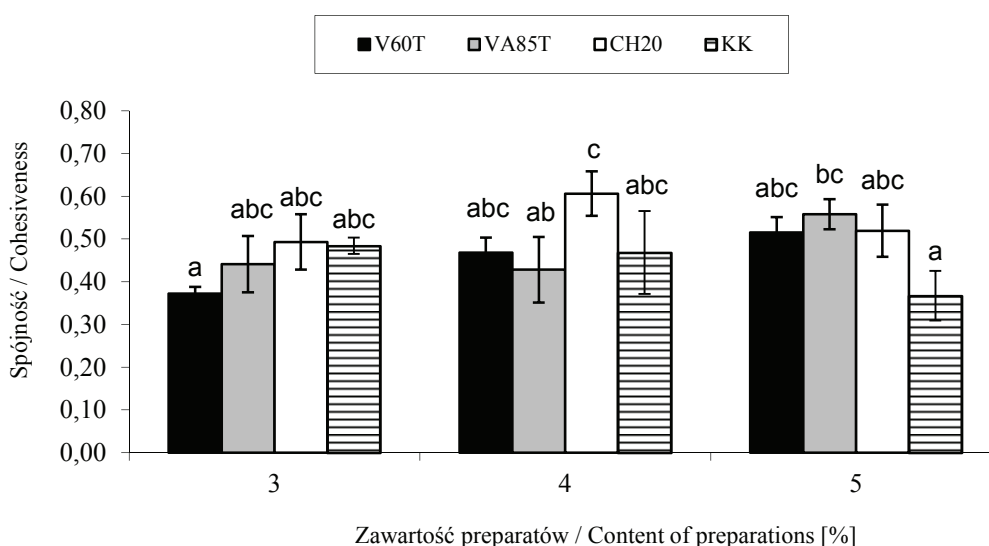
Rys. 2. Wpływ rodzaju i dodatku skrobi na przyległość analogów serów topionych w porównaniu z przyległością analogów wyprodukowanych z samej kazeiny.

Fig. 2. Effect of type and addition of starch on adhesiveness of processed cheese analogues compared to adhesiveness of analogues produced from casein only.

Zmiany spójności w zależności od dodatku i rodzaju użytych skrobi w analogach serów topionych przedstawiono na rys. 3. Wykazano, że analogi z 4-procentowym dodatkiem skrobi modyfikowanej z kukurydzy woskowej CH20 charakteryzowały się największą spójnością (0,61), natomiast najmniejszą – analogi otrzymane z 3-procentowym dodatkiem skrobi modyfikowanej z tapioki V60T (0,37) ($p < 0,05$). W przypadku próbek kontrolnych, najmniejszą spójnością charakteryzowały się analogi zawierające 15 % kazeiny kwasowej (0,37), lecz nie zaobserwowano istotnych różnic między wszystkimi próbkami kontrolnymi ($p > 0,05$).

Mounsey i O’Riordan [15] stwierdzili, że imitacje serowe z dodatkiem skrobi pochodzącej z kukurydzy natywnej i woskowej, pszenicy oraz z ziemniaków charakteryzowały się istotnie mniejszą spójnością w porównaniu z próbkami kontrolnymi niezawierającymi skrobi ($p \leq 0,05$), prawdopodobnie ze względu na mniejszą zawartość białka. Tylko imitacje z dodatkiem skrobi pochodzącej z ryżu nie wykazywały istotnych różnic w spójności w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Bhaskaracharya i Shah [2] odnotowali z kolei statystycznie istotną, dodatnią korelację pomiędzy zawartością białka i spójnością serów mozzarella. Mounsey i O’Riordan [15] zasugerowali,

że w przeciwieństwie do sieci para-kazeiny, której wiązania między- i wewnątrzcząsteczkowe są przerywane i tworzone na nowo wskutek powtarzanego naprężania, napęczniałe cząsteczki skrobi nie przyczynią się do zwiększenia spójności imitacji serowych. Wymienieni autorzy stwierdzili również, że duże cząsteczki skrobi (20 - 50 nm) w połączeniu ze zdolnością pęcznienia skrobi kukurydzianej i ziemniaczanej mogły wpłynąć na przerwanie matrycy imitacji serowych i następnie rozpad białkowych wiązań w próbkach. W niniejszej pracy nie zaobserwowano istotnych różnic ($p > 0.05$) w spójności pomiędzy próbkami kontrolnymi a próbkami zawierającymi skrobię kukurydzianą woskową CH20 oraz próbkami z dodatkiem skrobi modyfikowanych z tapioki (z wyjątkiem analogu z 5-procentowym dodatkiem skrobi modyfikowanej z tapioki VA85T).



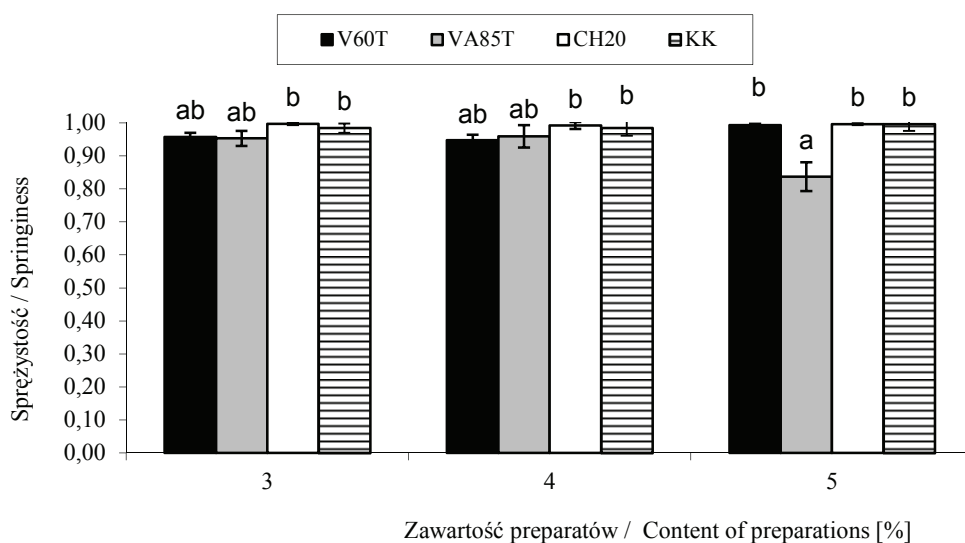
a - c – różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ($p < 0,05$) / differences among mean values denoted using different letters are statistically significant ($p < 0.05$).

Rys. 3. Wpływ rodzaju i dodatku skrobi na spójność analogów serów topionych w porównaniu ze spójnością analogów wyprodukowanych z samej kazeiny.

Fig. 3. Effect of type and addition of starch on cohesiveness of processed cheese analogues compared to cohesiveness of analogues produced from casein only.

Na rys. 4. przedstawiono wpływ rodzaju i dodatku skrobi, a także zawartości samej kazeiny na sprężystość analogów serów topionych. Wszystkie badane próbki z dodatkiem skrobi modyfikowanych oraz próbki kontrolne charakteryzowały się bardzo wysoką sprężystością w granicach od 0,837 do 0,997. Jedynie analogi

z 5-procentowym dodatkiem skrobi modyfikowanej z tapioki VA85T charakteryzowały się mniejszą sprężystością w stosunku do analogów wzorcowych (0,837) ($p < 0,05$). W badaniach własnych dotyczących zastosowania preparatów serwatkowych do produkcji analogów serów topionych na bazie kazeiny kwasowej stwierdzono, że sprężystość nie zależała od zawartości białka w produkcie i była cechą niezależną od twardości czy innych cech tekstury [27].



a - b – różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ($p < 0,05$) / differences among mean values denoted using different letters are statistically significant ($p < 0,05$).

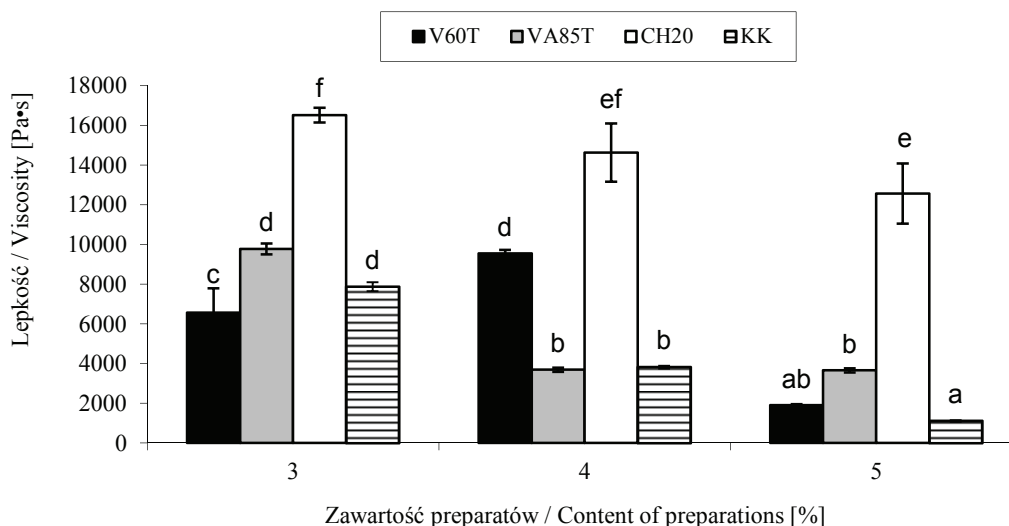
Rys. 4. Wpływ rodzaju i dodatku skrobi na sprężystość analogów serów topionych w porównaniu ze sprężystością analogów wyprodukowanych z samej kazeiny.

Fig. 4. Effect of type and addition of starch on springiness of processed cheese analogues compared to springiness of analogues produced from casein only.

Drugi etap badań miał na celu określenie lepkości i topliwości analogów serów topionych za pomocą reometrii rotacyjnej oraz zmodyfikowanego testu Schreibera.

Na rys. 5. przedstawiono wpływ rodzaju i dodatku skrobi, a także zawartości samej kazeiny na lepkość analogów serów topionych. Zdecydowanie największą lepkością spośród wszystkich analogów charakteryzowały się próbki otrzymane z dodatkiem skrobi modyfikowanej z kukurydzy woskowej CH20, a w szczególności analogi o 3-procentowym dodatku skrobi (16526 Pa·s) i 4-jej procentowym dodatku (14633 Pa·s) ($p < 0,05$). W przypadku próbek z dodatkiem skrobi z tapioki VA85T lepkość zmniejszała się w miarę zwiększania się zawartości skrobi ($p < 0,05$). Próbkę kontrolną nie-

zawierające skrobi wykazywały mniejszą lepkość wraz ze zwiększaniem się zawartości kazeiny kwasowej ($p < 0,05$).



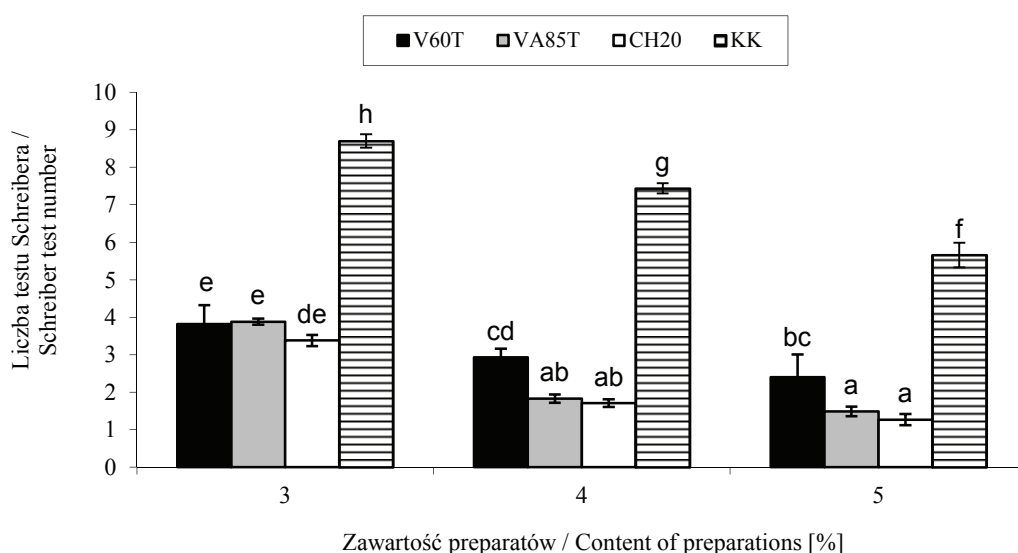
a - f – różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ($p < 0,05$) / differences among mean values denoted using different letters are statistically significant ($p < 0.05$).

Rys. 5. Wpływ rodzaju i dodatku skrobi na lepkość analogów serów topionych w porównaniu z lepkością analogów wyprodukowanych z samej kazeiny.

Fig. 5. Effect of type and addition of starch on viscosity of processed cheese analogues compared to viscosity of analogues produced from casein only.

W badaniach przeprowadzonych przez Plutę i wsp. [18], dotyczących wpływu hydrokoloidów na otrzymywanie serów topionych, zastosowanie 3 % skrobi modyfikowanej E-1450 (sól sodowa oktenylobursztynianu skrobiowego – N-Creamer) spowodowało znaczne zwiększenie lepkości w porównaniu z próbkami kontrolnymi sporządzonymi bez dodatku ww. skrobi. Mounsey i O’Riordan [14] badali właściwości reologiczne imitacji serowych zawierających 3 % wstępnie skleikowanych skrobi pochodzących z kukurydzy, pszenicy, ziemniaków i ryżu i zauważyli, że dyspersje skrobi z ryżu czy kukurydzy woskowej w połączeniu z kazeiną charakteryzowały się najwyższymi wartościami lepkości po ogrzewaniu do temp. 80 °C w porównaniu z kazeiną podpuszczkową ogrzewaną bez dodatku skrobi czy w połączeniu ze skrobią innego pochodzenia. Autorzy sugerują, że prawdopodobnie w czasie przetwarzania wstępnie skleikowana skrobia konkurowała z kazeiną podpuszczkową o wodę, przyczyniając się do osłabienia hydratacji kazeiny i w konsekwencji powodowała konwersję do bardziej

rozpuszczalnego parakazeinianu sodowo-fosforanowego. To z kolei mogło wpłynąć na osłabienie zdolności białka do emulgacji tłuszczu, skutkując większymi, mniej zemulgowanymi cząsteczkami tłuszczu i mniej uwodnioną matrycą białkową. Doublier i wsp. [5] dowiedli, że dodatek kazeinianu sodu do skrobi pochodzącej z tapioki zmniejszał lepkość otrzymanej mieszaniny w porównaniu ze skrobią ziemniaczaną oraz skrobią pochodzącą z pszenicy. Uważają oni, że może być to związane z różnicami termodynamicznymi. Lelievre i Husbands [10] stwierdzili natomiast zwiększenie lepkości otrzymanej mieszaniny po dodaniu kazeinianu sodu w przypadku skleikowanej skrobi kukurydzianej. Prawdopodobnie kazeinian sodu zmienił objętość pęcznienia skrobi, wpływając w ten sposób na właściwości reologiczne końcowego produktu.



A - h – różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ($p < 0,05$) / differences among mean values denoted using different letters are statistically significant ($p < 0,05$).

Rys 6. Wpływ rodzaju i dodatku skrobi na topliwość analogów serów topionych w porównaniu z topliwością analogów wyprodukowanych z samej kazeiny.

Fig. 6. Effect of type and addition of starch on meltability of processed cheese analogues compared to meltability of analogues produced from casein only.

W przypadku badanych analogów wraz ze zwiększaniem się zawartości kazeiny zmniejszała się ich topliwość. Dodatek skrobi modyfikowanych, jak również zwiększenie ich dodatku w gotowym produkcie, powodowały znaczne zmniejszanie topliwości w porównaniu z próbkami kontrolnymi (rys. 6). Próbki kontrolne wykazywały znacznie większe wartości topliwości w porównaniu z próbkami ze skrobią ($p < 0,05$).

Największą topliwością charakteryzowały się próbki z 13-procentowym dodatkiem kazeiny kwasowej (8,7). Spośród próbek zawierających skrobię modyfikowaną, największą topliwością charakteryzowały się analogi otrzymane z 3-procentowym dodatkiem skrobi z tapioki VA85T i V60T (odpowiednio: 3,9 i 3,8) oraz skrobi modyfikowanej z kukurydzy woskowej CH20 (3,4) ($p < 0,05$).

Chevanan i wsp. [3] stwierdzili, że topliwość sera jest odwrotnie proporcjonalna do jego twardości. Ser o mniejszej twardości charakteryzował się większą topliwością, co potwierdzają przeprowadzone badania (rys. 1 i 6). Topliwość poszczególnych imitacji serowych zawierających różnego rodzaju skrobię w badaniach Mounsey i O’Riordan [15] zmniejszała się w sposób następujący: imitacje z dodatkiem skrobi kukurydzianej > ziemniaków > kukurydzy woskowej > pszenicy > ryżu. Stan uwodnienia matrycy białkowej ma istotne znaczenie w kontroli topliwości imitacji serowych [30]. Unieruchomienie wody przez ziarna skrobi lub skleikowaną skrobię może prowadzić do odwodnienia matrycy białkowej, powodując zwiększenie hydrofobowych interakcji białko-białko, a w konsekwencji zmniejszenie topliwości [14], co ma potwierdzenie w niniejszej pracy. W innych badaniach dotyczących właściwości struktury i topliwości imitacji serowych zawierających 3 % skrobi pszennej (m/m) Mounsey i O’Riordan [13] otrzymali statystycznie mniejsze wartości topliwości w porównaniu z próbkami kontrolnymi ($p \leq 0,05$). Stwierdzili również, że zwiększenie dodatku skrobi do poziomu 7 - 9 % (m/m) nie skutkowało dalszymi istotnymi zmianami topliwości imitacji serowych. Jednak produkty z 5-procentowym dodatkiem skrobi pszennej charakteryzowały się mniejszą topliwością niż inne produkty zawierające skrobię.

Wnioski

1. Zastosowanie skrobi różnego pochodzenia botanicznego oraz o odmiennym typie modyfikacji chemicznej miało zróżnicowany wpływ na teksturę i topliwość analogów serów topionych.
2. W przypadku badanych analogów zwiększenie dodatku skrobi powodowało zwiększenie twardości oraz zmniejszenie topliwości w porównaniu z próbkami kontrolnymi.
3. Nie zaobserwowano istotnych różnic w spójności i sprężystości pomiędzy próbkami kontrolnymi a próbkami zawierającymi skrobię kukurydzianą woskową CH20 oraz próbkami z dodatkiem skrobi modyfikowanych z tapioki (z wyjątkiem analogu z 5-procentowym dodatkiem skrobi modyfikowanej z tapioki VA85T).
4. Zdecydowanie największą lepkością spośród wszystkich analogów charakteryzowały się próbki otrzymane z dodatkiem skrobi modyfikowanej z kukurydzy woskowej CH20, a w szczególności analogi o 3- i 4-procentowej zawartości skrobi. W przypadku próbek z dodatkiem skrobi z tapioki VA85T lepkość zmniejszała się w miarę zwiększania się zawartości skrobi.

Literatura

- [1] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis (16th Ed.). Gaithersburg, Maryland, 1997.
- [2] Bhaskaracharya R.K., Shah N.P.: Textural evaluation of commercial Mozzarella cheeses. *Aust. J. Dairy Technol.*, 1999, **54** (1), 36-40.
- [3] Chevanan N., Muthukumarappan K., Upreti P., Metzger L.E.: Effect of calcium and phosphorus, residual lactose and salt-to-moisture ratio on textural properties of Cheddar cheese during ripening. *J. Texture Stud.*, 2006, **37**, 711-730.
- [4] Cichosz G., Czeczot H.: Rzekomo niezdrowe tłuszcze zwierzęce. *Pol. Merk. Lek.*, 2011, **31** (185), 318-322.
- [5] Doublier J.L., Marzin C., Visdeloup S., Lefebvre J.: Effect of sodium caseinate on the pasting behaviour of starch from different origins. *Carbohydr. Polym.*, 1994, **25** (3), 228-229.
- [6] Glibowski P.: Wpływ olejów roślinnych na teksturę bezwodnego tłuszczu mlecznego. *Acta Agrophysica*, 2007, **9** (3), 603-612.
- [7] Kapoor R., Metzger L.E.: Process cheese: Technological aspects – a review. *Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2008, **7** (2), 194-214.
- [8] Krysińska P., Gałkowska D., Fortuna T.: Charakterystyka układów skrobi modyfikowanych uzyskanych z kukurydzy woskowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5** (60), 9-23.
- [9] Lee S.K., Anema S., Klostermeyer H.: The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2004, **39** (7), 763-771.
- [10] Lelievre J., Husbands J.: Effect of sodium caseinate on the rheological properties of starch pastes. *Starch-Stärke*, 1989, **41** (6), 236-238.
- [11] Lipiński K., Stasiewicz M., Rafałowski R., Kaliniewicz J., Purwin C.: Wpływ sezonu produkcji mleka na profil kwasów tłuszczowych tłuszczu mlekowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **1** (80), 72-80.
- [12] Mleko S., Foegeding E.A.: Physical properties of rennet casein gels and processed cheese analogs containing whey proteins. *Milchwissenschaft*, 2000, **55** (9), 513-516.
- [13] Mounsey J.S., O’Riordan E.D.: Alteration of imitation cheese structure and melting behavior with wheat starch. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, **226**, 1013-1019.
- [14] Mounsey J.S., O’Riordan E.D.: Modification of imitation cheese structure and rheology using pre-gelatinised starches. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, **226**, 1039-1046.
- [15] Mounsey J.S., O’Riordan E.D.: Characteristic of imitation cheese containing native starches. *J. Food Sci.*, 2001, **66** (4), 586-591.
- [16] Nastaj M.: Czym jest mleko? *Kulturystyka i Fitness*, 2009, **4**, 122-125.
- [17] Noronha N., Duggan E., Ziegler G.R., O’Riordan E.D., O’Sullivan M.: Inclusion of starch in imitation cheese: its influence on water mobility and cheese functionality. *Food Hydrocoll.* 2008, **22** (8), 1612-1621.
- [18] Pluta A., Ziarno M., Smolińska A.: Możliwość zastosowania hydrokoloidów w produkcji serów topionych. *Przem. Spoż.*, 2000, **5**, 57-59.
- [19] Schube V., Kaliszan E., Ratusz K.: Skrobie modyfikowane we wsadach owocowych, majonezach, dresingach. *Przem. Spoż.*, 2003, **3**, 22-26.
- [20] Sitkiewicz I., Denech S.: Właściwości reologiczne oraz retrogradacja wybranych skrobi modyfikowanych kukurydzy woskowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **1** (46), 143-151.
- [21] Sołowiej B.: Wpływ κ -karagenu na właściwości fizykochemiczne analogów serów topionych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **2** (81), 107-118.
- [22] Sołowiej B.: Ocena właściwości reologicznych analogów serów topionych o zmniejszonej zawartości tłuszczu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **1** (80), 60-71.


- [23] Sołowiej B.: Textural, rheological and melting properties of acid casein reduced-fat processed cheese analogues. *Milchwissenschaft*, 2012, **67** (1), 9-13.
- [24] Sołowiej B., Mleko S., Gustaw W., Udeh K.: Effect of whey protein concentrates on texture, meltability and microstructure of acid casein processed cheese analogs. *Milchwissenschaft*, 2010, **65** (2), 169-173.
- [25] Sołowiej B.: Wpływ procesu homogenizacji na właściwości tekstury i topliwość analogów serów topionych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **6** (67), 16-26.
- [26] Sołowiej B., Mleko S., Gustaw W.: Physicochemical properties of acid casein processed cheese analogs obtained with different whey products. *Milchwissenschaft*, 2008, **63** (3), 299-302.
- [27] Sołowiej B.: Analiza tekstury analogów serów topionych z dodatkiem preparatów serwatkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **5** (54), 292-300.
- [28] Tamime A.Y.: Processed cheese and analogues: An overview. In: *Processed Cheese and Analogues*. Oxford, UK, 2011.
- [29] Thapa T.B., Gupta V.K.: Rheology of processed cheese foods with added whey protein concentrates. *Indian J. Dairy Sci.*, 1992, **45**, 88-92.
- [30] Zhou N., Mulvaney S.J.: The effect of milk fat, the ratio of casein to water, and temperature on the viscoelastic properties of rennet casein gels. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81** (10), 2561-2571.

EFFECT OF MODIFIED STARCHES ON TEXTURE AND MELTABILITY OF PROCESSED CHEESE ANALOGUES

Summary

The objective of this study was to manufacture processed cheese analogues, in which acid casein was partially replaced by a modified waxy maize starch (CH20) or a modified tapioca starch (V60T and VA85T), and to determine the texture and meltability of the products manufactured. The texture of processed cheese analogues was analysed using a TA-XT2i Texture Analyser. With a cylindrical sampler of 15 mm diameter, a Texture Profile Analysis (TPA) was performed and the adhesiveness, cohesiveness, and springiness of processed cheese analogues were measured. In the puncture test used to analyze the processed cheese analogues, a 10 mm dia cylindrical sampler was applied. The viscosity of the processed cheese analogues was measured using a Brookfield DV II+ rotational viscometer with a Helipath Stand (F). The meltability of the processed cheese analogues was determined using a modified Schreiber test.

The application of modified starches impacted the textural properties and meltability of processed cheese analogues. The addition of an increased amount of starch caused the hardness to increase and the meltability to decrease compared to the control samples. No significant differences were reported in the cohesiveness and springiness of the control samples, samples containing the modified waxy-maize starch CH20, and samples with the addition of the modified tapioca starch (except for the analogue with the added 5 % of the modified tapioca starch VA85T). The samples obtained with the addition of the modified waxy-maize starch CH20 were characterized by definitely the highest viscosity of all the analogues, in particular the analogues containing 3 and 4 % of that starch. The viscosity of the samples with the addition of VA85T tapioca starch decreased along with the increasing content of starch therein.

Key words: processed cheese analogue, acid casein, modified starch, texture, meltability 

JAROSŁAW KOWALIK, KAMIL ADAMCZEWSKI, STEFAN ZIAJKA

SZACOWANIE WZROSTU LICZBY KOMÓREK *LISTERIA MONOCYTOGENES* W SERZE MOZZARELLA Z WYKORZYSTANIEM URZĄDZENIA IMPEDYMETRYCZNEGO

Streszczenie

Celem badań było określenie liczby pałeczek *Listeria monocytogenes*, którymi zanieczyszczono próbki sera typu mozzarella i przechowywano je w temperaturze: 3, 6, 9, 12, 15, 21 i 37 °C. Pomiaru wzrostu liczby komórek *L. monocytogenes* dokonano za pomocą urządzenia Bactometer M64 (bioMérieux), stosując zmodyfikowane, selektywne podłoże mikrobiologiczne. Do podłoża BHI (bioMérieux) wprowadzono dodatek wybiórczy do bulionu Frasera i dodatek wybiórczy amonowo-żelazowy(III) dla *Listeria* (Merck). Otrzymane wyniki dopasowano do równania Baranyi'a i Roberta i porównano z modelami prognostycznymi w programie ComBase Predictor. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, że wraz ze wzrostem temperatury przechowywania tempo namnażania patogenu było większe, a wzrost liczby drobnoustroju następował także w warunkach chłodniczych. Zmodyfikowana pożywka mikrobiologiczna umożliwiła ilościowe określanie liczby komórek *Listeria* z wykorzystaniem urządzenia impedymetrycznego.

Słowa kluczowe: mozzarella, *Listeria monocytogenes*, bezpieczeństwo żywności, mikrobiologia prognostyczna

Wprowadzenie

Listeria monocytogenes to Gram-dodatnia pałeczka należąca wraz z *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. murrayi* oraz *L. welshimeri* do rodziny *Enterobacteriaceae*. Pałeczka ta nazywana jest często „bakterią lodówkową”, gdyż patogen może rozwijać się w warunkach chłodniczych (w zależności od składu fizykochemicznego środowiska), pomimo że jej optimum temperaturowe wynosi 30 - 37 °C [2, 5, 6, 18, 29, 31]. Pałeczki *Listeria* wywołują chorobę zwaną listeriozą. Na listeriozę narażone są głównie osoby mające nieprawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy, osoby starsze, z chorobami nowotworowymi, z cukrzycą, marskością wątroby, alkoholicy,

Dr inż. J. Kowalik, mgr inż. K. Adamczewski, prof. dr hab. inż. S. Ziajka, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn. Kontakt: j.kowalik@uwm.edu.pl

kobiety ciężarne oraz noworodki, wśród których śmiertelność wynosi 40 % w przypadku zakażeń wewnątrzłonowych oraz 10 % w przypadku zakażeń okołoporodowych [4, 5, 13, 16, 24, 30].

W 2011 roku na terenie UE zarejestrowano 107 zgłoszeń stwierdzających przekroczenie dopuszczalnego poziomu *Listeria* w produktach spożywczych. Przekroczenie dotyczyło m.in. ryb (61 razy, w tym 20 z Polski), serów różnego typu z Francji i Włoch (23 razy), pasztetów z Belgii, szynki i salami z Włoch [21].

W wykrywaniu obecności tego patogenu stosuje się, oprócz klasycznej metody płytkowej, metody alternatywne, wykorzystujące zmianę właściwości fizykochemicznych i biologicznych środowiska rozwoju mikroorganizmów. Wśród nich są metody: turbidymetryczne, filtracyjne, immunologiczne oraz wykorzystujące pomiar aktywności metabolicznej (impedymetria) [17]. Metoda impedymetryczna pozwala na wykrycie obecności oraz liczby mikroorganizmów w produkcie spożywczym, wykorzystując zmianę właściwości elektrycznych podłoża [3]. Rozporządzenie WE nr 178/2002 [22] wprowadziło pojęcie analizy ryzyka, w którym jednym z elementów składowych jest ocena ryzyka mikrobiologicznego. Ocenie ryzyka mikrobiologicznego może służyć mikrobiologia prognostyczna, która dostarcza informacji przydatnych w szacowaniu ryzyka narażenia na niebezpieczeństwo konsumentów w przypadku produktu zanieczyszczonego, który mógł lub może trafić do obrotu [12, 28]. Wykorzystanie mikrobiologii prognostycznej umożliwia ilościowe prognozowanie wzrostu lub przeżywalności drobnoustrojów [28].

Celem badań było:

- określenie tempa wzrostu *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella podczas przechowywania w temp. 3 - 37 °C z wykorzystaniem alternatywnej metody pomiaru,
- zbadanie możliwości przystosowania metody impedymetrycznej do szybkiej mikrobiologicznej analizy ilościowej,
- wykorzystanie uzyskanych wyników w mikrobiologii prognostycznej.

Material i metody badań

Ser typu mozzarella, zakupiony w sklepie detalicznym, pochodził z trzech różnych partii produkcyjnych. Próbki sera przebadano na obecność *L. monocytogenes* (zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-1:1999/A1) [19]. Podzielono go na próbki o masie 25 g, a następnie zanieczyszczano hodowlą *Listeria monocytogenes* (szczepy 3 i 38) pozyskanych z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności (Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie). Próbki sera zanieczyszczono dziesięciokrotnym rozcieńczeniem (trzykrotny pasaż hodowli bulionowej) *L. monocytogenes* zapewniającym liczbę komórek na poziomie ok. 3 log jtk/g. Przygotowano po 15 próbek produktu dla 7 wariantów temperatury. Zanieczyszczone próbki

przechowywano w inkubatorach precyzyjnych z chłodzeniem ICP 500 (Mettler) w temp. 3, 6, 9, 12, 15, 21 i 37 °C.

Bactometer (bioMérieux) wykorzystuje zjawisko impedancji (zmiana przewodności elektrycznej pożywki podczas namnażania bakterii w założonej temperaturze wzrostu) [33]. W celu określania liczby komórek *Listeria monocytogenes* w produkcie dokonano kalibracji bactometru w odniesieniu do klasycznej metody płytkowej (według zaleceń instrukcji obsługi urządzenia). W metodzie płytkowej używano podłoża Chromocult Agar (Merck) według Ottavianiego i Agostiego (ALOA) do wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* (wg ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004) [9], zaś w systemie impedymetrycznym zmodyfikowaną pożywkę BHI (ang. *Brain Heart Infusion*, bioMérieux). Pożywkę tę celowo wzbogacono w dodatek selektywny Frasera (Merck), zawierający akryflawinę i kwas nalidiksowy (inhibitory wzrostu innych gatunków drobnoustrojów) oraz dodatek wzbogacający z cytrynianem żelazowo-amonowym (Merck) (stymulujący wzrost liczby komórek *Listeria*) [11, 14, 32]. W celu określenia selektywności zmodyfikowanej pożywki przebadano próbki sera niezanieczyszczonego pałeczkami *L. monocytogenes*. Bactometr nie wykrył zmian w impedancji podłoża.

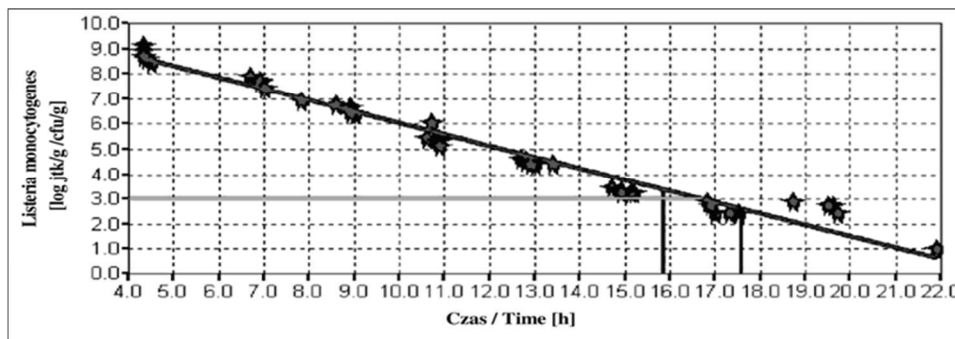
Pomiarów impedymetrycznych dokonywano za pomocą modułów baktometrycznych składających się z 16 wyposażonych w elektrody celek. Do każdej z nich dodawano 1 ml zmodyfikowanej, sterylnej pożywki BHI oraz 1 ml homogenatu badanego produktu, który otrzymano poprzez dodanie 225 ml wody peptonowej (Merck) do 25 g przechowywanej próbki (homogenizator typu Stomacher, Interscience). Czas, po którym dokonywano pomiaru liczby komórek zależał od dynamiki wzrostu patogenu w poszczególnych temperaturach przechowywania. Z każdej próbki wykonywano analizę mikrobiologiczną w trzech powtórzeniach, za wynik przyjmując średnią arytmetyczną z poszczególnych pomiarów.

Wyniki i dyskusja

Na rys. 1. przedstawiono krzywą kalibracji uzyskaną w programie komputerowym obsługującym system impedymetryczny. Wykreślono ją poprzez przypisanie uzyskanym czasom detekcji DT (czas, po którym następuje istotna zmiana impedancji pożywki w wyniku namnażania drobnoustroju), otrzymanych z kolejnych 10-krotnych rozcieńczeń hodowli *Listeria monocytogenes*, liczby jednostek tworzących kolonie (odczytanych z płytek Petriego z podłożem ALOA). Program komputerowy obsługujący urządzenie wyznaczył równanie regresji liniowej. Równanie miało postać:

$$\log \text{ jtk/g} = -0,45 \times \text{DT} + 10,34$$

(gdzie: DT – czas detekcji), a współczynnik determinacji $R^2 = 0,98$.



Rys. 1. Krzywa kalibracji umożliwiająca określenie liczby komórek *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella.

Fig. 1. Calibration curve to determine the number of cells of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese.

Oprócz monitorowania liczby drobnoustrojów w produkcie finalnym, istnieje możliwość prognozowania matematycznego wzrostu/przeżywalności badanych bakterii. Model prognostyczny w aplikacji ComBase Predictor (CP) (wykorzystujący równanie Baranyi'a i Roberta) umożliwiał symulację wzrostu liczby drobnoustrojów w określonych warunkach środowiska. Modele prognostyczne (zawarte w programach typu CP) tworzone są na podstawie wyników badań prowadzonych na zmodyfikowanych (zróżnicowanych pod względem składu fizykochemicznego) pożywkach syntetycznych. Wykorzystanie tego typu aplikacji pozwala na porównanie wygenerowanych modeli prognostycznych w CP z wynikami uzyskanymi w badaniach na produktach spożywczych. Zaobserwowano różnice w dynamice wzrostu liczby komórek *Listeria* między wygenerowanymi w CP a uzyskanymi podczas badań eksperymentalnych.

Aplikacją komputerową wspomagającą ocenę ryzyka mikrobiologicznego jest ComBase DMFit (ang. Dynamic Modelling Fit). Wykorzystuje ona również równanie Baranyi'a i Roberta [1, 10]. Program umożliwia dopasowanie modelu prognostycznego do wyników otrzymanych w badaniach. Ponadto wyznacza parametry takie, jak: czas trwania lagfazy oraz maksymalne tempo wzrostu liczby bakterii.

Wyniki badań własnych wprowadzono do aplikacji DMFit i otrzymano krzywe i parametry wzrostu *L. monocytogenes*. Uzyskane krzywe wzrostu porównano z krzywymi wygenerowanymi w programie CP. Program CP generował prognozy na podstawie wyników badań pochodzących z zanieczyszczonych *Listeria* zmodyfikowanych pożywek (z uwzględnieniem pH, zawartości NaCl), podobnych do parametrów fizykochemicznych sera typu mozzarella użytego w badaniach.

Podczas przechowywania zanieczyszczonych próbek sera w temp. 3 °C, wzrost liczby drobnoustrojów (rys. 2A) z poziomu początkowego – 3 log jtk/g do poziomu najwyższego – 7 log jtk/g nastąpił po 408 h (tab. 1). Przyrost liczby komórek w po-

czątkowej fazie przechowywania próbek był bardzo powolny, dopiero po ok. 200 h zaobserwowano wzrost logarytmiczny. Wyniki badań były podobne do przebiegu krzywych wzrostu wyznaczonych w CP. Maksymalne tempo wzrostu liczby komórek w temp. 3 °C wyniosło 0,0112 1/h (wyliczone w aplikacji DMFit). W DMFit wyliczono również czas trwania lagfazy (130 h). W temp. 6 °C zaobserwowano szybsze tempo wzrostu niż w temp. 3 °C (0,0159 1/h) (rys. 2B). W tej temperaturze fazę logarytmicznego wzrostu stwierdzono również po ok. 200 h. Maksymalny poziom populacji według wyliczeń w DMFit na podstawie uzyskanych wyników osiągnięto po 360 h (tab. 1). Podobną tendencję zaobserwowano w programie CP.

W temp. 9 °C (rys. 2C) maksymalny wzrost liczby komórek *L. monocytogenes* zaobserwowano po 144 h przechowywania (z poziomu 3 log jtk/g do 5 log jtk/g). Maksymalne tempo wzrostu wyniosło 0,0236 1/h, zaś lagfaza – 30 h (wyliczenia w ComBase DMFit). Podobny poziom *L. monocytogenes* w CP uzyskano po 200 h przechowywania w temp. 12 °C (rys. 2D). Wzrost liczby komórek *L. monocytogenes* następował bezpośrednio po zanieczyszczeniu materiału badawczego. Maksymalne tempo wzrostu wynosiło 0,0326 1/h (DMFit), a fazę stacjonarną osiągnięto po ok. 100 h przechowywania. Lagfazy nie zaobserwowano również podczas przechowywania próbek w temp. 15, 21 i 37 °C (rys. 2E, F, G). Maksymalne tempa wzrostu wyniosły odpowiednio: 0,0586, 0,0216 i 0,5635 1/h (DMFit) w temp. 15, 21 i 37 °C. Uzyskane wyniki z poszczególnych temperatur eksperymentalnych wprowadzono do aplikacji DMFit, uzyskując współczynniki determinacji R^2 świadczący o jakości dopasowania uzyskanych rezultatów do modelu Baranyi'a i Roberta. Najniższe wartości współczynnika uzyskano w przypadku danych pochodzących z badań prowadzonych w temp. 3 i 6 °C (R^2 = odpowiednio: 0,68 i 0,78). Lepszym dopasowaniem do modelu prognostycznego charakteryzowały się wyniki z temp. 9, 12, 15, 21 i 37 °C (R^2 = odpowiednio: 0,84, 1,0, 0,86, 0,93 i 0,94).

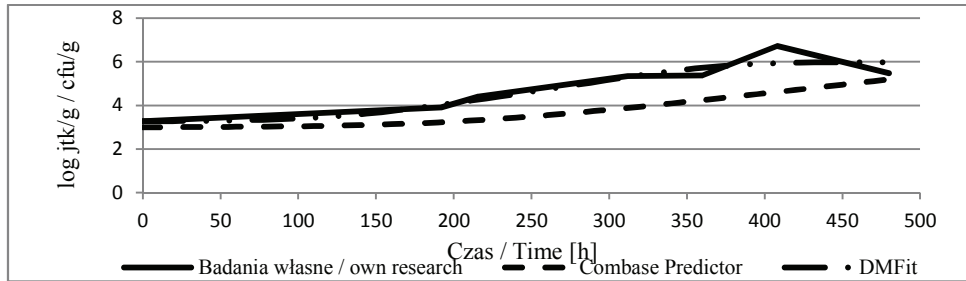
Na przeżywalność *L. monocytogenes* w określonym produkcie spożywczym może mieć wpływ wiele czynników. Bakterie te wykorzystują jako źródło energii: alkohole, kwasy organiczne, tłuszcze i inne substancje organiczne. Ser mozzarella stanowi dobre środowisko rozwoju *L. monocytogenes* ze względu na parametry fizykochemiczne. Zaobserwowany w badaniach własnych, w niskich temperaturach przechowywania, dłuższy czas trwania lag fazy niż w CP mógł wynikać ze współzawodnictwa bakterii fermentacji mlekowej (mikroflora technologiczna). Dominującym czynnikiem wpływającym na tempo namnażania patogenu była temperatura, o czym świadczy brak fazy adaptacyjnej w przypadku zanieczyszczonych próbek przechowywanych w temp. 15, 21 i 37 °C [25, 26]. Stecchini i wsp. [27] badali zachowanie *L. monocytogenes* w temp. 5 °C w serze typu mozzarella oraz w obecności bakterii z gatunku *Lactococcus lactis*. Badacze ustalili czas trwania lagfazy na poziomie 91 h oraz maksymalne tempo wzrostu wynoszące 0,0314 1/h (wyliczenie w aplikacji ComBase DMFit). Wzrost licz-

by drobnoustrojów następował przez ok. 270 h z poziomu 2 log jtk/g do 5 log jtk/g. Wymienieni autorzy uzyskali dwukrotnie szybsze tempo wzrostu patogenu w porównaniu z badaniami własnymi w temp. 6 °C, podczas podobnego czasu przechowywania. Menon i Garg [15], którzy badali wpływ olejku goździkowego na *L. monocytogenes* w serze w temp. 7 °C, również zaobserwowali wzrost liczby komórek patogenu. Wykazali oni maksymalne tempo wzrostu na poziomie 0,0365 1/h i czas trwania lagfazy – 11 h. Wzrost liczby komórek z poziomu początkowego 4 log jtk/g do poziomu 6 log jtk/g trwał ok. 80 h. Zaobserwowali dwukrotnie szybsze maksymalne tempo wzrostu, krótszą lagfazę oraz mniejszy przyrost liczby komórek w porównaniu z badaniami własnymi w temp. 6 °C.

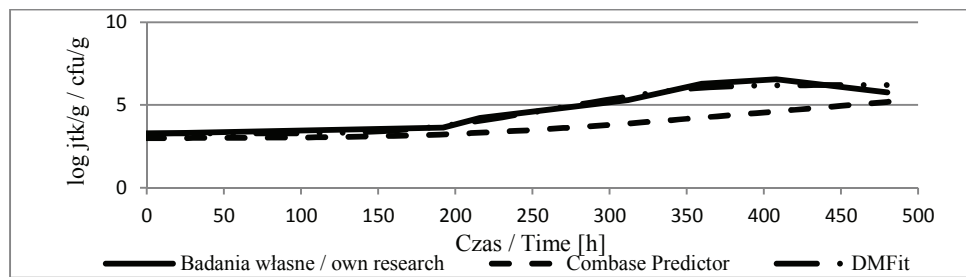
Tabela 1. Zestawienie wyznaczonych parametrów (ComBase DMFit) opisujących zachowanie *L. monocytogenes* w serze mozzarella.

Table 1. Compilation of calculated parameters (ComBase DMFit) describing the behaviour of *L. monocytogenes* in mozzarella cheese.

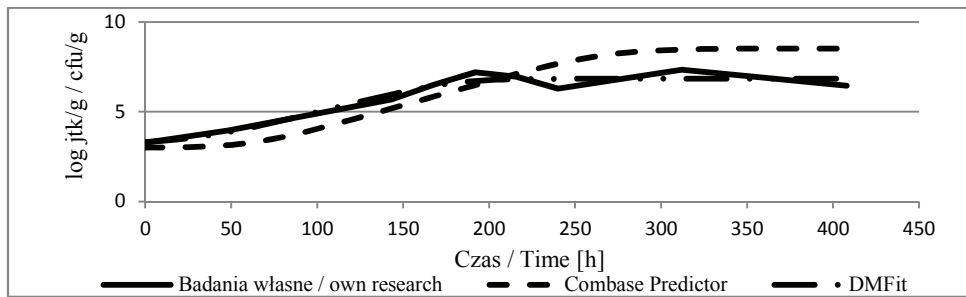
Parametry Parameters	Temperatura / Temperature [°C]						
	3	6	9	12	15	21	37
Lagfaza Lag phase [h]	200	200	30	0	0	0	0
Maksymalne tempo wzrostu Maximum growth rate [h ⁻¹]	0,0112	0,0159	0,0236	0,0326	0,0586	0,0216	0,5635
Maksymalna gęstość populacji [log jtk/g] Maximum population density [log cfu/g]	6,72	6,29	7,21	6,91	7,32	7,61	7,09
Czas uzyskania maksimum populacji Time to achieve maximum population [h]	408	360	192	216	168	168	48
Czas generacji Generation time [h]	89,3	62,9	42,4	30,7	17,1	46,3	1,8



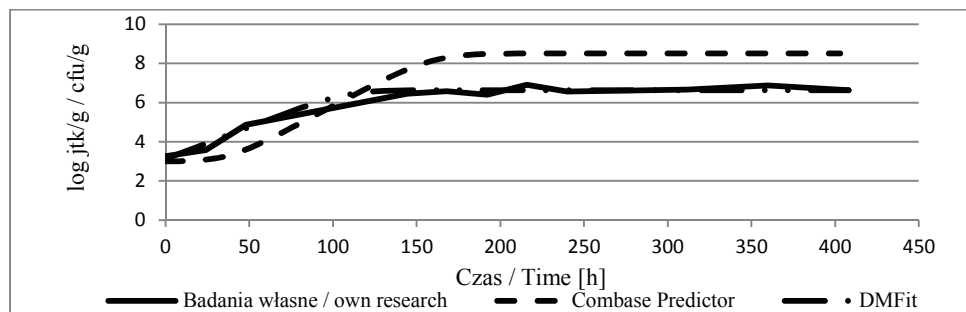
A(3°C)



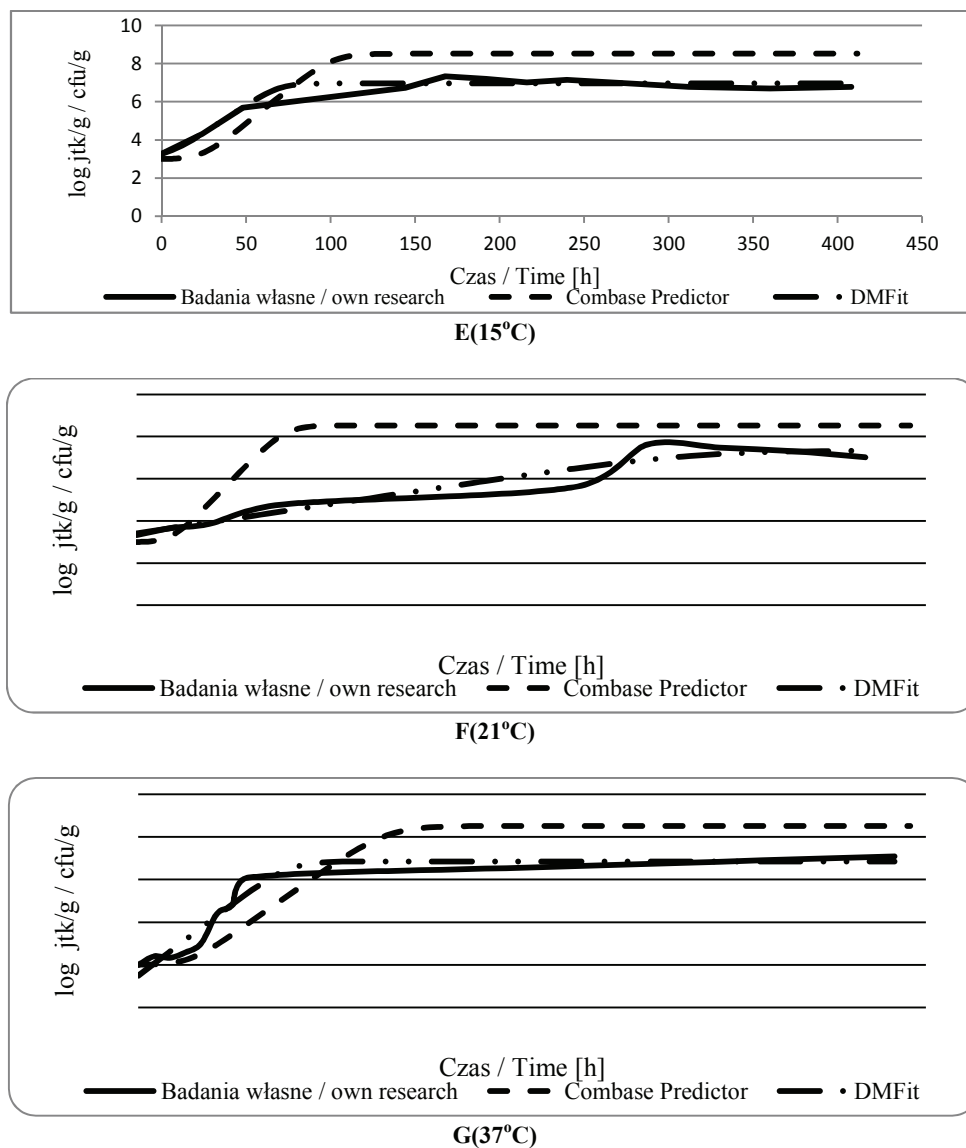
B(6°C)



C(9°C)



D(12°C)



Rys. 2. Zestawienie otrzymanych wyników (oraz dopasowanych w aplikacji DMFit) wzrostu liczby pałeczek *Listeria monocytogenes* w serze mozzarella podczas przechowywania w temp.: 3 °C (A), 6 °C (B), 9 °C (C), 12 °C (D), 15 °C (E), 21 °C (F) i 37 °C (G) z modelem prognostycznym CP.

Fig. 2. Comparison of obtained results (that match DMFit application) of growth of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese during storage at: 3 °C (A), 6 °C (B), 9 °C (C), 12 °C (D), 15 °C (E), 21 °C (F) and 37 °C (G) with CP predictive model.

Określenie obecności, a w szczególnych przypadkach również liczby komórek *L. monocytogenes* w produktach spożywczych należy do producenta żywności. Zgodnie z rozporządzeniem Komisji Europejskiej nr 2073 z 2005 roku [23] dla żywności gotowej do spożycia, w której możliwy jest wzrost *L. monocytogenes*, niebędącej żywnością przeznaczoną dla niemowląt ani żywnością specjalnego medycznego przeznaczenia, określono wartość maksymalną liczby komórek *L. monocytogenes* – 100 jtk/g. W rozporządzeniu zaproponowano referencyjną metodę określania liczby *Listeria monocytogenes* w produktach spożywczych (ISO 11290-2) [20]. Metoda klasyczna (płytkowa) jest czasochłonna, dlatego po walidacji metody alternatywnej w stosunku do metody referencyjnej ilościowe określanie liczby komórek drobnoustroju można dokonać w znacznie krótszym czasie. Ma to duże znaczenie w przypadku produktów o krótkim terminie przydatności do spożycia, a będących już w łańcuchu dystrybucyjnym. Obecnie istnieją na rynku nowsze aparaty wykorzystujące zjawisko impedymetrii, które po właściwym przystosowaniu z powodzeniem można zastosować do ilościowego określania ryzyka rozwoju wielu grup patogenów w różnych produktach spożywczych. W celu zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i przewidywania zagrożeń można wykorzystać bazę danych ComBase. Baza danych działa w systemie *online*, zawiera wyniki badań oraz programy komputerowe, które umożliwiają prognozowanie wzrostu liczby drobnoustrojów przy uwzględnieniu różnych czynników środowiska. Po walidacji na podstawie własnych danych eksperymentalnych, aplikacja może być użyteczna w prognozowaniu zachowania różnych gatunków drobnoustrojów (w tym patogenów) [7]. Programy tego typu można wykorzystać w zakładach przemysłowych na etapie analizy zagrożeń, szacowania ryzyka mikrobiologicznego czy weryfikacji wyników badań prowadzonych przez przykładowe laboratoria i instytucje publiczne zajmujące się nadzorem sanitarnym. Obecnie powstają bazy danych zawierające modele wzrostu drobnoustrojów na podstawie wyników badań konkretnych produktów spożywczych. Przykładem może być portal internetowy Wama Predictor, w którym znajdują się modele wzrostu/przeżywalności różnych patogenów w wybranych produktach mleczarskich i mięsnych [8].

Wnioski

1. Alternatywne metody pomiaru liczby komórek wykorzystujące zjawisko impedymetrii po wykalibrowaniu urządzenia i zmodyfikowaniu pożywki mogą być przydatne do szybkiego ilościowego określania bakterii *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella.
2. Wyniki badań pozyskane podczas przechowywania *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella i dopasowane do modelu Baranyi'a w ComBase DMFit są zbliżone do prognoz wygenerowanych w CP.

3. Program CP generuje krzywe wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* zapewniające margines bezpieczeństwa prognoz w zakresie danych eksperymentalnych w temp. 3 - 37 °C, co pozwala na korzystanie z niego podczas szacowania ryzyka mikrobiologicznego produktów o podobnych parametrach fizykochemicznych.

Praca naukowa finansowana ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu badawczego pt. „Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej do modelowania bezpieczeństwa żywności” (N R12 0097 06).

Literatura

- [1] Baranyi J., Tamplin M.: ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. *J. Food Prot.*, 2004, **9** (67), 1834-1840.
- [2] Budzińska K., Wroński G., Szejniuk B.: Survival time of bacteria *Listeria monocytogenes* in water environment and sewage. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2012, **1** (21), 31-37.
- [3] Czaczyk K., Trojanowska K.: Zastosowanie szybkich metod oznaczania i identyfikacji drobnoustrojów. *Przem. Spoż.*, 2006, **2**, 14-21.
- [4] Dziubek Z.: Zakażenia wywołane przez bakterie Gram dodatnie. W: *Choroby zakaźne i pasożytnicze*. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2010, ss. 118-119.
- [5] Furowicz A.J.: Bakteryjne i wirusowe choroby związane z zatruciami pokarmowymi. W: *Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową*. Red. A. Boroń-Kaczmarska. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1999, ss. 132-153.
- [6] Hilbert F., Smulders F. J. M.: Kälte ist kein vollständiger Schutz, *Fleischwirtschaft*, 2000, **12**, 26-28.
- [7] Informacje o bazie ComBase [online]. Dostępne w Internecie [20.01.2013]: <http://www.combase.cc/index.php/en/>
- [8] Informacje o bazie Wama Predictor [online]. Dostępne w Internecie [22.02.2013]: <http://wamapredictor.uwm.edu.pl/WamaPredictor>
- [9] ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Modyfikacja pożywki do oznaczania liczby. Modyfikacja normy EN ISO 11290-2:1998. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby.
- [10] Koseki S.: Microbial Responses Viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, **134**, 75-82.
- [11] Kowalik J., Łobacz A., Tarczyńska A.S., Ziajka S.: Graphic validation of growth models for *Listeria monocytogenes* in milk during storage. *Milchwissenschaft*, 2012, **1** (67), 38-42.
- [12] Kowalik J., Łobacz A., Tarczyńska A.S., Ziajka S.: Zastosowanie mikrobiologicznych modeli prognostycznych w produkcji bezpiecznej żywności. *Med. Weter.*, 2009, **6** (65), 381-384.
- [13] Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A.: Listerioza. W: *Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka*. α-Medica Press, Bielsko-Biała 2007, ss. 188-193
- [14] Malarska J.: Tradycyjne i nowoczesne metody ilościowego oznaczania drobnoustrojów. *Med. Weter.*, 2005, **10**, 1091-1092.
- [15] Menon K.V., Garg S.R.: Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiol.*, 2001, **6** (18), 647-650.
- [16] Molenda J.: Listerioza – patogeniza, perspektywy bezpieczeństwa żywności. *Med. Weter.*, 2009, **3**, 151-154.
- [17] Nowak A., Ołtuszek-Walczyk E.: *Listeria monocytogenes* w żywności metody wykrywania i oznaczania. *Przem. Spoż.*, 2012, **11** (66), 30-33.

- [18] Pichner R.: Nachweis und Klassifizierung von Bakterien. Fleischwirtschaft, 2007, **11**, 105-106.
- [19] PN-EN ISO 11290-1:1999/A1. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda wykrywania obecności.
- [20] PN-EN ISO 11290-2:2000. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby.
- [21] Raport roczny za rok 2011. [online]. RASFF. Dostępne w Internecie [22.02.2013]: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm
- [22] Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. Dz. Urz. UE L 31/1, s. 1, z 01.02.2002.
- [23] Rozporządzenie (WE) Komisji nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz. Urz. UE L 338/1 s. 1, z 22.12.2005.
- [24] Schwartzman M.S., Maffre A., Tenenhaus-Aziza F., Sanaa M., Butler F., Jordan K.: Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. Int. J. Food Microbiol., 2011, **145**, 31-38.
- [25] Sip A., Gardo A.: *Listeria monocytogenes*. Metody eliminowania z żywności – chemiczne, biologiczne i kombinowane. Przem. Spoż., 2011, **3**, 35-38.
- [26] Sip A., Krasowska M., Więckowicz M.: Zastosowanie bakteriocyn klasy IIa bakterii fermentacji mlekowej. Biotechnologia, 2009, **3**, 126-147.
- [27] Stecchini M.L., Aquili V., Sarais I.: Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. Int. J. Food Microbiol., 1995, **3 (25)**, 301-310.
- [28] Szczawiński J.: Mikrobiologia prognostyczna – zastosowanie praktyczne. Med. Weter., 2012, **9 (68)**, 540-543.
- [29] Szymczak B., Sawicki W., Bogusławska-Wąs E., Koronkiewicz A., Dąbrowski W.: Występowanie *L. monocytogenes* w świeżych owocach i warzywach pochodzących z upraw ekologicznych województwa zachodniopomorskiego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2011, **2 (75)**, 67-76.
- [30] Virella G.: Mikrobiologia i choroby zakaźne. Red. P.B Heczko., Wyd. Med. Urban & Partner, Wrocław 2000, ss. 130-132.
- [31] Voysey P.A., Anslow P.A., Bridgwater K.J., Lavender B., Watson L.: The effects of butter characteristics on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Dairy Technol., 2009, **3 (62)**, 326-330.
- [32] Walczycka M.: Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, **2 (43)**, 61-72.
- [33] Zaręba T., Tyski S.: Zastosowanie metody impedymetrii w badaniu skuteczności działania środków konserwujących leki. Med. Dośw. Mikrobiol., 2002, **54**, 89-96.

ESTIMATING CELL GROWTH OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN MOZZARELLA CHEESE USING IMPEDIMETRIC DEVICE

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the count of *Listeria monocytogenes*, used to contaminate the samples of mozzarella cheese that were stored at a temperature of 3, 6, 9, 12, 15, 21, and 37 °C. The *L. monocytogenes* cell growth was measured by a M64 Bactometer device (bioMérieux) using a modified, selective microbiological culture medium. Into the BHI medium (bioMérieux) were added: a selective additive to a Fraser broth and a selective iron (III) ammonium additive for *Listeria* (Merck). The results obtained were adjusted to match the Baranyi and Roberts equation and compared with the

predictive models in ComBase Predictor. Based on the research results obtained, it was found that, along with the increasing storage temperature the rate of proliferation of the pathogen increased, and, also, reported was the increase in the count of organisms under the cooling conditions. The modified culture medium made it possible to determine quantitatively the count of *Listeria* cells with the use of an impedimetric device.

Key words: mozzarella cheese, *Listeria monocytogenes*, food safety, predictive microbiology ☒

MAŁGORZATA KOWALSKA, ANNA ŻBIKOWSKA,
KRZYSZTOF ŚMIECHOWSKI, KATARZYNA MARCINIAK-ŁUKASIAK

WPLYW ILOŚCI LECYTYNY SŁONECZNIKOWEJ I CZASU HOMOGENIZACJI NA STABILNOŚĆ EMULSJI SPOŻYWCZEJ ZAWIERAJĄCEJ OLEJ Z ORZECHÓW WŁOSKICH

Streszczenie

W pracy dokonano oceny wpływu dodatku emulgatora oraz czasu homogenizacji na stabilność emulsyjnych układów dyspersyjnych. Do wytypowania parametrów stabilnych układów dyspersyjnych posłużono się programem komputerowym Kateskór. Na podstawie założonych wartości parametrów wyjściowych charakteryzujących stabilną emulsję (wielkość cząstek zdyspergowanych, lepkość i liczba faz) otrzymano kompromisowe optimum parametrów wejściowych: ilość emulgatora 5,87 - 6,52 g i czas homogenizacji 1,52 - 4,78 min. Doświadczalna ocena średniej wielkości cząstek, lepkości oraz obrazu mikroskopowego układu dyspersyjnego wykazała, że najbardziej stabilna była emulsja w wariacie III, zawierająca 5 g emulgatora i homogenizowana 3 min. Empirycznie ustalone parametry tej emulsji były zbliżone do zakresu kompromisowego optimum wyznaczonego przez program Kateskór.

Słowa kluczowe: olej z orzechów włoskich, lecytyna słonecznikowa, optymalizacja parametrów, wielkość cząstek emulsji, stabilność emulsji

Wprowadzenie

Pod względem termodynamicznym emulsje są układami dynamicznymi, które zmieniają swoje właściwości reologiczne w funkcji czasu. Ciągły ruch cząstek fazy wewnętrznej może prowadzić do niekorzystnych zmian, mających wpływ na stabilność emulsji [8, 16]. Wśród tych zmian należy wymienić procesy takie, jak: sedimentacja, śmietanowanie, flokulacja, koalescencja [2, 20] i dojrzewanie Ostwaldowskie [3, 4, 5, 10, 12].

Dr inż. M. Kowalska, dr hab. inż. K. Śmiechowski, Wydz. Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny, ul. Chrobrego 27, 26-600 Radom, dr hab. inż. A. Żbikowska, dr inż. K. Marciniak-Łukasiak, Katedra Technologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa. Kontakt: mkowalska7@vp.pl

W celu zwiększenia stabilności emulsji do układu wprowadza się substancje przeciwdziałające łączeniu się cząstek fazy rozproszonej [24, 28], względnie pozwalające zwiększyć lepkość układu [9], a tym samym spowolnić ruch fazy wewnętrznej [15]. Czynniki, które mają wpływ na otrzymanie stabilnego układu emulsyjnego są: wielkość cząstek fazy rozproszonej, lepkość układu rozumiana jako suma lepkości fazy zewnętrznej i wewnętrznej [1] i skład recepturowy emulsji (ilość i rodzaj emulgatora, stosunek faz, ilość zagęstnika) [7, 19]. Nie bez znaczenia są również parametry procesu homogenizacji, takie jak czas, czy liczba obrotów, a także sposób prowadzenia homogenizacji (na zimno czy na gorąco) [12]. Tak więc, aby otrzymać trwały układ jednofazowy (monodispersyjny), należy brać pod uwagę wszystkie wcześniej wymienione czynniki. Skład recepturowy i parametry technologiczne wytwarzania stabilnej emulsji można dobrać w sposób empiryczny [21, 25] lub wykorzystując komputerowe programy optymalizacji. Pierwszy sposób jest żmudny i długotrwały, drugi wydaje się bardziej korzystny.

Celem pracy było określenie wpływu warunków przygotowania emulsji spożywczej zawierającej jako bazę tłuszczową olej z orzechów włoskich na jej stabilność i charakterystykę fizykochemiczną przy użyciu programu komputerowego do optymalizacji „Kateskór” (program został opracowany na potrzeby Katedry Technologii Obuwia i Garbarstwa – Wydziału Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Uniwersytetu Techniczno-Humanistycznego w Radomiu) [26].

Material i metody badań

Do wytworzenia układów dyspersyjnych użyto oleju z orzechów włoskich (Oleofarm s. c.). Skład kwasów tłuszczowych oleju, określony techniką chromatografii gazowej według PN-EN ISO 5508 [22] i PN-EN ISO 5509 [23], był następujący: 7,89 % kwasów nasyconych (palmitynowego i stearynowego), 17,63 % kwasu oleinowego, 59,5 % kwasu linolowego, 14,98 % kwasu α -linolenowego. W roli emulgatora zastosowano lecytynę słonecznikową (RF Solutions) naturalnego pochodzenia, o właściwościach powierzchniowo czynnych i poprawiających strukturę emulsji [17]. Karboksymetyloceluloza (Barentz) została wykorzystana jako zagęstnik poprawiający cechy reologiczne emulsji. Ponadto wykorzystano: cukier biały (Cukrownia Głinojeck), musztardę kremową (Develey Polska Sp z o. o.), sól jodowaną Solino (Inowrocławskie Kopalnie Soli), ocet spirytusowy 10-procentowy (Społem Kielce), wodę pitną i benzo-*es*an sodu (ORffa Food Eastern Europe).

Skład recepturowy i technologia otrzymywania emulsji

Receptury emulsji opracowano na podstawie własnej specyfikacji. Sporządzono sześć układów emulsyjnych różniących się zawartością emulgatora oraz czasem homogenizacji (tab. 1). W badaniach przyjęto uproszczenie – nie uwzględniono minimal-

nych zmian zawartości wody w różnych wariantach emulsji (rzędu kilku procent). Emulsje wytwarzano na ciepło, podgrzewając obie fazy (olejową i wodną) do temp. 40 °C. Następnie zmieszane fazy homogenizowano za pomocą homogenizatora SILVERSON L4R, przy 3000 rpm. Czas homogenizowania był jednym z czynników zmiennych i zmieniał się w przedziale od 1 do 5 min. Ostudzone emulsje doprowadzano do pH = 6, stosując krystaliczny NaHCO₃ i mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego. Emulsje przechowywano w temp. 22 °C, w zamkniętym opakowaniu ze szkła białego.

Tabela 1. Skład recepturowy i czas homogenizacji emulsji.

Table 1. Composition of emulsion and homogenization time thereof.

Składniki / Ingredients	Wariant emulsji / Variant of emulsion					
	I	II	III	IV	V	VI
Stałe składniki emulsji / Constant components of emulsion						
Olej z orzechów włoskich [g]	30,0					
Cukier [g]	2,5					
Musztarda [g]	2,0					
Sól [g]	1,7					
Karboksymetyloceluloza [g]	1,0					
Ocet [g]	1,0					
Benzoesan sodu [g]	0,25					
Zmienne parametry emulsji / Variable parameters of emulsion						
Emulgator [g]	2,5	2,5	5,0	7,5	10,0	10,0
Czas homogenizacji [min]	1,0	5,0	3,0	3,0	5,0	1,0
Woda [g]	Uzupełnienie do 100 g / water added to make 100g					

Dobór ilości emulgatora i czasu homogenizacji

Optymalizację ilości emulgatora w emulsji oraz dobór czasu homogenizacji przeprowadzano za pomocą programu Kateskór. Program został opracowany na podstawie metody Kleemana [14], pozwalającej na minimalizację ilości przeprowadzanych eksperymentów do 6 różnych próbek. Wybór kompromisowego optimum zależy od oczekiwań badaczy, którzy wybierają wartości graniczne zmierzonych parametrów i na tej postawie program opracowuje zakres zadanych parametrów, dla których emulsja powinna wykazywać charakter stabilny. W przedstawionych badaniach przyjęty model stabilnego układu emulsyjnego charakteryzował się następującymi parametrami: lepkość – 21 Pa·s, liczba frakcji – 1,5, współczynnik dyspersyjności – 1,06, średnia wielkość cząstek emulsji – 3,3 μm, wartość współczynnika K_{90%} – 4,8. Zmierzone oraz

obliczone parametry zostały wykorzystane do przeprowadzenia optymalizacji czasu homogenizacji i dodatku emulgatora, przy których emulsja wykazuje najlepszą stabilność.

Metody badań

Lepkość, średnią wielkość oraz rozkład cząstek emulsji oznaczano po 24 h od ich wytworzenia. Badania lepkości oraz średniej wielkości cząstek powtórzono po dwóch tygodniach przechowywania emulsji. Pomiar lepkości pozornej wykonywano przy użyciu reometru Rheotest-2 Typ RV2 zgodnie z instrukcją urządzenia (1978). Pomiar przeprowadzano w temp. próbki 20 ± 1 °C. Lepkość emulsji obliczano z równania:

$$\eta = Z \cdot \alpha / 10 \text{ Dr}$$

gdzie:

η – lepkość [Pa·s],

α – współczynnik kątowy,

Dr – szybkość ścinania [s^{-1}],

Z – stała aparatu 2,4428 [Pa].

Wielkość cząstek fazy zdyspergowanej oznaczano metodą dyfrakcji laserowej przy użyciu spektrometru laserowego Microtrac FRA/UPA (Leed's & Northrup, USA) zgodnie z instrukcją urządzenia. Wielkość cząstek oznaczano trzykrotnie w ciągu 30 s. Współczynnik dyspersyjności k obliczano z równania:

$$k = (K_{90\%} - K_{10\%}) / K_{50\%}$$

gdzie: $K_{90\%}$, $K_{10\%}$, $K_{50\%}$ – średnice cząstek [μm] odczytywane z krzywej skumulowanej rozkładu (odpowiednio 90, 50, 10 % cząstek ma średnice nie większe od tych wartości).

Stabilność emulsji określano testem wirówkowym przy użyciu wirówki Nahita Centrifuges Model 2652 (Auxilab, S.L. Hiszpania), stosując parametry: 3000 rpm i czas 30 min. Dodatkowo, w piątej dobie po wytworzeniu emulsji, obserwowano rozmieszczenie jej cząstek za pomocą mikroskopu optycznego firmy NIKON (powiększenie 40-krotne).

Analizy powtarzano trzykrotnie, a wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem analizy wariancji przy użyciu programu komputerowego Statgraphics plus 4.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy średnimi wykonano testem Duncana, na poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wielkość cząstek fazy zdyspergowanej zależy od wielu czynników, m.in. od czasu i prędkości homogenizacji, rodzaju i dodatku emulgatora oraz ilości i rodzaju za-

gęstnika [4, 15, 27]. Właściwy dobór tych parametrów gwarantuje „ustabilizowanie cząstek” fazy zdyspergowanej, które pod względem termodynamicznym ciągle pozostają w ruchu, dążąc do zmian w strukturze układu dyspersyjnego.

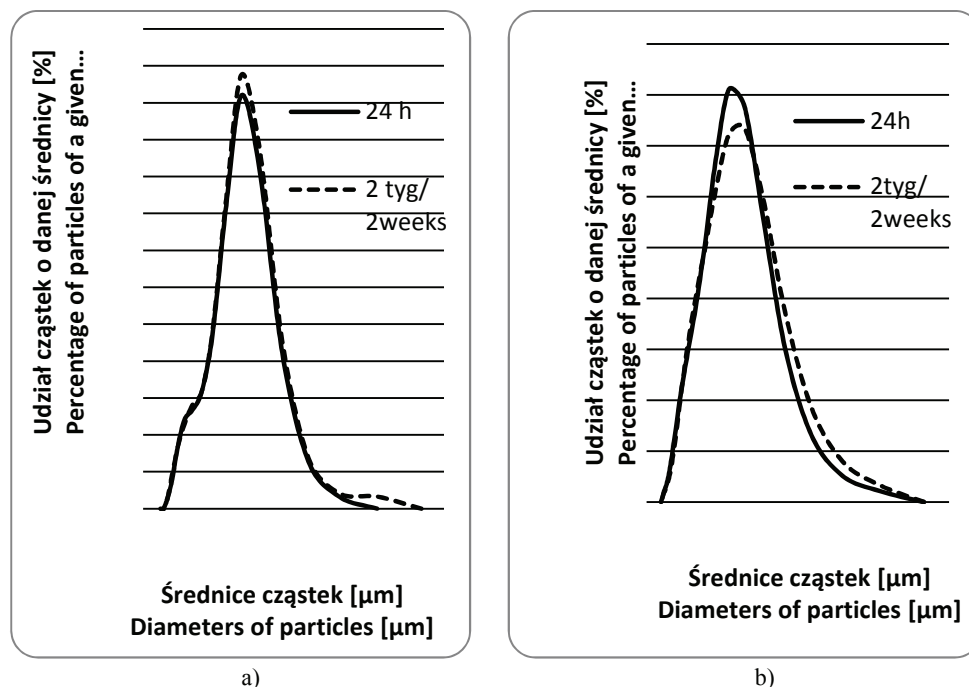
Tabela 2. Charakterystyka emulsji po 24 h od wytworzenia i po 2 tygodniach przechowywania.
Table 2. Profile of emulsion 24h after it was manufactured and after 2 week storage.

Rodzaj emulsji Kind of emulsion	Średnia wielkość cząstki [μm] Average size of particle [μm]		Współczynnik dyspersji Coefficient of dispersion		Liczba frakcji Number of fractions		Udział poszczególnych frakcji w emulsji [%] Percentage of each fraction in emulsion [%]		Lepkość [Pa·s] Viscosity [Pa·s]		Test wirówkowy Centrifugal test
	Po 24 h After 24 h	Po 2 tyg. After 2 weeks	Po 24 h After 24 h	Po 2 tyg. After 2 weeks	Po 24 h After 24 h	Po 2 tyg. After 2 weeks	Po 24 h After 24 h	Po 2 tyg. After 2 weeks	Po 24 h After 24 h	Po 2 tyg. After 2 weeks	
Wariant I	3,84e	4,05c	1,10	1,13	2	2	I -73 II-27	I -73 II- 27	15,1a	14,9a	rozwarstwienie delamination
Wariant II	3,59d	-	1,22	-	2	-	I -74 II-26	-	14,5a	-	stabilna stable
Wariant III	2,76a	2,83a	0,94	1,02	1	1	I-100	I -100	19,4b	18,7b	stabilna stable
Wariant IV	2,96b	3,08b	1,03	1,22	1	1	I -100	I -100	24,1c	18,5b	stabilna stable
Wariant V	3,32c	-	1,15	-	2	-	I -91 II-9	-	26,1cd	-	stabilna stable
Wariant VI	3,17c	-	1,14	-	1	1	I-100	-	24,6c	-	stabilna stable

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – wartości średnie przy tym samym parametrze oznaczone różnymi indeksami różnią się między sobą statystycznie istotnie ($p = 0,05$) / mean values ref. to the same parameter and denoted by different indexes differ statistically significantly among themselves ($p = 0,05$).

Wyniki przeprowadzonych badań (tab. 2) wskazują, że po 24 h przechowywania emulsji najmniejszą średnią wielkością cząstek oraz najmniejszą wartością współczynnika dyspersyjności charakteryzowały się emulsje z dodatkiem 5 i 7,5 g emulgatora, homogenizowane przez 3 min (wariant III i IV). Rozkład cząstek tych emulsji (rys. 1a i b) świadczył, że miały one najbardziej monodispersyjny charakter.



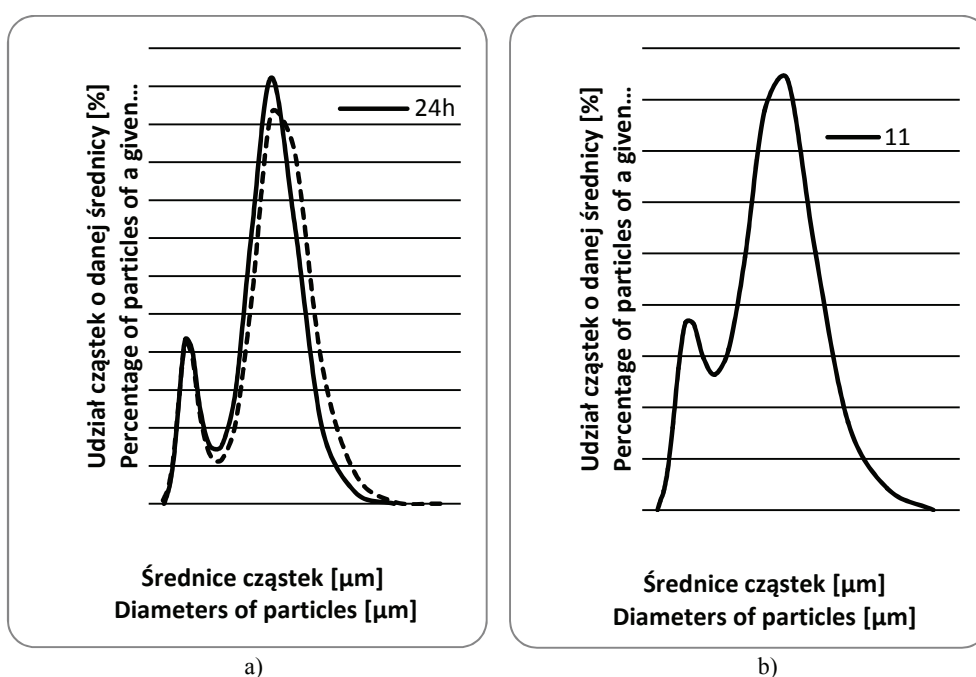
Rys. 1. Rozkłady wielkości cząstek: a) emulsji III; b) emulsji IV po 24 h od wytworzenia oraz po 2 tygodniach przechowywania.

Fig. 1. Distributions of particle sizes in: a) emulsions of Variant III; b) emulsions of Variant IV 24h after manufacturing them and after 2 week-storage.

Średnia wielkość cząstek w emulsjach I i II oraz V i VI wynosiła od 3,17 do 3,84 μm (tab. 2). Ich współczynniki dyspersyjności utrzymywały się na podobnym poziomie (od 1,10 do 1,22). Należy zaznaczyć, że emulsja z wariantu VI również wykazywała stabilny charakter po 24 h od wytworzenia (układ jednofrakcyjny), mimo że średnia wielkość cząstki była większa niż w wariantach III i IV (rys. 3b). Pojawienie się dodatkowej frakcji zaobserwowano natomiast w emulsjach w wariantach I, II i V (rys. 2a i b, 3a). W emulsji z wariantu V proces rozfrakcjonowania był najmniej widoczny, gdyż tylko 9 % stanowiła dodatkowa druga frakcja (rys. 3a). W pozostałych przypadkach udział frakcji w układzie emulsyjnym pozostawał na zbliżonym poziomie: 73 – 74 % – pierwsza frakcja i 26 - 27 % – druga frakcja (rys. 2a i b). Depree i wsp. [6] wykazali, że mniejsze krople emulsji, ściśle upakowane z większymi, mogą tworzyć strukturę siatki przestrzennej stabilizującej układ emulsyjny. Obecność takich dwóch wyraźnie zarysowanych frakcji w emulsji w wariantcie I może świadczyć o zaistnieniu takiego zjawiska.

Po dwóch tygodniach dokonano kolejnego pomiaru średniej wielkości oraz rozkładu cząstek olejowych. Stwierdzono, że w trzech najbardziej stabilnych emulsjach

(warianty I, III i IV) średnia wielkość cząstek rozproszonych nieznacznie wzrosła, jednak liczba frakcji pozostała taka sama (rys. 1a i b, 2a, tab. 2). W przypadku emulsji VI, mimo stabilnego układu po 24 h, po kolejnych dwóch tygodniach przestała wykazywać charakter układu dyspersyjnego (zaobserwowano całkowite rozwarstwienie). Gruczyńska i wsp. [11] wykazali, że na rozkład oraz średnią wielkość cząstek rozproszonej fazy emulsji wpływ mają warunki przechowywania. Podczas przechowywania emulsji, niezależnie od temperatury (pokoju lub chłodniczej), obserwuje się zwykle wzrost średniej wielkości cząstek.

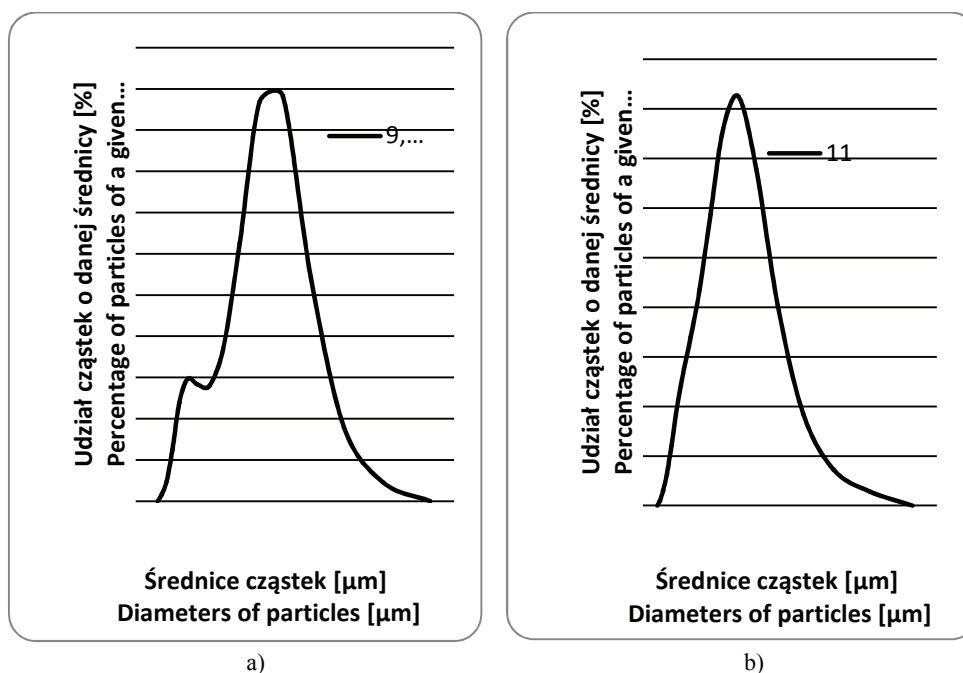


Rys. 2. Rozkłady wielkości cząstek: a) emulsji I po 24 h od wytworzenia emulsji oraz po 2 tygodniach przechowywania; b) emulsji II po 24 h od wytworzenia emulsji.

Fig. 2. Distributions of particle sizes in: a) emulsions of Variant I 24 h after manufacturing them and after 2 week-storage; b) emulsions of Variant II 24 h after manufacturing them.

Stopień dyspersji, jak również wielkość cząstek fazy rozproszonej, są skorelowane z lepkością fazy ciągłej układu emulsyjnego [18]. Badane emulsje charakteryzowały się zróżnicowaną lepkością od 14,5 do 26,1 [Pa·s] (tab. 2). Emulsje ze średnim dodatkiem emulgatora (5 i 7,5 g) homogenizowane przez 3 min (wariant III i IV) wykazywały optymalną wartość lepkości. Pomiar lepkości tych emulsji po 2 tygodniach wykazał nieznaczne zmniejszenie wartości tego parametru, natomiast lepkość emulsji I praktycznie się nie zmieniła. Uwzględniając różną zawartość wody w emulsjach

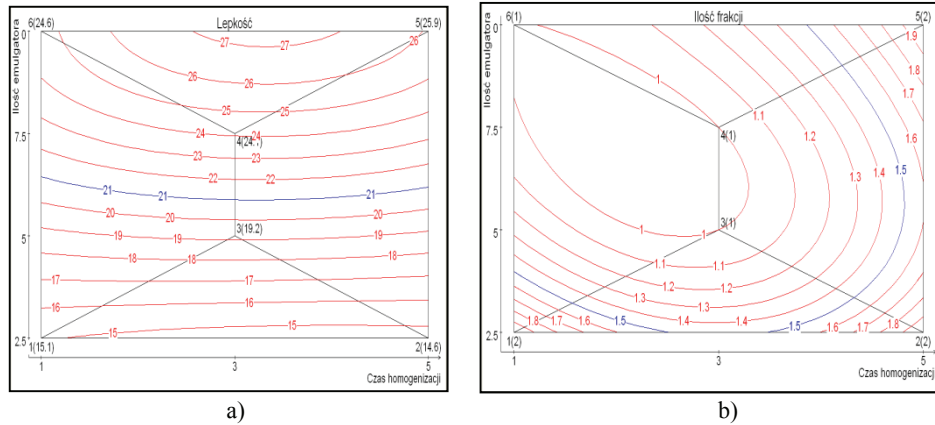
stwierdzono, że emulsje z większą ilością wody charakteryzowały się mniejszą lepkością. Zdaniem Huang i wsp. [13] lepkość fazy wodnej istotnie wpływa na stopień dyspersji oleju: im ma ona wyższą wartość, tym trudniej uzyskać odpowiednią dyspersję oleju. Biorąc pod uwagę tę zależność można stwierdzić, że emulsje V i VI były niewłaściwie zdyspergowane.



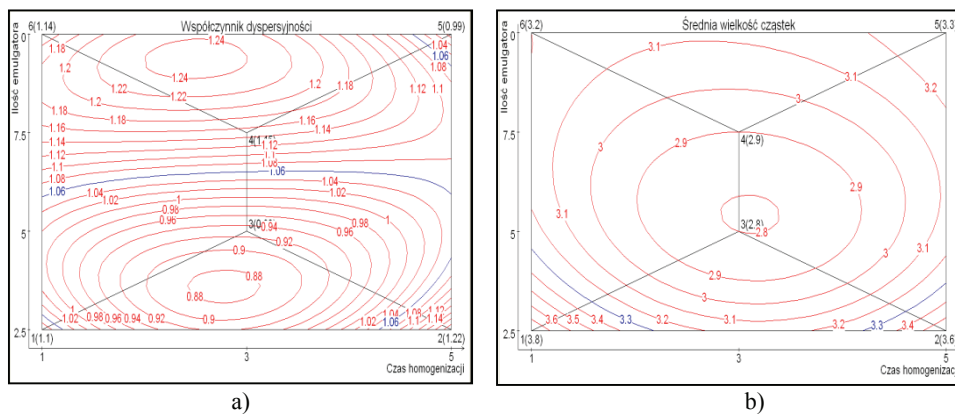
Rys. 3. Rozkłady wielkości cząstek: a) emulsji V, b) emulsji VI po 24 h od wytworzenia emulsji.

Fig. 3. Distributions of particle sizes in: a) emulsions of Variant V, b) emulsions of Variant VI 24 h after manufacturing them.

Przeprowadzony test wirówkowy wykazał, że najmniej stabilna była emulsja I, z najmniejszym dodatkiem emulgatora, za to z największą zawartością wody oraz największym zróżnicowaniem cząstek fazy zdyspergowanej. Analiza zależności pomiędzy parametrami zmiennymi procesu a lepkością emulsji wykazała, że na wzrost lepkości wpływała głównie ilość emulgatora (czas homogenizacji nie powodował znaczących zmian w wartościach tego parametru) (rys. 4a). Zaobserwowano, że w zakresie dodatku emulgatora od 5 do 10 g układ był monodispersyjny. W tym obszarze optimum stabilności zaobserwowano w przypadku 3 min homogenizacji (rys. 4b).



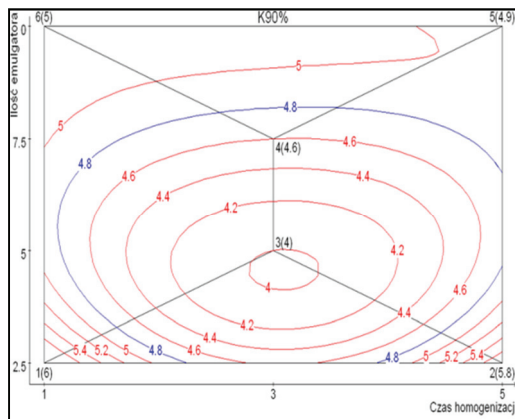
Rys. 4. Wpływ parametrów wejściowych na: a) lepkość emulsji i b) ilość frakcji w emulsji.
 Fig. 4. Effect of input parameters on: a) viscosity of emulsions and b) amount of fractions in emulsion.



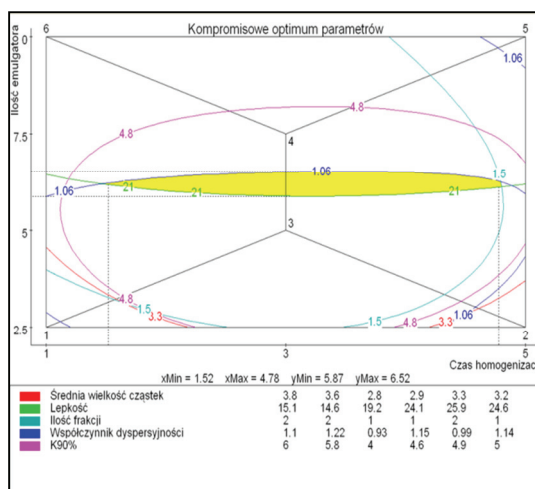
Rys. 5. Wpływ parametrów wejściowych na: a) współczynnik dyspersyjności i b) średnią wielkość cząstek emulsji.
 Fig. 5. Effect of input parameters on: a) coefficient of dispersion and b) average size of emulsion particle.

Analiza współczynnika dyspersyjności z wartościami od 0,88 do 1,24 pozwoliła na zaobserwowanie optimum czasu homogenizacji bliskiego 3 min i ilości emulgatora w granicach 3 - 4 g. Wskazuje to, że emulsja o tak zadanych parametrach wejściowych będzie dążyła do układu monodispersyjnego (rys. 5a). Z kolei analiza średniej wielkości cząstek wskazuje na występowanie optimum przy czasie homogenizacji w granicach 3 min i ilości emulgatora w zakresie 5 - 6 g. Średnia wielkość cząstek byłaby wtedy najmniejsza i wynosiła 2,8 μm (rys. 5b). Wydłużanie czasu homogenizacji nie doprowadzi do zmniejszenia wielkości cząstki w układzie dyspersyjnym. Bezzasadne byłoby również zwiększanie wielkości dodatku emulgatora.

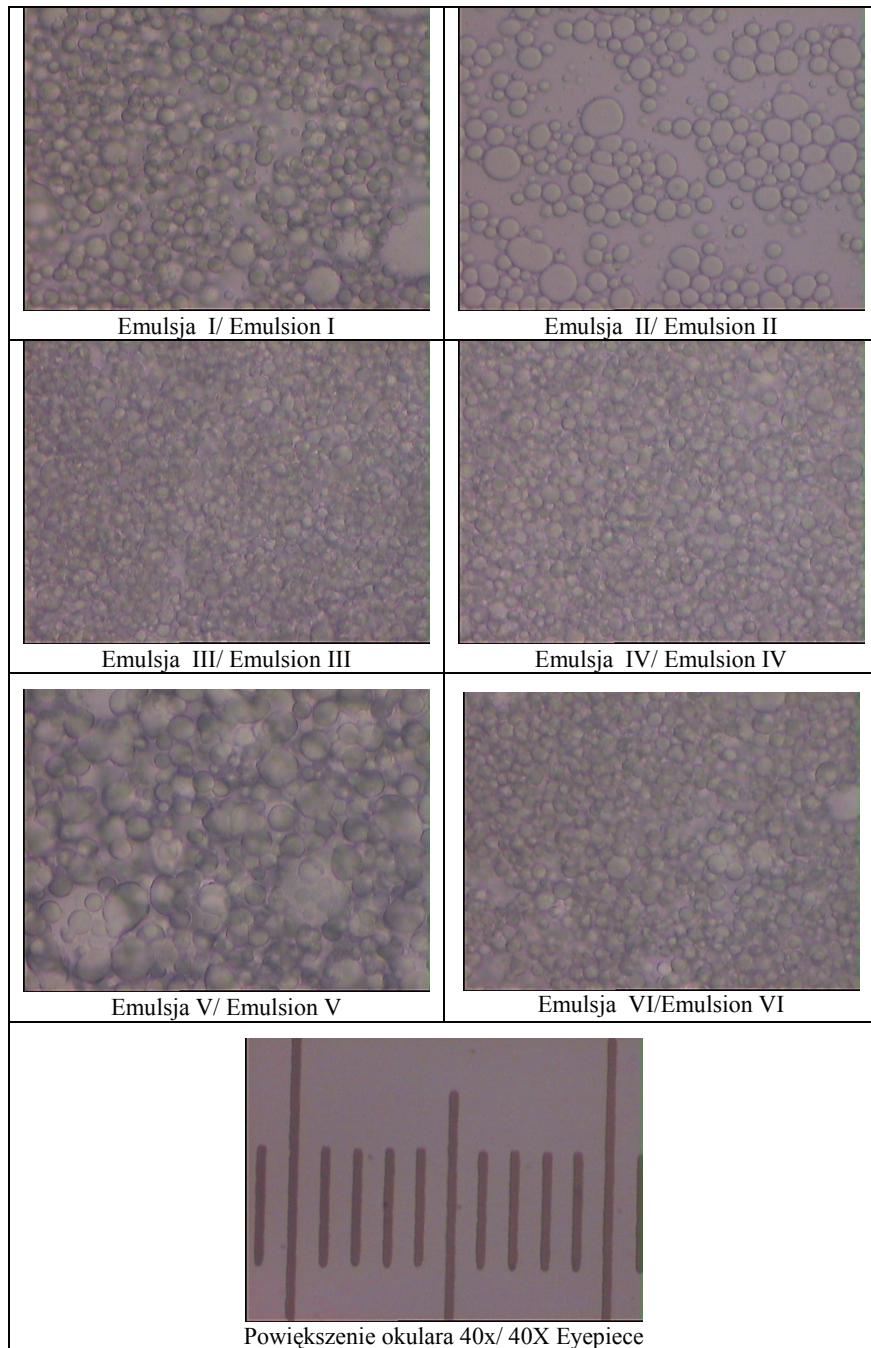
Analizując wpływ parametrów wejściowych na wartość $K_{90\%}$, można zauważyć takie same prawidłowości, jak w przypadku średniej wielkości cząstek. Optimum w przypadku najmniejszej wartości $K_{90\%} = 4 \mu\text{m}$ wystąpiło przy czasie homogenizacji wynoszącym około 3 min oraz dodatku emulgatora około 4,5 g (rys. 6).



Rys. 6. Wpływ parametrów wejściowych na wartość $K_{90\%}$.
 Fig. 6. Effect of input parameters on $K_{90\%}$ value.



Rys. 7. Kompromisowe optimum parametrów.
 Fig. 7. Compromise optimum of parameters.



Fot. 1. Obraz mikroskopowy emulsji (wraz ze skalą) przy powiększeniu 40x.

Phot. 1. Microscopic images of emulsions (I-VI) magnified 40 x.

Z przeprowadzonej analizy optymalizacji parametrów stabilności emulsji (rys. 7) wynika, że w przypadku wytworzonych emulsji, o zadanych na początku doświadczenia parametrach, optymalna ilość emulgatora mieści się w przedziale od 5,87 do 6,52 g, a optymalny czas homogenizacji w zakresie od 1,5 do 4,8 min.

Końcowy etap pracy polegał na analizie obrazów mikroskopowych badanych emulsji (fot. 1). Stwierdzono, że emulsje ze średnią wielkością dodatku emulgatora (5,0 i 7,5 g), homogenizowane przez 3 min (warianty III i IV) wykazywały najbardziej jednorodny charakter. W emulsji z największym dodatkiem emulgatora i po najdłuższym czasie homogenizacji (wariant V) zaobserwowano początek procesu koagulacji. Emulsje z najmniejszą ilością emulgatora, różniące się czasem homogenizacji (warianty I i II) cechowała porównywalna lepkość. Jednak w obrazie mikroskopowym zaobserwowano niejednorodność emulsji z wariantu II – widoczne były duże krople powstałe w wyniku połączenia mniejszych kuleczek. W obrazie mikroskopowym emulsji z wariantu I widoczne były natomiast pojedyncze, większe krople, co potwierdziło wcześniej opisane wyniki (obecność kolejnej frakcji) – rys. 3a i tab. 2.

Wnioski

1. Za optymalną emulsję uznano wariant III, charakteryzujący się dodatkiem emulgatora na poziomie 5 g i 3-minutowym czasem homogenizacji. Układ ten charakteryzował się zarówno najmniejszą wielkością cząstek, jak i współczynnikiem dyspersyjności. Emulsja miała charakter monodispersyjny, a obraz mikroskopowy potwierdził jednorodność układu.
2. Parametry emulsji III były zbliżone od zakresu wyznaczonego przez kompromisowe optimum parametrów emulsji wyznaczone przez program Kateskór. Analiza komputerowa wykazała, że dodatek emulgatora powinien się zawierać w przedziale od 5,87 do 6,52 g, a czas homogenizacji od 1,52 do 4,78 min.
3. Otrzymane wyniki potwierdzają przydatność komputerowej optymalizacji do ustalania właściwego składu i dobierania parametrów technologicznych stabilnych układów emulsyjnych.

Literatura

- [1] Bonilla J., Atarés L., Vargas M., Chiralt A.: Physicochemical properties of chitosan-essential oils film forming dispersions. Effect of homogenization treatments. *Procedia Food Science*, 2011, **1**, 44-49.
- [2] Buffo R.A., Reineccius G.A., Oehlert G.W.: Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsion. *Food Hydrocol.*, 2001, **15**, 53-66.
- [3] Burgaud I., Dickenson E., Nelson P.V.: An improved high-pressure homogenizer for making fine emulsions on a small scale. *J. Food Sci. Technol.*, 1990, **25**, 39-46.
- [4] Chanamai R., McClements D.J.: Creaming stability of flocculated monodisperse oil-in-water emulsions. *J. Colloid Int. Sci.*, 2000, **225**, 214-218.

- [5] Damodaran S.: Protein stabilization of emulsions and foams. *J. Food Sci.*, 2005, **70**, 54-66.
- [6] Depree J.A., Savage G.P.: Physical and flavour stability of mayonnaise. *Food Sci. Technol.*, 2001, **12**, 157-163.
- [7] Dickinson E.: An introduction to food colloids. Oxford University Press, Oxford 1992.
- [8] Dickinson E.: Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends Food Sci. Technol.*, 2012, **24** (1), 4-12.
- [9] Dickinson E., Elverson D.J., Murray B.S.: On the film-forming and emulsion-stabilizing properties of gum Arabic: dilution and flocculation aspects. *Food Hydrocol.*, 1989, **3** (2), 101-114.
- [10] Garti N.: Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *Lebensm. Wiss. Technol. Food Sci. Technol.*, 1997, **30**, 222-235.
- [11] Gruczyńska E., Kowalski B., Kowalska M., Śmiechowski K.: Charakterystyka wybranych majonezów oraz wpływ temperatury i czasu przechowywania na ich stabilność. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **4** (49), 154-166.
- [12] Huck-Iriart C., Álvarez-Cerimedo M.S., Candal R.J., Herrera M.L.: Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. *Cur. Opin. Col. Inter. Sci.*, 2011, **16**, 412-420.
- [13] Huang X., Kakuda Y., Cui W.: Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocol.*, 2001, **15**, 533-542.
- [14] Kleeman W.: *Plast und Kautschuk. Das Leder*, 1964, **11**, 723.
- [15] Kowalska M., Żbikowska A., Górecka A.: Wpływ wybranych zagęstników na rozkład kropelek oleju w emulsjach niskotłuszczowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **4** (77), 84-93.
- [16] Kryża K., Stodolnik L.: Zmiany stabilności oksydacyjnej i fizycznej emulsji niskotłuszczowych w czasie chłodniczego przechowywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **3** (52), 28-43.
- [17] Kulawik A., Tal-Figiel B., Warzeł M.: Lecytyna i jej rola w farmaceutycznych emulsjach suchych. *Inż. Ap. Chem.*, 2011, **50** (5), 62-63.
- [18] Langton M., Jordansson E., Altskär A., Sørensen Ch., Hermansson A.-M.: Microstructure and image analysis of mayonnaises. *Food Hydrocol.*, 1999, **13**, 113-125.
- [19] Maindarkar S.N., Bongers P., Henson A.M.: Predicting the effects of surfactant coverage on drop size distributions of homogenized emulsions. *Chem. Eng. Sci.*, 2013, **89**, 102-114.
- [20] McClements D.J.: *Food emulsion: Principles, practice and techniques*. Second edition. CRC Press LLC, New York 1999.
- [21] Mohammad S., Gharibzahedi T., Mousavi S.M., Hamed M., Khodaiyan F.: Application of response surface modeling to optimize critical structural components of walnut-beverage emulsion with respect to analysis of the physicochemical aspects. *Food Bioprocess Technol.*, 2013, **6** (2), 456-469.
- [22] PN-EN ISO 5508. 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- [23] PN-EN ISO 5509. 2001. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych.
- [24] Rampurna P., Gullapalli, Bhogi B. Sheth : Effect of methylcellulose on the stability of oil-in-water emulsions. *Int. J. Pharmaceutics*, 1995, **140**, 97-109.
- [25] Raymundo A., Franco J.M., Empis J., Sousa I: Optimization of the composition of low-fat oil-in-water emulsions stabilized by white lupin protein. *JAACS*, 2002, **79** (8), 783-790.
- [26] Smirnow W., Jakubczyk K.: OPTIKOMA program komputerowy. Politechnika Radomska, WMiTO, Radom 1997.
- [27] Saitoa M., Yin L., Kobayashic I., Nakajima M.: Comparison of stability of bovine serum albumin-stabilized emulsions prepared by microchannel emulsification and homogenization. *Food Hydrocol.*, 2006, **20**, 1020-1028.

- [28] Taherian A.R., Fustier P., Britten M., Ramaswamy H.S.: Rheology and stability of beverage emulsions in the presence and absence of weighting agents: a review. *Food Biophysics*, 2008, **3**, 279-286.

EFFECT OF SUNFLOWER LECITHIN QUANTITY AND HOMOGENIZATION TIME ON STABILITY OF FOOD EMULSION CONTAINING WALNUT OIL

S u m m a r y

In the research study assessed was the effect of adding an emulsifier and the impact of homogenization time on the stability of emulsion dispersion systems. A Kateskór software was used to choose parameters of stable dispersion systems. Based on the preset initial values of output parameters characterizing the stable emulsion (size of dispersed particles, viscosity, and number of phases), a compromise optimum of input parameters was obtained: the quantity of emulsifier in the emulsion amounting from 5.87 to 6.52 g and the homogenization time between 1.52 and 4.78 min.

The experimental evaluation of the average size of particles, viscosity, and microscopic image of the dispersion system proved that the most stable was the emulsion of Variant III; it contained 5 g of the emulsifier and was homogenized for 3 minutes. The empirically determined parameters of that emulsion were close to the range of the compromise optimum as determined by the Kateskór software.

Key words: walnut oil, sunflower lecithin, optimization of parameters, size of emulsion particles, emulsion stability ☒

ANNA ZADERNOWSKA, WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA,
LUCYNA KLĘBUKOWSKA

FLUORESCENCYJNA HYBRYDYZACJA *IN SITU* JAKO ALTERNATYWNA METODA OZNACZANIA OBECNOŚCI PAŁECZEK *SALMONELLA* SP. W MIĘSIE DROBIOWYM

Streszczenie

Salmonella sp. jest jedną z głównych przyczyn zatruc pokarmowych. Z uwagi na czasochłonność standardowej metody wykrywania tego patogenu w żywności istnieje potrzeba doskonalenia metod alternatywnych. W badaniach zastosowano fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH) z użyciem sondy Sal3 do wykrywania obecności *Salmonella* sp. w mięsie drobiowym (zaszczepionym *Salmonella* sp. oraz innymi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*) i porównano ją z immunodiagnostyczną metodą enzymo-immunofluorescencyjną (VIDAS® SLMX) oraz metodą wg PN-ISO-6579. Metodami: FISH i VIDAS nie otrzymano wyników fałszywie negatywnych. Metodą VIDAS uzyskano jednak kilka wyników fałszywie pozytywnych. W metodzie FISH nie zaobserwowano hybrydyzacji ze szczepami innymi niż *Salmonella* sp. Wyniki wskazują na możliwość zastosowania FISH jako szybkiej metody wykrywania *Salmonella* sp. w mięsie drobiowym.

Słowa kluczowe: mięso drobiowe, *Salmonella* sp., FISH, VIDAS, PN-ISO-6579

Wprowadzenie

Pałeczki *Salmonella* sp., będące główną przyczyną zatruc pokarmowych, są wskaźnikiem bezpieczeństwa żywności. Wymieniane są w corocznych raportach EFSA – European Food Safety Authority jako główny enteropatogen odpowiedzialny za epidemie zatruc pokarmowych. Główne źródło tych bakterii stanowią: mięso drobiowe, mięso wieprzowe, jaja, produkty mleczarskie, a w mniejszym stopniu: owoce i warzywa [6, 21]. Sprostanie standardom z zakresu zapewnienia bezpieczeństwa żywności oraz zarządzania ryzykiem w łańcuchu żywnościowym zmusza do opracowywania nowych, szybkich i pewnych metod identyfikacji zagrożeń mikrobiologicznych.

Dr inż. A. Zadernowska, mgr inż. W. Chajęcka-Wierzchowska, dr inż. L. Klębukowska, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn. Kontakt: anna.zadernowska@uwm.edu.pl

Standardowe metody hodowlane wykrywania *Salmonella* sp. w żywności uważa się za dobrze opracowane, ale są one wieloetapowe i wymagają od 4 do 5 dni analizy w celu uzyskania wstępnych pozytywnych lub negatywnych wyników. Niezbędne jest także wykonanie szeregu potwierdzeń biochemicznych, co znacznie wydłuża czas analizy i w konsekwencji wynik ostateczny otrzymuje się po 7 dniach. Wszystko to może sprzyjać popełnianiu błędów w interpretacji wyników [15]. Długi czas oznaczeń jest ponadto znacznym utrudnieniem w obrocie żywnością. Również możliwość zachowania aktywności metabolicznej drobnoustrojów, mimo utraty zdolności do tworzenia kolonii na podłożach stałych w wyniku np. warunków stresowych – tzw. stan VBNC (*viable but nonculturable*), przemawia za koniecznością doskonalenia metod diagnostycznych [5]. Problemem jest również możliwość występowania w produktach komórek subletalnie uszkodzonych podczas przeprowadzanych procesów technologicznych [8]. Alternatywą dla analiz tradycyjnych są techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), polegające na zastosowaniu sond stanowiących krótkie sekwencje oligonukleotydów, łączących się z kwasami nukleinowymi komórki [10]. Sondy są znakowane markerami fluorescencyjnymi, łączą się z materiałem genetycznym bakterii o sekwencji komplementarnej do sondy. Z uwagi na to, że sondy zawierają znaczniki fluorescencyjne, połączenie materiału zawartego w próbce z komplementarną sondą obserwuje się w mikroskopie epifluorescencyjnym. Technika ta jest dość powszechnie wykorzystywana w medycynie i w badaniach środowiskowych [13]. Jest również stosowana w badaniach złożonych układów populacji mikroorganizmów, jakimi są biofilmy [2].

Niezbędnym warunkiem zastosowania techniki FISH do skutecznego wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności jest dobranie optymalnych warunków przygotowania prób z uwagi na bardzo zróżnicowaną matrycę, tj. skład chemiczny żywności oraz mikroflorę towarzyszącą, które mogą prowadzić do odczytów obarczonych dużym błędem. Jeśli w żywności znajdują się pałeczki *Salmonella* sp., to najczęściej żywność ta jest znacznie zanieczyszczona innymi drobnoustrojami w tym pałeczkami Gram-ujemnymi. Dlatego do stosunkowo szybkiej oceny jakości i bezpieczeństwa żywności konieczny wydaje się dobór nie tylko sond dla poszczególnych gatunków drobnoustrojów, ale przede wszystkim zoptymalizowanie przygotowania prób żywności do badań w zależności od matrycy [4].

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) do wykrywania obecności pałeczek *Salmonella* sp. w mięsie drobiowym oraz porównanie tej metody z techniką immunoenzymatyczną (VIDAS[®] SLMX) oraz standardową metodą wg PN-ISO-6579:2003.

Material i metody badań

Szczepy

Podczas badań stosowano monokultury i kultury mieszane szczepów: *Salmonella bongori* ATCC[®] 43975, *Salmonella enterica* subsp. *anatum* ATCC[®] 9270, *Salmonella* Typhimurium ATCC[®] 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC[®] 13076, *Escherichia coli* ATCC[®] 11229, *Escherichia coli* ATCC[®] 14169, *Escherichia coli* ATCC[®] 23848, *Proteus mirabilis* ATCC[®] 25933, *Proteus vulgaris* ATCC[®] 33420, *Klebsiella pneumoniae* NCTC[®] 9633, *Citrobacter freundii* NCTC[®] 9750, *Enterobacter aerogenes* ATCC[®] 13048, *Enterobacter cloacae* ATCC[®] 35030. Ponadto badaniom poddano 3 szczepy *Salmonella* sp. wyizolowane z mięsa drobiowego i zidentyfikowane w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, WNoŻ, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Szczepy uaktywniano na podłożu bulionowym (Merck)/37 °C/24 h.

Sondy

W badaniach zastosowano sondy oligonukleotydowe, syntetyzowane na zamówienie w firmie Bionovo (tab. 1). Wszystkie sondy znakowane były barwnikami fluorescencyjnymi (Cy5, Cy3) na końcach 5' odpowiednio: EUB₃₃₈ – Cy5, NON₃₃₈ – Cy5, Sal3 – Cy3.

Tabela 1. Sondy oligonukleotydowe zastosowane w badaniach.
Table 1. Oligonucleotide probes used in research.

Sonda Probe	Specyficzność Specificity	Sekwencja nukleotydów (5'-3') Nucleotide sequence (5'-3')	Pozycja rRNA rRNA position	Literatura Literature
EUB ₃₃₈	Eubacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16S (338-355)	[1]
NON ₃₃₈	–	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	–	[20]
Sal3	<i>Salmonella enterica</i>	AAT CAC TTC ACC TAC GTG	23S (1713-1730)	[11]

Etapy badań

Badania prowadzono w dwóch etapach. W pierwszym materiał badawczy stanowiły namnożone hodowle szczepów. Stosowano 24-godzinne hodowle w bulionie odżywczym (Merck) szczepów izolowanych z żywności i szczepów referencyjnych wymienionych w punkcie 2.1. Kolejny etap obejmował badania zainfekowanego mięsa drobiowego zakupionego w sklepie na terenie Olsztyna (wykluczono w nim występowanie pałeczek *Salmonella* sp. zgodnie z PN-ISO-6579:2003 [12]). Procedura obejmowała jałowe przygotowanie 25-gramowej naważki mięsa w worku do Stomachera i zaszczepianie mięsa bakteriami w liczbie 100 - 500 jtk/g (stosując dziesięciokrotne

rozcieńczenia hodowli). Następnie dodawano 225 ml zbuforowanej wody peptonowej (Merck), przednamnażanie prowadzono w temp. 41,5 °C/24 h. Po tym czasie wykonywano dalsze analizy zgodnie z PN-ISO-6579:2003 [12], immunoanalizatorem miniVidas oraz techniką FISH.

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH)

Pobierano 1000 µl 24-godzinnej hodowli szczepów lub przednamnożonej próby, wirowano – 12000 obr./10 min. Zlewano supernatant, osad dwukrotnie przemywano 1000 µl PBS (Sigma). Tak przygotowane komórki zawieszano w 4-procentowym paraformaldehydzie (Sigma) i przetrzymywano w temp. 4 °C przez 4 h, a następnie przemywano dwukrotnie w roztworze etanolu i PBS (1 : 1). Komórki zawieszano w 500 µl mieszaniny etanol-PBS, nanoszono 10 µl tej mieszaniny na ośmiodołkowe szkiełka teflonowe (Thermo Scientific) i suszono. Przepłukiwano je w barwiaczu typu Hellendhala przez 3 min, w roztworze o stężeniu 50, 80, i 96 % etanolu. Na wysuszone preparaty nanoszono 10 µl buforu hybrydyzacyjnego (0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, ddH₂O, 0,01 % SDS), zawierającego 5 ng/µl sondy Sal3 oraz 5 ng/µl sondy EUB₃₃₈. Hybrydyzację prowadzono w wilgotnych komorach, w piecu hybrydyzacyjnym przez 3h/45 °C. Po inkubacji szkiełka przemywano w buforze płuczącym (0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, ddH₂O, 0,01 % SDS) – 45 °C/15 min. Następnie nanoszono olejek Vectashield HardSet Mounting Medium z 4',6-diamidyno-2-fenylindolem – DAPI (Vector) i przetrzymywano w temp. 4 °C/15 min. W badaniach zastosowano metodę FISH wg Vieira-Pinto i wsp. [16] w modyfikacji własnej. Preparaty analizowano przy użyciu mikroskopu epifluorescencyjnego OLYMPUS BX51, wyposażonego w 100-watowy palnik rtęciowy, kolorową kamerę cyfrową XC10 do obserwacji w IR, chłodzoną układem Peltiera z elementem światłoczułym CCD oraz odpowiednie zestawy filtrów dla fluorochromów: Cy3 (U-M41007 w zakresie 530 – 560 nm), Cy5 (U-M41008 w zakresie 590 - 650 nm), DAPI (U-MNU2 w zakresie 360 - 370 nm). Analizę obrazu prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania wersji CellSens Dimension plus Solution Multi Channel 5D. Zdjęcia preparatów wykonywano przy stałym czasie naświetlania.

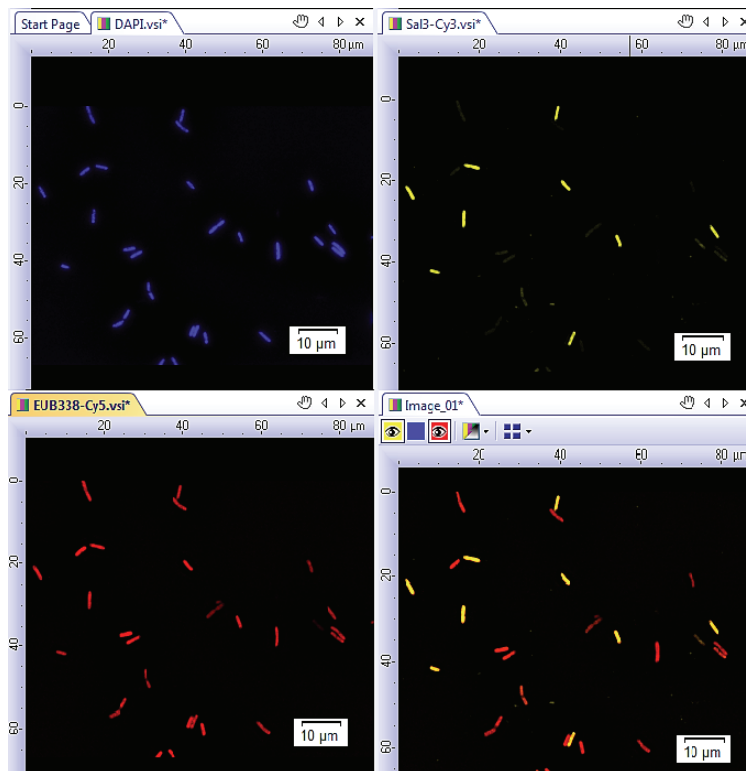
Analiza z użyciem immunoanalizatora miniVIDAS

Salmonella Xpress (SLMX) jest testem immunoenzymatycznym polegającym na wykrywaniu w badanej próbce specyficznych antygenów. Zasada testu polega na zdolności do tworzenia kompleksów między przeciwciałami a antygenami obecnymi w próbce, które następnie znakowane są fosfatazą alkaliczną. Aparat odczytuje wyniki na podstawie intensywności fluorescencji (ELFA) powstałej w trakcie reakcji. Poszczególne etapy analizy wykonywano analogicznie jak w poprzednim opracowaniu [3].

Wyniki i dyskusja

Oznaczanie *Salmonella* sp. w żywności polega na wykrywaniu obecności tych pałeczek w określonej ilości produktu – z reguły w 25 g (25 ml) [7]. Nie przeprowadza się natomiast oznaczania liczby tych drobnoustrojów w żywności. Zarówno w metodzie klasycznej (PN-ISO-6579:2003), jak i jej modyfikacjach, pierwszym etapem oznaczenia jest etap nieselektywnego namnażania. Jest on niezmiernie ważny, ponieważ produkcja żywności wiąże się z jej obróbką technologiczną np. ogrzewaniem, co może spowodować śmierć większości komórek lub ich subletalne uszkodzenie [14]. Ponadto, żywność jest specyficznym środowiskiem rozwoju dla mikroorganizmów ze względu na zróżnicowaną zawartość soli, konserwantów, pH itp. Pominięcie etapu przednamnażania próbki i posiew materiału bezpośrednio na podłoże stałe może wpłynąć na uzyskanie wyników fałszywie negatywnych. Również podczas badań techniką FISH wskazany jest ten etap z uwagi na próg wykrywalności metody tj. około 10^3 jtk/g. Czułość metody tradycyjnej, jak i techniki FISH jest znacznie większa, jeśli stosowany jest etap przednamnażania, co potwierdzają badania [12].

W technice FISH niezwykle istotnym etapem jest dobór parametrów permeabilizacji komórek. Sondy są dużymi cząsteczkami, a zatem trudno przenikają do wnętrza komórki bakteryjnej. Penetrację sond może dodatkowo utrudniać etap utrwalania komórek. Ważny jest zatem odpowiedni dobór procedury permeabilizacji, która ma na celu łatwiejsze wnikanie sondy do komórki poprzez zwiększenie jej „porowatości”. W przeprowadzonych badaniach monokultur *Salmonella* sp. obserwowano całkowite pokrycie sygnału komórek wizualizowanych z zastosowaniem sondy specyficznej znakowanej fluorescencyjnie Cy3 i sondy uniwersalnej EUB₃₃₈ znakowanej Cy5 oraz z DAPI. Interkalator DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol), to fluorochrom wiążący się selektywnie z parami zasad adenina-tymina [9]. Jest to barwnik stosowany do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów. Obserwowane pokrycie wszystkich sygnałów wskazuje na prawidłowo przeprowadzoną permeabilizację komórek *Salmonella* sp. I związanie się wszystkich obecnych w preparacie komórek z sondą Sal3. Natomiast specyficzność sondy Sal3 potwierdzono w badaniach kultur mieszanych, gdzie obserwowano całkowite pokrycie się sygnałów komórek związanych z EUB₃₃₈ i DAPI oraz fluorescencją wybranych komórek (*Salmonella* sp.) znakowanych sondą Sal3 (fot. 1). Niespecyficzne wiązania sond oligonukleotydowych zweryfikowano sondą NON₃₃₈, stanowiącą kontrolę negatywną. Dodatkowo potwierdzono pokrywanie się sygnałów pochodzących od fluorochromów: Cy3 i Cy5 z fluorochromem DAPI.



Fot. 1. Wykrywanie *Salmonella* sp. w hodowlach bulionowych z użyciem sondy Sal3. Niebieska fluorescencja (DAPI) – mieszanina pałeczek *Enterobacteriaceae*; żółta fluorescencja (Sal3-Cy3) – *Salmonella* sp.; czerwona fluorescencja (EUB338-Cy5) – mieszanina pałeczek *Enterobacteriaceae*; nałożony obraz (Sal3-Cy3 oraz Eub338).

Phot. 1. Detection of *Salmonella* sp. in broth culture samples using Sal3 probe. Blue fluorescence (DAPI) – mixed *Enterobacteriaceae* rods; yellow fluorescence (Sal3-Cy3) – *Salmonella* sp.; red fluorescence (EUB338-Cy5) - mixed *Enterobacteriaceae* rods; imposed image (Sal3-Cy3 and Eub338).

Aplikacja techniki FISH do badań żywności jest możliwa po odpowiednim przygotowaniu próby [4]. W związku z tym przed rozpoczęciem badań właściwych prowadzono analizy wstępne mające na celu optymalizację każdego z etapów przygotowania próby do analizy techniką FISH (dane niepublikowane). Niezwykle istotnymi parametrami okazały się: dobór odpowiedniej membrany do sączenia próby po procesie homogenizacji (worki z perforowanym filtrem bocznym – Interscience), czas i prędkość wirowania, etap opłukiwania komórek oraz czas i temperatura ich utrwalania. Takie podejście pozwoliło na oddzielenie komórek od występujących w mięsie cząstek białek, tłuszczów itp. Efektem było uzyskanie obrazu mikroskopowego bez elementów

wykazujących autofluorescencję, co ułatwiło obserwację i interpretację obrazu mikroskopowego.

Tabela 2. Wyniki analiz otrzymane metodami FISH, VIDAS i ISO w hodowlach na bulionie.
Table 2. Results of FISH, VIDAS, and ISO analyses obtained in broth cultures.

Układ szczepów Composition of strains	Hodowle na bulionie Broth cultures						
	Liczba prób / Quantity of samples						
	ogółem total	pozytywnych positive			negatywnych negative		
		FISH	ISO	VIDAS	FISH	ISO	VIDAS
Monokultury / Monocultures							
- <i>Salmonella</i> sp.	7	7	7	7	0	0	0
- ENT	9	0	0	0	9	9	9
Kultury mieszane / Mixed cultures							
- S+ENT	32	32	32	32	0	0	0
- ENT+ENT	36	0	0	0	36	36	36
Razem / Total	84	39	39	39	45	45	45

Objaśnienia: / Explanatory notes:

ENT – pozostałe pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* / other *Enterobacteriaceae* rods; S+ENT – *Salmonella* sp. i dwie inne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* / *Salmonella* sp. and two other rods from *Enterobacteriaceae* family; ENT+ENT – pozostałe pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* w układach po dwie / other *Enterobacteriaceae* rods arranged in twos.

W pierwszym etapie badań, prowadzonym w hodowlach na bulionie, wyniki uzyskane trzema metodami (FISH, SLMX, ISO) całkowicie się pokrywały (tab. 2). Potwierdza to wysoką specyficzność metod alternatywnych. W badaniach kontaminowanego mięsa obserwowano pewne rozbieżności w wynikach uzyskanych poszczególnymi metodami (tab. 3). Dotyczyły one próbek mięsa kontaminowanego mieszaniną pałeczek *Salmonella* sp. i innych z rodziny *Enterobacteriaceae*. Zarówno techniką FISH, jak i immunoenzymatyczną wykryto obecność pałeczek *Salmonella* sp. we wszystkich próbach, do których została dodana. Technika FISH nie uzyskano wyników pozytywnych w próbach kontaminowanych innymi niż *Salmonella* sp. pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*, podczas gdy testy SLMX wykazały 5 wyników fałszywie pozytywnych. Na możliwość otrzymania wyników fałszywie pozytywnych przez immunoanalizator VIDAS wskazywano także w innych badaniach [3, 18]. Może to być spowodowane reakcjami krzyżowymi z innymi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* znajdującymi się w matrycy (mięsie). Z uwagi na skład oraz pH mięso drobiowe z reguły jest wysoko obciążone różnorodną mikroflorą [19].

Tabela 3. Wyniki analiz otrzymane metodami FISH, VIDAS i ISO w kontaminowanym mięsie.

Table 3. Results of FISH, VIDAS, and ISO analyses obtained in inoculated meat.

Układ szczepów Composition of strains	Zaszczepione mięso Inoculated meat						
	Liczba prób / Quantity of samples						
	ogółem total	pozytywnych positive			negatywnych negative		
		FISH	ISO	VIDAS	FISH	ISO	VIDAS
Monokultury / Monocultures							
- <i>Salmonella</i> sp.	7	7	7	7	0	0	0
- ENT	9	0	0	0	9	9	9
Kultury mieszane / Mixed cultures							
- S+ENT	32	32	31	32	0	1*	0
- ENT+ENT	36	0	0	5	36	36	31
Razem / Total	84	39	38	44	45	46	40

Objaśnienia jak pod tab. 2: / Explanatory notes as in Tab. 2.

*Wynik fałszywie negatywny w mieszaninie *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* / False negative result in *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, and *Proteus mirabilis* mixture

Spośród 39 próbek mięsa kontaminowanych pałeczkami *Salmonella* sp. zarówno techniką FISH, jak i testem SLMX, wszystkie próbki oznaczono jako pozytywne. Metodą standardową otrzymano natomiast jeden wynik fałszywie negatywny. Jego przyczyną była prawdopodobnie duża liczba mikroflory towarzyszącej, której obfity wzrost na płytkach z podłożami wybiórczymi utrudniał interpretację wyników. Na podłożu XLD niektóre pałeczki z rodzaju *Proteus* sp. rosną w postaci kolonii charakterystycznych dla *Salmonella* sp. Błędny wybór kolonii do dalszych potwierdzeń może być przyczyną wyników fałszywie negatywnych.

Zastosowanie sondy oligonukleotydowej w oznaczaniu pałeczek *Salmonella* sp. W mięsie pozwoliło na otrzymanie wiarygodnych wyników. Porównując FISH oraz testy SLMX z metodą standardową uwagę zwraca czas analizy. Zarówno w technice FISH, jak i w metodzie immunoenzymatycznej można wykluczyć występowanie pałeczek *Salmonella* sp. w ciągu 20 - 26 h, podczas gdy metodą standardową etap ten zajmuje około 70 h. Niewątpliwą zaletą obu metod alternatywnych jest brak wyników fałszywie negatywnych, jednak otrzymywanie wyników fałszywie pozytywnych metodą immunoenzymatyczną wydłuża czas i generuje koszty.

Vieira-Pinto i wsp. [17] badali próbki naturalnie kontaminowanej wieprzowiny techniką FISH oraz metodą standardową. Techniką FISH wykryli pałeczki *Salmonella* sp. w 16 (34 %) na 47 badanych próbek, podczas gdy metodą płytkową zaledwie w 6 próbkach – przy czym w jednej z próbek pozytywnych oznaczonych metodą standardową nie wykryto obecności tych pałeczek, stosując technikę FISH. Znaczące różnice

w liczbie próbek pozytywnych otrzymanych stosowanymi metodami autorzy tłumaczą możliwością występowania komórek subletalnie uszkodzonych bądź komórek w stanie VBNC, które były „niehodowalne” na podłożach stałych, ale zawierały odpowiednią ilość rRNA niezbędnego do związania z sondą. Jest to jednak domniemanie autorów, które nie zostało potwierdzone empirycznie. Z uwagi na to, że badaniom poddano mięso naturalnie kontaminowane, być może uzyskiwali oni wyniki fałszywie pozytywne na skutek niespecyficznego wiązania sondy, co nie zostało przez cytowanych autorów sprawdzone. W badaniach własnych stworzono warunki modelowe – mięso zaszczepiano żywymi, aktywnymi i hodowlanymi komórkami *Salmonella* sp. Zatem powodem większej liczby wyników pozytywnych otrzymanych metodą FISH w porównaniu z metodą ISO może być raczej większa specyficzność metody, aniżeli zdolność do wykrywania komórek w stadium VBNC.

Wnioski

1. Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z zastosowaniem sondy Sal3 do wykrywania pałeczek *Salmonella* sp. w mięsie drobiowym, przy odpowiednim przygotowaniu próbki oraz doborze warunków hybrydyzacji, może być stosowana jako specyficzna metoda alternatywna.
2. Zastosowanie techniki FISH pozwala na skrócenie czasu oczekiwania na wyniki, co ma szczególne znaczenie podczas badań surowców i produktów o krótkim terminie przydatności do spożycia.
3. Zarówno analiza żywności techniką FISH, jak i z zastosowaniem urządzenia miniVIDAS wymaga nakładów finansowych na niezbędny sprzęt. Po odpowiednim wyposażeniu laboratorium, koszty pojedynczych analiz metodą standardową (ISO-6579), FISH i miniVIDAS są porównywalne.

Praca badawcza finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu nr NN 312 491340.

Literatura

- [1] Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W.: Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1919-1925.
- [2] Aoi Y.: *In situ* identification of microorganisms in biofilm communities. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, **94** (6), 552-556.
- [3] Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Kłębukowska L., Łaniewska-Trokenheim Ł.: *Salmonella* detection in poultry meat – validation of VIDAS Xpress Automatic Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay-Based Method. *J. Food Safety*, 2012, **32** (4), 407-414.

- [4] Cocolin L., Diez A., Urso R., Rantsiou K., Comi G., Bergmaier I., Beimfohr C.: Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **120**, 100-109.
- [5] Dahm H., Strzelczyk E.: Żyjące, lecz nie dające się hodować bakterie. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **43** (3), 251-265.
- [6] EFSA: A quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat: source attribution for human salmonellosis from meat. *Eur. Food Saf. Auth. J.*, 2008, **625**, 1-32.
- [7] Eijkelkamp J.M., Aarts H.J.M., van der Fels-Klerx H.J.: Suitability of rapid detection methods for *Salmonella* in poultry slaughterhouses. *Food Anal. Methods*, 2009, **2**, 1-13.
- [8] Jasson V., Baert L., Uyttendaele M.: Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella enterica* in chocolate. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, **145**, 488-491.
- [9] McNamara Ch.J., Lemke M.J., Leff L.G.: Underestimation of bacterial numbers in starvation-survival mode using the nucleic acid stain DAPI. *Arch. Hydrobiol.*, 2003, **157** (3), 309-319.
- [10] Moter A., Göbel U.F.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.*, 2000, **41**, 85-112.
- [11] Nordentoft S., Christensen H., Wegener H.C.: Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for in situ detection of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 2642-2649.
- [12] PN-ISO-6579:2003. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.
- [13] Rathnayaka R.M.U.S.K.: Effect of sample pre-enrichment and characters of food samples on the examination for the *Salmonella* by plate count method and fluorescent in-situ hybridization technique. *Am. J. Food Technol.*, 2011, **6** (9), 851-856.
- [14] Skowrońska A., Zmysłowska I.: Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). *Post. Mikrobiol.*, 2006, **45**, 183-193.
- [15] Taskila S., Tuomola M., Ojamo H.: Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. *Food Control*, 2012, **26**, 369-377.
- [16] Tomás D., Rodrigo A., Hernández M., Ferrús M.A.: Validation of Real-Time PCR and Enzyme-Linked Fluorescent Assay-Based Methods for Detection of *Salmonella* spp. in chicken feces samples. *Food Anal. Methods*, 2009, **2**, 180-189.
- [17] Vieira-Pinto M., Oliveira M., Aranha J., Martins C., Bernardo F.: Influence of an enrichment step on *Salmonella* sp. detection by fluorescent in situ hybridization on pork samples. *Food Control*, 2008, **19**, 286-290.
- [18] Vieira-Pinto M., Oliveira M., Bernardo F., Martins C.: Evaluation of Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) as a rapid screening method for detection of *Salmonella* in tonsils of slaughtered pigs for consumption: a comparison with conventional culture method. *J. Food Safety*, 2005, **25**, 109-119.
- [19] Vieira-Pinto M., Oliveira M., Bernardo F., Martins C.: Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent in situ hybridization: a comparison with VIDAS®-SLM system and ISO 6579 cultural method. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2007, **59** (6), 1388-1393.
- [20] Wachowicz I.: Wpływ rozmrażania solankowego na jakość mikrobiologiczną mięsa kurcząt. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2** (43), 253-264.
- [21] Wallner G., Amann R., Beisker W.: Optimizing fluorescent in situ hybridisation with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 1993, **14** (2), 136-143.
- [22] Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowski M.: Drobnoustroje chorobotwórcze i zatrucia pokarmowe w krajach UE. *Przem. Spoż.*, 2012, **66**, 26-29.

**FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION AS ALTERNATIVE SCREENING
METHOD FOR DETERMINING PRESENCE OF *SALMONELLA* SP.
IN CHICKEN MEAT**

S u m m a r y

Salmonella sp. is one of the main causes of food poisoning. Since the standard method for detecting that pathogen in food is time-consuming, it is necessary to perfect alternative methods. In the research study, a fluorescent in situ hybridization method (FISH) was utilized with the use of a Sal3 probe to detect *Salmonella* sp. in chicken meat (inoculated with *Salmonella* sp. and with other Enterobacteriaceae rods) and compared with an Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay-Based Method (VIDAS® SLMX) and with an ISO method. While using the FISH and VIDAS methods, no false negative results were obtained. With the use of the VIDAS method, several false positive results were obtained. In the FISH method, no hybridization was reported to any strains other than *Salmonella* sp. The results obtained indicate that the FISH method could, possibly, be utilized as a rapid screening method for detecting *Salmonella* sp. in chicken meat.

Key words: chicken meat, *Salmonella* sp., FISH, VIDAS, ISO-6579 ☒

BARBARA SIONEK, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA,
IZABELA PASTERNOK

PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII O WŁAŚCIWOŚCIACH PROBIOTYCZNYCH W KIELBASACH SUROWO DOJRZEWAJĄCYCH W CZASIE CHŁODNICZEGO PRZECHOWYWANIA

Streszczenie

Celem pracy było określenie wzrostu i przeżywalności trzech szczepów bakterii probiotycznych w czasie długiego przechowywania chłodniczego oraz ocena wpływu tych bakterii na jakość sensoryczną kielbasy wieprzowej surowo dojrzewającej. Przygotowano trzy warianty kielbas, każdy z dodatkiem innego szczepu bakterii fermentacji mlekowej. Zastosowano szczep probiotyczny *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 oraz dwa szczepy potencjalnie probiotyczne: *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 (Chr. Hansen) i *Lactobacillus acidophilus* Bauer. Kielbasy przechowywane przez 230 dni w temperaturze 4 – 6 °C poddano ocenie mikrobiologicznej i sensorycznej. Liczbę bakterii mlekowych (LAB) oznaczano po fermentacji i po 30, 60, 90, 150, 180 i 230 dniach. Ocenę sensoryczną przeprowadzono metodą Ilościowej Analizy Opisowej (QDA).

Liczba bakterii kwasu mlekowego w badanych kielbasach wynosiła od 10^8 do 10^9 jtk/g. Próbkę kielbas z dodatkiem szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900 i *B. animalis ssp. lactis* Bb-12 po fermentacji i po 230 dniach przechowywania charakteryzowały się wysoką liczbą bakterii kwasu mlekowego. Po 90 dniach zaobserwowano znaczące (o 3 rzędy logarytmiczne) zmniejszenie liczby bakterii w przypadku kielbasy z dodatkiem szczepu *Lb. acidophilus* Bauer. Przeżywalność tych bakterii w kielbasach zależała od czasu przechowywania. Badane kielbasy charakteryzowały się wysoką jakością sensoryczną w całym okresie przechowywania. We wszystkich próbkach, po 230 dniach przechowywania populacja bakterii mlekowych wynosiła ponad 10^6 jtk/g, co wskazuje na ich przydatność do procesów technologicznych i przechowywania. Najniższą przeżywalnością w okresie przechowywania charakteryzował się szczep *Lb. acidophilus* Bauer, natomiast przeżywalność dwóch pozostałych szczepów była podobna, utrzymywała się na poziomie 10^8 jtk/g kielbasy.

Słowa kluczowe: probiotyki, kielbasy surowo dojrzewające, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, przechowywanie, przeżywalność

Dr inż. B. Sionek, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, mgr inż. I. Pasternok, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa. Kontakt: barbara_sionek@sggw.pl

Wprowadzenie

Produkty fermentowane są poszukiwanym rodzajem żywności z uwagi na ich walory prozdrowotne i smakowe. Wzrastająca świadomość konsumentka wyraża się m.in. poszukiwaniem produktów żywnościowych naturalnych, bezpiecznych, o właściwościach prozdrowotnych, zredukowanej zawartości soli, azotynów i azotanów [6, 20, 23]. Obecnie coraz większą uwagę zwraca się na rolę i znaczenie bakterii probiotycznych, które stanowią naturalną mikroflorę jelitową i wywierają korzystny wpływ na organizm. Dodatek bakterii probiotycznych do produktów żywnościowych wpływa korzystnie na organizm człowieka poprzez stymulację systemu immunologicznego, działanie antybakteryjne na szczepy chorobotwórcze, obniżanie poziomu cholesterolu, [16]. Właściwości probiotyczne mogą być przypisane do określonego szczepu danego gatunku [18]. Bakterie probiotyczne hamują rozwój flory patogennej i ograniczają procesy psucia się żywności. Zapewniają w ten sposób stabilizację biologiczną produktu w czasie procesów technologicznych, jak i podczas przechowywania. Efekty prozdrowotne żywności probiotycznej wynikają ze zmiany mikroflory przewodu pokarmowego, dlatego podstawowym zagadnieniem jest ich przeżywalność w czasie pasażu przez układ pokarmowy [3]. Czynniki, które wpływają na przeżywalność bakterii w środowisku są: pH, temperatura przechowywania, obecność konkurencyjnych mikroorganizmów, inhibitory wzrostu (np. NaCl) [20].

Jako probiotyki najczęściej stosowane są w przemyśle spożywczym bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, izolowane z przewodu pokarmowego człowieka [3]. Bakterie kwasu mlekowego (LAB, ang. *Lactic Acid Bacteria*) pełnią podstawową rolę w procesie fermentacji mięsa. Chronią one produkt przed rozwojem niepożądanego mikroflory i przyczyniają się do zwiększenia jego trwałości. Głównym produktem fermentacji mlekowej jest kwas mlekowy. Bakterie kwasu mlekowego są w większości względnie beztlenowcami, choć szczepy *Bifidobacterium* są wrażliwe na obecność tlenu w środowisku. Zależnie od szczepu, bakterie kwasu mlekowego należą do mezo- lub termofili [4]. Optymalne pH dla ich rozwoju wynosi 4,0 - 4,5. Zastosowanie bakterii probiotycznych w fermentowanych wyrobach mięsnych przyczynia się do tworzenia korzystnego smaku i zapachu oraz stabilizacji barwy [22].

W przypadku produktów mięsnych proces fermentacji i dojrzewania jest utrudniony. Wynika to z małej zawartości glukozy, niskiego pH i aktywności wody oraz wysokiej zawartości NaCl [7]. Ponadto, w przypadku mięsa nierozdrobnionego procesy dyfuzji są zróżnicowane, a zaszczepienie kulturami bakterii może być nierównomierne. Dodatkowym utrudnieniem jest dobór odpowiednich warunków fermentacji. Wyższa temperatura sprzyja rozwojowi drobnoustrojów probiotycznych, natomiast niższa temperatura i wydłużony czas fermentacji korzystnie wpływają na walory smakowe. Produkty mięsne z dodatkiem probiotyków pojawiły się na rynku niemieckim i japońskim w roku 1998 [2]. Do tej pory brak jest standardów oraz zasad dotyczących

fermentacji i dojrzewania wędlin surowych z dodatkiem drobnoustrojów probiotycznych. Podstawowe zagadnienia obejmują charakterystykę i przygotowanie surowców mięsnych oraz wybór odpowiednich szczepów bakterii probiotycznych, a także ocenę wpływu probiotyków na jakość produktu i jego walory zdrowotne. Innym problemem jest współwystępowanie innych szczepów bakterii w produktach mięsnych. Z tego powodu do oceny przeżywalności drobnoustrojów probiotycznych konieczna jest pełna identyfikacja szczepów bakterii kwasu mlekowego [8]. Według wytycznych FAO/WHO szczepy bakterii mogą być uznane za probiotyczne, gdy podczas badań klinicznych udowodniony zostanie korzystny wpływ na zdrowie oraz gdy ich liczba w 100 g porcji żywności będzie wynosić co najmniej 10^6 jtk/g [10]. Według niektórych autorów, w celu uzyskania efektu prozdrowotnego produktu żywnościowego konieczna jest liczba bakterii na poziomie 10^8 - 10^{10} komórek w 1 g produktu [11, 16].

Celem pracy była ocena wzrostu i przeżywalności trzech szczepów bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych oraz określenie ich wpływu na jakość sensoryczną kielbasy wieprzowej surowo dojrzewającej w czasie długotrwałego przechowywania (230 dni) w temperaturze 4 °C.

Material i metody badań

Material do badań stanowiły kielbasy wieprzowe surowo dojrzewające z dodatkiem bakterii fermentacji mlekowej. Zastosowano szczep probiotyczny *Lactobacillus casei* LOCK 0900 (zgłoszenie patentowe nr P-382760) oraz dwa potencjalnie probiotyczne: *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 (Chr. Hansen) i *Lactobacillus acidophilus* Bauer, pochodzący z kolekcji Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej (zdeponowany w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem B/00019). Probiotyczne szczepy bakterii powinny spełniać aspekty bezpieczeństwa, wykazywać zdolność do przeżycia i namnażania w przewodzie pokarmowym, charakteryzować się przydatnością do procesów technologicznych i przechowywania. Istotnym zagadnieniem jest wykazanie korzystnego wpływu na zdrowie człowieka [6, 18].

Liczba bakterii probiotycznych w hodowli wyjściowej, która służyła do zaszczerpienia badanych prób kielbasy wieprzowej, wynosiła około 10^9 jtk/cm³ w zależności od zastosowanego szczepu.

Proces produkcji kielbas surowo dojrzewających przeprowadzano w Katedrze Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Surowiec stanowiły polędwice wieprzowe (80 %) oraz słonina (20 %). Mięso peklowano na sucho 24 h w temp. 2 °C mieszanką peklującą o składzie: 20 g soli morskiej, 9,7 g peklosoli, 0,3 g azotanu(V) sodu w stężeniu 2,8 % w stosunku do masy mięsa. Następnie mięso było rozdrabniane w wilku laboratoryjnym i mieszane z wcześniej pokrojoną i zamrożoną (-19 °C) słoniną. Do zapeklowanego farszu dodawano 0,6 %

glukozy, po czym dodano zawiesinę odpowiedniego szczepu bakterii probiotycznych. W ten sposób otrzymano trzy warianty kielbas, każdy z dodatkiem innego szczepu bakterii fermentacji mlekowej.

Kielbasy poddawano fermentacji w temp. 16 °C i wilgotności względnej powietrza 75 - 85 % przez trzy dni. Po tym czasie produkt wędzono w temp. 27 - 30 °C, a następnie poddawano dojrzewaniu właściwemu przez 3 tygodnie w temp. 16 °C. Zapakowane próżniowo kielbasy przechowywano przez 230 dni bez dostępu światła w temp. 4 °C.

W próbkach kielbas monitorowano wzrost i przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej, a kielbasy poddawano analizie sensorycznej z zastosowaniem metody Ilościowej Analizy Opisowej (QDA).

Ocenę liczby bakterii przeprowadzano po zakończonym dojrzewaniu (dzień 0) oraz podczas przechowywania po 30, 60, 90, 150, 180 i 230 dniach. Liczbę bakterii po zakończeniu inkubacji oznaczano metodą płytkową przez posiew wgłębny na podłożu MRS (Biokar Diagnostics, Francja) lub BSM (Sigma Aldrich, Niemcy) w zależności od stosowanego szczepu bakterii. Wyniki podano w jednostkach tworzących kolonie w 1g produktu (jtk/g). Posiewy inkubowano w temp. 37 °C przez 48 h.

Analizę sensoryczną metodą QDA wykonywał zespół przeszkolony zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO 8586-2:2008 [19]. Wybrano 14 wyróżników jakości sensorycznej i oceny ich intensywności nanoszono na niestrukturyzowaną skalę graficzną (0-10 j.u.). Ocenę przeprowadzano po 30, 60, 150, 180 i 230 dniach. Oceniane wyróżniki to: intensywność zapachu wędzankowego, intensywność zapachu tłuszczowego, intensywność zapachu ostrego, intensywność zapachu innego, rozdrobnienie tkanki mięsnej, zwięzłość (wsad), tłuszcz "widoczny", soczystość, intensywność smaku wędzankowego, intensywność smaku tłuszczu, intensywność smaku słonego, intensywność smaku kwaśnego, intensywność smaku innego, jakość ogólna.

Analizę statystyczną przeprowadzono w celu oceny zależności między czasem przechowywania a przeżywalnością badanego szczepu bakterii. Zastosowano analizę korelacji i regresji liniowej. Opracowanie statystyczne wyników oznaczeń mikrobiologicznych wykonano w programie Microsoft Excel oraz Statgraphics v. 5.1.

Wyniki i dyskusja

Kielbasy surowo dojrzewające mogą stanowić dostateczny nośnik drobnoustrojów probiotycznych, mimo tego że wyroby mięsne nie są tak dobrym środowiskiem dla ich rozwoju jak mleko. Z drugiej jednak strony mięso w czasie pasażu przez układ pokarmowy pełni funkcję protekcyjną dla bakterii probiotycznych. Twierdzi się, że chroni bakterie probiotyczne przed wpływem żółci [9, 14]. Bakterie probiotyczne dodane w procesie produkcji wędlin fermentowanych powinny wykazywać zdolność do przetrwania w warunkach procesu technologicznego [23].

Aby zwiększyć namnażanie i przeżywalność bakterii probiotycznych, do produktów mięsnych dodaje się mono- i polisacharydy na poziomie 0,4 - 0,8 % [16, 21]. W badanych próbkach kielbas z dodatkiem 0,6 % glukozy, po procesie dojrzewania w temp. 16 °C przez 21 dni liczba bakterii kwasu mlekowego była duża i wynosiła: 9,20, 9,22 i 8,70 log jtk/cm³ odpowiednio w próbkach z dodatkiem szczepów: *Lactobacillus acidophilus* Bauer, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 i *L. casei* ŁOCK 0900 (tab. 1). Podobne wyniki liczby bakterii probiotycznych w poledwicach surowo dojrzewających uzyskały Neffe i Kołożyn-Krajewska [17]. Wykazano, że dodatek glukozy do poledwic wieprzowych przed procesem fermentacji korzystnie wpływał na wzrost i rozwój bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900 i *Lb. casei* ŁOCK 0908. Liczba bakterii kwasu mlekowego w próbkach z dodatkiem 0,2 % glukozy wynosiła 10⁸ jtk/g i była wyższa o jeden rząd logarytmiczny w porównaniu z próbami bez glukozy [17].

Procesy fermentacji i dojrzewania produktów mięsnych pozwalają na uniknięcie wysokotemperaturowej obróbki cieplnej, co umożliwia dobrą przeżywalność bakterii w farszu kielbas surowych [5]. Zastosowana temperatura procesu dojrzewania (16 °C) mogła stwarzać dobre warunki rozwoju bakterii mlekowych, w tym szczepów probiotycznych [1, 2]. Próbkę kielbas po zakończeniu dojrzewania i 7,5 miesiąca (230 dni) przechowywania, w warunkach beztlenowych, w temp. 4 °C, z dodatkiem szczepu *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 charakteryzowały się dużą ogólną liczbą bakterii kwasu mlekowego (tab. 1). Podobnie w pracy Neffe i Kołożyn-Krajewskiej [17] wykazano, że bakterie probiotyczne *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 i *L. casei* ŁOCK 0908 rozmnażają się i przeżywają w poledwicach przechowywanych w temp. 4 °C w opakowaniach próżniowych przez 6 miesięcy.

Podczas przechowywania przeżywalność szczepów *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 i *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 była na podobnym poziomie około 10⁷-10⁸ jtk/g (tab. 1). W przypadku szczepu *B. animalis subsp. lactis* Bb-12 oraz *L. casei* ŁOCK 0900 nie było istotnej zależności liniowej między liczbą przeżywających bakterii a czasem przechowywania ($p > 0,05$). Współczynnik korelacji liniowej pomiędzy czasem przechowywania a przeżywalnością: $r = -0,53$, zarówno dla *B. animalis subsp. lactis* Bb-12, jak i *L. casei* ŁOCK 0900, wskazuje, że zależności te były umiarkowane.

Jedynie w przypadku szczepu *Lactobacillus acidophilus* Bauer po 90 dniach zaobserwowano znaczące (o 3 rzędy logarytmiczne), w porównaniu z wartością po fermentacji, zmniejszenie liczby bakterii. Współczynnik korelacji $r = -0,95$ wskazuje na stosunkowo mocną i istotną ($p < 0,01$) zależność liniową między czasem przechowywania a przeżywalnością szczepu *Lactobacillus acidophilus* Bauer. Wartość p-value wyniosła 0,0012, co świadczy o statystycznie istotnym obniżeniu liczby bakterii *L.*

acidophilus Bauer w czasie przechowywania. Jaworska i wsp. [13] także wykazali nieznaczne obniżenie liczby bakterii kwasu mlekowego w tym *L. acidophilus*. Bauer w polędwicach fermentowanych po 180 dniach przechowywania z 7,95 do 7,00 log jtk/g w próbach bez dodatku glukozy i z 7,69 do 7,53 log jtk/g w próbach z dodatkiem 0,3 % glukozy [13]. Obniżenie liczby bakterii mogło być spowodowane nagromadzeniem kwasu mlekowego, który hamował rozwój bakterii mlekowych. Poszczególne szczepy bakterii mlekowych wytwarzają różne ilości kwasu mlekowego, co powinno być uwzględniane przy ich wyborze [15]. Ponadto, wytwarzanie kwasu mlekowego przez bakterie mlekowe zależy od średnicy kiełbasy, co związane jest z dostępnością tlenu [12].

Tabela 1. Liczba bakterii kwasu mlekowego w próbkach kiełbas surowo dojrzewających po procesie dojrzewania i przechowywaniu [log jtk/g].

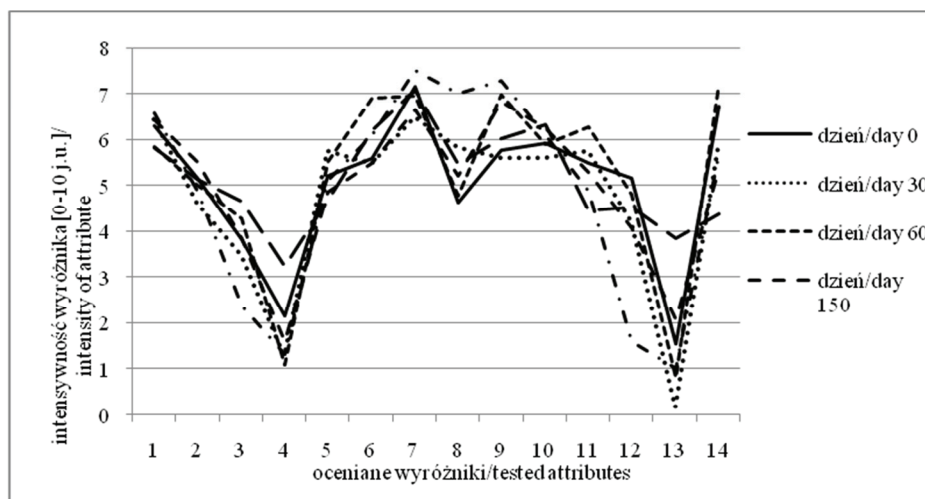
Table 1. Count of lactic acid bacteria in samples of dry fermented sausages after ripening and during storage [log cfu/g].

Czas przechowywania [dni] Storage period [days]	Kiełbasy z dodatkiem szczepów probiotycznych Sausages with probiotic strains added		
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Bauer	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. Bb-12	<i>Lactobacillus casei</i> ŁOCK 0900
0	9,20 ± 0,62	9,22 ± 1,15	8,70 ± 1,19
30	8,93 ± 1,08	8,40 ± 0,68	8,39 ± 0,13
60	8,35 ± 0,68	8,08 ± 0,27	8,17 ± 0,0
90	8,51 ± 0,32	8,41 ± 0,48	8,65 ± 0,63
150	6,89 ± 0,13	8,09 ± 0,02	7,22 ± 0,04
180	6,63 ± 0,04	7,67 ± 0,14	8,08 ± 0,09
230	6,82 ± 0,26	8,49 ± 0,10	8,15 ± 0,08
p	< 0,01	> 0,10	> 0,10
Współczynnik korelacji r Correlation coefficient r	-0,95*	-0,53	-0,53

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation ; * wartość założonego poziomu istotności p = 0,01; n = 10.

Badane próbki kielbas po okresie przechowywania spełniały kryterium minimum probiotycznego (populacja probiotyków ponad 10^6 jtk/g). Wszystkie badane szczepy bakterii wykazały zdolność do przeżywania do ostatniego dnia badań w liczbie 10^6 - 10^8 jtk/g.



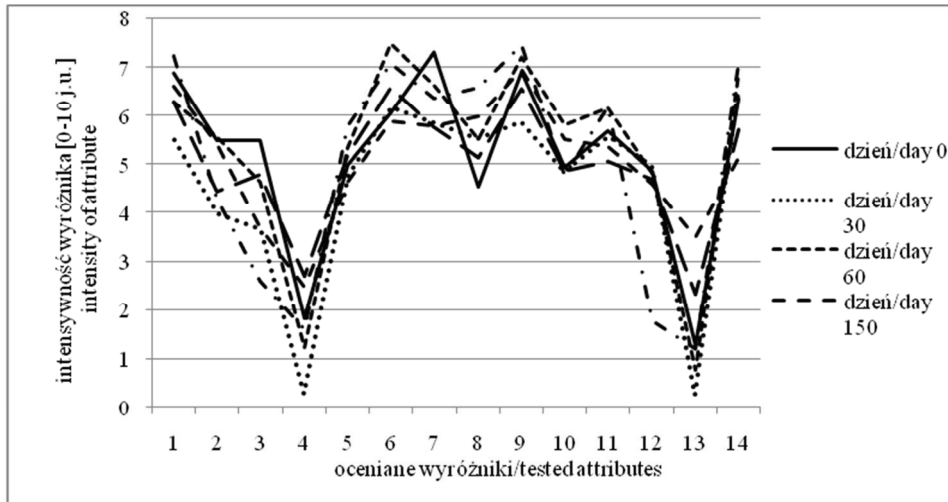
Objaśnienia: / Explanatory notes:

Zapach / Smell: 1 – wędzony / like smoked bacon; 2 – zjełczały / rancid; 3 – ostry / pungent; 4 – inny / other; 5 – rozdrobnienie tkanki mięsnej / finely chopping of muscle tissue; 6 – zwięzłość / compactness; 7 – tłuszcz "widoczny" / "visible" fat; 8 – soczystość / juiciness; Smak / Flavour: 9 – wędzony / like smoked bacon; 10 – zjełczały / rancid; 11 – słony / salty; 12 – kwaśny / sour; 13 – inny / other; 14 – jakość ogólna / overall quality.

Rys. 1. Wpływ czasu przechowywania na jakość sensoryczną kielbasy surowo dojrzewającej z dodatkiem szczepu *Lactobacillus casei* LOCK 0900.

Fig. 1. Effect of storage time duration on sensory quality of raw (dry) fermented sausages with added *Lactobacillus casei* LOCK 0900.

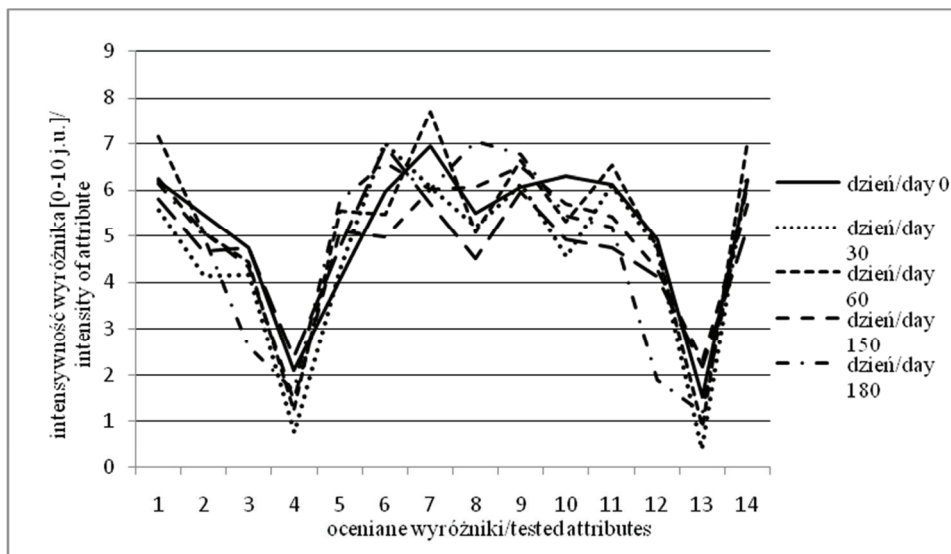
Prawidłowo przeprowadzony proces produkcji pozwala na uzyskanie wyrobów mięsnych charakteryzujących się korzystnymi cechami sensorycznymi. We wszystkich badanych kielbasach wysoko oceniono smak i zapach wędzony. Może to być wynikiem zastosowanej temperatury dojrzewania i dodatku bakterii probiotycznych. Największe zmiany w wyczuwalnym zapachu wędzonym odnotowano w przypadku kielbas z dodatkiem *Lactobacillus casei* LOCK 0900 (rys. 1). Wyróżniki uznane za negatywne, czyli: smak gorzki, zapach ostry, zapach inny, były słabo wyczuwalne we wszystkich badanych próbkach. Intensywność smaku kwaśnego została oceniona jako nisko wyczuwalna. Warto zauważyć, że w 180. dniu przechowywania stwierdzono gwałtowne zmniejszenie intensywności smaku kwaśnego we wszystkich badanych próbkach (rys. 1, 2 i 3).



Objaśnienia jak pod rys. 1 / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Wpływ czasu przechowywania na jakość sensoryczną kielbasy surowo dojrzewającej z dodatkiem szczepu *Lactobacillus acidophilus* Bauer.

Fig. 2. Effect of storage time duration on sensory quality of raw (dry) fermented sausages with added *Lactobacillus acidophilus* Bauer.



Objaśnienia jak pod rys. 1 / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 3. Wpływ czasu przechowywania na jakość sensoryczną kielbasy surowo dojrzewającej z dodatkiem szczepu *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12.

Fig. 3. Results of sensory analysis of fermented sausages with *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 during storage.

Wszystkie badane próbki kielbas charakteryzowały się wysoką jakością ogólną, co więcej, wyróżnik ten kształtował się na podobnym poziomie w całym okresie przechowywania. Można wnioskować, że dodatek szczepów probiotycznych i potencjalnie probiotycznych pozytywnie wpływa na jakość ogólną wyrobu mięsnego.

Wnioski

1. Liczba bakterii trzech zastosowanych szczepów bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych w kielbasach wieprzowych przechowywanych w temp. 4 - 6 °C przez 230 dni była powyżej minimum potrzebnego do uznania produktu za probiotyczny (10^6 jtk/g) zgodnie z wymaganiami FAO/WHO, co wskazuje na ich przydatność do procesów technologicznych i przechowalniczych.
2. Najmniejszą przeżywalnością w czasie przechowywania charakteryzował się szczep potencjalnie probiotyczny *Lactobacillus acidophilus* Bauer, natomiast przeżywalność dwóch pozostałych szczepów: *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 i *Lactobacillus casei* LOCK 0900 była podobna (10^8 jtk/g kielbasy).
3. Badane próby kielbas z dodatkiem bakterii probiotycznych charakteryzowały się wysoką jakością sensoryczną zarówno po fermentacji, jak i w ciągu 230 dni przechowywania chłodniczego.
4. Wieprzowa kielbasa dojrzewająca z dodatkiem bakterii o właściwościach probiotycznych jest ich dobrym nośnikiem przez cały okres przechowywania (230 dni) w temp. 4 - 6 °C, a szczepami szczególnie przydatnymi do produkcji są: *Lactobacillus casei* LOCK 0900 i *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12.

Literatura

- [1] Ammor M.S., Mayo B.: Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci.*, 2007, **76** (1), 138-146.
- [2] Arihara K.: Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Sci.*, 2006, **74** (1), 219-229.
- [3] Bielecka M.: Żywność probiotyczna. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka* 2002, **4** (1), 27-32.
- [4] Bystron J., Molenda J.: Rola bakterii kwasu mlekowego w utrwalaniu fermentowanych przetworów mięsnych. *Życie Weter.*, 2004, **79** (12), 688-690.
- [5] Cegielka A., Masłowska K.A.: Możliwości zastosowania bakterii probiotycznych w przetwórstwie mięsa. *Med. Weter.*, 2009, **65** (11), 735-738.
- [6] Chen M. F.: The mediating role of subjective health complaints on willingness to use selected functional foods. *Food Qual. Prefer.*, 2011, **22** (1), 110-118.
- [7] De Vuyst L., G. Falony G., Leroy F.: Probiotic in fermented sausages. *Meat Sci.*, 2008, **80** (1), 75-78.
- [8] Dolatowski Z. J., Kołożyn-Krajewska D.: Bakterie probiotyczne w produktach mięsnych. *Przem. Spoż.*, 2010, **3** (64), 21-25.

- [9] Ganzle M.G., Hertel C., Vossen J.M., Hammes W.P.: Effect of bacteriocin producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **48** (10), 21-35.
- [10] Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report a Joint FAO/WHO Working Group, 2002.
- [11] Heller K.J.: Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, **73** (2), 374-379.
- [12] Hugas M., Monfort J.M.: Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chem.*, 1997, **59** (4), 547-554.
- [13] Jaworska D., Neffe K., Kolożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.: Survival during storage and sensory effect of potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus* Bauer and *Lactobacillus casei* Bif3^{IV} in dry fermented pork loins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2011, **46** (12), 2491-2497.
- [14] Klingberg T.D., Budde B.B.: The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **109** (1-2), 157-159.
- [15] Kolożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J.: Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochem.*, 2012, **47** (12), 1761-1772.
- [16] Libudzisz Z.: Bakterie fermentacji mlekowej. W: Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności.* Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2008, ss. 25 -58.
- [17] Neffe K., Kolożyn-Krajewska D.: Możliwości zastosowania bakterii probiotycznych w dojrzewających produktach mięsnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **5** (72), 167-177.
- [18] Nowak A., Ślizewska K., Libudzisz Z.: Probiotyki – historia i mechanizmy działania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **4** (71), 5-19.
- [19] PN-EN ISO 8586-2:2008. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania oceniających. Część 2: Eksperti oceny sensorycznej.
- [20] Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T.: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 2000, **84** (3), 197-215.
- [21] Työppönen S, Petäjä E., Mattila-Sandholm T.: Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **83** (3), 233-244.
- [22] Wójciak K., Dolatowski Z. J., Okoń A.: The effect of probiotic strains on oxidative stability of cured pork meat products. *Fleischwirtschaft*, 2012, **1**, 100-104.
- [23] Zhang W., Xiao S., Samaraweera H., Lee E.J., Ahn D.U.: Improving functional value of meat products. *Meat Sci.*, 2010, **6** (1), 15-31.
- [24] Ziarno M., Zaręba D.: Charakterystyka komercyjnych kultur startowych stosowanych w przetwórstwie mięsa. *Med. Weter.*, 2008, **64** (9), 1078-1082.

SURVIVAL OF BACTERIA WITH PROBIOTIC PROPERTIES IN DRY FERMENTED SAUSAGES DURING REFRIGERATED STORAGE

S u m m a r y

The objective of the study was to determine the growth and survival of three probiotic bacteria strains during long-term refrigerated storage and to assess the impact of those bacteria on the sensory quality of dry fermented pork sausages. Three variants of sausages were prepared, each type with a different strain of milk fermentation bacteria. There were applied: a *Lactobacillus casei* LOCK 0900 probiotic strain and two potentially probiotic strains: *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 (Chr. Hansen) and *Lactobacillus acidophilus* Bauer. the scope of the research experiment, it was planned to analyze three types of sau-

sage samples, each type with one of the three probiotic strains added: *Lactobacillus casei* LOCK 0900 (Patent Claim No P-382760), *Bifidobacterium animalis subsp.* Bb-12 (Chr. Hansen), and *Lactobacillus acidophilus* Bauer. The sausages stored for 230 days at a temperature between 4 and 6 °C were microbiologically and sensory analyzed. The count of lactic acid bacteria (LAB) was determined immediately after the fermentation and 30, 60, 90, 150, 180, and 230 days thereafter. The sensory quality was performed using a method of Quantitative Descriptive Analysis (QDA).

The count of lactic acid bacteria in the sausages studied was between 10^8 and 10^9 CFU/g. The samples of sausages with the added strains of *Lb. casei* LOCK 0900 and *B. animalis ssp. lactis* Bb-12, after fermentation and after the 230 day-storage period were characterized by a high count of lactic acid bacteria. On the 90th day, a significant decrease (by 3 logarithmic orders) was reported in the count of those bacteria in the case of the sausages with the *Lb. acidophilus* Bauer strain added. The survival rate of those bacteria in the sausages depended on the storage time. The sausages analyzed were characterized by a high sensory quality over the entire period of storage. After the 230-day storage, in all the samples analyzed, the count of lactic acid bacteria was above 10^6 CFU/g; this confirms the usefulness of those bacteria in technological processes and long-term storage. The *Lb. acidophilus* Bauer strain was characterized by the lowest survival rate during storage while the survival rates of the two other strains was similar and remained at a level 10^8 CFU/g of sausage.

Key words: probiotics, dry fermented sausages, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, storage, survival ☒

EWA JABŁOŃSKA-RYŚ, WALDEMAR GUSTAW, AGNIESZKA LATOCH

OCENA PRZYDATNOŚCI TECHNOLOGICZNEJ WYBRANYCH ODMIAN JABŁEK POD WZGLĘDEM POTENCJAŁU BRĄZOWIENIA

Streszczenie

Celem pracy była ocena przydatności do przetwórstwa wybranych odmian jabłek deserowych pod względem potencjału brązowienia. Materiałem do badań było 8 popularnych na rynku krajowym odmian jabłek: 'Alwa', 'Boskoop', 'Cortland', 'Golden Delicious', 'Jonagold', 'Ligol', 'Lobo' oraz 'Szampion'. Potencjał brązowienia określano za pomocą różnic parametrów barwy miąższu jabłek (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^*) oraz zmian absorpcji ekstraktu miąższu jabłek (ΔA_{440}) w czasie. Badania wykazały duże zróżnicowanie odmianowe pod względem potencjału brązowienia. Skłonność do ciemnienia związana jest z zawartością polifenoli, ale bardziej uzależniona jest od zawartości kwasu askorbinowego w miąższu owoców. Najmniejszym potencjałem brązowienia charakteryzowały się owoce odmiany 'Szampion'. W próbkach owoców tej odmiany różnice poszczególnych parametrów barwy po 24 h przechowywania były najmniejsze ($\Delta L^* = 1,9$; $\Delta a^* = 1,5$; $\Delta b^* = 2,5$; $\Delta E^* = 3,5$), a zmiana absorpcji ekstraktu miąższu jabłek była minimalna. Uznano więc, że owoce tej odmiany mogą być zalecane do produkcji soków naturalnie mętnych oraz produktów przecierowych bez konieczności stosowania w procesie technologicznym dodatku kwasu askorbinowego.

Słowa kluczowe: jabłka, sok naturalnie mętny, przecier, potencjał brązowienia

Wprowadzenie

Część jabłek deserowych kierowana jest do przetwórstwa z uwagi na ich niską jakość. Szacuje się, że 30 - 35 % jabłek deserowych jest wysokiej jakości, 30 - 40 % średniej i 30 - 35 % niskiej [11]. Głównym kierunkiem przetwarzania jabłek jest produkcja klarownego soku i koncentratu. Wraz ze wzrostem świadomości konsumentów w zakresie walorów prozdrowotnych soków naturalnie mętnych i przecierowych wzrasta zainteresowanie tymi produktami. Soki te, w porównaniu z sokami klarownymi,

Dr inż. E. Jabłońska-Ryś, dr hab. inż. W. Gustaw, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, dr inż. A. Latoch, Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin. Kontakt: ewa.jablonska-rys@up.lublin.pl

w znacznie większym stopniu zapewniają zachowanie cennych składników jabłek, jakimi są substancje polifenolowe [13, 16].

Istotnym problemem w produkcji soków naturalnie mętnych, przecierów i kremogenów jest niekorzystna zmiana ich barwy, związana z ciemnieniem enzymatycznym, czyli utlenianiem związków polifenolowych. Aby uzyskać produkt o wysokiej jakości, zarówno pod względem składu chemicznego (zachowanie związków polifenolowych), jak i barwy, często stosuje się dodatek kwasu askorbinowego do miazgi [8]. Ważne jest również skrócenie czasu trwania procesu technologicznego do niezbędnego minimum oraz ograniczenie kontaktu rozdrobnionego surowca z tlenem atmosferycznym. Nie bez znaczenia jest też czynnik odmianowy, czyli skłonność danej odmiany jabłek do ciemnienia, określane też mianem potencjału brązowienia.

Obecnie na rynku pojawiają się oferty soków owocowych niewzbogacanych w żadne substancje dodatkowe, w tym nawet w kwas askorbinowy. Wysoka jakość takich soków jest uwarunkowana nie tylko prawidłowym przebiegiem procesu technologicznego, ale przede wszystkim odpowiednim doбором surowca.

Do określania potencjału brązowienia mogą być stosowane różne metody. Najprostszą jest metoda wizualna, w której stopień ciemnienia próbki jest oceniany wzrokowo wg skali 3-stopniowej [5] lub 5-stopniowej [3]. Szersze zastosowanie mają metody instrumentalne, pozwalające określić różnicę poszczególnych parametrów barwy: ΔE^* , ΔL^* , Δa^* , Δb^* oraz pomiary zmian absorbancji klarownego ekstraktu z badanej próbki przy określonej długości fali. W pomiarach najczęściej stosuje się $\lambda = 440$ nm [1, 3, 4, 10], nieliczne badania przeprowadzano przy długości fali od 320 do 400 nm [12, 17].

Celem pracy była ocena przydatności do przetwórczego zagospodarowania wybranych odmian jabłek deserowych, uwzględniająca potencjał brązowienia.

Material i metody badań

Material do badań stanowiło 8 popularnych odmian jabłek deserowych: 'Alwa', 'Boskoop', 'Cortland', 'Golden Delicious', 'Jonagold', 'Ligol', 'Lobo' oraz 'Szampion'. Jabłka pochodziły z prywatnego gospodarstwa sadowniczego, położonego w województwie lubelskim.

Potencjał brązowienia określano za pomocą różnic poszczególnych parametrów barwy miąższu jabłek (ΔE^* , ΔL^* , Δa^* , Δb^*) oraz absorbancji ekstraktu miąższu jabłek (ΔA_{440}) w czasie. Dodatkowo wykonano analizę zawartości związków polifenolowych metodą Folina-Ciocalteu'a oraz kwasu askorbinowego.

Do pomiaru parametrów barwy pobierano po 3 owoce z każdej odmiany. Jabłka przecinano wzdłuż z boku gniazda nasiennego, odsłaniając powierzchnię miąższu o średnicy około 5 cm. Mierzono barwę miąższu bezpośrednio po przecięciu owoców oraz po 0,5, 2,0, 3,5 i 24 h. Barwę mierzono metodą odbiciową przy użyciu koloryme-

tru sferycznego 8200 Series firmy X-Rite. Pomiaru prowadzono przy użyciu źródła światła D65 i standardowego obserwatora kolorymetrycznego o polu widzenia 10°. Kolorymetr kalibrowano w odniesieniu do wzorca bieli. Wyniki wyrażano w systemie CIE L*a*b*, gdzie L* określa jasność barwy, a* – składową barwy w zakresie czerwono-zielonym i b* – w zakresie żółto-niebieskim. Różnicę parametrów barwy, wyrażaną jako ΔL^* , Δa^* , Δb^* , obliczano po 24 h przechowywania w temp. 20 ± 2 °C. Bez-względną różnicę barwy (ΔE^*) wyliczano z równania [19]:

$$E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Oznaczenia wykonywano w 15 powtórzeniach każdej z odmian jabłek.

Oznaczanie potencjału brązowienia wykonywano w wodnych ekstraktach [3] z miąższu 3 owoców każdej z odmian. W tym celu 50 g miąższu z jabłek bez skórek i gniazd nasiennych homogenizowano przez 1 min z 50 g wody destylowanej i kwasem askorbinowym (1 %), jako inhibitorem brązowienia [20]. Ekstrakty otrzymywano również poprzez dodatek wody po upływie 0,5 i 2 h do przechowywanego w temp. 20 ± 2 °C zhomogenizowanego miąższu (bez dodatku kwasu askorbinowego). Otrzymane homogenizaty wirowano przez 5 min w temp. 4 °C przy 1500 obr., następnie do 2 ml supernatantu dodawano 4 ml 96-procentowego etanolu. Po wymieszaniu próbki zostawiano na 15 min w celu depektynizacji i wirowano ponownie w warunkach jak wyżej. Za pomocą spektrofotometru Helios UV Visible w ekstraktach mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 440$ nm. Oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach każdej z odmian jabłek.

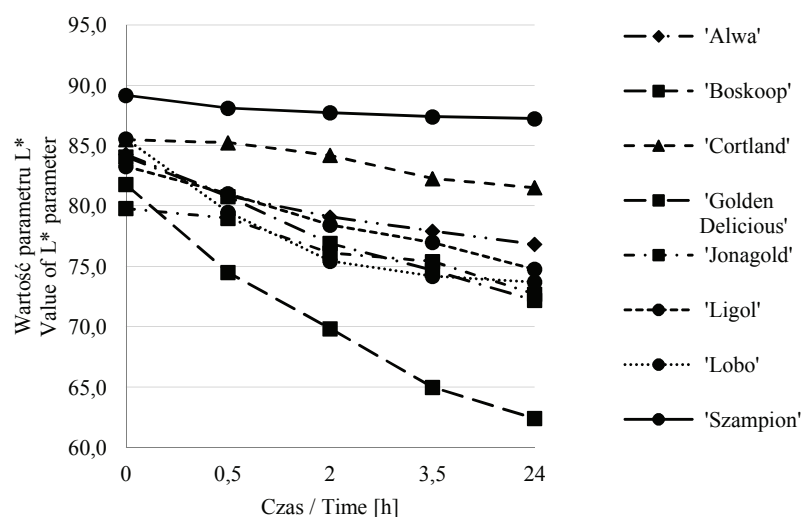
Do oznaczenia zawartości polifenoli odważano 50 g miąższu z trzech owoców każdej z odmian, bez skórek i gniazd nasiennych, homogenizowano przez 1 min z 50 g mieszaniny aceton : woda (70 : 30, m/m). Zarówno jabłka, jak i mieszaniny do ekstrakcji, były chłodzone do temp. około 4 °C w celu zahamowania reakcji utleniania [22]. Homogenizat wirowano przez 5 min w temp. 4 °C przy 1500 obr. Zawartość związków fenolowych w supernatancie oznaczano wg metody opisanej przez Khanizadeha i wsp. [7]. Wyniki podawano w mg/kg świeżego miąższu, w przeliczeniu na kwas galusowy.

Oznaczenie zawartości kwasu askorbinowego wykonywano metodą miareczkową zgodnie z PN-A-04019:1998 [15].

Analizy chemiczne wykonano w trzech powtórzeniach, wyniki opracowano statystycznie testem Tukeya na poziomie istotności $p < 0,05$, przy użyciu programu Statistica 9. Przy określaniu istotności współczynników korelacji przyjęto następującą skalę: $r = 0$ – brak korelacji, $0 < r < 0,1$ – korelacja nikła, $0,1 \leq r < 0,3$ – korelacja słaba, $0,3 \leq r < 0,5$ – korelacja przeciętna, $0,5 \leq r < 0,7$ – korelacja wysoka, $0,7 \leq r < 0,9$ – korelacja bardzo wysoka, $0,9 \leq r < 1$ – korelacja prawie pełna [18].

Wyniki i dyskusja

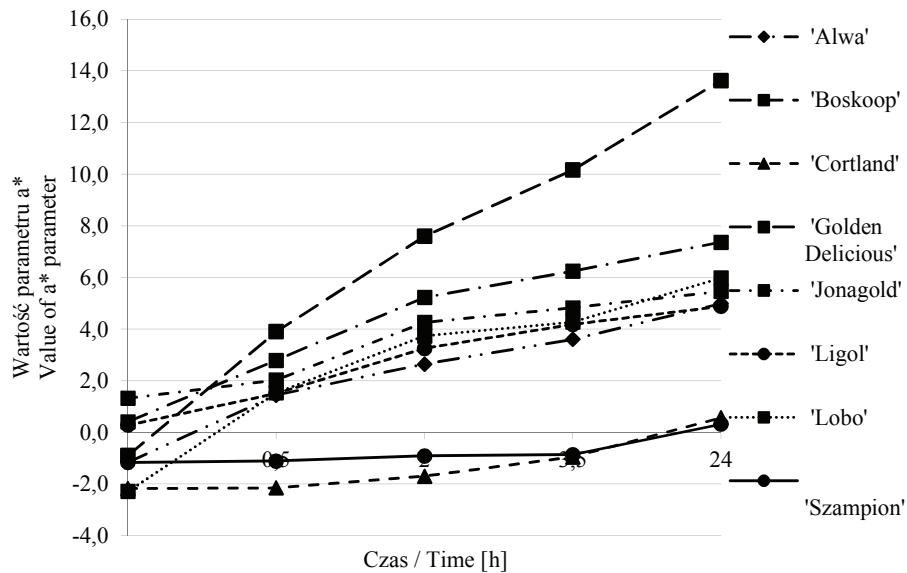
Badane odmiany jabłek charakteryzowały się zróżnicowaną jasnością świeżego miąższu. Najwyższą wartość parametru L^* stwierdzono w próbkach odmiany ‘Szampion’ (89,2), najniższą – w jabłkach ‘Jonagold’ (79,8). Zmiany parametru L^* w czasie przechowywania próbek w temp. 20 ± 2 °C przedstawiono na rys. 1. Wartość tego parametru, mierzona po 24 h, mieściła się w zakresie od 62,4 (‘Boskoop’) do 87,2 (‘Szampion’). Najmniejsze skłonności do ciemnienia, wyrażone jako ΔL^* , stwierdzono w odmianach ‘Szampion’ oraz ‘Cortland’, odpowiednio: 1,9 i 4,0, zaś największą różnicę jasności (19,4) zaobserwowano w próbkach odmiany ‘Boskoop’ (tab. 1).



Rys. 1. Zmiany wartości parametru L^* miąższu jabłek w ciągu 24-godzinnego przechowywania.

Fig. 1. Changes in value of L^* parameter of apple flesh during 24 h storage.

Wartości parametru a^* świeżego miąższu jabłek, określające barwę w zakresie czerwono-zielonym, wykazały również duży rozrzut w zależności od odmiany owoców (rys. 2). Wartości ujemne świadczą o udziale barwy zielonej w miąższu jabłek, a na poziomie 10 – świadczą o znacznym zbrunatnieniu [2]. Początkowo zawierały się one w zakresie od -2,3 (‘Lobo’) do 1,3 (‘Jonagold’). Miąższ stopniowo ciemniał, a procesowi temu towarzyszył wzrost wartości parametru a^* , który po 24 h wynosił od 0,3 (‘Szampion’) do 13,6 (‘Boskoop’). Najmniejsze skłonności do ciemnienia, wyrażone jako Δa^* , stwierdzono w jabłkach ‘Szampion’ oraz ‘Cortland’, odpowiednio: 1,8 i 2,7, zaś największą różnicę parametru a^* (14,5) zaobserwowano w próbkach odmiany ‘Boskoop’ (tab. 1).



Rys. 2. Zmiany wartości parametru a* miąższu jabłek w ciągu 24-godzinnego przechowywania.
Fig. 2. Changes in value of a* parameter of apple flesh during 24 h storage.

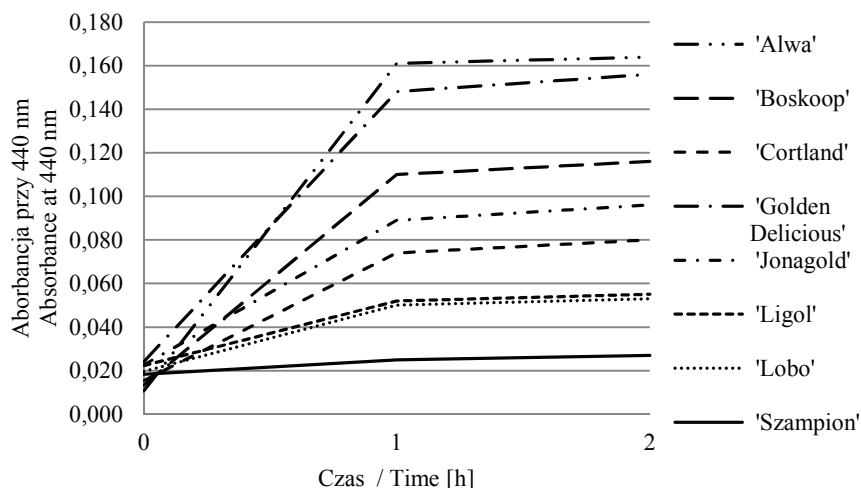
Tabela 1. Różnice parametrów barwy miąższu jabłek po 24 h przechowywania.
Table 1. Differences in colour parameters of apple flesh after 24 h of storage.

Odmiana jabłek Apple variety	Δa^*	Δb^*	ΔL^*	ΔE^*
'Alwa'	6,2	18,4	7,5	20,8
'Boskoop'	14,5	11,3	19,4	26,7
'Cortland'	2,7	9,9	4,0	11,0
'Golden Delicious'	7,0	8,5	11,9	16,2
'Jonagold'	4,1	5,9	7,1	10,1
'Ligol'	4,6	9,2	8,5	13,4
'Lobo'	8,3	13,1	11,9	19,5
'Szampion'	1,5	2,5	1,9	3,5

Bezwzględna różnica barwy, wyrażana jako ΔE^* , przyjmowała różne wartości w zależności od odmiany jabłek (tab. 1). Podobnie, jak w przypadku analizy parametrów ΔL^* i Δa^* , najmniejsze zmiany barwy nastąpiły w próbkach miąższu odmiany 'Szampion'. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Zarembę i wsp. [23] oraz Biller i wsp. [2], którzy oceniali zmiany poszczególnych wyróżników barwy jabłek

podczas ich suszenia. Spośród trzech analizowanych odmian jabłek 'Szampion' wykazywał najmniejszą tendencję do ciemnienia.

Inne tendencje odmianowe zauważono po oznaczeniu potencjału brązowienia jako zmiany absorbancji ekstraktów miąższu. Początkowo wartości nie były zróżnicowane i wynosiły od 0,011 ('Alwa') do 0,024 ('Golden Delicious'). Stosując tę metodę potwierdzono, że najmniejszym potencjałem brązowienia charakteryzowały się owoce odmiany 'Szampion', w przypadku których zmiana absorbancji była minimalna. W przypadku pozostałych odmian obserwowano wzrost absorbancji po 0,5 h, największy w jabłkach 'Alwa' oraz 'Golden Delicious', a następnie stabilizację jej wartości (rys. 3). Miąższ jabłek odmiany 'Boskoop' wykazywał przeciętny potencjał brązowienia, pomimo uzyskania w próbkach tej odmiany największych wartości parametrów ΔE^* , ΔL^* i Δa^* (tab. 1).



Rys. 3. Zmiany absorbancji ekstraktów miąższu jabłek przy długości fali $\lambda = 440$ nm.

Fig. 3. Changes in absorbance of apple flesh extracts at $\lambda = 440$ nm.

Skłonność do ciemnienia miąższu jabłek jest związana ze składem chemicznym, głównie z zawartością polifenoli oraz kwasu askorbinowego. Badane odmiany różniły się istotnie pod tym względem (tab. 2). Największą zawartość polifenoli ogółem oznaczono w miąższu jabłek 'Boskoop' i 'Alwa', odpowiednio: 554,5 i 505,5 mg/kg, najmniejszą w miąższu 'Lobo', 'Ligol' i 'Szampion', odpowiednio: 263,0, 272,2 oraz 306,8 mg/kg. Podobne wyniki dotyczące zawartości polifenoli w jabłkach różnych odmian uzyskali Kosmala i Kołodziejczyk [9] (od 258 do 631 mg/kg) oraz Khanizadeh i wsp. [7] (od 228 do 522 mg/kg). Znacznie większe ilości podają Vrhovsek i wsp. [22] (od 662 do 2119 mg/kg). Należy jednak nadmienić, że dane te odnoszą się do całych

jabłek, a nie jedynie do frakcji miąższu [22]. Najwięcej tych związków znajduje się bowiem w skórce [21].

Tabela 2. Zawartość polifenoli oraz kwasu askorbinowego w miąższu badanych odmian jabłek (wartość średnia \pm odchylenie standardowe).

Table 2. Content of polyphenols and ascorbic acid in flesh of analyzed apple varieties (mean value \pm standard deviation).

Odmiana jabłek Apple variety	Zawartość badanych związków / Content of compounds analyzed	
	Polifenole / Polyphenols [mg/kg]	Kwas askorbinowy Ascorbic acid [mg/100 g]
'Alwa'	505,5 ^d \pm 16,9	8,8 ^b \pm 0,5
'Boskoop'	554,5 ^d \pm 28,5	6,0 ^a \pm 0,9
'Cortland'	397,6 ^c \pm 20,1	11,9 ^d \pm 0,9
'Golden Delicious'	350,6 ^{b,c} \pm 15,0	9,4 ^{b,c} \pm 0,9
'Jonagold'	359,7 ^{b,c} \pm 26,3	10,8 ^{c,d} \pm 0,5
'Ligol'	272,2 ^a \pm 25,9	10,5 ^{b,c,d} \pm 0,5
'Lobo'	263,0 ^a \pm 22,2	6,5 ^a \pm 0,5
'Szampion'	306,8 ^{a,b} \pm 11,1	14,5 ^e \pm 0,9
\bar{x}	376,2	9,8

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values denoted by different letters in the columns differ statistically significantly ($p \leq 0,05$).

Odmiany jabłek o największej zawartości polifenoli w miąższu charakteryzowały się jednocześnie największą całkowitą różnicą barwy (ΔE^*). Współczynniki korelacji pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a wartością parametrów określających potencjał brązowienia były najwyższe w przypadku ΔA_{440} oraz ΔE^* i wynosiły odpowiednio: 0,747 i 0,608 (tab. 3).

Jabłka nie należą do owoców zasobnych w witaminę C. Planchon i wsp. [14] podają, że w zależności od odmiany owoce te zawierają od 8,7 do 24 mg kwasu askorbinowego w 100 g, przy czym ilości te maleją w trakcie przechowywania nawet pięciokrotnie [6]. Kwas askorbinowy jest jednym z czynników hamujących przemiany oksydacyjne związków polifenolowych, decydującym o barwie soków jabłkowych naturalnie mętnych. W procesie technologicznym zaleca się stosowanie dodatku kwasu askorbinowego w celu stabilizacji barwy w ilościach nieprzekraczających 250 mg/kg surowca [13]. W przeprowadzonym doświadczeniu największą zawartość kwasu askorbinowego (14,5 mg/100 g) stwierdzono w próbkach miąższu jabłek 'Szampion', zaś najmniejszą – w próbkach odmian 'Boskoop' i 'Lobo', odpowiednio: 6,0 i 6,5 mg/100 g (tab. 2).

Tabela 3. Współczynniki korelacji między zawartością polifenoli i kwasu askorbinowego w miąższu jabłek a parametrami określającymi potencjał brązowienia.

Table 3. Coefficients of correlation between content of polyphenols and ascorbic acid in apple flesh, and parameters to define browning potential.

Potencjał brązowienia wyrażony jako: Browning potential expressed as:	Polifenole Polyphenols	Kwas askorbinowy Ascorbic acid
ΔA_{440}	0,747*	- 0,451
ΔE^*	0,608	- 0,949*
ΔL^*	0,427	- 0,896*
Δa^*	0,559	- 0,904*
Δb^*	0,476	- 0,676

Objaśnienia: / Explanatory notes:

(*) – współczynniki korelacji statystycznie istotne na poziomie $p < 0,05$ / Statistically significant coefficients of correlation at $p < 0.05$.

Wykazano bardzo wysoką ujemną korelację pomiędzy zawartością kwasu askorbinowego w miąższu jabłek a potencjałem brązowienia, głównie wyrażanym jako parametr ΔE^* , ΔL^* oraz Δa^* (tab. 3). Może to dowodzić, że nawet mała rodzima zawartość kwasu askorbinowego w miąższu jabłek ma istotny wpływ na stabilizację barwy uzyskanego z nich soku.

Wnioski

1. Jabłka cechuje duże zróżnicowanie pod względem potencjału brązowienia w zależności od odmiany, co może determinować kierunek ich zagospodarowania przetwórczego.
2. Potencjał brązowienia jest dodatnio skorelowany z zawartością polifenoli ogółem, jednak większe współczynniki korelacji (lecz o ujemnym kierunku) zaobserwowano w odniesieniu do zależności zawartości kwasu askorbinowego w miąższu owoców i parametrów ΔE^* , ΔL^* oraz Δa^* .
3. Spośród analizowanych odmian jabłek deserowych najmniejszym potencjałem brązowienia charakteryzowały się owoce odmiany 'Szampion'. Z tego względu mogą być one zalecane do produkcji soków naturalnie mętnych czy produktów przecierowych.

Literatura

- [1] Arias E., Gonzales J., Lopez-Buesa P., Oria R.: Optimization of processing of fresh-cut pear. J. Sci. Food Agric., 2008, **88**, 1755-1763.


- [2] Biller E., Zaremba R., Ekielski A.: Zmienność poszczególnych wyróżników barwy w czasie przebiegu procesu suszenia jabłek, w zależności od zastosowanej metody blanszowania. *Inż. Rol.*, 2007, **5 (93)**, 31-36.
- [3] Brandelli A., Lopes C.H.G.L.: Polyphenoloxidase activity, browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening. *J. Food Biochem.*, 2005, **29**, 624-637.
- [4] Chiabrando V., Giacalone G.: Effect of antibrowning agents on color and related enzymes in fresh-cut apples during cold storage. *J. Food Process. Preserv.*, 2012, **36 (2)**, 133-140.
- [5] DeEll J., Toivonen P., Khanizadeh S., Hampson C.: Browning potential of new apple varieties. *Acta Hort.*, 2009, **814**, 529-532.
- [6] Felicetti E., Mattheis J.P.: Quantification and histochemical localization of ascorbic acid in 'Delicious', 'Golden Delicious' and 'Fuji' apple fruit during on-tree development and cold storage. *Postharvest Biol. Technol.*, 2010, **56**, 56-63.
- [7] Khanizadeh S., Tsao R., Rekika D., Yang R., Charles M.T., Rupasinghe V.H.P.: Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Comp. Anal.*, 2008, **21**, 396-401.
- [8] Kopera M., Mitek M.: Wpływ dodatku kwasu L-askorbinowego do miazgi owocowej na zawartość polifenoli w sokach gruszkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2 (47)**, 116-123.
- [9] Kosmala M., Kołodziejczyk K.: Procyjanidyny najpopularniejszych w Polsce deserowych odmian jabłek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2 (47)**, 124-134.
- [10] Kuczyński A.P., Varoquaux P., Souty M.: Reflectance spectra of „ready-to-use” apple products for determination of enzymatic browning. *Int. Agrophysics*, 1993, **7**, 85-92.
- [11] Makosz E.: Wielkość zbiorów, potrzeby i opłacalność produkcji jabłek, gruszek, wiśni i czereśni. *Mat. XXXI Międzyn. Seminarium Sadowniczego, Limanowa*, 4-5 III 2011.
- [12] Murata M., Haruta M., Murai N., Tanikawa N., Nishimura M., Homma S., Itoh Y.: Transgenic apple (*Malus domestica*) shoot showing low browning potential. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 5243-5248.
- [13] Oszmiański J., Wojdyło A.: Soki naturalnie mętne – dobry kierunek w przetwórstwie jabłek. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2006, **2**, 20-22.
- [14] Planchon V., Lateur M., Dupont P., Lognay G.: Ascorbic acid level of Belgian apple genetic resources. *Sci. Hort.*, 2004, **100**, 51-61.
- [15] PN-A-04019:1998. Produkty spożywcze. Oznaczanie zawartości witaminy C.
- [16] Rembiałkowska E., Hallmann E., Adamczyk M., Lipowski J., Jasińska U., Owczarek L.: Wpływ procesów technologicznych na zawartość polifenoli ogółem oraz na potencjał przeciwutleniający przetworów (soku i kremogenu) uzyskanych z jabłek pochodzących z produkcji ekologicznej i konwencjonalnej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **1 (46)**, 121-126.
- [17] Rząca M., Witrowa-Rajchert D.: Wpływ techniki suszenia na właściwości optyczne suszu jabłkowego. *Acta Agroph.*, 2007, **10 (2)**, 445-453.
- [18] Stanisław A.: Podstawy statystyki dla prowadzących badania naukowe. Odcinek 21: Analiza korelacji. *Med. Prakt.*, 2000, **10**, 176-181.
- [19] Tsurutani M., Murata M., Homma S.: Comparison of enzymatic browning of Japanese pear and apple. *Food Sci. Technol. Res.*, 2000, **6 (4)**, 344-347.
- [20] Valentines M.C., Vilaplana R., Torres R., Usall J., Larrigaudiere C.: Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharv. Biol. Technol.*, 2005, **36**, 227-234.
- [21] Vieira F.G.K., Borges G.S.C., Copetti C., Gonzaga L.V., Nunes E.C., Fett R.: Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 2009, **59 (1)**, 101-106.
- [22] Vrhovsek U., Rigo A., Tonon D., Mattivi F.: Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 6532-6538.

- [23] Zaremba R., Biller E., Ekielski A.: Zmiany barwy jabłek w czasie przebiegu procesu suszenia konwekcyjnego. *Inż. Rol.*, 2007, **5 (93)**, 429-435.

ASSESSING TECHNOLOGICAL USEFULNESS OF SELECTED APPLES VARIETIES IN TERMS OF BROWNING POTENTIAL

Summary

The objective of the research study was to assess the processing usefulness of selected varieties of dessert apples in terms of browning potential. The research material constituted 8 varieties of apples that were popular in the home market: 'Alwa', 'Boskoop', 'Cortland', 'Golden Delicious', 'Jonagold', 'Ligol', 'Lobo', and 'Szampion'. The browning potential was determined based on the changes in colour parameters of the apple flesh (ΔE^* , ΔL^* , Δa^* , Δb^*) and the changes in absorbance of the apple flesh extract (ΔA_{440}) over time. The research showed high varietal differences in terms of the browning potential. The tendency to darken is connected with the content of polyphenols; however, it depends much more on the content of ascorbic acid in the flesh of fruits. The fruits of the 'Szampion' variety were characterized by the smallest browning potential. In the samples of this variety, the differences in the individual colour parameters after 24 h of storage were the lowest ($\Delta L^* = 1.9$; $\Delta a^* = 1.5$; $\Delta b^* = 2.5$; $\Delta E^* = 3.5$) and the change in the absorbance of apple flesh extract was minimal. Therefore, it was concluded that the fruits of this particular variety could be recommended to manufacture naturally cloudy juices and apple pulp products and adding ascorbic acid to the technological process would be not necessary.

Key words: apples, naturally cloudy juice, puree, browning potential 

PAULINA NOWICKA, MIROŚLAWA TELESZKO, ANETA WOJDYŁO,
JAN OSZMIAŃSKI

OCENA WALORÓW SENSORYCZNYCH I WARTOŚCI ŻYWIENIOWEJ PRZECIERU ARONIOWEGO Z DODATKIEM WYTŁOKÓW Z LNU I SUSZONYCH LIŚCI STEWII

Streszczenie

Celem pracy była ocena konsumencka przecierów aroniowych, w których skorygowano smak cierpki za pomocą wyłoków z lnu i suszonych liści stewii. Produktem najbardziej akceptowanym przez zespół oceniający był przecier zawierający 470 g aronii z dodatkiem 30 g wyłoków z lnu i 0,3 g stewii (nota ogólna 6,7). Dodatkowo wyznaczono wartości Indeksów Glikemicznych (IG) 100-procentowego przecieru aroniowego oraz najbardziej akceptowanego przecieru z dodatkiem lnu i stewii, aby ocenić walory zdrowotne proponowanego produktu. Wzorzec (IG = 100) stanowiła czysta glukoza. IG przecieru aroniowego osiągnął wartość średnią na poziomie 27,3, przecieru aroniowego z dodatkiem lnu i stewii – 20,3, a roztworu glukozy z dodatkiem lnu i stewii – 56,8.

Dowiedziano zatem, że dodatek lnu w znacznym stopniu może redukować cierpkość produktów aroniowych, a dodatek stewii nadaje produktom finalnym lekko słodki smak. Ponadto wykazano, że analizowane produkty mogą być stosowane w profilaktyce cukrzycy, ponieważ ich spożycie powoduje niewielki wzrost stężenia glukozy we krwi.

Słowa kluczowe: aronia, stewia, wyłoki z lnu, ocena sensoryczna, Indeks Glikemiczny

Wprowadzenie

Coraz większa świadomość konsumentów dotycząca zdrowego odżywiania wymaga projektowania i tworzenia nowych produktów spożywczych, atrakcyjnych zarówno pod względem cech sensorycznych, jak i wartości odżywczej. Nie zawsze bowiem połączenie korzystnie oddziałujących na zdrowie człowieka składników wiąże się ze spełnieniem oczekiwań potencjalnego nabywcy. Należy więc analizować żywność nie tylko pod względem składu chemicznego czy wartości zdrowotnej, ale także oceniać ją sensorycznie, aby poznać preferencje konsumentów.

Mgr inż. P. Nowicka, mgr inż. M. Teleszko, dr hab. inż. A. Wojdyło, prof. dr hab. J. Oszmiański, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław. Kontakt: paulina.nowicka@up.wroc.pl

Aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa* Eliot) to atrakcyjny surowiec zarówno przetwórczy, jak i prozdrowotny. Wykorzystuje się go do produkcji soków, syropów i dżemów, ale jego cierpki smak nie zawsze jest akceptowany przez konsumentów, pomimo znaczącej zawartości składników biologicznie aktywnych. Ciemnopurpurowe owoce aronii są bogatym źródłem polifenoli, a w szczególności antocyjanów i procyjanidyn, stąd też w badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazują silne działanie przeciwutleniające. Ponadto jagody te cechują się właściwościami przeciwmiażdżycowymi, przeciwzapalnymi i przeciwcukrzycowymi [12, 18, 22, 31].

Stevia rebaudiana jest wieloletnim krzewem należącym do rodziny astrowatych. Coraz częściej stosuje się ją jako substancję słodzącą. Słodki smak stewii wynika z obecności w jej składzie glikozydów diterpenowych, głównie stewiozydów, a także w mniejszych ilościach rebaudiozydów i stewiolbiozydów. Ekstrakty z tej rośliny, 300 razy słodsze od cukru, są niskokaloryczne. Dodatkowo mają niewielki wpływ na stężenie glukozy we krwi, przez co mogą być atrakcyjnym zamiennikiem cukru dla diabetyków [17, 21, 36].

Wytłoki z lnu (*Linum L.*), zwane inaczej mączką lnianą, są surowcem odpadowym, powstającym w wyniku tłoczenia oleju z nasion lnu. Zawierają one włókno pokarmowe oraz śluzy, wykazujące działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe oraz przeciwcukrzycowe [10].

Cukrzyca (*diabetes mellitus*) jest przewlekłą chorobą niezakaźną, wynikającą z zaburzeń wydzielania insuliny przez trzustkę. Niedobór tego hormonu w organizmie człowieka powoduje niemożność wykorzystania glukozy przez komórki organizmu, czego konsekwencją jest nadmierne stężenie glukozy we krwi, wydalanie glukozy wraz z moczem oraz niewłaściwy metabolizm węglowodanów, białek i tłuszczów. Wraz z wystąpieniem cukrzycy następują liczne zmiany w organizmie człowieka, związane m.in. ze zwiększeniem stresu oksydacyjnego czy z zaburzeniami metabolizmu [11, 14]. Liczne badania dowodzą jednak, że spożywanie owoców charakteryzujących się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym obniża poziom stężenia glukozy we krwi przez hamowanie aktywności α -glukozydazy jelitowej. Ponadto stymuluje ono wydzielanie insuliny i zmniejsza wchłanianie lipidów. Frakcje związków biologicznie aktywnych, np. aronii, chronią także przed uszkodzeniem komórek β , obniżają ciśnienie tętnicze krwi oraz stężenie cholesterolu i triacylogliceroli [16, 27, 30]. Spożycie owoców kształtuje również niską odpowiedź glikemiczną w organizmie człowieka. Odpowiedź tę definiuje wartość Indeksu Glikemicznego (IG), który określa zdolność węglowodanów zawartych w produkcie do podnoszenia stężenia glukozy we krwi. Kallergis i wsp. [20] dowodzą, że po spożyciu świeżych owoców wartość tego współczynnika jest niska bądź średnia, co jest równoznaczne z niewielkim wzrostem stężenia cukru w osoczu oraz ze znacznym ograniczeniem ilości wydzielanej insuliny. Spożywanie produktów o niskim IG sprzyja korzyściom prozdrowotnym, takim jak: możli-

wość regulowania glikemii poposiłkowej, zmniejszenie ryzyka wystąpienia cukrzycy, wysokiego cholesterolu oraz chorób serca. Dieta niskoglikemiczna pomaga również w zmniejszaniu masy ciała oraz w normowaniu apetytu i łaknienia, dlatego zalecana jest w leczeniu cukrzycy [5, 20].

Celem pracy była ocena stopnia pożądalności przecierów aroniowych, w których skorygowano smak cierpki za pomocą dodatku wyłoków z lnu i suszonych liści stewii. Ponadto wyznaczono Indeksy Glikemiczne (IG) wybranych kompozycji aroniowych.

Material i metody badań

Badania przeprowadzono w Zakładzie Technologii Owoców i Warzyw Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w okresie od października 2011 do stycznia 2012 roku. Materiał badawczy stanowiły: owoce aronii czarnoowocowej odmiany 'Galicyjanka' (Sady Trzebnica), suszone i odtłuszczone wyłoki lniane (Oleofarm, Pietrzykowice) oraz suszone liście stewii i glukoza zakupione w handlu detalicznym. W aronii oznaczano zawartość cukrów ogółem [32], a wynik tej analizy podano jako średnią z trzech powtórzeń nieróżniących się od siebie istotnie, uwzględniając odchylenie standardowe.

Do produkcji przecierów użyto składników w następujących proporcjach:

- P1 – 500 g aronii (próbka kontrolna),
- P2 – 460 g aronii, 0,2 g stewii, 40 g lnu,
- P3 – 465 g aronii, 0,2 g stewii, 35 g lnu,
- P4 – 470 g aronii, 0,2 g stewii, 30 g lnu,
- P5 – 460 g aronii, 0,3 g stewii, 40 g lnu,
- P6 – 465 g aronii, 0,3 g stewii, 35 g lnu,
- P7 – 470 g aronii, 0,3 g stewii, 30 g lnu.

Owoce aronii homogenizowano bez dodatku lub z dodatkiem wyłoków lnianych i suszonych liści stewii w urządzeniu Thermomix (Vorwerk, Niemcy), doprowadzając mieszaninę składników do temp. 100 °C. Gorący produkt rozlewano do szklanych słoiczek i pozostawiano do pasteryzacji (10 min), po czym schładzano do 20 °C.

Ocenę konsumencką przecierów aroniowych przeprowadzano z wykorzystaniem 9-stopniowej skali hedonicznej z oznaczeniami brzegowymi, tj. „bardzo nie lubię” (1) – „bardzo lubię” (9) [2]. Ocenie podlegały następujące wyróżniki jakościowe produktów: barwa, smak, zapach, konsystencja oraz struktura. Badania przeprowadziła grupa ośmiu osób w wieku: 22 - 60 lat, wybranych losowo spośród studentów i pracowników Katedry Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Zakodowane próbki podawano konsumentom do analizy w temp. ok. 20 °C w jednolitych, szklanych pojemnikach o pojemności 130 ml zgodnie z wytycznymi normy PN-ISO 6658:1998 [33]. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie tabelaryzowanej, podano wartości średnie oraz odchylenia standardowe.

Wartość IG 100-procentowego przecieru aroniowego, przecieru aroniowego z dodatkiem stewii i wyciągów z lnu oraz roztworu glukozy z dodatkiem stewii i wyciągów z lnu oznaczono według Brounsa i wsp. [6]. Zasada metody polega na pomiarze stężenia glukozy we krwi po spożyciu produktu, w którym znajduje się 25 g cukrów ogółem i porównanie wyniku ze standardem, czyli roztworem glukozy (25 g w 250 ml wody). Pomiarów glikemii dokonuje się kolejno po 15, 30, 45, 60, 90 i 120 min od rozpoczęcia spożywania produktu. W badaniu wzięło udział 6 osób, w wieku od 24 do 60 lat, które w chwili rozpoczęcia pomiarów były na czczo. Analizy przeprowadzono w godzinach porannych przez cztery kolejne dni.

Oznaczona zawartość cukrów ogółem w przecierze aroniowym (*total sugars in chokeberry* ($\bar{x} \pm s / SD$)) wyniosła $9,08 \pm 0,10$ %. W tab. 1 przedstawiono warianty produktów, w których oznaczono IG w kolejnych dniach.

Tabela 1. Produkty, w których oznaczono IG w kolejnych dniach.
Table 1. Products, in which IG was determined on subsequent days.

Warianty produktów w których oznaczono IG / Variants of products, in which IG was determined			
Dzień 1 roztwór glukozy (25,00 g glukozy + 250,00 ml wody) glucose solution (25,00 g glucose + 250,00 ml water)	Dzień 2 100-procentowy przecier aroniowy (275,30 g aronii) 100 % chokeberry puree (275,30 g chokeberry)	Dzień 3 przecier aroniowy z lnem i stewią (275,30 g aronii + 17,55 g lnu + 175,00 mg stewii) / chokeberry puree with flax and stevia (275,30 g chokeberry + 17,50 g flax + 175,00 mg stevia)	Dzień 4 roztwór glukozy z lnem i stewią (25,00 g glukozy + 17,50 g lnu + 175,00 mg stewii + 250,00 ml wody) glucose solution with flax and stevia (25,00 g glucose + 17,50 g flax + 175,00 mg stevia + 250,00 ml water)

Indeks Glikemiczny danego produktu obliczano jako wartość uśrednioną z indywidualnych pomiarów, według poniższego równania:

$$IG = (P_{k_p} / P_{k_g}) \cdot 100$$

gdzie: P_{k_p} – powierzchnia pierwotna pod krzywą, która powstała po spożyciu badanego produktu, P_{k_g} – powierzchnia pod krzywą sporządzoną po spożyciu glukozy.

Nakłucia w celu pobrania próbki krwi wykonywane były za pomocą nakłuwacza Accu-Chek Multiclix (Roche Diagnostics, Niemcy), który załadowany był bębenkami z sześcioma lancetami. Odczyt glikemii przeprowadzono z wykorzystaniem glukometru Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Niemcy), do którego wkładano pasek testowy z pobraną próbką krwi.

Obliczeń i analiz statystycznych dokonywano za pomocą programów: Microsoft Exel 2007 oraz Statistica 2012, w którym istotność różnic określano testem Duncana, na poziomie $p \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

W tab. 2. przedstawiono wyniki oceny konsumenckiej przecierów aroniowych z dodatkami stewii i wyłoków z lnu. Wartości IG wybranych przecierowych produktów aroniowych przedstawiono w tab. 3 i na rys. 1.

Tabela 2. Wyniki oceny konsumenckiej poszczególnych wariantów przecierów aroniowych.
Table 2. Results of consumer assessment of individual variants of chokeberry purees.

Wyróżnik jakościowy Qualitative characteristic	Przecieri/ Purees ($\bar{x} \pm s / SD$)						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Barwa / Colour	7,5 ^a ± 1,9	6,6 ^a ± 1,7	5,1 ^c ± 1,0	6,8 ^a ± 0,9	6,1 ^b ± 1,7	6,4 ^b ± 1,8	7,5 ^a ± 0,8
Zapach / Flavour	6,8 ^a ± 2,5	6,0 ^b ± 2,8	6,1 ^b ± 2,4	5,6 ^c ± 1,5	5,8 ^c ± 1,8	5,3 ^d ± 2,4	4,8 ^e ± 2,4
Smak / Taste	5,8 ^c ± 3,0	4,0 ^e ± 2,0	4,4 ^d ± 1,8	4,8 ^d ± 1,9	6,5 ^b ± 1,4	6,5 ^b ± 1,6	7,3 ^a ± 2,0
Konsystencja Consistency	4,3 ^e ± 2,4	6,1 ^c ± 1,7	3,8 ^f ± 2,7	5,9 ^d ± 1,8	6,3 ^c ± 1,5	6,6 ^b ± 1,6	7,4 ^a ± 1,2
Struktura / Structure	3,8 ^c ± 2,4	4,9 ^b ± 1,8	4,1 ^c ± 1,7	6,8 ^a ± 1,3	6,8 ^a ± 1,2	6,5 ^a ± 2,5	6,6 ^a ± 1,3
Ocena ogólna / Total	5,6 ^d ± 1,6	5,5 ^d ± 1,1	4,7 ^e ± 0,9	6,0 ^c ± 0,8	6,3 ^b ± 0,4	6,3 ^b ± 0,6	6,7 ^a ± 1,1

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} – wartość średnia / mean value; s / SD – odchylenie standardowe / standard deviation; $n = 8$

a - f – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie oznaczają różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) / mean values in columns and denoted by different letters differ statistically significantly at ($p < 0.05$).

Przetworami o najbardziej atrakcyjnej barwie w ocenie konsumenckiej były: 100-procentowy przecier aroniowy (P1) i przecier aroniowy z dodatkiem 30 g lnu i 0,3 g stewii (P7), którym przypisano ocenę ogólną równą 7,5. Większy dodatek wyłoków lnianych (35 i 40 g) niekorzystnie wpłynął na akceptację barwy analizowanych produktów, przy czym najniższą notą ogólną (5,1) oceniono przecier z dodatkiem 0,2 g suszonych liści stewii i 35 g wyłoków lnianych (P3). Prawdopodobnie wynika to z charakterystycznej ciemnozielonej barwy dodatku słodzącego, który w połączeniu z ciemnopurpurowym kolorem aronii nie był atrakcyjny w opinii konsumentów. Ocena barwy przetworów w dużym stopniu wpływa na pożądalność produktu przez konsumenta, ponieważ wizualna ocena produktu bardzo często decyduje o jego zakupie [26].

Przecier aroniowy bez dodatku stewii i lnu (P1) uzyskał najwyższe noty pod względem zapachu (6,8). Dodatkowo zaobserwowano, że produkty zawierające 0,2 g suszonych liści stewii oceniano wyżej aniżeli produkty ze zwiększonym dodatkiem

suszonych liści stewii (0,3 g). Zdaniem panelu sensorycznego najmniej atrakcyjnym zapachem charakteryzowała się próbka P7 (4,7). Wynika to prawdopodobnie z intensywnego i trawiastego aromatu suszonych liści stewii, który podany w większej dawce sprawiał, że w produkcie pojawiał się zapach obcy, nieakceptowany przez konsumentów. Przypuszczenia te potwierdzają badania prowadzone przez Łysoniewską i wsp. [26], którzy podają, że im większa intensywność i typowość zapachu surowca podstawowego, tym jakość sensoryczna oceniana jest wyżej. W momencie, gdy pojawiają się „obce” aromaty, produkt uważany jest za gorszy jakościowo [26, 34].

Smak 100-procentowego przecieru aroniowego (P1) został oceniony na poziomie 5,8 (3 – 9). Niższe oceny, od 4,0 do 4,8, przypisano przecierom z mniejszym dodatkiem suszonych liści stewii, natomiast za bardziej pożądane pod względem smaku konsumenci uznali produkty z 0,3-gramowym dodatkiem tych liści. W tych przetworach oceny kształtowały się na poziomie 6,5 w przypadku wariantu P5 i P6 oraz 7,3 w przecierze z dodatkiem 30 g wyłoków z lnu i 0,3 g stewii (P7). Pod względem smaku oceniający preferowali produkty przecierowe z większym dodatkiem stewii oraz najmniejszym przewidzianym recepturą dodatkiem wyłoków lnianych (30 g).

Stosunkowo niska ocena wzorcowego produktu przecierowego (P1) wynika z cierpkiego smaku i ściąającego wrażenia odczuwanego podczas spożywania owoców z aronii [3]. Jak podają Szajdek i wsp. [35], uczucie ściągania i trudności w przełykaniu owoców i produktów z aronii wynikają z interakcji tanin z białkami błony śluzowej i receptorami smakowymi języka. Stąd też charakterystyczna śluzowata zawiesina, jaka została utworzona w produktach z dodatkiem lnu, spowodowała zarówno złagodzenie cierpkości próbek, jak również wzrost ich lepkości, co przełożyło się bezpośrednio na lepsze oceny produktów finalnych. Powstanie lepkiego i śluzowatego produktu było możliwe dzięki zawartości w wyłokach lnu dużej ilości błonnika pokarmowego, a w szczególności frakcji lepkich, takich jak: śluzy, neutralne arabinoksyłany czy kwaśne ramnozy, zawierające polisacharydy o bardzo dużej lepkości [4, 19]. Substancje te, otaczając cząstki homogenizatu aroniowego, poprawiały strukturę samego produktu i ułatwiały jego przełykanie. Pomimo tego wyniki wskazują, że głównym determinantem decydującym o pożądalności produktu przecierowego był środek słodzący. Z przeprowadzonej analizy wynika, że 0,3-gramowy dodatek suszonych liści stewii znacznie zwiększył atrakcyjność produktu. Korzystny wpływ stewii na smak końcowego produktu potwierdzają Lemus-Mondaca i wsp. [24] oraz Caracostas i wsp. [8], którzy uważają, że słodki smak tej rośliny, pomimo nutki goryczy, bardzo dobrze komponuje się z wieloma produktami spożywczymi i jest w pełni akceptowany przez konsumentów. Ponadto substancja ta jest alternatywą dla cukru, przez co coraz powszechniej bywa stosowana na całym świecie [8, 24].

Oceniający uznali również za korzystny wpływ dodatku suszu lnianego na konsystencję i strukturę produktu. Wynika to ze zdolności wyłoków lnu do tworzenia pro-

duktu o zdecydowanie większej lepkości i śluzowatej konsystencji. W przypadku przetworów aroniowych powoduje to otrzymanie produktów delikatniejszych, o zachowanym smaku i aromacie.

Ogólna ocena konsumentencka potwierdziła założenia postawione w pracy, że dodatek lnu i stewii wpłynie korzystnie na smakowość produktu finalnego. Za najbardziej atrakcyjne przetwory aroniowe zostały uznane przecier z 0,3-gramową dawką stewii oraz najmniejszym dodatkiem wyłoków lnianych (30 g). Spośród tych przetworów najwyżej oceniono (6,7) produkt przecierowy oznaczony symbolem P7, który cechował się także najkorzystniejszymi: smakiem, barwą i konsystencją. To właśnie ten wariant, wybrano do dalszej części analiz, które polegały na wyznaczeniu IG przetworu aroniowego.

Oznaczenie zawartość cukrów ogółem w owocach aronii było niezbędne do prawidłowego oznaczenia IG, gdyż stanowiło to wartość wyjściową, względem której przeliczono właściwe dawki produktu poddawanego analizie. Obliczono, że przy zawartości 9,08 % cukrów ogółem ilością niezbędną do określenia IG w 100-procentowym przecierze aroniowym jest 275,3 g (w takiej naważce znajduje się 25 g cukrów ogółem). Następnie kolejne warianty produktów określono w odniesieniu do najwyżej ocenionego przez konsumentów przecieru aroniowego – P7 (470 g aronii, 30 g lnu i 0,3 g stewii). W ten sposób skomponowano produkt, w skład którego wchodziły: przecier aroniowy w ilości 275,3 g oraz proporcjonalnie przeliczony względem produktu P7 dodatek wyłoków lnu i suszonych liści stewii. Analogicznie przygotowano ostatni produkt z dodatkiem roztworu glukozy, który stanowił próbkę kontrolną, weryfikującą założenie doświadczenia, że dodatek lnu i stewii będzie zmniejszał wartość IG.

W tab. 3. przedstawiono wyniki pomiarów IG oraz średnie poziomy stężenia glukozy we krwi w poszczególnych okresach po spożyciu wybranych produktów. Graficzna prezentacja wyników przedstawiona na rys. 1. Pozwala ona na ocenę pola powierzchni pod każdą krzywą, a tym samym na obliczenie wartości badanego parametru.

Największy poziom stężenia glukozy we krwi występował po spożyciu roztworu czystej glukozy. Przyjęto go jako wzorzec (IG = 100), do którego porównywano pozostałe wyniki. Foster-Powell i wsp. [15] proponują przyjęcie za wzorzec białego pieczywa, ale jak twierdzą Brouns i wsp. [6], zmienność składu chemicznego białego pieczywa pochodzącego z różnych wypieków może powodować trudności w porównywaniu wyników różnych eksperymentów.

W badanych czterech wariantach najwyższy poziom glikemii był osiągany po 45 min od spożycia produktu. Po tym czasie zainicjowana została reakcja insulinowa, której zadaniem było obniżenie krzywej stężenia cukru w organizmie do poziomu wyjściowego [29]. W przypadku roztworu glukozy najwyższe stężenie cukru we krwi wy-

niosło 177,2 mg/ml krwi, po spożyciu 100-procentowego przecieru aroniowego maksymalna wartość kształtowała się na poziomie 113,5 mg/ml krwi, przecieru aroniowego z dodatkiem wyłoków lnu i liści stewii osiągnęła wartość 107,8 mg/ml, a w przypadku roztworu glukozy z dodatkiem wyłoków z lnu i liści stewii: 137,8 mg/ml krwi.

Tabela 3. Średnie stężenie glukozy we krwi badanych po spożyciu przetworów aroniowych oraz wartości IG tych przetworów.

Table 3. Mean level of glucose in blood of the examined after they consumed chokeberry products, and GI values of chokeberry products.

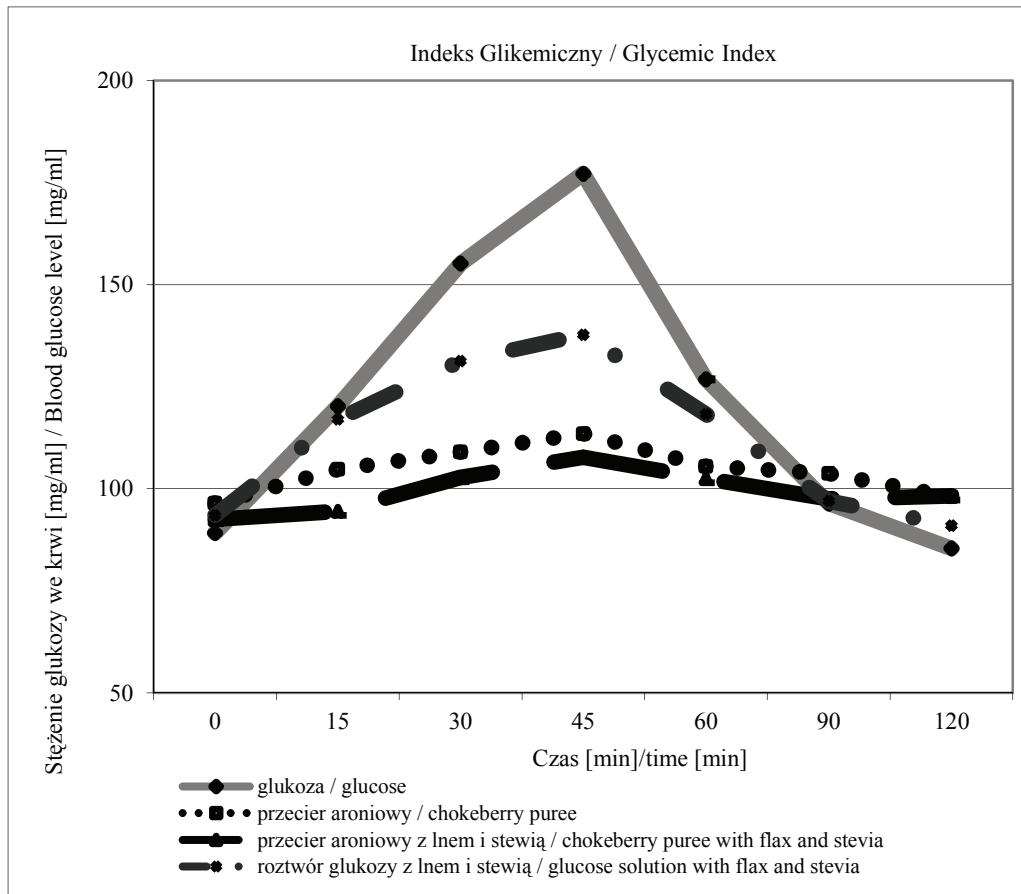
Czas [min] Time [min]	Próba / Sample ($\bar{x} \pm s / SD$)			
	Glukoza Glucose	Przecier aroniowy Chokeberry puree	Przecier aroniowy z lnem i stewią Chokeberry puree with flax and stevia	Roztwór glukozy z lnem i stewią Glucose solution with flax and stevia
0	89,2 ± 27,1	96,5 ± 14,2	92,5 ± 8,0	93,5 ± 5,3
15	120,2 ± 17,6	104,7 ± 13,1	94,5 ± 6,2	117,0 ± 11,9
30	155,2 ± 16,4	109,0 ± 14,9	102,8 ± 8,5	131,3 ± 22,3
45	177,2 ± 43,7	113,5 ± 13,4	107,8 ± 14,1	137,8 ± 22,7
60	126,8 ± 26,3	105,5 ± 9,1	102,5 ± 10,5	118,3 ± 18,2
90	96,4 ± 14,1	103,8 ± 10,1	97,5 ± 13,6	97,0 ± 15,2
120	85,4 ± 10,7	98,0 ± 9,7	98,3 ± 8,3	91,0 ± 8,2
Wartość IG GI values	100,0 ± 0,0	27,3 ± 2,8	20,3 ± 6,9	56,8 ± 18,1

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} - wartość średnia / mean value; s / SD- odchylenie standardowe / standard deviation; n = 6.

Krzywe sporządzone na podstawie otrzymanych wyników wskazują, że po spożyciu przecierów aroniowych oraz roztworu glukozy z dodatkiem lnu i stewii następowały łagodne i stopniowe zmiany glikemii. W przypadku roztworu glukozy widoczny był gwałtowny wzrost i spadek poziomu cukru. Jak podają Flint i wsp. [13], gwałtowne zmiany stężenia glukozy we krwi mogą przyczyniać się do częstego pojawiania się uczucia głodu i zmian apetytu oraz zaburzeń glikemii poposiłkowej. Zaburzenia te wiążą się bezpośrednio z ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2 czy chorób układu krążenia [28].

Końcowym rezultatem przeprowadzonej analizy było wyznaczenie wartości IG badanych przetworów. W zależności od otrzymanej wartości produkt może być definiowany jako: żywność o bardzo niskim IG ($IG < 35$), o niskim IG ($35 < IG < 55$), o średnim IG ($55 < IG < 70$) oraz o wysokim IG ($IG > 70$) [29, 15, 25]. W przypadku 100-procentowego przecieru aroniowego współczynnik ten przyjął wartość 27,3, który kwalifikuje go do grupy produktów o niskim IG. Przecier aroniowy z dodatkiem



Rys. 1. Zależność stężenia glukozy we krwi [mg/ml] od czasu [min] po spożyciu produktów: roztworu glukozy, przecieru aroniowego, przecieru aroniowego z dodatkiem lnu i stewii oraz roztworu glukozy z dodatkiem lnu i stewii.

Fig. 1. Correlation between glucose level in blood [mg/ml] and time [min] after consuming products: glucose solution, chokeberry puree, chokeberry puree with flax and stevia added, and glucose solution with flax and stevia added.

lnu i stewii cechował się IG równym 20,3 i, analogicznie jak w przypadku czystego przecieru aroniowego, można go zaliczyć do produktów o niskim IG. Indeks aronii jest więc zbliżony do tego, jaki kształtuje się w owocach: truskawki, porzeczki, wiśni, czy żurawiny (IG = 25), natomiast przetwory aronii wzbogacone lnem i stewią miały współczynnik glikemiczny podobny do owoców cytryny, czy pędów bambusa [29]. Roztwór glukozy z dodatkiem wyłoków lnianych i suszonych liści stewii cechował się indeksem wynoszącym 56,8 (średni IG). Dodatek lnu i stewii do roztworu glukozy

spowodował zmniejszenie wchłaniania cukru do krwi o 43 %. Mniejsza glikemia poposiłkowa wystąpiła także po spożyciu przecieru z dodatkiem lnu i substancji słodzącej aniżeli po spożyciu 100-procentowego przecieru aroniowego. W tym przypadku różnica wynosiła 25 %. Przeprowadzone analizy wskazują, że dodatek lnu wpływa na metabolizm glukozy, poprzez regulację jej wchłaniania w organizmie człowieka. Spostrzeżenia te potwierdzają badania Bleodona i wsp. [4], Cunnane'a i wsp. [9], Ibruggera i wsp. [19] oraz Lermaya i wsp. [23]. Dodatek zarówno zmielonego siemienia lnianego, jak i wyłóków lnianych poprawia homeostazę glukozy, zmniejszając wchłanianie glukozy do krwi, obniżając poziom insuliny i poprawiając wrażliwość organizmu na ten hormon. Szereg korzystnych oddziaływań lnu na organizm człowieka przypisuje się rozpuszczalnym włóknom, które stanowią główny składnik tej rośliny. Powodują one zwiększenie lepkości pożywienia, dzięki czemu stężenie glukozy utrzymuje się w odpowiednim przedziale [4, 19].

Warto też zwrócić uwagę na korzystne oddziaływanie stewii, która nadała produktom aroniowym słodki smak, nie powodując przy tym po ich spożyciu wzrostu stężenia glukozy we krwi. Liczne badania [1, 7, 24] potwierdzają, że stevia może być stosowana jako substytut sacharozy, szczególnie w leczeniu cukrzycy, otyłości, czy nadciśnienia tętniczego. Poza silnymi właściwościami słodzącymi, przypisuje się jej również działanie: przeciwcukrzycowe, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe [1, 7, 24].

Przeprowadzone badania dowodzą, że dodatek do przecieru z aronii wyłóków lnianych i suszonych liści stewii na ogół korzystnie wpływa na poprawę walorów smakowych oraz wartość prozdrowotną produktu finalnego.

Wnioski

1. Dodatek wyłóków z lnu i suszonych liści stewii korzystnie wpływa na smakowość produktu finalnego. Za przetwórcę aroniowy najbardziej atrakcyjny sensorycznie uznana została próbka zawierająca 470 g przecieru, 0,3 g stewii oraz 30 g wyłóków lnianych.
2. Mniejszy dodatek suszonych liści stewii (0,2 g) korzystniej wpływa na zapach i barwę finalnego produktu. Natomiast smak przecierów aroniowych oceniany jest wyżej w przypadku większego dodatku tej rośliny (0,3 g na 500 g produktu).
3. Wartość Indeksu Glikemicznego roztworu glukozy z dodatkiem lnu i stewii wyniosła 56,8, 100-procentowego przecieru aroniowego: 27,3, a przecieru z aronii wzbogaconego dodatkiem zmielonych wyłóków lnu i liści stewii: 20,3.
4. Dodatek zmielonych wyłóków lnu do produktów przecierowych zmniejsza glikemię poposiłkową oraz powoduje stopniowy i niewielki wzrost stężenia glukozy w organizmie.

5. Wytłoki lniane i suszone liście stewii dodane do przecieru z aronii poprawiają walory smakowe, niwelują cierpko-gorzki posmak oraz zwiększają jego wartość prozdrowotną.

Dziękujemy Paniom: mgr inż. Aleksandrze Mączce, mgr inż. Agacie Banaszak oraz mgr inż. Marcie Mikulskiej za bezinteresowną pomoc w realizacji badań zawartych w powyższym opracowaniu.

Praca została wykonana w ramach projektu PO IG 01.01.02-00-061/09 „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych”

Literatura

- [1] Atteh J., Onagbesan O., Tona K., Decuypere E., Geuns J., Buyse J.: Evaluation of supplementary Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: Effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 2008, **92**, 640-649.
- [2] Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I.: Sensoryczne badania żywności. Podstawy. Metody. Zastosowania. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2009.
- [3] Białek M., Rutkowska J., Hallmann E.: Aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa*) jako potencjalny składnik żywności funkcjonalnej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **6 (85)**, 21-30.
- [4] Bloedon L.T., Szapary P.O.: Flaxseed and Cardiovascular Risk. *Rev. Nutr.*, 2004, **1 (62)**, 18-27.
- [5] Brand-Miller J., Hayne S., Petocz P., Colagiuri S.: Low-glycemic index diets in the management of diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care*, 2003, **26 (8)**, 2261-2270.
- [6] Brouns F., Bjorck I., Frayn K.N., Gibbs A.L., Slama G., Wolever T.M.S.: Glycaemic index methodology. *Nutr. Res. Rev.*, 2005, **18**, 145-171.
- [7] Brusick D.J.: A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **46**, 83-91.
- [8] Caracostas M.C., Curry L.L., Bolieau A.C., Brusick D.J.: Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **46**, 1-10.
- [9] Cunnane S.C., Ganguli S., Menard C.: High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br. J. Nutr.*, 1993, **69**, 443-453.
- [10] Czemplik M. Szopa J.: Review. Optimizing biomedical and industrial products development based on flax. Perspectives in agriculture. *Veter. Sci. Nutr. Nat. Res.*, 2009, **4 (62)**, 1-10.
- [11] Day C., Bailey C.J.: Obesity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Br. J. Diab. Vasc. Disease*, 2011, **11**, 55-66.
- [12] Esatbeyoglu T., Winterhalter P.: Preparation of dimeric procyanidins B1, B2, B5, and B7 from a polymeric procyanidin fraction of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 5147-5153.
- [13] Flint A., Gregersen N.T., Gluud L.L., Moller B.K., Raben A., Tetens I., Verdich C., Astrup A.: Reviews Article. Associations between postprandial insulin and blood glucose responses, appetite sensations and energy intake in normal weight and overweight individuals: a meta-analysis of test meal studies. *Br. J. Nutr.*, 2007, **98**, 17-25.
- [14] Fonseca F.A.: Review. Defining and characterising the progression of type 2 diabetes. *Br. J. Diab. Vasc. Disease*, 2008, **8**, S3-S9.

- [15] Foster-Powell K., Holt S.H.A., Brand-Miller J.C.: International table of glycemic index and glycaemic load values. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, **76**, 5-56.
- [16] Fraga C.G., Galleano M., Verstraeten V., Oteiza P.I.: Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Asp. Med.*, 2010, **31**, 435-445.
- [17] Geunus J.M.C.: Molecules of interest stevioside. *Phytochemistry*, 2003, **64**, 913-921.
- [18] Howard L.E., Brownmiller C., Prior R.E., Mauromoustakos A.: Improved stability of chokeberry juice anthocyanins by beta cyclodextrin addition and refrigeration. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **1**, 1-28.
- [19] Ibrugger S., Kristensen M., Mikkelsen M.S., Astrup A.: Research report. Flaxseed dietary fiber supplements for suppression of appetite and food intake. *Appetite*, 2012, **58**, 490-495.
- [20] Kalergis M., de Grandpre E., Andersons C.: The role of the glycemic index in the prevention and management of diabetes: A review and discussion. *Can. J. Diabetes*, 2005, **29** (1), 27-38.
- [21] Koyama E., Kitazawa K., Ohori Y., Izawa O., Kakegawa K., Fujino A., Ui M.: *In vitro* metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food Chem. Toxicol.*, 2003, **41**, 359-374.
- [22] Kullig S.E., Rawel H.: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – a review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.*, 2008, **74**, 1625-1634.
- [23] Lemay A., Dodin S., Kadri N., Jacques H., Forest J.C.: Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. *Obstet. Gynecol.*, 2002, **100**, 495-504.
- [24] Lemus-Mondaca R., Vega-Galvez A., Zura-Bravo L., Ah-Hen K.: Review. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.*, 2012, **132**, 1121-1132.
- [25] Little J.P., Chilibeck P.D., Bennett C., Zello G.A.: Food for endurance – the evidence, with a focus on glycaemic index. *Perspectives in agriculture. Veter. Sci., Nutr. Nat. Res.*, 2009, **4** (58), 1-13.
- [26] Lysoniewska E., Kalisz S., Mitek M.: Jakość sensoryczna napojów i nektarów z czarnej porzeczki wzbogaconych ekstraktami z jeżówki purpurowej oraz zielonej herbaty. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **6** (79), 167-177.
- [27] Malińska D., Kiersztan A.: Flavonoids-characteristics and significance for therapy. *Post. Biochem.*, 2004, **50**, 182-196.
- [28] Monro J.A., Mishra S.: Database values for food-based dietary control of glycaemia. *J. Food Comp. Anal.*, 2010, **2**, 1-19.
- [29] Montignac M.: Tajemnice Indeksu Glikemicznego. *Artivita Sp. z o.o.*, Warszawa 2010.
- [30] Nampoothiri S.V., Prathapan A., Cherian O.L., Raghu K.G., Venugopalan V.V., Sundaresan A.: *In vitro* antioxidant and inhibitory potential of *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis* fruits against LDL oxidation and key enzymes linked to type 2 diabetes. *Food Chem. Tox.*, 2011, **49**, 125-131.
- [31] Olas B., Kedzińska M., Wachowicz B., Stochmal A., Oleszek W., Jezierski A., Piekarski J., Glowacki R.: Effect of aronia on thiol levels in plasma of breast cancer patients. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2010, **5** (1), 38-46.
- [32] PN-90/A-75101.07. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości cukrów i ekstraktu bezcukrowego.
- [33] PN-ISO 6658:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Wytyczne ogólne.
- [34] Reguła J.: Wartość odżywcza i ocean organoleptyczna ciastek wzbogaconych w susz grzybowy *Shitake lentinula*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **4** (65), 79-85.
- [35] Szajdek A., Borowska E.J.: Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant. Foods Hum. Nutr.*, 2008, **63**, 147-156.

- [36] Vanek T., Nepovim A., Valicek P.: Determination of stevioside in plant material and fruit teat. J. Food Compos. Anal., 2001, **14**, 383-388.

**ASSESSMENT OF SENSORY QUALITIES AND NUTRITIONAL VALUE
OF CHOKEBERRY PUREE WITH ADDED FLAX POMACE AND
DRIED LEAVES OF STEVIA**

S u m m a r y

The objective of the research study was the consumer assessment of chokeberry purees the astringent taste of which was improved by adding flax pomace and dried leaves of stevia. The most accepted product by the assessment panel was the one containing 470 g of chokeberry, 30 g of added flax pomace, and 0.3 g of added stevia (total score of 6.70). Additionally, in order to assess pro-health qualities of the suggested product, the Glycemic Index (IG) values were determined of the 100 % chokeberry puree and of the most accepted puree. Pure glucose constituted a model (IG = 100). The determined mean IG values of individual products were as follows: chokeberry puree: 27.3; chokeberry puree with the added flax pomace and stevia: 20.3; glucose solution with the added flax and stevia: 56.8.

As a result, it was proved that the addition of flax could considerably decrease the astringent taste of chokeberry products, and the addition of stevia made the final products taste slightly sweet. Furthermore, it was confirmed that the products analyzed could be used in the prevention of diabetes, because they caused the blood glucose level to increase only slightly.

Key words: chokeberry, stevia, flax pomace, organoleptic assessment, Glycemic Index ☒

AGNIESZKA SZPARAGA, ADAM KOPEĆ, EWA CZERWIŃSKA

WPLYW ODWADNIANIA OSMOTYCZNEGO I ZAMRAŻALNICZEGO PRZECHOWYWANIA NA STAN MIKROBIOLOGICZNY ŚLIWEK ROZMRAŻANYCH W KOMORZE PRÓŻNIOWO-PAROWEJ

Streszczenie

Celem pracy była ocena stanu mikrobiologicznego śliwek odmiany 'węgierka zwykła', które odwodniono osmotycznie w roztworach sacharozy, a następnie przechowywano w formie zamrożonej przez 6 miesięcy. W odstępach czterotygodniowych, w owocach poddanych rozmrożeniu w komorze próżniowo-parowej oznaczano ogólną liczbę bakterii mezofilnych, psychrofilnych oraz grzybów. Wraz z wydłużaniem czasu zamrażalniczego przechowywania stwierdzono zmniejszanie liczby bakterii mezofilnych i psychrofilnych w badanych próbkach owoców. Najmniejszą liczbę drobnoustrojów zawierały śliwki odwadniane w 65-procentowym roztworze sacharozy przez 1,5 i 3,0 h. Najwięcej tych bakterii po półrocznym przechowywaniu oznaczono w próbkach owoców niepoddanych wstępnej obróbce osmotycznej (próba kontrolna). Zaobserwowano również, że w owocach poddanych łagodnej obróbce osmotycznej (niskie stężenia sacharozy) liczba drobnoustrojów była zbliżona do oznaczonej w śliwkach zamrożonych konwencjonalnie. Ogólna liczba grzybów pleśniowych i drożdży w badanym materiale podczas zamrażalniczego przechowywania uległa redukcji. Pod koniec okresu zamrażalniczego przechowywania nie stwierdzono obecności grzybów pleśniowych w owocach odwadnianych w roztworach o stężeniach od 55 do 65 %, bez względu na czas obróbki. Dominującą mikroflorę śliwek (około 75 % ogólnej liczby bakterii) stanowiły bakterie z rodzaju *Bacillus*. Wśród zidentyfikowanych pleśni dominowały rodzaje *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* i *Cladosporium*.

Słowa kluczowe: śliwki, odwadnianie osmotyczne, rozmrażanie próżniowo-parowe, czystość mikrobiologiczna

Wprowadzenie

Wzbogacenie rynku produktów spożywczych w nowe wyroby związane jest z rozwojem badań nad skutecznością metod utrwalania [13, 15]. Zamrażanie owoców

Dr inż. A. Szparaga, Katedra Biochemii i Biotechnologii, dr inż. A. Kopeć, Katedra Procesów i Urządzeń Przemysłu Spożywczego, dr E. Czerwińska, Katedra Biologicznych Podstaw Rolnictwa, Wydz. Mechaniczny, Politechnika Koszalińska, ul. Raclawicka 15-17, 75-620 Koszalin.

Kontakt: agnieszkaplawgo@wp.pl

należy do stosunkowo droższych metod utrwalania ze względu na to, że zawierają one znaczne ilości wody [19]. Pod względem ekonomicznym usuwanie wody przed zamrożeniem produktu podczas odwadniania osmotycznego (metoda dehydrofreezing) jest dobrym rozwiązaniem, powodującym minimalizowanie zmian cech fizykochemicznych owoców [14]. Ważnym aspektem utrwalania jest zachowanie wysokiej jakości produktu, która jest ściśle powiązana z techniką mrożenia oraz rozmrażania [4, 14, 20]. Niewłaściwe postępowanie podczas rozmrażania może doprowadzić do znacznego obniżenia jakości rozmrażanych owoców i warzyw [1, 6, 10].

Rozmrażanie próżniowo-parowe żywności, według metody opracowanej przez firmę APV Clark Built i Stację Badawczą Torry w Aberdeen [17], odbywa się w atmosferze pary wodnej, w warunkach obniżonego ciśnienia. Rozmrażany produkt umieszcza się w komorze próżniowej, z której odpompowuje się powietrze. Komora jest połączona z zewnętrznym zbiornikiem wypełnionym wodą. W wyniku powstającej próżni woda zaczyna wrzeć w temperaturze otoczenia. Powstająca para wodna wypełnia komorę rozmrażalniczą i kondensuje na powierzchni produktu. Ciepło kondensacji jest przejmowane przez zamrożony produkt, powodując jego szybkie rozmrażanie [7, 10, 11, 16, 17].

Charakterystyczną cechą surowców i produktów spożywczych jest ich stosunkowo niska trwałość oraz podatność na działanie mikroorganizmów [12, 22]. Przeżywalność drobnoustrojów zależy w dużym stopniu od składu chemicznego zamrożonej żywności. Redukcja liczby żywych komórek drobnoustrojów szybciej przebiega podczas zamrażania i w początkowym okresie przechowywania produktów, gdyż wtedy giną mikroorganizmy wrażliwe na niską temperaturę. Podczas przechowywania produktów mrożonych następuje stopniowe zamieranie mikroflory psychrofilnej [23].

Celem pracy było określenie wpływu odwadniania osmotycznego w roztworach sacharozy i zamrażalniczego przechowywania przez 6 miesięcy na stan mikrobiologiczny śliwek odmiany 'węgierka zwykła' rozmrażanych w komorze próżniowo-parowej.

Materiał i metody badań

Materiałem badawczym były śliwki odmiany 'węgierka zwykła' (*Prunus domestica* L.). Badana odmiana śliwek pochodziła z sadu owocowego ze Skierniewic, w którym jest stosowana dobra praktyka sadownicza (metoda integrowanej produkcji). Zbiór owoców odbywał się w latach: 2008, 2009 i 2010 pod koniec września. Do badań przeznaczono surowiec dojrzały konsumpcyjnie, zdrowy, o zbliżonych wymiarach. Owoce oceniono pod względem jednorodności odmianowej. Cechami całkowicie dyskwalifikującymi były oznaki spleśnienia, sfermentowania, porażenia, a także nadgnicia lub zgnicia. Surowiec wstępnie umyto w celu usunięcia zanieczyszczeń organicznych

oraz mineralnych, a w pewnym stopniu również i mikroflory powierzchniowej. Ze śliwek usunięto szypułki oraz pestki poprzez ręczne drylowanie.

Odwadnianie osmotyczne połówek śliwek przeprowadzano w roztworach sacharozy o stężeniach: 35, 45, 55 i 65 %, w ciągu 1,5 i 3,0 h, w temp. 20 °C. Stosunek masy surowca do masy roztworu osmotycznego wynosił 1 : 4. Kontrolę stanowiły świeże owoce poddane zamrożeniu bez wstępnej obróbki osmotycznej (próba „0” w tabelach z wynikami). Odwadnianie przeprowadzano w łaźni wodnej z wytrząsaniem typu Elpin + typ 357. Odwodnione owoce oraz śliwki stanowiące próbę kontrolną ważono i pakowano w woreczki wykonane z PE, a następnie zamrażano w warunkach konwekcji swobodnej. Masa pojedynczej próbki wynosiła 100 ± 2 g. Owoce zamrażano do -18 °C i przechowywano przez 6 miesięcy w zamrażarce Gorenje F 61300 DW. W odstępach czterotygodniowych produkt był rozmrażany metodą próżniowo-parową, z zastosowaniem komory s-p-p, do momentu wskazania przez termoparę temp. 4 °C w centrum termicznym próbki.

Śliwki poddane utrwalaniu metodą dehydrofreezing oraz próbki kontrolne tuż po rozmrożeniu w komorze homogenizowano, a następnie wykonywano rozcieńczenia (metodą dziesięciokrotną). Ocenę stanu mikrobiologicznego śliwek zhomogenizowanych wykonywano stosując posiewy rozcieńczonych próbek metodą wgłębną Kocha. Z każdego rozcieńczenia wykonywano posiewy w trzech powtórzeniach. Ogólną liczbę drobnoustrojów w badanej próbce wyznaczano jako średnią ważoną, uwzględniającą dwa kolejne rozcieńczenia. Identyfikację wyhodowanych gatunków bakterii wykonywano za pomocą analizatora mini API firmy bioMerieux, stosując testy API 50 CHB, ID 32 STAPH, ID 32 GN. Identyfikację grzybów pleśniowych wykonywano na podstawie cech makro- i mikroskopowych. Przy identyfikacji wyhodowanych drożdży zastosowano test firmy bioMerieux ID 32 C. Oceniając jakość mikrobiologiczną śliwek, wartości uzyskanych wyników odnoszono do kryteriów mikrobiologicznych zawartych w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych [27].

Ogólną liczbę bakterii i grzybów w każdej z trzech prób wyznaczano jako średnie wartości pomiarów zestawione w formie tabelarycznej, a uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w programie Statistica (wersja 10.0) oraz programie Analiza Wariancji Doświadczeń Wersja 2.1 (Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy).

Wyniki i dyskusja

Zastosowana metoda dehydrofreezing i rozmrażanie śliwek w komorze próżniowo-parowej miały wpływ na ograniczenie wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów w stosunku do śliwek, które stanowiły próbę kontrolną (niepoddanych osmotycznemu odwadnianiu i rozmrażanych w powietrzu).

Ogólna liczba bakterii mezofilnych w badanych próbkach owoców była niższa niż w próbce kontrolnej „0” w czasie zamrażalniczego przechowywania (tab. 1).

Tabela 1. Ogólna liczba bakterii mezofilnych w 1 g śliwek utrwalonych metodą dehidrofrozowania, rozmrażanych próżniowo-parowo, w okresie przechowywania.

Table 1. Total number of mesophilic bacteria in 1 g of plums preserved using dehydrofreezing method and vacuum-steam thawed, during their storage.

Rodzaj próby Type of sample	Ogólna liczba bakterii mezofilnych [log jtk/g] Total number of mesophilic bacteria [log cfu/g]						\bar{x}
	Czas przechowywania [tygodnie] / Storage time [weeks]						
	4	8	12	16	20	24	
0	2,56	2,29	2,24	2,20	2,05	1,99	2,22
35 %, 1,5 h	2,43	2,11	2,14	2,10	2,00	1,92	2,12
35 %, 3 h	2,29	2,15	2,15	2,05	1,96	1,89	2,08
45 %, 1,5 h	2,18	2,12	2,11	2,00	1,93	1,79	2,02
45 %, 3 h	2,15	2,08	2,08	1,96	1,89	1,78	1,99
55 %, 1,5 h	2,09	2,00	2,02	1,94	1,79	1,72	1,93
55 %, 3 h	1,96	1,90	1,94	1,86	1,75	1,67	1,85
65 %, 1,5 h	2,00	1,80	1,87	1,79	1,6	1,59	1,78
65 %, 3 h	1,94	1,72	1,83	1,74	1,63	1,56	1,74
\bar{x}	2,18	2,02	2,04	1,96	1,84	1,77	1,97
NIR _{czas/time} 0,1135							NIR _{próba/sample} 0,139
NIR _{próba x czas / sample x time} 0,3404							

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} - wartość średnia / mean value; NIR – najmniejsza istotna różnica przy $p = 0,05$ / least significant difference at $p = 0.05$.

Najmniejszą liczbę drobnoustrojów zawierały śliwki odwadniane w 65-procentowym roztworze sacharozy przez 1,5 i 3,0 h. Najwięcej bakterii po półrocznym przechowywaniu oznaczono w próbkach owoców niepoddanych wstępnej obróbce osmotycznej (próba kontrolna „0”). Śliwki te odznaczały się trzykrotnie większą liczbą bakterii po półrocznym przechowywaniu w stosunku do owoców wstępnie odwodnionych w 65-procentowym roztworze sacharozy. Stwierdzono również, że w owocach poddanych łagodnej obróbce osmotycznej liczba drobnoustrojów była zbliżona do obserwowanej w śliwkach zamrożonych. Czas odwadniania nie wpływał w znaczący sposób na różnice w liczbie bakterii w rozmrażanych owocach, tak jak długość zamrażalniczego przechowywania czy stężenie zastosowanych roztworów osmotycznych.

Ogólna liczba bakterii psychrofilnych w badanych owocach po sześciomiesięcznym zamrażalniczym przechowywaniu uległa redukcji (tab. 2). Najwyższą liczbę drobnoustrojów psychrofilnych stwierdzono w śliwkach mrożonych bez przeprowadzonego procesu odwadniania osmotycznego i poddanych badaniu po rozmrożeniu próżniowo-parowym.

Tabela 2. Ogólna liczba bakterii psychrofilnych w 1 g śliwek utrwalonych metodą dehydrofreezing, rozmrażanych próżniowo-parowo, w okresie przechowywania.

Table 2. Total number of psychrophilic bacteria in 1 g of plums preserved by dehydrofreezing method and vacuum-steam thawed, during their storage.

Rodzaj próby Type of sample	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych [log jtk/g] Total number of psychrophilic bacteria [log cfu/g]						\bar{x}
	Czas przechowywania [tygodnie] / Storage time [weeks]						
	4	8	12	16	20	24	
0	2,47	2,38	2,32	2,15	2,20	2,15	2,28
35 %, 1,5 h	2,31	2,28	2,26	2,10	1,88	1,85	2,11
35 %, 3 h	2,26	2,18	2,14	2,05	1,88	1,76	2,05
45 %, 1,5 h	2,19	2,09	2,08	2,07	1,88	1,75	2,01
45 %, 3 h	2,07	2,00	2,00	1,96	1,85	1,73	1,94
55 %, 1,5 h	1,97	1,99	1,90	1,90	1,79	1,67	1,84
55 %, 3 h	1,79	1,91	1,88	1,83	1,60	1,41	1,74
65 %, 1,5 h	1,61	1,73	1,67	1,62	1,46	1,28	1,56
65 %, 3 h	1,54	1,48	1,63	1,52	1,36	1,20	1,46
\bar{x}	2,02	2,00	1,99	1,91	1,71	1,64	1,89
NIR _{czas/time} 0,1024							NIR _{próba/sample} 0,1211
NIR _{próba x czas/time x sample} 0,3211							

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

W śliwkach odwadnianych w roztworze o stężeniu 65 % przez 3 h nastąpiło ponad dwukrotne zmniejszenie liczby drobnoustrojów po całym cyklu przechowywalniczym. Czystość mikrobiologiczna śliwek zamrożonych bez wstępnego usuwania wody oraz owoców odwodnionych w roztworach o najniższym, 35-procentowym stężeniu, była zbliżona. Wydłużenie czasu odwadniania osmotycznego i zwiększenie stężenia syropów skutkowało zmniejszoną liczbą bakterii psychrofilnych po rozmrożeniu.

Ogólna liczba grzybów pleśniowych i drożdży w badanym materiale podczas zamrażalniczego przechowywania uległa redukcji (tab. 3). Nie zaobserwowano grzybów w śliwkach, w których wstępnie usunięto wodę podczas odwadniania w roztworach o stężeniu 65 %, bez względu na czas obróbki. Natomiast w próbie kontrolnej wystąpiła prawie 10-krotna redukcja liczby grzybów. Liczba grzybów w próbach śliwek była

na zbliżonym i bardzo niskim poziomie. Stwierdzono również, że owoce odwadniane w roztworach o dużych stężeniach cechował brak wzrostu grzybów już po drugim lub trzecim terminie zamrażalniczego przechowywania.

Tabela 3. Ogólna liczba grzybów pleśniowych w 1 g śliwek utrwalonych metodą dehydrofreezing, rozmrażanych próżniowo-parowo, w okresie przechowywania.

Table 3. Total number of moulds in 1 g of fruits fixed by dehydrofreezing, vacuum-steam thawed during storage.

Rodzaj próby Type of sample	Ogólna liczba grzybów pleśniowych [log jtk/g] Total number of moulds [log cfu/g]						\bar{x}
	Czas przechowywania [tygodnie] / Storage time [weeks]						
	4	8	12	16	20	24	
0	2,43	2,02	2,11	1,88	1,85	1,46	1,96
35 %, 1,5 h	2,30	2,00	1,81	1,77	0,95	0,90	1,62
35 %, 3 h	2,25	1,96	1,71	1,67	0,78	0,90	1,55
45 %, 1,5 h	2,18	1,95	1,68	1,49	0,78	0,78	1,48
45 %, 3 h	2,14	1,91	1,59	1,43	0,7	0,78	1,43
55 %, 1,5 h	2,12	1,89	brak wzrostu	0,30	0,85	0,70	0,98
55 %, 3 h	2,05	1,79	1,15	brak wzrostu	0,70	0,70	1,07
65 %, 1,5 h	2,00	1,74	0,70	brak wzrostu	0,30	brak wzrostu	0,79
65 %, 3 h	1,87	1,38	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu	0,54
\bar{x}	2,15	1,85	1,19	0,95	0,77	0,69	1,27
NIR _{czas/time} 0,2119							NIR _{próba/sample} 0,3987
NIR _{próba x czas /sample x time} 0,5789							

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

Redukcja liczby komórek drobnoustrojów podczas zamrażalniczego przechowywania jest charakterystyczna dla tego procesu. Zbliżone wyniki uzyskali Majczyna i Białasiewicz [23], którzy zaobserwowali, że podczas przechowywania produktów mrożonych następuje zamieranie drobnoustrojów. Także Beales [2] wykazał, że owoce, w których wstępnie zredukowano zawartość wody podczas odwadniania osmotycznego, charakteryzują się mniejszą liczbą mikroorganizmów, czyli ilość wody występująca w zamrożonym produkcie determinuje możliwość przeżycia drobnoustrojów. W opinii Bealesa [2], w produktach mrożonych komórki drobnoustrojów mogą ulegać tzw. subletalnemu uszkodzeniu i w zależności od sposobu i warunków prowadzenia procesu rozmrożenia żywności powraca ich aktywność metaboliczna. W badaniach

własnych, w odwodnionych i zamrożonych śliwkach ogólna liczba bakterii była na bardzo niskim poziomie w porównaniu z wynikami Mulyawanti i wsp. [25], którzy badali czystość mikrobiologiczną owoców mango, zamrożonych w ciekłym azocie i przechowywanych przez 3 miesiące w temp. $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i stwierdzili obecność mikroflory, pomimo zastosowanych parametrów przechowywania [25]. Wykonane badania dowiodły również, że proces rozmrażania miał istotny wpływ na liczbę przeżywających w produkcji bakterii. Podobnie, jak w przypadku analiz wykonanych przez Kumalaningsiha i Hidayata [21], stwierdzono, że szybkie rozmrażanie ogranicza liczbę drobnoustrojów [21]. Natomiast wyniki badań własnych były sprzeczne z uzyskanymi przez Skupień i Wójcik-Stopczyńską [28], które w badaniach nad jakością mrożonych przecierów z truskawek odmiany 'Elsanta' wykazały, że zmniejszenie liczby bakterii i grzybów było zróżnicowane, ale bardziej efektywne w przecierach niesłodzonych. Po całym cyklu zamrażalniczego przechowywania Skupień i Wójcik-Stopczyńska [28] stwierdziły, że we wszystkich zamrożonych homogenatach ogólna liczba bakterii była zbliżona i kształtowała się na poziomie 10^2 jtk/g. Uzyskane wyniki badań dotyczące liczby grzybów również nie znajdują odzwierciedlenia w badaniach wymienionych autorek. Odnotowały one bowiem, że po rocznym składowaniu zamrożonych przecierów pojedyncze grzyby pleśniowe pozostały tylko w homogenatach słodzonych [28]. W dostępnej literaturze zaznacza się, że jakość mikrobiologiczna mrozonek i przeżywalność drobnoustrojów zależą od wielu czynników, a mechanizm ich oddziaływania nie zawsze jest do końca poznany. Dlatego wyniki otrzymywane przez badaczy są zróżnicowane, a niekiedy sprzeczne. Stwierdzona przez Skupień i Wójcik-Stopczyńską [28] redukcja liczby bakterii w zamrożonych homogenatach truskawkowych była mniejsza niż zaobserwowana w przedstawionych badaniach i w badaniach przeprowadzonych przez Steinkę i Stankiewicz [29] w zamrażanych homogenatach aloesowych. Redukcja liczby bakterii i grzybów w śliwkach niepoddanych wstępnemu odwadnianiu osmotycznemu była na poziomie zbliżonym do wartości podawanych przez Grudę i Postolskiego [10] w odniesieniu do zamrażanych malin, jagód i czarnych porzeczek oraz truskawek [10]. Zaobserwowane zmniejszenie liczby mikroorganizmów w czasie zamrażalniczego składowania odwodnionych osmotycznie owoców potwierdzają doniesienia tych badaczy, że w mrożonych owocach, po kilku miesiącach składowania, liczba bakterii, drożdży i pleśni nie przekracza 1,5 % wartości wyjściowych. Natomiast przedstawione wyniki badań są sprzeczne z opinią tych badaczy, którzy wykazali większą przeżywalność bakterii i grzybów w homogenatach z dodatkiem cukru [28].

Przeprowadzone badania jakościowe mikroflory śliwek wykazały obecność przede wszystkim bakterii z rodzaju *Bacillus*. W niemal wszystkich przypadkach stanowiły one około 75 % ogólnej liczby bakterii. W przypadku prób kontrolnych, które zostały zamrożone bez wstępnego usunięcia wody, w ostatnim, szóstym miesiącu przechowywania stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Bacillus cereus*. Bakterie te wytwarzają

dwa typy toksyn odpowiedzialnych za wymioty i biegunki [9]. W przeprowadzonych badaniach laseczkę tę wykryto jedynie w próbkach kontrolnych, a jej liczba na poziomie 2 - 5 jtk/g nie stanowi zagrożenia dla konsumentów, gdyż udowodniono, że takie zagrożenie stanowi dopiero zanieczyszczenie rzędu 10^3 jtk/g [9]. Kordowska-Wiater i wsp. [18] przeprowadzili ocenę jakościową drobnoustrojów w zamrożonych warzywach i nie wykryli obecności pałeczek *Salmonella* spp., natomiast bakterie *B. cereus* i *S. aureus* występowały w większej liczbie niż w owocach, tj. średnio na poziomie 10^1 - 10^2 jtk/g [18].

Wśród mikroorganizmów, które zanieczyszczają surowce i produkty przeznaczone do zamrażania, są drobnoustroje określane umownie jako psychrofile (zimnolubne) i psychrotrofy (zimnotolerancyjne), które preferują warunki obniżonej temperatury [26]. Są to zarówno drobnoustroje chorobotwórcze odpowiadające za jakość zdrowotną żywności, jak i saprofityczne, rozkładające podstawowe składniki żywności – odpowiedzialne za jakość sensoryczną produktów.

We wszystkich wariantach doświadczalnych, w śliwkach stwierdzono obecność bakterii *Staphylococcus xylosum*. Spośród streptokoków zidentyfikowano *Streptococcus mitis*. Wykryto również naturalnie występującą na surowcach roślinnych mikroflorę, a mianowicie *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. Zidentyfikowano także *Micrococcus luteus*, należące do grupy bakterii Gram-dodatnich. Jednak powszechnie bakterie te uważane są za niechorobotwórcze. Obecność tych drobnoustrojów wyjaśniali Beales [2] i Geiges [8]. Stwierdzili oni, że bakterie Gram-dodatnie należą do grupy drobnoustrojów o szczególnej oporności na ujemną temperaturę i są zdolne do przeżycia kilku miesięcy w żywności głęboko zamrożonej [2, 8]. Wśród zidentyfikowanych pleśni dominowały rodzaje *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* oraz *Fusarium* i *Cladosporium*. Mikroorganizmy te stanowią najliczniejszą grupę w atmosferze (nawet do 2×10^4 jtk/m³) [30]. Uzyskane wyniki można również odnieść do badań Bealesa [2] i Geiges [8], którzy potwierdzili, że najbardziej odporne na zamrażanie są zarodniki grzybów, a także drożdże. Wymienieni autorzy izolowali z mrożonych produktów psychrotrofowe pleśnie należące do rodzajów: *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor* oraz drożdże *Candida* i *Saccharomyces* [2, 8]. Podobne rodzaje mikroorganizmów zidentyfikowali Mulyawanti i wsp. [25] w owocach mango. Pomimo niskiej temperatury wykryto w nich obecność *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Penicillium*, *Monilia* [25], co potwierdza opinię Kumalaningsiha i wsp. [21] o możliwej przeżywalności drobnoustrojów nawet w temperaturze -34 °C [21].

Skład mikroflory występującej na powierzchni owoców uzależniony jest od mikroflory powietrza w sadzie oraz gatunku badanej rośliny. Generalnie przeważają grzyby strzępkowe (rodzaje: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Epicoccum*) i organizmy drożdżopodobne (rodzaj *Aureobasidium*), a ich liczba kształtuje się w granicach

$5 \times 10^2 - 10^4$ jtk na cm^2 powierzchni [3, 5]. Często w posiewach pojawiają się również szczepy drożdżowe, zarówno niefermentujące (rodzaj *Rhodotorula*), jak i fermentujące. Głównym źródłem zanieczyszczeń mikrobiologicznych owoców śliwy mogą być warunki panujące w sadzie, miejsce lokalizacji, skład powietrza i wody, a także obecność owadów przenoszących drobnoustroje (w ich organizmie pełnią rolę symbiontów) [24]. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne owoców następuje także podczas ich bezpośredniego kontaktu z podłożem w czasie zbiorów. Przeprowadzone badania dowiodły jednak, że znaczna część mikroflory znajdującej się na owocach może zostać usunięta w wyniku prawidłowej obróbki wstępnej.

W badaniach własnych wykazano również obecność drożdży, wśród których dominowały rodzaje *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces*. Nie stwierdzono obecności drożdży z rodzajów *Pichia* i *Candida*, których rozwój prowadzi do zmian sensorycznych gotowego produktu. Wśród zidentyfikowanych drożdży na szczególną uwagę zasługuje rodzaj *Zygosaccharomyces*, należący do grupy osmofilnych, które rozwijają się szybciej w środowisku o wysokich stężeniach cukrów. Obecność ich w śliwkach odwadnianych w roztworach sacharozy o 65-procentowym stężeniu jest na to dowodem, ale połączenie odwadniania osmotycznego z zamrażaniem wpłynęło na ograniczenie ich liczby.

Wnioski

1. Zastosowane metody dehydrofreezing i rozmrażanie śliwek w komorze próżniowo-parowej miały wpływ na ograniczenie wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów w porównaniu ze śliwkami, które stanowiły próbę kontrolną (i nie były poddawane osmotycznemu odwadnianiu przed zamrożeniem).
2. Wykazano, że stan mikrobiologiczny śliwek zależał od: stężenia roztworu sacharozy, czasu obróbki osmotycznej oraz czasu zamrażalniczego przechowywania. Największa redukcja liczby drobnoustrojów nastąpiła w śliwkach po odwodnieniu osmotycznym w roztworze o stężeniu 65 %, po 3 h procesu. Wydłużenie czasu zamrażalniczego przechowywania powodowało obniżenie ogólnej liczby bakterii psychrofilnych, mezofilnych, grzybów i drożdży.
3. W owocach utrwalonych metodą dehydrofreezing i rozmrażanych w komorze próżniowo-parowej nie stwierdzono obecności drobnoustrojów chorobotwórczych, a wśród oznaczonej mikroflory dominowały bakterie z rodzaju *Bacillus* oraz grzyby z rodzaju *Alternaria* i *Saccharomyces*.

Literatura

- [1] Anonim: Ashrae Handbook of Fundamentals. American Society of Heating, Refrigerating and Air Conditioning Engineers, Atlanta, GA, USA, 2001.

- [2] Beales N.: Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Compr. Rev. Food Sci. F*, 2004, **3** (1), 1-20.
- [3] Buck W.J., Lachance M.A., Traquair J.A.: Microflora of peach bark: population dynamics and composition. *Canadian J. Bot.*, 1998, **76** (2), 345-354.
- [4] Chiralt A., Talens P.: Physical and chemical changes induced by osmotic dehydration in plant tissues. *J. Food Eng.*, 2005, **67** (1-2), 167-177.
- [5] Davenport R.R.: Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis*, 1974, **13**, 123-130.
- [6] Diakun J., Kopeć A.: Koncepcja rozmrażania próżniowo-parowego produktów spożywczych z wykorzystaniem sublimacji. *Mat. XI Konf. Nauk.-Techn. BEMS, Koszalin 2004*.
- [7] Diakun J., Kopeć A.: Porównanie procesu rozmrażania mięsa metodami próżniowo-parową i sublimacyjno-próżniowo-parową. *Inżynieria Rolnicza*, 2006, **7** (82), 73-81.
- [8] Geiges O.: Microbial processes in frozen food. *Adv. Space Res.*, 1996, **18** (12), 109-118.
- [9] Granum P.E., Lund T.: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems. Microbiol. Lett.*, 1997, **157** (2), 223-228.
- [10] Gruda Z., Postolski J.: *Zamrażanie żywności*. WNT, Warszawa 1999.
- [11] Jason A.C.: *Thawing frozen fish*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, HMSO Press, Edinburgh 1974.
- [12] Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A.: *Modern food microbiology*. Ed. Springer, USA, 2005.
- [13] Kamińska A., Lewicki P.P.: Ruch masy w żelach modelowych i jabłkach odwadnianych osmotycznie, zamrożonych i przechowywanych. *Inżynieria Rolnicza*, 2005, **9** (69), 167-173.
- [14] Kamińska A., Lewicki P.P.: Metoda dehydrofreezing (D-F) – znaczenie i przyszłość. *Przem. Spoż.*, 2005, **9** (59), 12-15.
- [15] Kamińska A., Lewicki P.P.: Wpływ wstępnej obróbki osmotycznej na przebieg procesów zamrażania i rozmrażania jabłek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2** (47), 101-107.
- [16] Kopeć A., Diakun J.: Kinetyka zmian masy i temperatury w procesie sublimacyjno-parowo-próżniowego rozmrażania mięsa. *Inżynieria Rolnicza*, 2005, **11** (71), 251-258.
- [17] Kopeć A., Diakun J., Milewski T.: Rozmrażanie truskawek metodą próżniowo-parową. *Inżynieria Rolnicza*, 2009, **2** (111), 83-89.
- [18] Kordowska-Wiater M., Janas P., Sosnowska B., Waśko A., Nowak A., Kluza B.: Występowanie bakterii patogennych oraz drobnoustrojów wskaźnikowych zanieczyszczenia fekalnego w mrożonych warzywach. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **2** (51), 134-144.
- [19] Kowalska H., Lenart A.: Kinetyka odwadniania osmotycznego jabłek i marchwi w wybranych parametrach procesu. *Zesz. Nauk. PŁ, Inżynieria Chemiczna i Procesowa*, 1999, **821** (25), 55-61.
- [20] Kowalska H., Lenart A.: Zmiany struktury tkanki roślinnej wywołane odwadnianiem osmotycznym. *Inżynieria Rolnicza*, 2005, **9** (69), 187-195.
- [21] Kumalaningsih S., Dan N. Hidayat.: *Mikrobiologi Hasil Pertanian*. [online]. MRiRW. Dostępne w Internecie [29.07.2013.]: <http://digilib.umm.ac.id/files/disk1/182/jiptumpp-gdl-s1-2007-sayyidahim-9090-1.+PENDA-N.pdf>
- [22] Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (Red.): *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2008.
- [23] Majczyna D., Białasiewicz D.: Przeżywalność drobnoustrojów w niskich temperaturach. *Chłodnictwo*, 2001, **36** (5), 45-48.
- [24] Morais P.B., Martins M.B., Klaczko L.B., Medonca-Hagler L.C., Hagler A.H.: Yeasts succession in the Amazon Fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila spp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61** (12), 4251-4257.
- [25] Mulyawanti I., Dewandari K.T., Yulianingsi H.: Effects of freezing and storage periods on characteristics of frozen sliced arumanis mango. *Indones J. Agric.*, 2010, **3** (1), 32-38.

- [26] Piotrowska M., Nowak A.: Drobnoustroje w produktach spożywczych mrożonych i przechowywanych w warunkach chłodniczych. *Chłodnictwo*, 2005, **40 (12)**, 50-52.
- [27] Rozporządzenie (WE) nr 1441/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 5 grudnia 2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. *Dz. Urz. UE L 322*, s. 15-22, z 07.12.2007.
- [28] Skupień K., Wójcik-Stopczyńska B.: Ocena jakości przecierów z truskawek odmiany *Elsanta*. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2005, **4 (2)**, 25-35.
- [29] Steinka I., Stankiewicz J.: Ocena wpływu mrożenia aloesu na mikroflorę pozyskiwanej pulpy. *Post. Mikrobiol. Supplement 1*, 2004, **43**, 499.
- [30] Stępańska D., Harmata K., Kasprzyk I., Myszowska D., Stach A.: Occurrence of airborne *Cladosporium* and *Alternaria* spores in Southern and Central Poland in 1995-1996. *Aerobiologia*, 1999, **15**, 39-47.

EFFECT OF OSMOTIC DEHYDRATION AND FROZEN STORAGE ON MICROBIOLOGICAL CONDITION OF PLUMS DEFROSTED IN VACUUM-STEAM CHAMBER

S u m m a r y

The objective of the paper was to assess the microbiological condition of plums of 'Węgierka' variety that were osmotically dehydrated in sucrose solutions and, then, stored frozen during a period of 6 months. At 4-week intervals, in the fruit thawed in a vacuum-steam chamber, determined were total amounts of mesophilic and psychrophilic bacteria, as well as of fungi. It was found that along with extending the frozen storage time, the count of mesophilic and psychrophilic bacteria in the fruit samples analyzed decreased. The plums dehydrated in a 65 % sucrose solution for 1.5 and 3.0 hours had the least count of the microorganisms. In the fruit samples, which were not osmotically pre-treated (control sample) and which were stored frozen for half a year, the highest count of those bacteria was reported. It is also found that in the fruit dehydrated in the solutions showing a low concentration of sucrose, the amount of microbes was similar to that found in the conventionally frozen plums. The total quantity of mould and yeast in the material analyzed was reduced during their frozen storage. Regardless of the processing time, by the end of the period of frozen storage, no moulds were found in the fruit dehydrated in the solutions the concentration rate of which ranged from 55 to 65 %. The *Bacillus* genus bacteria were a prevailing micro-flora found in plums (about 75 % of the total count of bacteria). Amongst the identified moulds, the dominant types were *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, as well as *Fusarium* and *Cladosporium*.

Key words: plums, osmotic dehydration, vacuum-steam thawing, microbiological purity ☒

MAGDALENA JESZKA-SKOWRON, EWA FLACZYK,
JOANNA KOBUS-CISOWSKA, ALICJA KOŚMIDER, DANUTA GÓRECKA

OPTIMALIZACJA PROCESU EKSTRAKCJI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH O AKTYWNOŚCI PRZECIWRODNIKOWEJ Z LIŚCI MORWY BIAŁEJ ZA POMOCĄ METODY PŁASZCZYZNY ODPOWIEDZI (RSM)

Streszczenie

Liście morwy zawierają polifenole, alkaloidy, terpenoidy oraz steroidy. Ich ekstrakty mogą być cennym składnikiem żywności prozdrowotnej.

Celem pracy była optymalizacja procesu ekstrakcji związków fenolowych z liści morwy oraz ocena aktywności przeciwrodnikowej uzyskanych ekstraktów testem DPPH, z wykorzystaniem metody powierzchni odpowiedzi (Response Surface Methodology).

Na podstawie RSM, w wybranych zakresach stężenia etanolu w wodzie i w wybranej temperaturze procesu ekstrakcji, uzyskano największe zawartości polifenoli i najwyższą aktywność przeciwrodnikową. Wartości przewidywane nie różniły się istotnie od wartości oznaczonych eksperymentalnie ($p \leq 0,001$). Stężenie etanolu w wybranym ekstrakcie wyniosło 65 %, a temperatura procesu ekstrakcji: 63 °C.

Słowa kluczowe: liście morwy białej, proces ekstrakcji, polifenole ogółem, aktywność przeciwrodnikowa, Response Surface Methodology

Wprowadzenie

Ekstrakty z liści morwy, ze względu na właściwości biologiczne, są cennym surowcem do produkcji prozdrowotnych produktów wspomagających układ krążenia i aktywność przeciwcukrzycową. Liście morwy są zasobne w związki bioaktywne, takie jak: polifenole, alkaloidy, steroidy oraz terpeny. Głównymi substancjami o właściwościach przeciwutleniających w liściach są: glikozydy flawonoli (3-(6-malonylo-

*Dr inż. M. Jeszka-Skowron, Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej, Wydz. Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 5, 60-965 Poznań, prof. dr hab. E. Flaczyk, dr inż. J. Kobus-Cisowska, prof. dr hab. D. Górecka, Katedra Technologii Żywności Człowieka, dr inż. A. Kośmider, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań.
Kontakt: magdalena.jeszka-skowron@put.poznan.pl*

glikozyd) kwercetyny, 3-(6-malonyloglikozyd) kemferolu, rutyna, izokwercytryna), kumaryny (skopolina, skimina) oraz fenolokwasy (kwas chlorogenowy i kwas kawowy) [11, 13, 15, 17]. Liście zawierają także alkaloidy, w tym pochodne piperydynowe: (1,5-dideoksy-1,5-imino-D-sorbitol (DNJ) oraz fagomina), polihydroksylowane pochodne pirolidyny i alkaloidy nortropanowe [4]. Związki te wykazują udokumentowaną aktywność przeciwmiażdżycową i przeciwcukrzycową [6, 13, 18]. Również owoce morwy mają wysoki potencjał przeciwutleniający [3].

Dotychczas nie optymalizowano procesu ekstrakcji związków fenolowych z liści morwy polskiej odmiany wielkolistnej żółwińskiej. Na podstawie wcześniejszych analiz ekstraktów do niniejszej pracy wybrano ekstrakt etanolowy, ponieważ zawierał istotnie więcej polifenoli ogółem oraz charakteryzował się wyższą aktywnością przeciwrodnikową niż ekstrakt acetonowy czy wodny pozyskany z liści morwy [12].

W celu optymalizacji warunków ekstrakcji zastosowano metodę płaszczyzny odpowiedzi (ang. *Response Surface Methodology* - RSM), która wykorzystuje metody analizy matematycznej oraz statystycznej do określenia interakcji między badanymi zmiennymi pozwalającymi na wyznaczenie właściwej odpowiedzi przy minimalnej liczbie doświadczeń [5]. Plan centralny kompozycyjny jest jednym z najpopularniejszych form RSM, stosowany w celu optymalizacji różnych procesów związanych z żywnością i roślinami, takimi jak: proces ekstrakcji związków bioaktywnych [10, 20, 23], mielenie [9], procesy fermentacji roślin [8] czy produkcja dietetycznych produktów skrobiowych [19].

Celem pracy była optymalizacja procesu ekstrakcji związków fenolowych oraz aktywności przeciwrodnikowej z liści morwy białej za pomocą mieszaniny etanolu i wody, na podstawie zastosowanego planowania doświadczeń metodą powierzchni odpowiedzi (RSM). W pracy postawiono hipotezę, że metoda RSM pozwoli uzyskać optymalne warunki ekstrakcji przy stosunkowo niskich nakładach surowcowych i odczynnikowych.

Material i metody badań

Liście morwy białej (*Morus alba L.*) odmiany wielkolistnej żółwińskiej zebrano na początku sierpnia 2009 roku na plantacji Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, w Zakładzie Doświadczalnym Pętkowo. Liście wraz z szypułkami wysuszono w temperaturze 60 ± 1 °C i zmielono do postaci proszku o stopniu rozdrobnienia 0,8 - 0,08 mm [16]. Susz z liści przechowywano w pojemnikach (PE) bez dostępu światła w temp. $4,0 \pm 0,5$ °C.

Do uzyskania związków fenolowych z liści morwy zastosowano trzykrotną ekstrakcję. W pierwszym etapie 2 g proszku z liści morwy zalewano 40 ml mieszaniny rozpuszczalników etanolu z wodą. Zakres temperatur oraz stężenie etanolu w wodzie przyjęte w doświadczeniu przedstawiono w tab. 1. i 2. Całość wytrząsano w łaźni

wodnej w określonej temperaturze przez 15 min i stałej amplitudzie, a supernatant dekantowano. W drugim i trzecim etapie ekstrakcji liście ponownie zalewano rozpuszczalnikiem w ilości 30 ml i wytrząsano przez 15 min. Roztwory z trzech etapów łącznie, filtrowano (Whatman 1 : 11 μm) i uzyskiwano 100 ml ekstraktu. Stałymi parametrami procesu ekstrakcji we wszystkich doświadczeniach były: stopień rozdrobnienia liści, stosunek masy surowca do ilości rozpuszczalnika, wytrząsanie z taką samą amplitudą oraz czas ekstrakcji. W zaplanowanych doświadczeniach sumaryczny czas ekstrakcji wyniósł 45 min. Wykonano trzykrotną ekstrakcję po 15 min [2]. Wydajność procesu ekstrakcji wyniosła $27,55 \pm 0,22 \%$.

Ogólną zawartość polifenoli w świeżych ekstraktach z liści morwy oznaczano przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu'a [7]. Metoda polegała na pomiarze zmiany barwy żółtego odczynnika Folina-Ciocalteu'a zredukowanego grupami hydroksylowymi związków fenolowych w środowisku węglanu sodu na barwę niebieską. Absorbancję próbek mierzono przy użyciu spektrofotometru firmy Metertek SP-830 (Tajwan), przy długości fali $\lambda = 765 \text{ nm}$). Do wykreślenia krzywej kalibracyjnej użyto roztworów alkoholowych kwasu galusowego jako wzorca ($r = 0,99$). Wyniki wyrażano jako równoważnik kwasu galusowego (GAE) w $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ suchej masy ekstraktu. W celu obliczenia suchej masy ekstraktu świeże ekstrakty pozyskane z liści morwy zagęszczano do sucha.

Oznaczenie aktywności przeciwrodnikowej świeżych ekstraktów z liści morwy wykonywano metodą spektrofotometryczną z użyciem stabilnego rodnika 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) [1]. Polegało ono na określeniu stopnia wygaszania rodników DPPH przez zawarte w ekstraktach przeciwutleniacze, czemu towarzyszyło zmniejszenie intensywności barwy purpurowej i przejście w barwę żółtą. Absorbancję próbek, po upływie 30-minutowej inkubacji w temp. $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ bez dostępu światła, mierzono przy długości $\lambda = 517 \text{ nm}$ (Metertek SP-830, Tajwan).

Zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH obliczano z równania:

$$AA = 100 - \frac{(E_w - E_0)}{E_k} 100 \%,$$

gdzie:

AA – zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH [%],

E_w – absorbancja próbki właściwej (ekstrakt z liści morwy) z roztworem DPPH,

E_0 – absorbancja próbki właściwej bez dodatku roztworu DPPH,

E_k – absorbancja próbki kontrolnej (alkoholowy roztwór DPPH).

Jednocześnie wyznaczano badaną aktywność przeciwrodnikową w mM Trolox/100 g suchej masy ekstraktu. Testy wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyboru odpowiedniego modelu (powierzchni), służącego do określenia poziomów zmiennych (temperatura, stężenie etanolu), przy których proces ekstrakcji osiąga

wartości ekstremalne (optymalne) przy przyjętych ograniczeniach, kierowano się wartościami współczynnika determinacji (R^2) oraz skorygowanego współczynnika determinacji ($Adj R^2$). Kierowano się również rezultatem testu braku dopasowania (*Lack of fit*) ($p \geq 0,05$) oraz wartością współczynnika dopasowania modelu (*Desirability*) [14]. Pozostałe wyniki poddano jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi analizowano za pomocą testu Tukeya. Do określenia stopnia wzajemnych powiązań pomiędzy poszczególnymi parametrami obliczono współczynnik korelacji Pearsona (r). Testowanie prowadzono na poziomie istotności $p \leq 0,05$. Wszystkie analizy wykonano w programie Statistica 10,0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

Wyniki i dyskusja

W pracy przeanalizowano wpływ stężenia rozpuszczalników (etanolu z wodą) oraz wpływ temperatury procesu ekstrakcji na zawartość związków fenolowych i potencjał przeciwrodnikowy, mierzony testem DPPH w ekstrakcie etanolowym z liści morwy białej odmiany wielkolista żółwińska (tab. 1).

Tabela 1. Wybrane parametry wstępne RSM ekstraktu etanolowego z liści morwy.

Table 1. Selected preliminary RSM parameters of ethanol extract from mulberry leaves.

Czynnik Factor	Nazwa czynnika Name of Factor	Jednostka Unit	Typ Type	Najniższy poziom czynnika The lowest level of Factor	Najwyższy poziom czynnika The highest level of Factor
X_1	Stężenie etanolu Ethanol concentration	[%]	Numeryczny Numeric	60	96
X_2	Temperatura ekstrakcji Temperature of extraction	[°C]		20	70

Sumaryczny czas ekstrakcji wszystkich doświadczeń był jednakowy i wynosił 45 min. Na podstawie powyższych danych program wyznaczył 13 doświadczeń, które obejmowały pięć powtórzeń dla punktu centralnego (tab. 2).

Po wykonaniu analiz empirycznych, czyli po oznaczeniu stężenia polifenoli i aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów oraz estymacji z wykorzystaniem zgromadzonych danych, wybrano na podstawie wartości współczynnika determinacji (R^2) oraz poprawionego współczynnika determinacji ($Adj R^2$) odpowiedni zredukowany model kwadratowy, a program wyznaczył optymalne poziomy czynniki X_1 (rozpuszczalnika – etanolu) oraz X_2 (temperatury). Wyniki te zweryfikowano, oznaczając w kolejno wyznaczonym ekstrakcie rzeczywistą zawartość polifenoli ogółem oraz aktywność przeciwrodnikową testem DPPH.

Tabela 2. Plan centralny kompozycyjny oraz wyniki doświadczeń obejmujące odpowiedzi odnoszące się do ekstraktów etanolowych z liści morwy.

Table 2. Central composition plan and experimental results to comprise responses referring to ethanol extracts of mulberry leaves.

Kolejność doświadczeń* Sequence of experiments	Kolejność doświadczeń** Sequence of experiments	Typ Type	Czynnik X ₁ Stężenie etanolu Factor X ₁ Ethanol concentration [%]	Czynnik X ₂ Temperatura Factor X ₂ Temperature [°C]	Odpowiedź 1 Polifenole Response 1 Phenolics [mg GAE/g s.m. ekstraktu/dry mass of extract]	Odpowiedź 2 DPPH Response 2 [mM Trolox/100 g s.m. ekstraktu/dry mass of extract]
1	13	Fact	65,00	28,00	99,37 ± 8,91	24,54 ± 0,99
2	10	Fact	91,00	28,00	34,92 ± 4,49	8,29 ± 0,31
3	8	Fact	65,00	63,00	116,40 ± 6,59	33,02 ± 0,59
4	1	Fact	91,00	63,00	68,78 ± 2,60	15,38 ± 0,35
5	3	Axial	59,62	45,50	93,38 ± 6,24	28,20 ± 0,28
6	5	Axial	96,38	45,50	29,09 ± 3,68	2,43 ± 0,54
7	2	Axial	78,00	20,75	70,92 ± 2,89	17,00 ± 0,60
8	11	Axial	78,00	70,25	112,8 ± 5,26	40,51 ± 0,64
9	7	Center	78,00	45,50	97,66 ± 0,01	23,33 ± 0,27
10	9	Center	78,00	45,50	94,13 ± 1,33	23,75 ± 1,10
11	1	Center	78,00	45,50	86,11 ± 1,70	20,65 ± 0,60
12	6	Center	78,00	45,50	82,90 ± 4,01	21,61 ± 0,74
13	4	Center	78,00	45,50	94,45 ± 2,31	18,82 ± 0,45

Objaśnienia / Explanatory notes:

* - kolejność nierandomizowana / non-randomized sequence; ** - kolejność randomizowana / randomized sequence; DPPH – 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazyl

Zawartość polifenoli w etanolowych ekstraktach z liści morwy wynosiła od 34,92 do 116,40 mg GAE/g s.m. ekstraktu, natomiast aktywność przeciwrodnikowa mieściła się w przedziale: 2,43 - 40,51 mM Trolox/100 g s.m. ekstraktu (tab. 2).

Wyniki analizy wariancji zredukowanego modelu kwadratowego przedstawiono w tab. 3. Test braku dopasowania (*Lack of Fit*) okazał się nieistotny w porównaniu z błędem czystym (*Pure Error*). Jednocześnie test braku dopasowania został potwierdzony wysokimi współczynnikami determinacji oraz skorygowanego współczynnika determinacji, które wyniosły odpowiednio: $R^2 = 96,16\%$, $Adj. R^2 = 94,88\%$ (polifenole ogółem) oraz $R^2 = 94,61\%$, $Adj. R^2 = 91,91\%$ (aktywność przeciwrodnikowa badana testem DPPH).

Tabela 3. Wyniki analizy wariancji zredukowanego modelu kwadratowego.

Table 3. Analysis of variance results of reduced quadratic model.

Wyszczególnienie Item	Polifenole ogółem Total phenolic content					Aktywność przeciwrodnikowa (DPPH) DPPH scavenging activity				
	SS	DF	MS	F	Prob	SS	DF	MS	F	Prob
Model	8101,09	3	2700,36	75,09	< 0,0001	1097,55	4	274,39	35,08	< 0,0001
A - stężenie etanolu A - ethanol concentration	5150,61	1	5150,61	143,23	< 0,0001	618,36	1	618,36	79,06	< 0,0001
B - temp. B - temp.	1515,73	1	1515,73	42,15	0,0001	297,90	1	297,90	38,09	0,0003
A ²	1434,76	1	1434,76	39,90	0,0001	89,68	1	89,68	11,47	0,0096
B ²						68,14	1	68,14	8,71	0,0184
Reszta Residue	323,64	9	35,96			62,57	8	7,82		
Brak dopasowania Lack of Fit	168,07	5	33,61	0,86	0,5721	46,33	4	11,58	2,85	0,1671
Czysty błąd Pure Error	155,56	4	38,89			16,24	4	4,06		

Objaśnienia: / Explanatory notes:

SS - suma kwadratów / sum of squares; DF - stopnie swobody / degrees of freedom; F - wartość F / F value; MS - średni kwadrat / mean square; Prob - prawdopodobieństwo / probability.

Na podstawie powyższych wyników i wybranego modelu pogram wyznaczył przewidywane wartości polifenoli oraz aktywność przeciwrodnikową (tab. 4). Ilości polifenoli oznaczone doświadczalnie nie różniły się statystycznie istotnie od wartości przewidywanych ($p \leq 0,001$) i zawarte były w przedziale ufności 95 % średniej.

Po analizie wpływu stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na zawartość polifenoli w ekstrakcie etanolowym z liści morwy stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury tego procesu wzrastała zawartość polifenoli w badanym ekstrakcie (rys. 1). Z kolei, im stężenie etanolu w układzie ekstrakcyjnym wzrastało, tym zawartość polifenoli malała.

W badaniach ustalono empirycznie, że stężenie rozpuszczalników miało decydujący wpływ na pozyskanie większej ilości polifenoli, przy czym ekstrakcja trzykrotna w sumarycznym czasie 45 min umożliwiła uzyskanie największej zawartości związków fenolowych. Podobne zależności uzyskali Katsube i wsp. [15], którzy analizowali parametry procesu ekstrakcji glikozydów flawonoli z liści morwy za pomocą etanolu o różnym stężeniu.

Tabela 4. Wartości przewidywane oraz oznaczone doświadczalnie w ekstrakcie etanolemym z liści morwy.

Table 4. Predicted and experimentally determined values in ethanol extract from mulberry leaves.

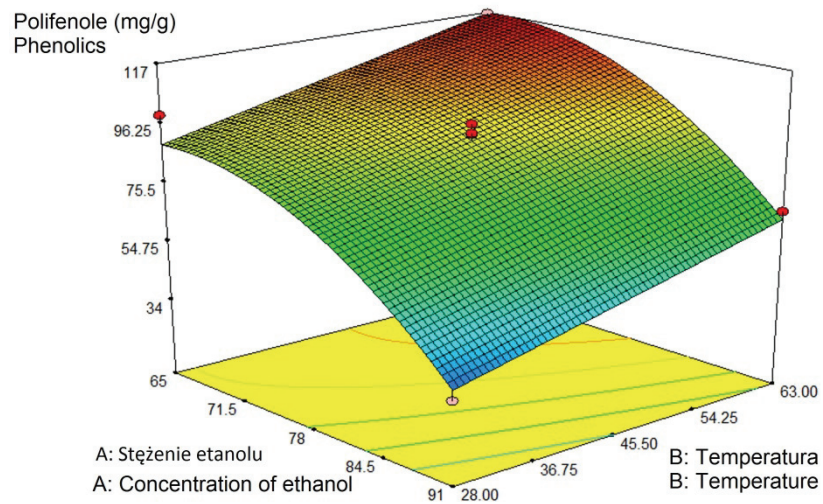
Odpowiedź Response	Wartości przewidywane Predicted values	Przewidywany błąd standardowy Predicted standard error	95 % minimum	95 % maksimum maximum	Wartości oznaczone doświadczalnie Experimentally determined values
Polifenole* Phenolics	116,81 ^a	3,54	108,81	124,81	116,91 ^a ± 0,01
Aktywność przeciwrodnikowa DPPH** DPPH scavenging activity	36,06 ^A	1,71	32,12	40,01	38,81 ^A ± 0,02

Objaśnienia: / Explanatory notes:

różne litery w wierszach wskazują statystyczną istotność różnic w teście Tukeya przy $p \leq 0,001$ / different letters in rows point out statistical significance of differences in Tukey's test at $p \leq 0.001$; * mg GAE/g s.m. ekstraktu / mg GAE/g of dry mass of extract; ** mM Trolox /100 g s.m. ekstraktu / mM Trolox /100 g of dry mass of extract.

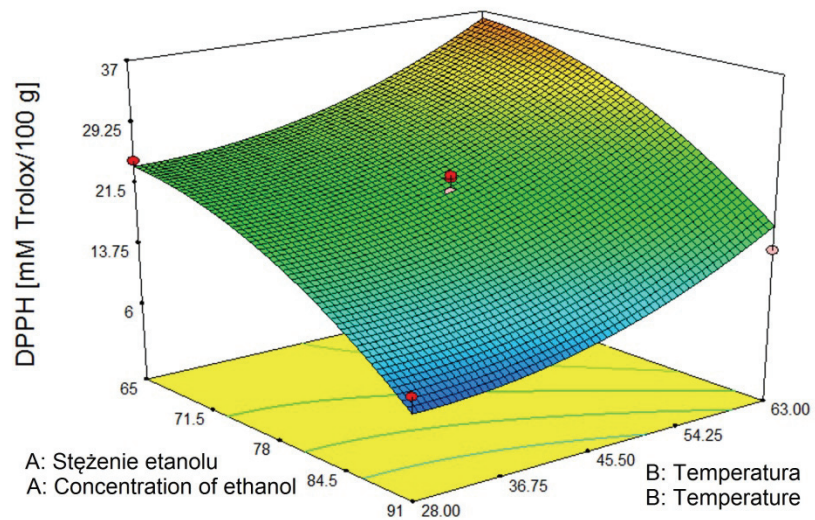
Na wyniki procesu ekstrakcji, rozumiane jako największa ilość wyekstrahowanych polifenoli i najwyższa aktywność przeciwrodnikowa, wpływała również temperatura ekstrakcji. Na ogół przyjmuje się, że wraz ze wzrostem temperatury wzrasta ilość ekstrahowanych związków. Jednakże zbyt wysoka temperatura może powodować rozkład związków termolabilnych i zmiany w składzie związków bioaktywnych. Dlatego w przeprowadzonych doświadczeniach, w których badano zakres temp. 20 - 70 °C, optymalna temperatura ekstrakcji roztworem etanolowo-wodnym wyniosła 63 °C.

Jednocześnie po przeanalizowaniu wpływu stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na aktywność przeciwrodnikową (DPPH) ekstraktu etanolowego z liści morwy stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca badanych ekstraktów wzrastała wraz ze zmniejszaniem się stężenia etanolu w wodzie (od 99 do 65 % etanolu) (rys. 2). Aktywność przeciwrodnikowa ekstraktu o stężeniu etanolu wynoszącym 65 % wyniosła powyżej 37 mM Trolox/100 g s.m. ekstraktu. Natomiast powyżej stężenia 78 % etanolu aktywność przeciwrodnikowa ekstraktu stopniowo obniżała się. Temperatura ekstrakcji również miała istotny wpływ na aktywność badanych ekstraktów i wraz z jej zwiększaniem wzrastała aktywność ekstraktów mierzona testem DPPH. Natomiast w zakresie temperatur 28,0 - 45,5 °C aktywność przeciwrodnikowa wynosiła od 2 do 8 mM Trolox/100 g s.m.



Rys. 1. Wpływ stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na zawartość polifenoli w ekstrakcie etanolem z liści morwy.

Fig. 1. Effect of ethanol concentration and temperature of extraction process on content of phenolics in ethanol extract from mulberry leaves.

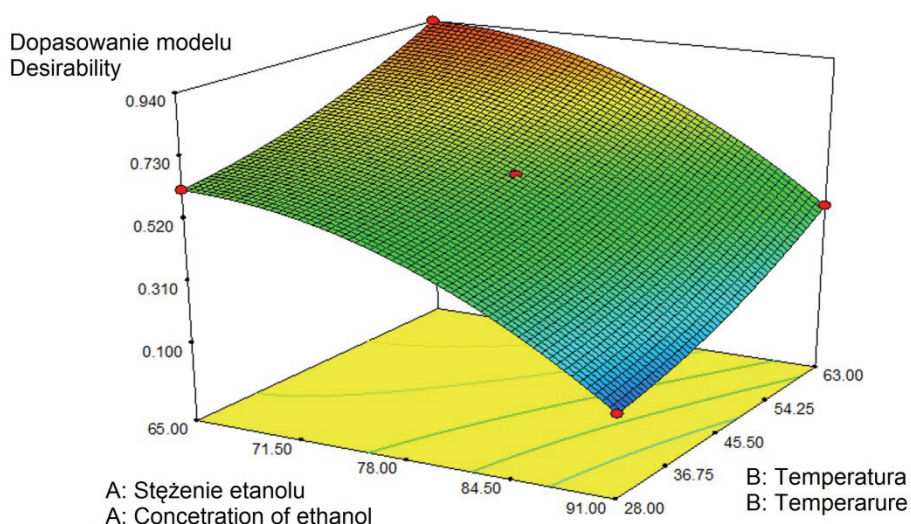


Rys. 2. Wpływ stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na aktywność przeciwrodnikową (DPPH) ekstraktu etanolem z liści morwy.

Fig. 2. Effect of concentration of ethanol and temperature of extraction process on antiradical activity (DPPH) of ethanol extract from mulberry leaves.

Dopasowanie modelu było najwyższe przy 65-procentowym stężeniu etanolu w wodzie, natomiast malało wraz z jego wzrostem (rys. 3). Zaobserwowano także, że temperatura procesu ekstrakcji w zadanym zakresie, czyli od 28 do 63 °C wpływała istotnie na dopasowanie modelu. W temperaturze poniżej 63 °C istotnie obniżało się dopasowanie modelu, w szczególności, gdy stężenie rozpuszczalnika wyniosło 91 %, to wartość dopasowania modelu była równa 0.

Program wyliczył optymalne poziomy stężenia etanolu w wodzie i temperatury procesu ekstrakcji tj. odpowiednio: 65 % oraz 63 °C. Stosując powyższe parametry procesu ekstrakcji uzyskano największe stężenie polifenoli i najwyższą aktywność przeciwrodnikową oznaczoną testem DPPH o dopasowaniu modelu wynoszącym 0,94. Optymalny proces wydobywania związków o aktywności przeciwutleniającej z liści morwy białej odmiany wielkolistej żółwińskiej pozwolił na zastosowanie stosunkowo niskich nakładów surowcowych, odczynnikowych i czasowych.



Rys. 3. Wpływ stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na dopasowanie modelu.

Fig. 3. Effect of concentration of ethanol and temperature of extraction process on Desirability of model.

Zastosowane w modelu RSM odpowiedzi pozwoliły określić współzależność liniową pomiędzy zawartością polifenoli ogółem oraz aktywnością przeciwrodnikową z rodnikiem DPPH. Wysoka wartość współczynnika korelacji Pearsona ($r = 0,92$; przy $p \leq 0,001$) potwierdziła wystąpienie istotnych zależności liniowych, co znaczy, że wraz ze wzrostem zawartości polifenoli wzrastała aktywność przeciwrodnikowa mierzona

testem DPPH. Podobne zależności w różnych surowcach zielarskich przedstawili Sierżant i wsp. [22]. Karacabey i Mazza [14] określili, że aktywność przeciwutleniająca ekstraktów etanolowych z moszczu winogron mierzona testami TEAC oraz ORAC była wysoko skorelowana z zawartością polifenoli w badanych ekstraktach, odpowiednio $r = 0,95$ oraz $r = 0,89$ przy $p \leq 0,001$. Również Sielicka i wsp. [21] stwierdzili dodatnią korelację pomiędzy zawartością polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą oznaczoną testem DPPH w herbatkach ziołowych i ziołowo-owocowych ($r = 0,70$). Dodatnia korelacja pomiędzy aktywnością przeciwrodnikową i zawartością związków fenolowych wskazuje, że mechanizm działania przeciwutleniającego związków zawartych w ekstrakcie polega na neutralizacji wolnych rodników. Tak więc otrzymany ekstrakt alkoholowy, jako bioaktywny komponent, może być szeroko stosowany w żywności o znaczeniu prozdrowotnym.

Wnioski

1. Zastosowanie modelu RSM w celu optymalizacji procesu ekstrakcji liści z morwy pozwoliło określić optymalne warunki procesu ekstrakcji związków bioaktywnych przy wykonaniu minimalnej liczby doświadczeń.
2. Stwierdzono wysoką współzależność liniową pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a aktywnością przeciwrodnikową mierzoną testem DPPH.
3. Wybrany ekstrakt mógłby być komponentem wieloskładnikowych produktów bioaktywnych.

Praca została wykonana w ramach projektów nr N N312 209138 oraz PO IG 01.01.02-00-061/09 „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych”.

Literatura

- [1] Amarowicz R., Pegg R.B., Bautista D.A.: Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K12. *Nahrung*, 2000, **44** (1) 60-62.
- [2] Amarowicz R., Piskuła M., Honke J., Rudnicka B., Troszyńska A., Kozłowska H.: Extraction of phenolic compounds from lentil seeds (*Lens culinaris*) with various solvents. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1995, **45**, 53-62.
- [3] Arfan M., Khan R., Rybarczyk A., Amarowicz R.: Antioxidant activity of mulberry fruit extracts. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, **13**, 2472-2480.
- [4] Asano N., Yamashita T., Yasuda K., Ikeda K., Kizu H., Kameda Y., Kato A., Nash R.J., Lee H.S., Ryu K.S.: Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 4208-4213.
- [5] Bogucki M.: Optymalizacja jednokryterialna. Model jednoczynnikowy. *Motrol*, 2009, **11**, 22-30.
- [6] Butt M.S., Nazir A., Sultan M.T., Schroen K.: *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Trends Food Sci. Technol.*, 2008, **19**, 505-512.

- [7] Cheung L.M., Cheung P.C.K., Ooi V.E.C.: Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.*, 2003, **81** (2), 249-255.
- [8] Dhandhukia P.C., Thakkar V.R.: Response surface methodology to optimise the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasiodiplodia theobromae*. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, **105** (3), 636-643.
- [9] Ghodke S.K., Ananthanarayan L., Rodrigues L.: Use of response surface methodology to investigate the effects of milling conditions on damaged starch, dough stickiness and chapatti quality. *Food Chem.*, 2009, **112** (4), 1010-1015.
- [10] Huang W., Li Z., Niu H., Li D., Zhang J.: Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *J. Food Eng.*, 2008, **89** (3), 298-302.
- [11] Jeszka M., Flaczyk E.: HPLC analysis – determination of flavonols in *Morus alba* leaves, III. International Scientific Conference of PhD. Students, Nitra, Slovakia 2008, 28 November, pp. 118-120.
- [12] Jeszka M., Kobus J., Flaczyk E.: Określenie potencjału antyoksydacyjnego ekstraktów z liści morwy białej. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009, **XLII**, 885-889.
- [13] Jeszka-Skowron M., Flaczyk E., Jeszka J., Krejpcio Z., Król E., Buchowski M.S.: Mulberry leaf extract intake reduces hyperglycaemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats fed high-fat diet. *J. Funct. Foods*, 2014 (w druku).
- [14] Karacabey E., Mazza G.: Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chem.*, 2010, **119** (1), 343-348.
- [15] Katsube T., Imawaka N., Kawano Y., Yamazaki Y., Shiwaku K., Yamane Y.: Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.*, 2006, **97** (1), 25-31.
- [16] Katsube T., Tsurunaga Y., Sugiyama M., Furunod T., Yamasaki Y.: Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chem.*, 2009, **113**, 964-969.
- [17] Katsube T., Yamasaki M., Shiwaku K., Ishijima T., Matsumoto I., Abe K., Yamasaki Y.: Effect of flavonol glycoside in mulberry (*Morus alba* L.) leaf on glucose metabolism and oxidative stress in liver in diet-induced obese mice. *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 2386-2392.
- [18] Kumar V.R., Chauhan S.: Mulberry: Life enhancer. *J. Med. Plant Res.*, 2008, **2** (10), 271-278.
- [19] Le Thanh-Blicharz J., Białas W., Lewandowicz G.: Response surface optimization of manufacturing of dietary starch products. *Acta Scient. Polon., Technol. Aliment.*, 2009, **8** (4), 51-62.
- [20] Lee W.C., Yusof S., Hamid N.S.A., Baharin B.S.: Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology (RSM). *J. Food Eng.*, 2006, **75** (4), 473-479.
- [21] Sielicka M., Pacholek B., Zagórska A.: Właściwości przeciwutleniające wybranych herbatek będących suplementami diety. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **5** (72), 112-122.
- [22] Sierżant K., Pyrkosz-Biardzka K., Gabrielska J.: Właściwości przeciwutleniające naturalnych ekstraktów polifenolowych z wybranych roślin w układach modelowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **6** (85), 41-53.
- [23] Silva E.M., Rogez H., Larondelle Y.: Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.*, 2007, **55**, 381-387.


**OPTIMIZING PROCESS OF EXTRACTING PHENOLIC COMPOUNDS HAVING
ANTIRADICAL ACTIVITY FROM WHITE MULBERRY LEAVES BY MEANS
OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY (RSM)**

S u m m a r y

Mulberry leaves contain polyphenols, alkaloids, terpenoids, and steroids. Their extracts can be a valuable component of the pro health food.

The objective of the research study was to optimize the process of extracting phenolic compounds from mulberry leaves and to assess the antiradical activity of derived extracts by a DPPH test, with the use of a response surface methodology (RSM).

Based on RSM, the highest contents of polyphenols and the highest antioxidant activity were obtained within the selected ranges of the ethanol concentration in water and at a selected temperature of the extraction process. The predicted values did not differ significantly from the experimentally determined values ($p \leq 0.001$). The rate of ethanol concentration in the selected extract was 65 %, and the temperature of extraction process was 63 °C.

Key words: white mulberry leaves, extraction process, total phenolics, antiradical activity, Response Surface Methodology 

BARTOSZ KRUSZEWSKI, ALEKSANDRA JEDLIŃSKA, MICHAŁ ANTCZAK,
EDYTA LIPIŃSKA, DOROTA WITROWA-RAJCHERT

NOWA METODA OTRZYMYWANIA PROSZKÓW MIODOWYCH ORAZ OCENA ICH AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ

Streszczenie

Celem pracy była ocena możliwości uzyskania proszków miodowych metodą suszenia rozpyłowego roztworów pofermentacyjnych miodu gryczanego o różnej zawartości ekstraktu ogólnego. Założeniem było uzyskanie proszków miodowych o właściwościach biologicznych zbliżonych do właściwości materiału wyjściowego.

Sporządzono brzeczkę miodową, którą poddano fermentacji. Roztwory o zadanym ekstrakcie ogólnym po dodaniu nośnika poddano suszeniu rozpyłowemu. W miodzie, roztworach pofermentacyjnych oraz w proszkach miodowych oznaczono liczbę diastazową, zawartość HMF, pH, kwasowość ogólną oraz ogólną zawartość polifenoli.

Stwierdzono, że analizowany miód gryczany charakteryzował się dobrą jakością. Zawartość polifenoli wynosiła 40,86 mg kwasu galusowego/100 g. Roztwory pofermentacyjne cechowały się wysokim pH, brakiem obecności HMF i prawie dwukrotną zawartością polifenoli w porównaniu z miodem. Uzyskano proszki, w których około 50 % suchej substancji stanowiły składniki miodu. Charakteryzowały się one dużą zawartością polifenoli (36,62 - 51,30 mg kwasu galusowego/100 g miodu) oraz poziomem HMF zgodnym ze standardem Codex Alimentarius lub w niewielkim stopniu przekraczającym ten limit. Otrzymane proszki nie utraciły aktywności enzymatycznej (liczba diastazowa około 5,0).

Słowa kluczowe: miód, fermentacja nastawu, suszenie rozpyłowe, proszki miodowe, polifenole, hydroksymetylofurfural, liczba diastazowa

Wprowadzenie

Parametry, jakie powinien wykazywać miód pszczeli, określone zostały na szczeblu międzynarodowym w Kodeksie Żywnościowym [3], na szczeblu europejskim – w dyrektywie 2001/110/EC [4] oraz polskimi aktami prawa żywnościowego w rozporządzeniach Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi [18, 19]. Z dniem 1 stycznia 2003 roku

Mgr inż. B. Kruszewski, mgr inż. M. Antczak, dr inż. E. Lipińska, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, mgr inż. A. Jedlińska, prof. dr hab. D. Witrowa-Rajchert, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa. Kontakt: bartosz_kruszewski@sggw.pl

przestała obowiązywać Polska Norma dotycząca miodu pszczelego [16]. Jednak w wielu punktach była ona bardziej restrykcyjna od unijnej.

Miód gryczany należy do grupy miodów nektarowych. Jest uznawany za jeden z najbardziej wartościowych rodzajów miodu pod względem odżywczym [8]. Charakteryzuje się ciemnobrązową barwą, ostrym, „drapiącym” i słodkim smakiem oraz bardzo intensywnym zapachem kwiatów gryki. W jego składzie chemicznym występuje dużo fruktozy w stosunku do glukozy (F/G około 1,8), a także znaczne ilości magnezu, żelaza i innych pierwiastków. Odnacza się znaczną kwasowością i wyjątkowo dużą zawartością białka. Jako miód letni bogaty jest w liczne enzymy, olejki eteryczne i flawonoidy. Badania przeprowadzone w Oddziale Pszczelnictwa Instytutu Ogrodnictwa w Puławach [20] wskazują, że nawet po roku przechowywania tego produktu w temperaturze pokojowej aktywność diastazy kształtuje się znacznie powyżej normy. Jedną z niepożądanych substancji w miodach, wpływającą szkodliwie na organizm człowieka jest 5-hydroksymetylofurfural (HMF).

Polska należy do europejskiej czołówki producentów miodu – ponad 23 tysiące ton w 2011 roku (17,2 tys. ton w 2012). Tylko 1 % wyprodukowanego w Polsce miodu zużywa przemysł farmaceutyczny, kosmetyczny i spożywczy, w tym fermentacyjny [17]. Powodem, dla którego wykorzystanie miodu jako surowca w przemyśle spożywczym jest bardzo małe, są jego właściwości fizykochemiczne. Szczególnie związane jest to z jego wysoką gęstością i lepkością, utrudniającą dozowanie oraz z koniecznością upłynniania po krystalizacji. Dobrym rozwiązaniem problemu może być miód w proszku. Może on być swobodnie mieszany z innymi surowcami, a ponadto wchodzić w skład suplementów diety, przekąsek, batonów czy stanowić środek słodzący w produktach dietetycznych [22]. Jednak duża zawartość glukozy i fruktozy (około 74 % świeżej masy), które charakteryzują się niską temperaturą przemiany szklistej, uniemożliwia otrzymanie produktu w postaci sypkiego proszku. Trudno jest uzyskać informacje na temat rozwiązań technologicznych suszenia miodów. Prace poświęcone temu zagadnieniu pojawiają się niezwykle rzadko. Co więcej, większość wyników badań objęta jest ochroną patentową. Patenty dotyczą głównie aspektów suszenia rozpyłowego – zastosowanych mieszanin nośników, parametrów procesu, początkowych stężeń roztworów oraz rozwiązań konstrukcyjnych urządzeń [9]. Miód w proszku próbowano otrzymywać metodą suszenia rozpyłowego, tunelowego, próżniowego, bębnowego, mikrofalowego i liofilizacyjnego [7, 21, 22, 29]. Najczęściej stosowaną metodą jest suszenie rozpyłowe. Temperaturę przemiany szklistej podwyższano dotychczas poprzez dodatek wysokocząsteczkowych substancji nośnikowych lub obniżenie temperatury suszenia [9].

Innym, nowym sposobem umożliwienia suszenia miodu proponowanym w niniejszej publikacji, jest redukcja zawartości cukrów poprzez poddanie go fermentacji alkoholowej do zadanej zawartości ekstraktu ogólnego. Jednakże fermentacja miodu po-

woduje pewne zmiany w składzie substancji biologicznie aktywnych i zniekształca wrażenia sensoryczne (smak, zapach). Z drugiej strony, oprócz zmniejszenia zawartości cukrów podczas fermentacji powstaje alkohol, który dodatkowo poprawia zdolność miodu do suszenia rozpyłowego, odparowując całkowicie podczas tego procesu.

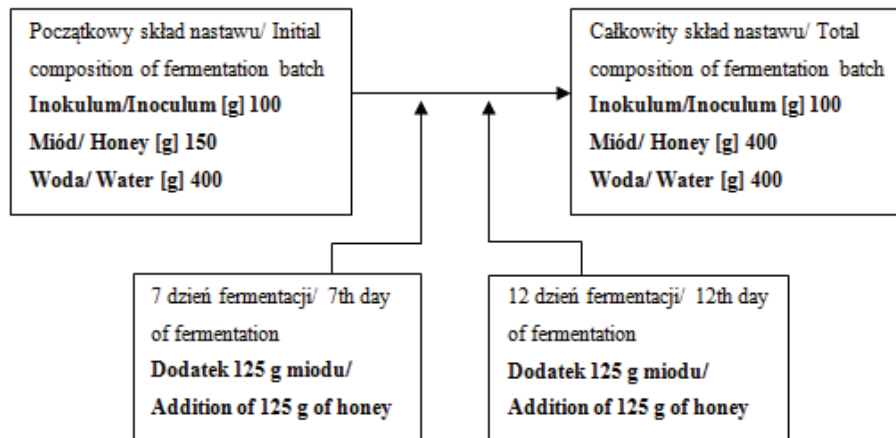
Celem pracy była ocena możliwości uzyskania proszków miodowych metodą suszenia rozpyłowego roztworów pofermentacyjnych miodu gryczanego. Założono otrzymanie proszków miodowych o właściwościach biologicznych zbliżonych do właściwości materiału wyjściowego.

Materiał i metody badań

Podstawowy materiał do badań stanowił miód gryczany, pochodzący z niewielkiej pasieki w Supraślu (10 rodzin pszczelich), której produkcja zaspokaja głównie własne potrzeby producenta. Miód z pasieki o masie 10 kg, stanowiący mieszaninę równych części miodu pozyskanego od każdej pszczelej rodziny, został pobrany w sierpniu 2011 roku do jednego sterylne go pojemnika. Do czasu pobrania próbek miód przechowywano w chłodni w temp. 7 ± 1 °C i wilgotności względnej powietrza 70 %, bez dostępu światła. W celu poddania fermentacji i dalszego przetworzenia, pobrano osiem próbek miodu z kilku miejsc pojemnika po uprzednim upłynnieniu, przy ciągłym mieszaniu w temp. około 30 °C.

Fermentację rozcieńczanych miodów prowadzono przy użyciu szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* nr 33, pochodzącego z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie. „Matki drożdżowe” namnażano na podłożu przygotowanym z miodu rozcieńczonego wodą 1 : 2. Hodowlę inokulum prowadzono w wstrząsarce laboratoryjnej Bühler SM 30C Control (Niemcy) przy 200 rpm w temp. 28 °C przez 48 h. Proces fermentacji każdego nastawu rozpoczynano od dodatku inokulum do przygotowanych wodnych roztworów miodu. Nastawy przygotowywano, rozcieńczając miód wodą do uzyskania 30-procentowego ekstraktu i szczepiono je inokulum w ilości 10 % (v/v). Miód dodawano w czasie fermentacji w trzech porcjach – pierwsza na etapie tworzenia nastawu, następnie kolejne po 7 i 12 dniach od zadania kultury starterowej. Skład przygotowywanych roztworów fermentacyjnych przedstawiono na rys. 1.

Przygotowano równolegle 8 identycznych nastawów, a ich fermentacja w temp. 28 °C trwała maksymalnie 48 dni. W czasie fermentacji dokonywano oznaczenia ekstraktu pozornego metodą refraktometryczną (przed i po dodatku każdej porcji miodu) oraz ubytku masy nastawów (próby ważono w regularnych odstępach czasu co 24 h).



Rys. 1. Etapy dodawania miodu w czasie fermentacji.

Fig. 1. Stages of adding honey during fermentation.

Po osiągnięciu określonej zawartości suchej substancji (odpowiednio: 30, 27, 24 %) dwie wybrane próby rozcieńczano do 20 %, dodawano nośnik do zawartości suchej substancji 33 % i każdą suszono rozpyłowo w dwóch powtórzeniach. Nośnik stanowiły: guma arabska instant („Nexira food”, Francja) i skrobia tapiokowa typu OSA (Niemcy) w stosunku wagowym 2 : 1. Skład roztworów poddawanych suszeniu był następujący: 300 g 20-procentowego roztworu pofermentacyjnego miodu, 60 g nośnika. Mieszaniny homogenizowano przy użyciu homogenizatora MPW-120 (Polska) przez 5 min, przy 15000 obr./min. Podczas suszenia rozpyłowego w suszarce laboratoryjnej Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Szwajcaria) na stałym poziomie utrzymywano następujące parametry: temp. powietrza wlotowego – 180 °C, strumień podawania surowca – $5,55 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{s}$, strumień rozpylanego surowca – $230,77 \text{ cm}^3/\text{s}$, przepływ powietrza – $9,72 \cdot 10^3 \text{ cm}^3/\text{s}$. Po suszeniu oddzielnie zbierano proszki z komory i odbieralnika.

W miodzie, roztworach pofermentacyjnych oraz w otrzymanych proszkach oznaczano wg PN-88/A-77626 [16]: zawartość wody, liczbę diastazową, zawartość HMF, pH, kwasowość ogólną. Analizę ogólnej zawartości polifenoli wykonano metodą z odczynnikiem Folina-Ciocalteu’a przy maksimum absorbancji wyznaczonej przy długości fali $\lambda = 735 \text{ nm}$, w spektrofotometrze Helios Omega firmy Thermo Scientific. Całkowitą zawartość polifenoli wyrażano w przeliczeniu na kwas galusowy, dlatego też z jego użyciem wykonano krzywą wzorcową w zakresie stężeń 0 - $100 \text{ mg}/\text{dm}^3$ [11]. Oznaczenia analityczne wykonywano w czterech powtórzeniach z każdej próby. Należy pamiętać, że wykonane analizy chemiczne materiału badanego odnoszą się szczególnie do dnia ich wykonania i ewentualnie krótkiego okresu po analizach [24].

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie za pomocą programu Statgraphics 15.1, wykonując jednoczynnikową analizę wariancji, a do szacowania istotności różnic między wartościami średnimi zastosowano test Tukeya HSD na poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Doniesienia naukowe o suszeniu miodu traktują tylko o właściwościach fizycznych pozyskiwanych proszków miodowych, natomiast aspekt wartości odżywczej jest pomijany. Dlatego wyniki badań odniesiono jedynie do miodu gryczanego, stanowiącego surowiec wyjściowy.

Miód gryczany charakteryzował się dobrą jakością i odpowiadał wymaganiom określonym w odpowiednich normach (tab. 1).

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne miodu gryczanego ($\bar{x} \pm s / SD$).

Table 1. Physicochemical properties of buckwheat honey ($\bar{x} \pm s / SD$).

Liczba diastazowa Diastase number	HMF [mg/100 g]	pH	Kwasowość ogólna Total acidity [ml 1M NaOH/100 g]	Zawartość wody Water content [%]	Polifenole Polyphenols [mg/100 g]
50,0	0,42 ± 0,08	3,81 ± 0,04	5,0 ± 0,1	17,3 ± 0,1	40,86 ± 0,73

Objaśnienie: / Explanatory note:

$\bar{x} \pm s / SD$ – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation.

Liczba diastazowa, czyli aktywność głównie alfa-amylazy w miodzie wynosiła 50,0 (zakres normy 41,6 - 73,8), co świadczy o tym, że miód nie został przegrzany oraz o braku ewentualnego zafałszowania syropem cukrowym.

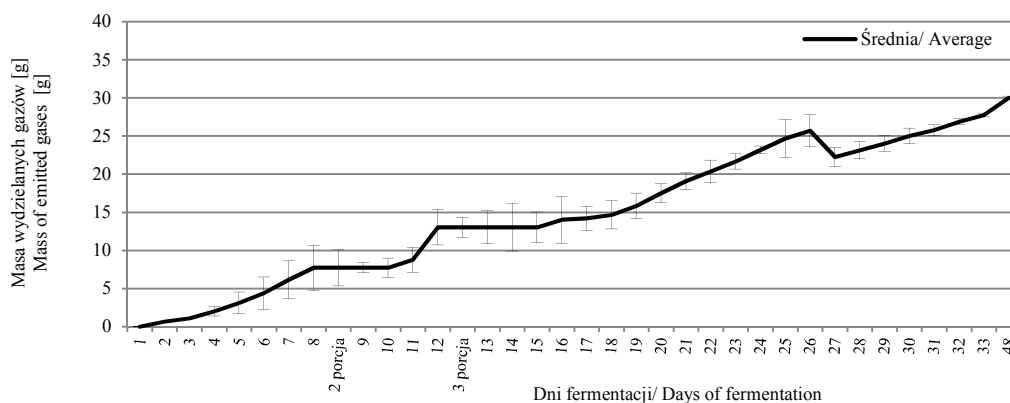
W badanym miodzie pH osiągnęło wartość 3,81, a więc dolną granicę prawidłowego zakresu. Natomiast kwasowość oznaczona za pomocą miareczkowania potencjometrycznego do pH 8,3 wyniosła 5 ml 1M NaOH/ 100 g miodu, czyli 50 mval/kg. Wynik ten jest bardzo zbliżony do wartości średniej polskich miodów gryczanych, uzyskanej przez Oddział Pszczelnictwa Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Puławach [20] oraz wyników badań Majewskiej [12, 14]. Wysoka kwasowość miodu uniemożliwia jego długie przechowywanie oraz przyspiesza powstawanie hydroksymetylofurfuralu (HMF) [5].

W świeżym miodzie HMF nie występuje wcale lub jest go mało. Oznaczona zawartość wynosiła 0,42 mg/100 g (limit ≤ 3 mg/100 g). Tak mała zawartość HMF świadczy o prawidłowym pozyskiwaniu i przechowywaniu miodu [12, 13].

Na podstawie refraktometrycznego współczynnika załamania światła określono zawartość wody w badanym miodzie, która wynosiła 17,3 %, co można uznać za wynik prawidłowy. Dozwolona maksymalna wartość wynosi 20 %.

Średnia zawartość polifenoli ogółem wynosiła 40,86 mg kwasu galusowego w 100 g miodu. Meda i wsp. [15] oznaczyli od 32,49 do 93,66 mg kwasu galusowego w 100 g miodów nektarowych, przy czym najwyższe wartości dotyczyły miodów gryczanych. Potwierdzają to również Gheldof i Engeseth [6], którzy wykazali średnią zawartość polifenoli ogółem w miodach gryczanych na poziomie 79,5 mg w 100 g. Można więc stwierdzić, że badany gatunek miodu charakteryzował się małą zawartością polifenoli. Nie musi to jednak oznaczać, że aktywność przeciwutleniająca miodu była mała, gdyż oprócz polifenoli duży wpływ na nią mają peptydy, kwasy organiczne, enzymy, produkty reakcji Maillarda, takie jak melanoidyny oraz inne związki [1, 10].

Na podstawie wagowej zmiany masy fermentowanych miodów określano łączną ilość wydzielanego dwutlenku węgla, pary wodnej i lotnych metabolitów [2]. Monitoring tych zmian przedstawiono na rys. 2. W czasie całego przebiegu fermentacji zaobserwowano ciągłe zwiększanie się masy wydzielanych gazów. Tylko w 27. dniu nastąpił niewielki ubytek ich masy, co mogło być spowodowane rozszczelnieniem korka lub nadmiernym mieszaniem roztworu.

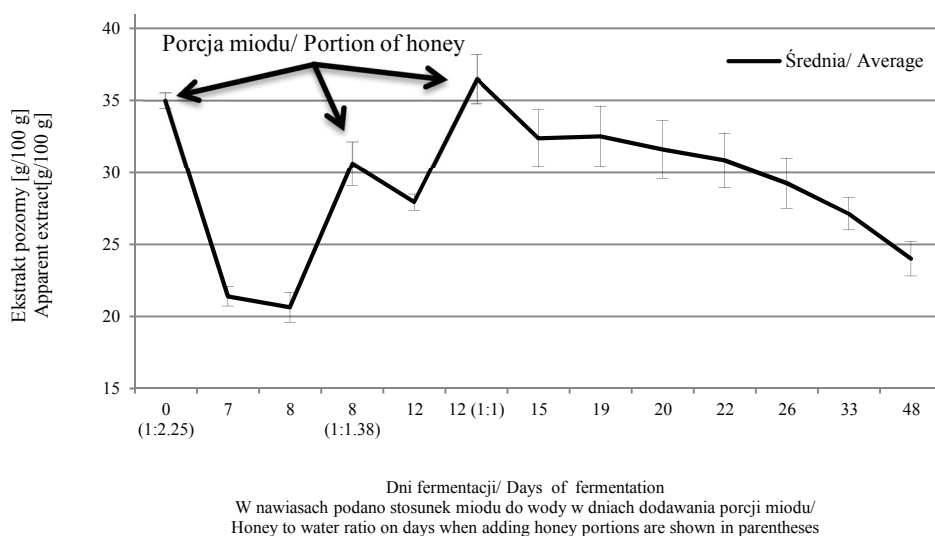


Rys. 2. Ubytek masy nastawów miodowych w czasie fermentacji.

Fig. 2. Weight loss of honey batches during fermentation.

Zmiany ekstraktu w nastawie w czasie fermentacji przedstawiono na rys. 3. Największy ubytek zawartości suchej substancji z 35 do 21,4 g/100 g zaobserwowano pomiędzy 1. a 7. dniem fermentacji. Świadczy to o przebiegu fermentacji burzliwej. Po każdym dodatku kolejnych porcji miodu do nastawów zmniejszanie zawartości suchej substancji nie było już tak szybkie. Spowodowane jest to obniżeniem liczby aktywnych

komórek drożdży, z uwagi na brak suplementacji podłoża. Dodatkowo, Wzorek i Pogorzelski [28] sugerują, że fermentacja w środowisku o dużej zawartości cukru może być zakłócona, ze względu na niezbyt korzystne wysokie ciśnienie osmotyczne. W celu poprawy procesu fermentacji sugerowane jest dodawanie miodu w dwóch, a nie w trzech porcjach oraz suplementacja podłoża i zachowanie prawidłowego bilansu C : N : P.



Rys. 3. Zmiany zawartości suchej substancji rozpuszczalnej w wodzie w nastawie w czasie fermentacji.
Fig. 3. Changes in content of water soluble dry matter in batch during fermentation.

Roztwory pofermentacyjne miodu gryczanego przed przygotowaniem do suszenia rozpyłowego zbadano pod względem składu i właściwości. Metody podane w PN-88/A-77626 [16] odpowiednio zaadaptowano, aby porównać uzyskane wyniki z wartościami miodu wyjściowego.

Można stwierdzić, że postępujący proces fermentacji wpłynął na obniżenie pH i wzrost kwasowości ogólnej (tab. 2). Różnica pH między roztworem 30- a 27-procentowym była znacznie mniejsza (0,06) niż między 27- a 24-procentowym (0,17). Przyczyną takiej różnicy była ściśle związana z czasem trwania fermentacji. Roztwór o stężeniu 27 % suchej substancji otrzymano w 33. dniu fermentacji, podczas gdy roztwór 24-procentowy – w 48. dniu. Korelacja między pH a kwasowością ogólną była bardzo duża – $r = 0,99$.

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne roztworów pofermentacyjnych ($\bar{x} \pm s / SD$).Table 2. Physicochemical properties of post-fermentation solutions ($\bar{x} \pm s / SD$).

Zawartość ekstraktu Extract content [%]	Liczba diastazowa Diastase number	pH	Kwasowość ogólna Total acidity [ml 1M NaOH/100 g]	Polifenole Polyphenols [mg/100 cm ³]	HMF [mg/100 g]
30	38,5 ^a	3,27 ^a ± 0,03	34,0 ^a ± 0,8	74,26 ^a ± 1,39	*
27	50,0 ^b	3,21 ^a ± 0,03	38,0 ^a ± 0,9	77,16 ^a ± 1,05	*
24	poza górną skalą beyond upper limit	3,04 ^a ± 0,02	56,0 ^b ± 1,1	87,49 ^b ± 1,44	*

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s / SD$ – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; n = 4

*nie wykryto/ not detected; wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) / mean values in columns and denoted by different letters are statistically significantly different at ($p < 0.05$).

Liczba diastazowa oraz zawartość polifenoli w badanych roztworach zwiększały się wraz z malejącą zawartością ekstraktu. Jest to skutek postępującego procesu fermentacji – nagromadzenia enzymów w roztworze przy jednoczesnym wyczerpaniu się substratów, a także syntezy produktów innych szlaków metabolicznych niż fermentacja alkoholowa. Stwierdzono prawie dwukrotny wzrost stężenia polifenoli w roztworach w porównaniu z miodem. Podobne wyniki uzyskali Wantusiak i wsp. [26], którzy badali właściwości przeciwutleniające miodów pszczelich i miodów pitnych. Wykazali, że całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) miodu i fermentowanych produktów miodowych zależał głównie od stężenia polifenoli. Natomiast CPA miodów pitnych było tym większe, im większa była proporcja miodu w stosunku do wody.

W żadnym z trzech analizowanych roztworów pofermentacyjnych (24, 27, 30 %) nie wykryto HMF. Podczas fermentacji nie powinny zachodzić żadne procesy syntezy tego związku. Natomiast ilość HMF wniesiona wraz z miodem została bardzo rozcieńczona – poniżej progu oznaczalności zastosowanej metody.

Otrzymano proszki tylko z dwóch roztworów pofermentacyjnych – 30- i 27-procentowego. Zrezygnowano z suszenia roztworów o 24-procentowym ekstrakcie pozornym (oblepanie wnętrza suszarki). Przyczyną zakłócenia procesu suszenia było za duże stężenie ubocznych metabolitów procesu fermentacji [2]. Znając zawartość suchej substancji miodu w proszkach (średnio $48,29 \pm 0,24$ %), przeliczano uzyskane wyniki na masę świeżego miodu obecnego w proszkach (tab. 3).

Proces suszenia roztworów pofermentacyjnych o stężeniu 30 i 27 % spowodował obniżenie kwasowości ogólnej odpowiednio o 27 i 34 %. Spowodowane to zostało odparowaniem tej części zakwaszającej roztworu, która stanowiła frakcję najbardziej lotną. Potwierdzeniem tego zjawiska jest podwyższone pH proszków. Zarówno pod względem kwasowości ogólnej, jak i pH nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ($p = 0,05$) pomiędzy proszkami z odbieralnika i komory oraz proszkami uzyskanymi z roztworów o różnym stężeniu.

Tabela 3. Właściwości fizykochemiczne proszków miodowych, wyrażane na 100 g miodu ($\bar{x} \pm s / SD$).
Table 3. Physicochemical properties of honey powders expressed per 100 g of honey ($\bar{x} \pm s / SD$).

Proszek Powder	pH	Kwasowość ogólna Total acidity [ml 1M NaOH/100 g]	Polifenole Polyphenols [mg/100 g]	Liczba diastazowa Diastase number	HMF [mg/100 g]
o30	3,88 ^a ± 0,02	24,8 ^a ± 0,3	36,62 ^a ± 0,61	2,5 ^a	4,64 ^a
k30	3,89 ^a ± 0,02	24,7 ^a ± 0,4	51,30 ^c ± 0,88	5,0 ^b	4,52 ^a
o27	3,86 ^a ± 0,02	25,0 ^a ± 0,3	40,03 ^b ± 0,74	5,0 ^b	3,40 ^b
k27	3,83 ^a ± 0,02	25,4 ^a ± 0,4	43,58 ^b ± 0,75	6,5 ^c	3,21 ^b

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s / SD$ – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; $n = 4$;
o – odbieralnik / receptacle; k – komora / chamber; 30, 27 – stężenia roztworów / concentration of solutions; wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) / mean values in columns and denoted by different letters are statistically significantly different at ($p < 0.05$).

Pod względem liczby diastazowej uzyskanych proszków można zauważyć znaczące zmniejszenie jej wartości do zakresu 2,5 do 6,5. Samborska [23] wskazuje przyczyny inaktywacji enzymów w czasie suszenia rozpyłowego. Obniżenie liczby diastazowej może być spowodowane nie tyle działaniem podwyższonej temperatury (180 °C), co zbyt mocnym wysuszeniem roztworów, tzn. usunięciem nie tylko wody wolnej, ale także wody strukturalnej, odpowiedzialnej za utrzymanie natywnej struktury. Niekorzystnym czynnikiem jest również działanie naprężeń ścinających podczas procesu rozpylania. Zbyt duża intensywność naprężeń niszczy struktury cząsteczek. Innymi słowy wielkość liczby diastazowej może być swoistym markerem poprawności ustawienia parametrów suszenia miodu. Liczba diastazowa pozyskanych w doświadczeniu proszków wskazuje więc na potrzebę regulacji zastosowanych parametrów procesu suszenia. Otrzymane proszki mają aktywność enzymatyczną i w zależności od

potrzeb, może być to niepożądane lub dodatkowo przemawiać za ich zastosowaniem. Proszki pobrane z komory, niezależnie od stężenia użytych roztworów, wykazywały statystycznie istotnie większą liczbę diastazową niż te z odbieralnika.

Kolejną pozytywną właściwością proszków miodowych była duża zawartość polifenoli. Obserwowano ich redukcję o około 30 % w stosunku do zawartości w roztworach, ale pomimo strat stężenie w proszkach było na poziomie równym lub nawet wyższym niż w miodzie gryczanym. Wintersteen i wsp. [27] ogrzewali w wysokiej temperaturze gryczane miody pitne i zauważyli brak zmian lub nawet wzrost stężenia polifenoli. Zawartość polifenoli w proszkach różniła się znacząco tylko w przypadku, gdy użyto roztworu o 30-procentowym ekstrakcie. Pomimo zetknięcia się z gorącym powietrzem, aktywność przeciwutleniająca proszków może być wysoka nie tylko przez wzgląd na zawartość polifenoli, ale także na obecność innych substancji przejawiających takie zdolności. Turkmen i wsp. [25] dowiedli, że działanie podwyższonej temperatury na miód spowodowało przebieg procesów syntezy substancji o właściwościach przeciwutleniających, głównie w reakcjach Maillarda, które zwiększyły jego aktywność przeciwutleniającą.

Średnie zawartości HMF w proszkach otrzymanych z roztworów 30- i 27-procentowego różniły się od siebie statystycznie istotnie ($p = 0,05$). Dopuszczalne stężenie HMF w miodzie według standardu Codex Alimentarius [3] wynosi 4 mg/100 g. Proszki otrzymane z 30-procentowego roztworu przekraczały tę normę. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic ($p = 0,05$) stężenia HMF w proszkach pobranych z odbieralnika i komory suszarki.

W przedstawionej pracy zaproponowano nową metodę otrzymywania proszków miodowych o zmniejszonej zawartości cukrów prostych oraz określono właściwości fizykochemiczne i biologiczne materiału badawczego na każdym etapie postępowania. Ogólnie można stwierdzić, że jest to metoda obiecująca, ale wymagająca dalszych badań i udoskonaleń. Parametry procesu fermentacji alkoholowej nastawów miodowych należy ściśle kontrolować, w celu monitorowania zawartości substancji stanowiących źródło węgla, azotu i fosforu dla stosowanych kultur drożdży – w celu zapewnienia optymalnych warunków ich metabolizmu. Należy również zwracać uwagę, aby stężenia związków utrudniających proces suszenia, jak na przykład glicerol, były jak najmniejsze. Zmian wymagają także parametry suszenia rozpyłowego roztworów pofermentacyjnych, aby poprawić jakość otrzymywanych proszków. Wpływ procesu suszenia na aktywność biologiczną miodu, ocenianą na podstawie zawartości polifenoli, był porównywalny z wynikami uzyskiwanymi podczas suszenia innych surowców. Jednakże, aby w pełni dokonać takiej oceny, należałoby zbadać zmiany zawartości innych substancji, takich jak: witaminy, poszczególne cukry czy aminokwasy oraz prześledzić zmiany aktywności przeciwutleniającej.

Wnioski

1. Proponowana procedura fermentacji i suszenia pozwala na otrzymanie proszków miodowych dobrej jakości i o 50-procentowej zawartości suchej substancji pochodzącej z miodu.
2. Proces fermentacji alkoholowej zmniejszył poziom cukrów prostych do wartości umożliwiających wysuszenie miodu, przy ograniczonym dodatku wysokocząsteczkowego nośnika.
3. Proszki miodowe charakteryzowały się większą kwasowością i zawartością polifenoli niż miód użyty do ich wytworzenia.
4. Suszenie rozpyłowe znacząco zmniejszyło aktywność enzymatyczną roztworów miodowych, ale całkowicie ich jej nie pozbawiło.
5. Ze względu na wysoką zawartość HMF w otrzymanych proszkach, należy zoptymalizować parametry suszenia roztworów miodu w celu zminimalizowania procesu jego powstawania.

Literatura

- [1] Al-Mamary M., Al-Meeri A., Al-Habori M.: Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr. Res.*, 2002, **22**, 1041-1047.
- [2] Bonin S., Ślusarska M.: Wpływ dodatku soli magnezu i wapnia do wysokocukrowych nastawów na proces fermentacji winiarskiej i przyrost biomasy drożdży. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **4 (53)**, 109-119.
- [3] Codex Stan 12-1981 FAO/WHO. Norme codex pour le miel, 1981, **12**, 39-55.
- [4] Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Official J. Eur. Com.*, 2001, L10: 47-52.
- [5] Fallico B., Zappala M., Arena E., Verzera A.: Methods for the determination of HMF in honey – a comparison. *Food Control*, 2005, **16**, 273-277.
- [6] Gheldof N., Engeseth N.J.: Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 3050-3055.
- [7] Hebbar H.U., Rastogi N.K., Subramanian R.: Properties of dried and intermediate moisture honey products a review. *Int. J. Food Prop.*, 2008, **11**, 804-819.
- [8] Hołderna-Kędzia E., Kędzia B.: Badania nad przeciwutleniającymi właściwościami miodu pszczelego. *Acta Agrobot.*, 2006, **59**, 2006, 265-269.
- [9] Jedlińska A., Samborska K., Witrowa-Rajchert D.: Aspekty techniczno-technologiczne suszenia miodu. *NIT.*, 2012, **2 (5)**, 35-43.
- [10] Kruszewski B., Obiedziński M.: Kontrowersyjne produkty reakcji Maillarda w żywności. *ABID*, 2011, **16 (4)**, 37-41.
- [11] Kumazawa S., Tanigucki M., Suzuki Y., Shimura M., Kwon M-S., Nakayama T.: Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 373-377.
- [12] Majewska E., Kowalska J., Jeżewska A.: Charakterystyka jakości miodów wielokwiatowych z różnych regionów Polski. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010, **3**, 391-397.
- [13] Majewska E., Kowalska J., Owerko B.: Fizykochemiczne parametry wybranych miodów gryczanych dostępnych na rynku polskim. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, **4**, 1233-1238.

- [14] Majewska E.: Porównanie wybranych właściwości miodów pszczelich jasnych i ciemnych. *Nauka Przyr. Technol.*, 2009, **4 (3)**, 1-9.
- [15] Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G.: Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honeys as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.*, 2005, **91**, 571-577.
- [16] PN-88/A-77626. Miód pszczeli.
- [17] Pszczelarstwo i rynek miodu w Polsce. [online]. MRiRW Dostępne w Internecie [14.11.2012]: <http://www.minrol.gov.pl/pol/Ministerstwo/Biuro-Prasowe/Informacje-Prasowe/Pszczelarstwo-i-rynek-miodu>
- [18] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu. *Dz. U.* 2009. Nr 17, poz. 94.
- [19] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 lutego 2004 r. w sprawie szczególnych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu. *Dz. U.* 2004. Nr 40, poz. 370.
- [20] Rybak-Chmielewska H., Szczęsna T.: Composition and properties of polish buckwheat honey. *Current advances in buckwheat research*. Institute of Pomology and Floriculture, Puławy 1995.
- [21] Sahu J.K.: The effect of additives on vacuum dried honey powder properties. *Int. J. Food Eng.*, 2008, **4 (8)**, 1356-1367.
- [22] Samborska K., Choromańska A., Witrowa-Rajchert D., Bakier S.: Suszenie rozpyłowe miodu pszczelego z maltodektryną. *PTPS*, 2011, 1, 19-23.
- [23] Samborska K.: Suszenie rozpyłowe enzymów – przyczyny inaktywacji oraz metody i mechanizmy ich stabilizacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **6 (73)**, 7-17.
- [24] Socha R., Juszcak L., Pietrzyk S., Gałkowska D., Fortuna T., Witczak T.: Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2011, **46**, 528-534.
- [25] Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E.S., Velioglu S.Y.: Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.*, 2006, **95**, 653-657.
- [26] Wantusiak P.M., Piszcz P., Skwarek M., Głód B.K.: Właściwości antyoksydacyjne miodów wyznaczone metodami chromatograficznymi. *Camera Separatoria*, 2011, **2 (3)**, 297-317.
- [27] Wintersteen C.L., Andrae L.M., Engeseth N.J.: Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *J. Food Sci.*, 2005, **70**, 119-126.
- [28] Wzorek W., Pogorzelski E.: *Technologia winiarstwa gronowego i owocowego*. Sigma-NOT, Warszawa 1998.
- [29] Zheng-Wei C., Li-Juan S., Wei Ch., Da-Wen S.: Preparation of dry honey by microwave-vacuum drying. *J. Food Eng.*, 2008, **84**, 582-590.

NOVEL METHOD OF PRODUCING HONEY POWDERS AND ASSESSMENT OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the possibility of producing honey powders from post-fermentation buckwheat honey solutions containing different amounts of total extract by means of a spray drying method. The purpose was to produce honey powders having the biological properties similar to those of the baseline material.

Aqueous solutions of honey were made and fermented. A medium was added to the solutions containing a preset total extract, which, then, underwent a spray drying process. In the honey, post-fermentation solutions, and honey powders determined were: diastase number, HMF content, pH, total acidity, and content of total polyphenols.

It was found that the buckwheat honey analyzed was characterized by a good quality. The content of polyphenols was 40.86 mg gallic acid/100 g of honey. The post-fermentation solutions were characterized by a high pH value, the absence of HMF, and almost a doubled amount of the polyphenols compared to honey. There were produced powders, in which the honey ingredients constituted ca. 50 % of dry matter. They were characterized by a high content of polyphenols (36.62-51.30 mg gal. acid/100 g of honey) and a HMF content level as per the Codex Alimentarius standard or slightly exceeding this limit. The powders produced did not lose enzymatic activity (diastase number ca. 5.0).

Key words: honey, fermentation batch, spray drying, honey powders, polyphenols, hydroxymethylfurfural, diastase number ☒

MAGDALENA FUJARCZUK, ANNA CZUBASZEK,
AGATA WOJCIECHOWICZ-BUDZISZ, MIROSŁAW ŻMIJEWSKI

WPŁYW PREPARATÓW ENZYMATYCZNYCH I METODY WYPIEKU NA WYBRANE CECHY CHLEBA PSZENNO-OWSIANEGO

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań była ocena zmian cech jakościowych pieczywa, otrzymanego z mieszanek mąki pszennej z różnym udziałem śruty owsianej, pod wpływem dodatku preparatów enzymatycznych i metody wypieku. Do badań użyto mąki pszennej typu 650 oraz mieszanek mąki pszennej i śruty owsianej. Udział śruty owsianej wynosił 10, 20 lub 30 %. Zastosowano dwa preparaty enzymatyczne: Bakezyme GO 1500 BG i Gluzyme Mono 10 000 BG o działaniu utleniającym. Mąkę pszenną i mieszanki pszenno-owsiane oceniono pod względem zawartości białka ogółem i skrobi, wydajności glutenu, wskaźnika sedymentacji i liczby opadania. Ciasto prowadzono metodą jednofazową. Do wypieku stosowano metodę tradycyjną oraz metodę odroczoną z zamrażaniem kęsów ciasta. Pieczywo oceniono pod względem wydajności i objętości. Właściwości miększu określono za pomocą aparatu typu INSTRON 5544 (test TPA). Wykazano, że wzrost udziału śruty owsianej w mieszance z mąką pszenną powodował zwiększenie zawartości białka ogółem oraz zmniejszenie: zawartości skrobi, wydajności glutenu i wskaźnika sedymentacji. Zastosowanie śruty owsianej jako zamiennika mąki pszennej w ilości 20 i 30 % prowadziło do znacznego zmniejszenia objętości pieczywa oraz wzrostu twardości, gumowatości i żuwalności miększu. Dodatek preparatów enzymatycznych nie spowodował istotnych zmian w badanych parametrach jakości chlebów. Pieczywo z odroczonego wypieku charakteryzowało się mniejszą: objętością bochenka, elastycznością i spoistością miększu oraz większą: wydajnością, twardością, gumowatością i żuwalnością w porównaniu z pieczywem otrzymanym w sposób tradycyjny.

Słowa kluczowe: chleb, śruta owsiana, preparaty enzymatyczne, odroczony wypiek, tekstura miększu

Wprowadzenie

Chleb uznawany jest za jeden z podstawowych artykułów żywnościowych. Wzrastająca świadomość konsumentów sprawia, że coraz częściej wybierają pieczywo zawierające różne dodatki podwyższające jego wartość żywieniową. Do takich dodatków należą produkty owsiane, które wyróżniają się dużą zawartością białka o wysokiej

Dr inż. M. Fujarczuk, dr hab. A. Czubaszek, dr inż. A. Wojciechowicz-Budzisz, dr inż. M. Żmijewski, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław. Kontakt: anna.czubaszek@up.wroc.pl

wartości biologicznej, tłuszczu o znacznym udziale nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz błonnika pokarmowego bogatego w β -glukany [5, 9, 21]. Cennym składnikiem ziarna owsa są także polifenole, tokoferole i fitosterole o działaniu antyoksydacyjnym [23]. Badania prowadzone przez różnych naukowców [4, 21] dowodzą, że spożywanie produktów owsianych przyczynia się do obniżania poziomu cholesterolu we krwi, podwyższenia odporności immunologicznej organizmu, efektywniejszego leczenia stanów zapalnych jelita i śluzówki żołądka. Indeks glikemiczny produktów owsianych jest mniejszy niż innych produktów zbożowych, co powoduje, że zaleca się je w diecie osób chorych na cukrzycę [4, 21]. Częściowe zastąpienie mąki chlebowej produktami owsianymi niejednokrotnie powoduje obniżenie jakości pieczywa [5, 6, 12, 14]. Z tego powodu poszukuje się dodatków technologicznych poprawiających jego jakość. Salmenkallio-Marttila i wsp. [33] wykazali, że właściwości mięksiszu chleba pszenno-owsianego może poprawić dodatek glutenu. Transglutaminaza, enzym stosowany przez tych autorów w celu wzmocnienia siatki glutenowej, przyczynił się do zwiększenia twardości i gumowatości mięksiszu. Tym niemniej, enzymy mogą pozytywnie wpływać na objętość chleba, strukturę jego mięksiszu czy też świeżość. Producenci pieczywa chętnie stosują w technologii produkcji pieczywa enzymy, gdyż większość z nich działa w umiarkowanych warunkach środowiska, przede wszystkim temperatury i pH, dzięki czemu możliwe jest zachowanie naturalnych cech biologicznych produktów piekarskich. Ważne jest również to, że enzymy ulegają degradacji podczas procesów termicznych i w końcowym wyrobie nie są obecne. Nie są zatem traktowane przez ustawodawstwo jako dodatki do żywności i nie powodują negatywnych reakcji wśród konsumentów [7].

Dostępne w handlu pieczywo z dodatkiem produktów owsianych otrzymuje się wyłącznie metodą tradycyjnego wypieku, podczas gdy inne rodzaje pieczywa wytwarza się także z wykorzystaniem wypieku odroczonego. Metoda ta pozwala na rozdzielenie procesu otrzymywania pieczywa na dwie fazy: wytwarzanie ciasta i jego zamrożenie oraz wypiek rozmrożonych kęsów. Umożliwia to racjonalne planowanie produkcji w piekarni, w tym przeniesienie uciążliwej i kosztownej produkcji nocnej na produkcję dzienną. Sprzedawcy, dzięki tej metodzie, mają możliwość wypieku chleba bezpośrednio w miejscu sprzedaży i zgodnie z aktualnym zapotrzebowaniem, a konsumenci – możliwość samodzielnego wypieku w domu [13, 35]. Stosowanie tej metody wypieku daje wiele korzyści ekonomicznych, ale często prowadzi do obniżenia jakości otrzymywanych produktów piekarskich [19, 34].

W celu poprawy jakości produktu gotowego w przemysłowej produkcji pieczywa z zastosowaniem odroczonego wypieku wykorzystywane są enzymy o działaniu utleniającym. Ich zadaniem jest wzmocnienie siatki glutenowej, osłabionej działaniem niskich temperatur. Najczęściej używana jest oksydaza glukozowa [15, 30]. W wyniku działania tego enzymu w cieście powstaje nadtlenek wodoru, który powoduje utlenia-

nie wolnych grup hydrosulfidowych (-SH) cysteiny do mostków disulfidowych (-S-S-) cystyny [1, 31]. Dzięki temu zwiększa się liczba wiązań poprzecznych pomiędzy łańcuchami polipeptydowymi białka, co wzmacnia strukturę glutenu i powoduje wzrost jego sprężystości [29].

Celem podjętych badań była ocena jakości pieczywa z mieszanek mąki pszennej z różnym udziałem śruty owsianej pod wpływem dodatku preparatów enzymatycznych zawierających glukooksydazę oraz ocena metody wypieku.

Material i metody badań

Materiał badawczy stanowiły: mąka pszenna typu 650 „Diamant” wyprodukowana przez Młyny Zbożowe Stanisława Grygiera Sp. z o.o. oraz rozdrobnione w młynku laboratoryjnym typu WŻ-1 (Sadkiewicz Instruments) ziarno handlowej mieszanki owsa nagiego pochodzące z Centrali Nasiennej w Głubczycach (śruta owsiana). Z mąki pszennej i śruty owsianej sporządzano mieszanki. Udział śruty owsianej w mieszankach wynosił 10, 20 i 30 %. Próbą kontrolną była mąka pszenna (bez udziału śruty owsianej). W badaniach stosowano dwa preparaty enzymatyczne zawierające oksydazę glukozową: Bakezyme GO 1500 BG (DSM Food Specialties B.V.) – w ilości 50 ppm (wagowo) i Gluzyne Mono 10 000 BG (Novozymes) – w ilości 30 ppm (wagowo). Preparaty enzymatyczne dodawano w ilościach zgodnych z zaleceniami producentów. Próbę kontrolną w ocenie wpływu preparatów enzymatycznych na właściwości wypiekowe badanych próbek stanowiły: mąka pszenna i mieszanki pszenno-owsiane bez dodatku preparatów enzymatycznych.

Chleby pszenne i pszenno-owsiane z dodatkiem preparatów enzymatycznych lub bez nich wypiekano metodą tradycyjną oraz z zastosowaniem odroczonego wypieku (24 warianty chleba). Wypiek tradycyjny wykonywano metodą Biskupskiego opisaną przez Karolini-Skaradzińską i wsp. [17]. Ciasto przeznaczone do mrożenia zarabiano tak jak w metodzie tradycyjnej, zwiększając o 2 % dodatek drożdży. Otrzymane ciasto (kęsy 430 - 460-gramowe) wkładano do aluminiowych form, które po zawinięciu w folię polietylenową umieszczano w zamrażarce Mors 122 (Polar) i przechowywano w temp. -18°C przez 1 miesiąc. Przed wypiekiem zamrożone ciasto umieszczano na 12 h w chłodzarnie ERT1506FOW (ELECTROLUX) w temp. ok. 4 °C w celu powolnego rozmrożenia, a następnie przenoszono do komory fermentacyjnej KL 864 (Tecnoeka) (temp. 32 °C) i poddawano 105-minutowej fermentacji. Podczas fermentacji stosowano dwukrotne ręczne przegniatanie ciasta po 75 min i po kolejnych 30 min. Po drugim przegniataniu ciasto umieszczano w komorze fermentacyjnej do osiągnięcia dojrzałości piecowej (średnio około 45 min). Wypiek prowadzono w piecu laboratoryjnym (Brabender o.H.) w temp. 230°C przez 30 min.

W mące pszennej i mieszankach pszenno-owsianych oznaczano: zawartość skrobi metodą Lintnera [16], zawartość białka ogółem – metodą Kjeldahla wg PN-EN ISO

20483:2007 [26], stosując przelicznik $N \times 5,7$, wydajność glutenu mokrego – wg PN-77/A-74041 [25], wskaźnik sedymentacji [3] oraz liczbę opadania – wg PN-EN ISO 3093:2010 [27].

Pieczyno oceniano pod wzgłdem wydajności i objętości chleba ze 100 g mąki po 3 h od wypieku. Objętość bochenków mierzono w objętościomierzu Sa-Wy (Sadkiewicz Instruments) wypełnionym ziarnem prosa. Za pomocą aparatu typu INSTRON 5544 badano właściwości tekstury miększu chleba (test TPA). Test polegał na dwukrotnym ściskaniu do 50 % pierwotnej wysokości próbek miększu wyciętych ze środka bochenka, w kształcie sześciangu o boku 10 mm. Elementem ściskającym był trzpień o wymiarach podstawy 42×42 mm i wysokości 10 mm. Prędkość przesuwu trzpienia wynosiła 60 mm/min, a siła jego nacisku 0,20 N. Pomiaro wykonano w 6 powtórzeniach. Wynikiem tych pomiarów były wykresy w układzie siła – przemieszczenie (program Merlin). Określano następujące parametry miększu: twardość [N] – wielkość siły odpowiadająca wysokości pierwszego pik (po pierwszym ściskaniu), elastyczność [mm] – szerokość drugiego pik (po drugim ściskaniu), spoistość – iloraz pól powierzchni $A2/A1$ ($A1$ i $A2$ [mm²] – pola powierzchni pod pierwszym i drugim pikiem), gumowatość [N] – iloczyn twardości i spoistości, żuwalność [N·mm] – iloczyn gumowatości i elastyczności.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie. Wyniki charakterystyki materiału doświadczalnego poddano analizie wariancji przy jednokierunkowej klasyfikacji dla jednej zmiennej (udział śruty owsianej), a cechy jakościowe pieczywa – analizie wariancji trzyczynnikowej (udział śruty owsianej w mieszankach, dodatek preparatu enzymatycznego, metoda wypieku chleba). Zróznicowanie wartości średnich oceniono testem Duncana, wyznaczając grupy jednorodne przy $p \geq 0,05$. Obliczenia wykonano w programie statystycznym Statgraphics 6,0 plus.

Wyniki i dyskusja

Wartość wypiekowa mąki zależy od wielu czynników. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wzrost udziału śruty owsianej w mieszance z mąką pszenną powodował sukcesywne zmniejszanie zawartości skrobi oraz wzrost zawartości białka ogółem (tab. 1). Zależność taka była oczekiwana, gdyż śruta owsiana zawierała mniej skrobi i więcej białka ogółem niż mąka pszenna. Wydajność glutenu mokrego z mąki pszennej wynosiła 30 % (tab. 1). Zastąpienie 10 % mąki śrutą owsianą spowodowało zmniejszenie jego wydajności do 27 %, a w mieszankach z 20-procentowym udziałem śruty – do 23 %. Zgodnie z normą PN-A-74022 [24], taka ilość glutenu jest zbyt mała w mące przeznaczonej do wypieku chleba. Oprócz zmniejszenia wydajności glutenu obserwowano również obniżenie jego jakości, na co wskazuje istotne zmniejszanie wskaźnika sedymentacji przy rosnącym udziale śruty owsianej w mieszance z mąką pszenną (tab. 1). Pod wpływem dodatku śruty owsianej liczba

opadania mieszanek pszenno-owsianych ulegała niewielkiemu obniżeniu (maksymalnie o 20 s), ale we wszystkich próbkach była na poziomie odpowiednim dla mąki o optymalnej aktywności amylolitycznej. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pozostają w zgodzie z uzyskanymi we wcześniejszych badaniach [5, 6].

Tabela 1. Charakterystyka materiału doświadczalnego.

Table 1. Profile of the experimental material.

Próbki Samples		Zawartość skrobi Starch content [% s.m.]	Zawartość białka ogółem Total protein content [% s.m.]	Wydajność glutenu mokrego Yield of wet gluten [%]	Wskaźnik sedymentacji Sedimentation value [cm ³]	Liczba opadania Falling number [s]
Mąka pszenna Wheat flour		51,1 a	12,0 c	30 a	84 a	310 a
Mieszanki pszenno-owsiane Wheat -oat blends	Udział śruty owsianej Percentage of cracked oats [%]					
	10	50,7 b	12,1 bc	27 b	76 b	300 ab
	20	49,2 c	12,4 ab	23 c	72 c	297 ab
	30	48,8 d	12,6 a	nie wymyto not eluted	58 d	290 b
Śruta owsiana Cracked oats		41,1	15,1	-	-	288

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c, d – wartości średnie oznaczone w kolumnach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / – mean values in columns and designated by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

W procesie produkcji pieczywa zwraca się uwagę na jego wydajność. Według Korusa i Achremowicza [20] wprowadzenie do receptury produktów, które charakteryzują się dużą zawartością błonnika pokarmowego, zwiększa wodochłonność mieszanek, a przez to także wydajność pieczywa. Gambuś i wsp. [11] wykazali, że 3- do 10-procentowy dodatek mąki i otrąb uzyskanych z przemiału laboratoryjnego ziarna owsa nagiego nie wpływa na wydajność pieczywa pszennego. Czubaśzek [5] wykazała natomiast, że wydajność pieczywa pszenno-owsianego zależy od ilości i rodzaju produktu owsianego wprowadzanego do receptury. Dodatek otrąb owsianych oddziałuje korzystnie na wydajność pieczywa, a śruta owsiana w ilości 10 - 30 % nie zmienia wartości tej cechy. Wyniki badań własnych zamieszczone w tab. 2. wskazują, że chleby pszenne i pszenno-owsiane z udziałem 10 i 20 % śruty miały podobną wydajność, mieszczącą się w przedziale 153,0 - 153,7 %. Przy 30-procentowym udziale śruty

w mieszance obserwowano natomiast zmniejszenie wydajności pieczywa do 149,3 %. Przyczyną zmniejszenia wydajności chleba z 30-procentowym udziałem śruty owsianej mógł być zbyt duży udział części zewnętrznych ziarniaka w mące, przez co wolno chłonęła ona wodę, a ciasto w opisywanym doświadczeniu zarabiano w miesiarce fari-nografu, dodając tyle wody, by jego konsystencja po 5 min mieszenia wynosiła 250 jB. Być może taki czas mieszenia, przy zakładanej konsystencji ciasta, był zbyt krótki, aby próbka mogła związać taką ilość wody, która pozwoliłaby na uzyskanie większej wydajności pieczywa.

Preparaty enzymatyczne nie wpływały istotnie ($p \leq 0,05$) na wydajność uzyskanego chleba (151,8 % – bez udziału enzymów, 152,3 % – Bakezyme GO, 152,8 % – Gluzyme Mono). Istotne zmiany ($p \leq 0,05$) obserwowano natomiast w zależności od metody wypieku. Chleby wypieczone metodą odroczoną cechowały się istotnie większą ($p \leq 0,05$) wydajnością (153,2 %) niż uzyskane metodą tradycyjną (151,4 %). Mandala i wsp. [22] także obserwowali zwiększenie wydajności pieczywa pszenno-owsianego pod wpływem mrożenia ciasta. Uważają oni, że zwiększenie wydajności pieczywa po mrożeniu ciasta ma związek z uszkodzeniem jego składników strukturalnych przez kryształy lodu powstające podczas mrożenia.

W ocenie objętości pieczywa stwierdzono, że największą miały chleby pszenne (479 cm^3) (tab. 2). Zastąpienie 10 % mąki pszennej śrutą owsianą powodowało zmniejszenie objętości bochenka średnio o 32 cm^3 , a chleby zawierające 20 i 30 % śruty były jeszcze mniejsze (średnia objętość wynosiła odpowiednio 360 i 377 cm^3). Niekorzystny wpływ produktów owsianych na wielkość bochenków zaobserwowali również inni autorzy [5, 6, 11, 12, 14, 18]. Za przyczynę tego zjawiska uważa się zmiany w ilości i jakości glutenu po zastąpieniu części mąki pszennej produktami owsianymi. Dodatek preparatów enzymatycznych nie wpływał na objętość chleba. Uzyskane wartości średnie wahały się w przedziale od 402 cm^3 (Gluzyme Mono) do 428 cm^3 (bez udziału enzymów). Nieznacznie mniejsza objętość chlebów zawierających preparaty enzymatyczne może wskazywać na niewielkie wzmocnienie struktury glutenu wskutek oksydacyjnego działania glukooksydazy. Mrożenie ciasta powodowało znaczne zmniejszenie objętości chlebów (metoda tradycyjna – 478 cm^3 , metoda odroczonej – 349 cm^3). Inni autorzy [19, 22, 34] także wykazali niekorzystny wpływ stosowania metody odroczonego wypieku na objętość pieczywa.

Cechy tekstury spożywanych produktów mają ogromne znaczenie dla konsumentów i bardzo często są jednym z ważniejszych czynników decydujących o wyborze i zakupie danego artykułu żywnościowego. Gambuś i wsp. [12] wykazali, że użycie do wypieku chleba całościowej mąki owsianej w ilości do 10 % nie zmienia istotnie

Tabela 2. Cechy jakościowe chleba wypiekanego z mieszanek mąki pszennej z różnym udziałem śrutki owsianej.

Table 2. Quality characteristics of bread baked of wheat flour blends with different amounts of cracked oats.

Czynniki zmienności Factors of variation		Wydajność chleba Yield of bread [%]	Objętość chleba ze 100 g mąki Volume of bread made using 100g of flour [cm ³]
Udział śrutki owsianej w mieszance Percentage of cracked oats in blend [%]	0	153,0 ^a	479 ^a
	10	153,7 ^a	447 ^b
	20	153,2 ^a	360 ^c
	30	149,3 ^b	377 ^c
Preparat enzymatyczny Enzymatic preparation	bez enzymów without enzymes	151,8 ^a	428 ^a
	Bakezyme GO 1500BG	152,3 ^a	416 ^a
	Gluzyme Mono 10 000 BG	152,8 ^a	402 ^a
Metoda wypieku Method of baking	tradycyjny traditional	151,4 ^b	483 ^a
	odroczoney postponed	153,2 ^a	349 ^b

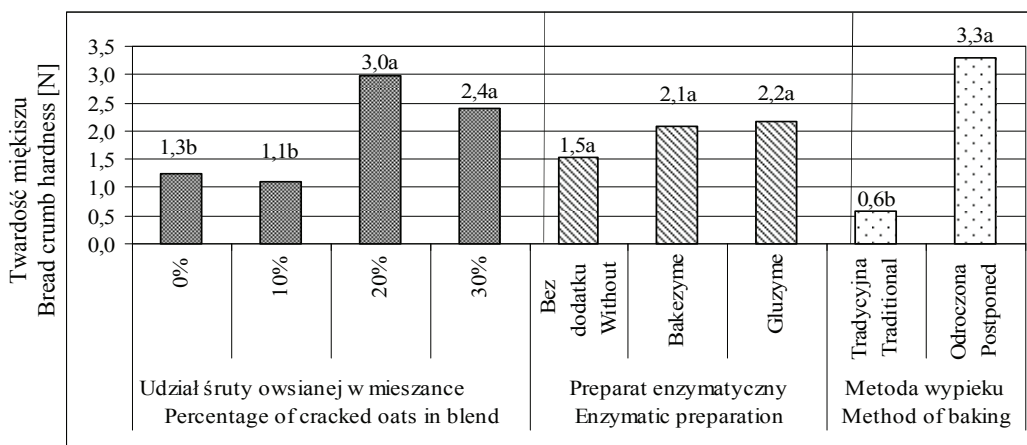
Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c, – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie dla tego samego czynnika różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values denoted by different letters and in the column ref. to the same factor differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

twierdności miękiszu. W badaniach Gibińskiego i wsp. [14] nawet przy 25-procentowym udziale mąki owsianej (produktu ubocznego przy produkcji błonnika owsianego) pieczywo miało podobną twierdność miękiszu, jak pieczywo pszenne. Wyniki badań własnych wskazują, że miękisz chleba pszennej i pszenno-owsianej z udziałem 10 % śrutki owsianej miał podobną twierdność (odpowiednio 1,3 i 1,1 N) (rys. 1). Zastąpienie mąki pszennej śrutką owsianą w większych ilościach (20 i 30 %) powodowało natomiast około dwukrotne zwiększenie twierdności pieczywa w odniesieniu do chleba pszennej. Dodatek preparatów enzymatycznych nie wpływał znacząco na twierdność miękiszu. Można było jednak zauważyć tendencję zwiększenia wartości tej cechy po ich zastosowaniu. Istotnie ten wyróżnik tekstury chleba zmieniała metoda wypieku. Chleb wypiekany z ciasta poddanego mrożeniu miał niemal sześciokrotnie większą twierdność miękiszu w porównaniu z chlebem otrzymanym metodą tradycyjną (0,6 N – chleb wypiekany tradycyjnie i 3,3 N – chleb z wypieku odroczonego). Postolski i Gruda [28]

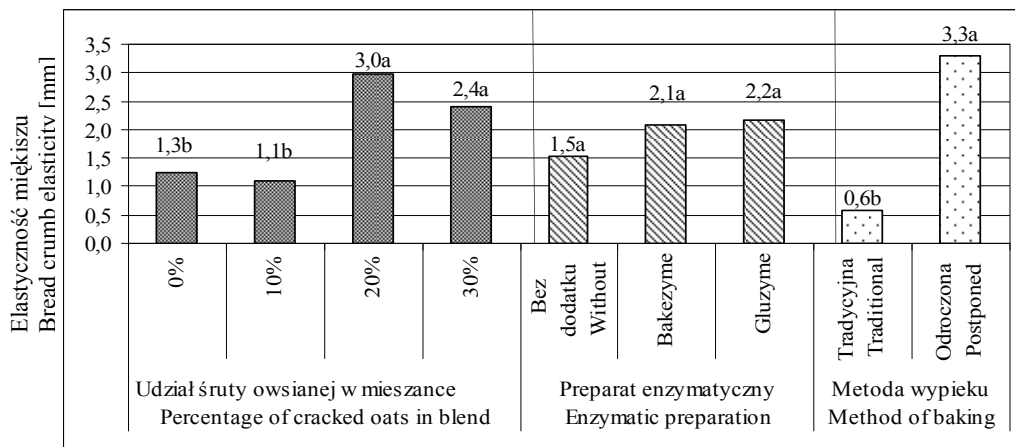
uwzględniają, że duża twardość miękiszu chleba wypiekanego z ciasta mrożonego może być spowodowana zmianami, jakie zachodzą w siatce glutenowej w czasie mrożenia i rozmrażania kęsów ciasta.

Według Diowksza i wsp. [8] elastyczność miękiszu jest uzależniona od składu recepturowego chleba, a przede wszystkim od wprowadzanych dodatków. Dzięki i wsp. [10] wykazali niekorzystny wpływ mąki sojowej na elastyczność miękiszu chleba już przy zastosowaniu 2,5 % tego dodatku. W badaniach własnych obserwowano zmniejszenie elastyczności miękiszu pod wpływem dodatku śruty owsianej (rys. 2). Istotne obniżenie wartości tego parametru stwierdzono jednak dopiero przy 20- i 30-procentowym jej udziale. Preparaty Bakezyme GO 1500 BG i Gluzyme Mono 10 000 BG nie wywierały istotnego wpływu na elastyczność miękiszu pieczywa. Chleby wypieczone metodą tradycyjną miały bardziej elastyczny miękisz w porównaniu z chlebami pochodzącymi z odroczonego wypieku. Zmniejszenie elastyczności ciasta, już na etapie jego rozmrażania, zauważyli Asghar i wsp. [2], badając ciasta z dodatkiem koncentratu białka serwatkowego. Obserwowane przez nich zmiany są potwierdzeniem założeń o destrukcyjnym oddziaływaniu niskich temperatur na komponenty tworzące ciasto oraz wypiekany z niego chleb.



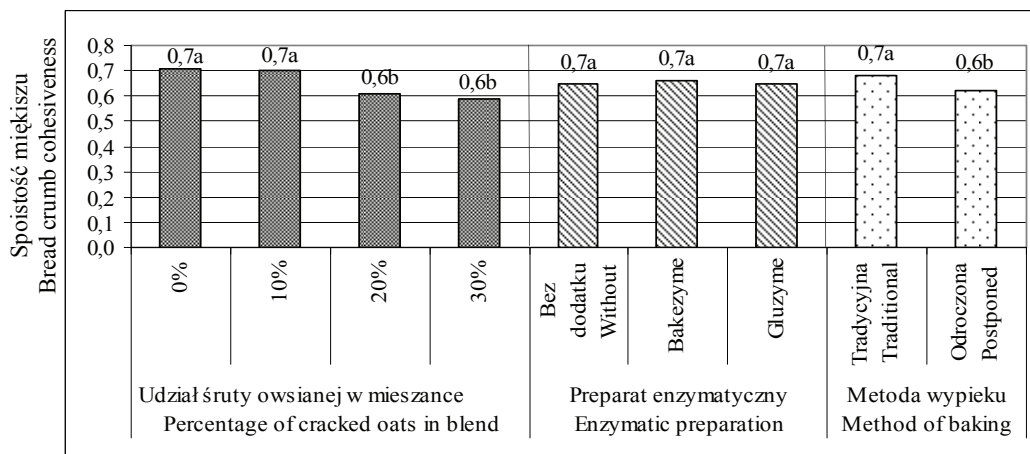
Rys. 1. Twardość miękiszu chleba wypiekanego z mieszanek mąki pszennej z różnym udziałem śruty owsianej (a, b – wartości średnie oznaczone różnymi literami dla tego samego czynnika różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$).

Fig. 1. Crumb hardness of bread baked from wheat flour blends with varying participation oat ground (a-b – mean values denoted by different letters and ref. to the same factor differ statistically significantly at $p \leq 0.05$).



Rys. 2. Elastyczność miękiszu chleba wypiekanego z mieszanek mąki pszennej z różnym udziałem śrutki owsianej (a, b – wartości średnie oznaczone różnymi literami dla tego samego czynnika różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$).

Fig. 2. Crumb elasticity of bread baked using wheat flour blends with varying amounts of cracked oats (a, b – mean values denoted by different letters and ref. to the same factor differ statistically significantly at $p \leq 0.05$).



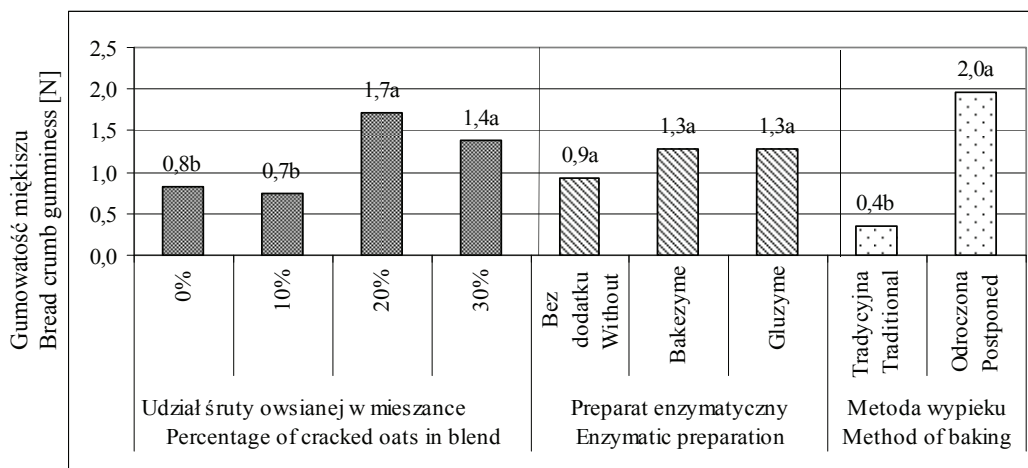
Rys. 3. Spoistość miękiszu chleba wypiekanego z mieszanek mąki pszennej z różnym udziałem śrutki owsianej (a, b – wartości średnie oznaczone różnymi literami dla tego samego czynnika różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$).

Fig. 3. Crumb cohesiveness of bread baked using wheat flour blends with varying amounts of cracked oats (a, b – mean values denoted by different letters and ref. to the same factor differ statistically significantly at $p \leq 0.05$).

Badania Różyło [32], z wykorzystaniem mąki owsianej jako zamiennika mąki pszennej, wskazują, że produkt ten już w ilości 10 % wpływa na zmniejszenie spoisto-

ści mięksiszu chleba. Na podstawie przeprowadzonych badań własnych stwierdzono, że wzrost ilości śruty owsianej także wpłynął na zmniejszenie spoistości mięksiszu chleba, przy czym istotne zmiany zachodziły przy udziale większym niż 10 % (rys. 3). Obserwowano także niekorzystne oddziaływanie mrożenia ciasta na tę cechę. Preparaty enzymatyczne zawierające oksydazę glukozową nie zmieniały tej cechy chleba w stosunku do chleba bez preparatów.

Gumowatość badanych chlebów zależała od udziału śruty owsianej i metody ich wypieku (rys. 4). Oceniając wpływ udziału śruty owsianej w mieszance stwierdzono, że najwyższą wartością tego parametru charakteryzował się chleb z 20- i 30-procentowym udziałem śruty owsianej (odpowiednio: 1,7 N i 1,4 N). Gumowatość mięksiszu chleba pszennego i zawierającego 10 % śruty wynosiła odpowiednio: 0,8 N i 0,7 N. Wzrost gumowatości mięksiszu po zastąpieniu mąki pszennej mąką lub śrutą owsianą obserwowano także Różyło [32], która stwierdziła, że już 5-procentowy dodatek tych produktów prowadzi do zwiększenia wartości tego parametru tekstury chleba. Gumowatość mięksiszu chleba otrzymanego metodą odroczonego wypieku była ponad pięciokrotnie wyższa niż chleba wypiekanego tradycyjnie (odpowiednio: 2,0 i 0,4 N) (rys. 4). Pozostaje to w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez Asghara i wsp. [2], którzy zauważyli, że ujemne temperatury powodują znaczny wzrost gumowatości rozmrożonych kęsów ciasta. W badaniach własnych stwierdzono ponadto, że różnice

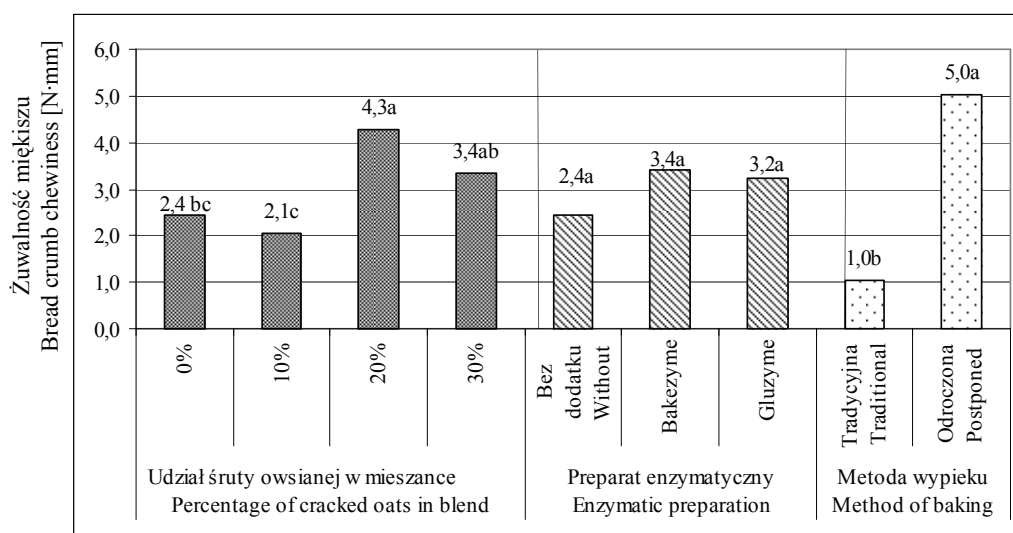


Rys. 4. Gumowatość mięksiszu chleba wypiekanego z mieszanek mąki pszennej z różnym udziałem śruty owsianej (a, b – wartości średnie oznaczone różnymi literami dla tego samego czynnika różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$).

Fig. 4. Crumb gumminess of bread baked using wheat flour blends with varying amounts of cracked oats (a, b – mean values denoted by different letters and ref. to the same factor differ statistically significantly at $p \leq 0,05$).

między gumowością chleba bez preparatów enzymatycznych i z ich dodatkiem były statystycznie nieistotne (rys. 4). Widoczna była jednak tendencja zwiększania tej cechy po ich dodaniu.

Po przeanalizowaniu wpływu udziału śruty owsianej na żuwalność miększu stwierdzono, że wielkość tego parametru w chlebie pszennym oraz w chlebach z 10-procentowym udziałem śruty owsianej była statystycznie nieistotna ($p \leq 0,05$) (2,4 N·mm; 2,1 N·mm) (rys. 5). Największą żuwalnością cechowało się pieczywo z 20-procentowym udziałem śruty owsianej (4,3 N·mm). Nie stwierdzono istotnych zmian żuwalności miększu przy stosowaniu preparatów Bakezyme GO 1500 BG i Gluzyme Mono 10 000BG. Mrożenie ciasta przed wypiekiem przyczyniło się natomiast do znacznego wzrostu żuwalności miększu w porównaniu z chlebem wypieczonym w sposób tradycyjny. Przeciętna wartość tego wyróżnika tekstury chlebów z wypieku odroczonego wynosiła 5,0 N·mm, a chlebów wytworzonych tradycyjnie – 1,0 N·mm.



Rys. 5. Żuwalność miększu chleba wypiekanego z mieszanki mąki pszennej z różnym udziałem śruty owsianej (a, b – wartości średnie oznaczone różnymi literami dla tego samego czynnika różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$).

Fig. 5. Crumb chewiness of bread baked using wheat flour blends with varying amounts of cracked oats (a, b – mean values denoted by different letters and ref. to the same factor differ statistically significantly at $p \leq 0.05$).

Wnioski

1. Mąka pszenna cechowała się dobrymi właściwościami wypiekowymi. Częściowe zastąpienie jej śrutą owsianą spowodowało wzrost zawartości białka oraz zmniejszenie ilości skrobi, wydajności glutenu i liczby sedymentacji w mieszankach.
2. Zastosowanie śruty owsianej z ziarna owsa nagiego jako zamiennika mąki pszennej wpłynęło na zmniejszenie objętości bochenków, wzrost twardości i gumowatości oraz obniżenie elastyczności i spoistości miększu chleba. Tylko miększ chleba z 10-procentowym udziałem śruty owsianej miał podobne parametry tekstury jak chleb pszenny.
3. Nie stwierdzono istotnych zmian wydajności, objętości i właściwości tekstury miększu badanych chlebów pod wpływem dodatku preparatów enzymatycznych Bakezyme GO 1500 BG oraz Gluzyme Mono 10 000 BG. Zauważono tylko tendencję wzrostu twardości, gumowatości i żuwalności miększu po ich zastosowaniu.
4. Mrożenie ciasta stosowane w wypieku odroczone poprawiało wydajność chleba, natomiast bardzo niekorzystnie oddziaływało na jego objętość i strukturę miększu. Powodowało ono kilkukrotne zwiększenie twardości, gumowatości i żuwalności miększu oraz zmniejszenie jego elastyczności i spoistości w porównaniu z miększem chleba uzyskanego metodą tradycyjną.

Badania i publikacja finansowana ze środków przyznanych na badania własne prowadzone w Katedrze Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu – umowa NoŻ/312/2012/SC).

Literatura

- [1] Aja S., Wang J., Rosell C.M.: Improvement of cereal protein network through enzyme treatment. In: Recent advances in enzymes in grain processing. Eds. C.M. Courtin, W.S. Veraverbeke, J.A. Delcour. Leuven, Belgium, 2003, pp. 101-106.
- [2] Asghar A., Anjum F.M., Allen J.C., Rasool G., Sheikh M.A.: Effect of modified whey protein concentrates on instrumental texture analysis of frozen dough. Pakistan J. Nutr., 2009, **8** (2), 189-193.
- [3] Axford D.W.E., Mc Detmott E.E., Retman D.G.: Note on the sodium dodecyl sulfate test of bread-making quality. Comparison with Pelshenke and Zeleny test. Cereal Chem., 1979, **56** (6), 582-584.
- [4] Ciołek A., Makarska E., Makarski B.: Zawartość wybranych składników żywieniowych w ziarnie owsa czarnego i żółtoziarnistego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2008, **3** (58), 80-88.
- [5] Czubaszek A.: Charakterystyka technologiczna mieszanek mąki pszennej z produktami przemiału owsa. Zesz. Nauk. UP we Wrocławiu, Rozprawy CCL III. Wrocław 2008, 564.
- [6] Czubaszek A. Karolini-Skaradzińska Z.: Effects of wheat flour supplementation with oat products on dough and bread quality. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2005, **14/55**(3), 281-286.
- [7] Dadas A.: Enzymy bez których nie ma ani chleba ani bułeczek. Przegl. Piek. i Cuk., 2009, **7**, 9-7.
- [8] Diowksa A., Sucharzewska D., Ambroziak W.: Wpływ składu mieszanek skrobiowych na właściwości chleba bezglutenowego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2008, **2** (57), 40-50.
- [9] Dvančová D., Havrelentová M., Hlinková A., Holzár P.: Effect of fertilization and variety on the β -glucan content in the grain of oats. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2010, **3** (70), 108-116.

- [10] Dżiki D., Siastała M., Laskowski J.: Zmiany właściwości fizycznych pieczywa pszennego pod wpływem dodatku mąki sojowej. *Acta Agrophysica*, 2010, **15** (1), 91-100.
- [11] Gambuś H., Pisulewska E., Gambuś F.: Zastosowanie produktów przemiału owsa nieoplewionego do wypieku chleba. *Biul. IHAR*, 2003, **229**, 283-290.
- [12] Gambuś H., Gambuś F., Pisulewska E.: Całoziarnowa mąka owsiana jako źródło składników dietetycznych w chlebach pszennych. *Biul. IHAR.*, 2006, **239**, 259-267.
- [13] Giannou V., Tzia C.: Frozen dough bread: quality and textural behavior during prolonged storage – prediction of final product characteristics. *J. Food. Eng.*, 2007, **79** (3), 929-934.
- [14] Gibiński M., Gambuś H., Nowakowski K., Mickowska B., Pastuszka D., Augustyn G., Sabat R.: Wykorzystanie mąki owsianej – produktu ubocznego przy produkcji koncentratu z owsa – w piekarstwie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **3** (70), 56-75.
- [15] Hanft F., Koehler P.: Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *J. Sci. Food Agric.*, 2006, **86** (11), 1699-1704.
- [16] Jakubczyk T., Haber T.: Analiza zbóż i przetworów zbożowych. Wyd. SGGW – AR, Warszawa 1983.
- [17] Karolini-Skaradzińska Z., Subda H., Korczak B., Kowalska M., Żmijewski M., Czubaszek A.: Ocena technologiczna ziarna i mąki wybranych odmian pszenicy ozimej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, **2** (27), 68-77.
- [18] Kawka A., Kroll T.: Wpływ otrąb owsianych na jakość ciasta i pieczywa pszennego. *Biul. IHAR*, 2006, **239**, 237-245.
- [19] Kot M.: Technologia odroczonego wypieku pieczywa z zastosowaniem spowalniania fermentacji keśów ciasta (cz. I). *Przeł. Piek. Cuk*, 2008, **3**, 42-46.
- [20] Korus J., Achremowicz B.: Zastosowanie preparatów błonnikowych różnego pochodzenia jako dodatków do wypieku chlebów bezglutenowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **1** (38), 65-73.
- [21] Lange E.: Produkty owsiane jako żywność funkcjonalna. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **3** (70), 7-24.
- [22] Mandala I., Polaki A., Yanniotis S.: Influence of frozen storage on bread enriched with different ingredients. *J. Food Eng.*, 2009, **92**, 137-145.
- [23] Piątkowska E., Witkiewicz R., Pisulewska E.: Właściwości antyoksydacyjne wybranych odmian owsa siewnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **3** (70), 100-107.
- [24] PN-A-74022. Przetwory zbożowe. Mąka pszenna.
- [25] PN-77/A-74041. Oznaczenie ilości i jakości glutenu.
- [26] PN-EN ISO 20483:2007. Ziarno zbóż i nasiona roślin strączkowych. Oznaczanie zawartości azotu i przeliczanie na zawartość białka. Metoda Kjeldahla.
- [27] PN-EN ISO 3093:2010. Pszenica, żyto i mąki z nich uzyskane, pszenica durum i semolina. Oznaczanie liczby opadania metodą Hagberga-Pertena.
- [28] Postolski J., Gruda Z.: Zamrażanie żywności. WNT, Warszawa 1995.
- [29] Popper L.: Verfahren zur Herstellung von laminiertem Teig, Sulfhydryl- Oxidase enthaltend. *Getreidetechnologie*, 2009, **1**, 10.
- [30] Poulsen C., Hostrup P.B.: Purification and characterization of a hexose oxidase with excellent strengthening effects in bread. *Cereal Chem.*, 1998, **75**, 51-57.
- [31] Rosell C.M., Wang S., Aja S., Bean S., Lookhart G.: Wheat flour proteins as affected by transglutaminase and glucose oxidase. *Cereal Chem.*, 2003, **80**, 52-55.
- [32] Różyło R.: Zmiany cech tekstury miększu chleba pszennego pod wpływem dodatku produktów z owsa. *Acta Agrophysica*, 2007, **10** (3), 667-676.

- [33] Salmenkallio-Marttila M., Roininen K., Autio K., Lähteenmäki L.: Effects of gluten and transglutaminase on microstructure, sensory characteristics and instrumental texture of oat bread. *J. Agric. Food Sci.*, 2004, **13**, 138-150.
- [34] Sobczyk M.: Wpływ mrożenia międzyproduktów piekarskich na jakość gotowego wyrobu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2 (47) Supl.**, 314-324.
- [35] Sobczyk M., Malon A.: Wpływ czasu zapiekania na jakość bułek kajzerek w technologii odroczonego wypieku. *Nauka Przynr. Technol.*, 2009, **3, 4**, 1-10.

EFFECT OF ENZYMATIC PREPARATIONS AND BAKING METHODS ON SELECTED PARAMETERS OF WHEAT-OAT BREAD

S u m m a r y

The objective of the study was to assess the changes in quality parameters of bread, produced of blends of wheat flour with different amounts of cracked oats, which were induced by the addition of enzymatic preparations and the baking method. In the experiment, wheat flour of 650 type and the blends of wheat flour and cracked oats were used. The percentage of cracked oats in the blend was 10, 20, or 30 %. Two enzymatic preparations were applied: Bakezyme GO 1500 BG and Gluzyme Mono 10 000 BG with oxidizing properties. In the wheat flour and wheat-oat blends, the following was determined: total content of protein and starch, yield of wet gluten, sedimentation value, and falling number. The bread dough was made using a single-phase method. The bread was baked using two methods: a traditional method and a postponed baking method, where pieces of dough were frozen. The yield and volume of bread baked were estimated. Mechanical properties of crumb were determined by an INSTRON 5544 apparatus (TPA test). It was proved that the increase in the amount of cracked oats in the wheat flour caused the content of total protein to increase, and the content of starch, the yield of gluten, and the sedimentation value to decrease. The addition of cracked oats as a wheat flour supplement, its quantity being 20 and 30 %, caused the loaf volume to decrease significantly, and the hardness, gumminess, and crumb cohesiveness to increase. The addition of enzyme preparations did not result in any significant changes in the analyzed parameters of the bread quality. The bread baked acc. to the delayed baking method was characterized by a lower loaf volume, a lower elasticity and cohesiveness of crump; however, this bread showed a higher baking efficiency, and its hardness, gumminess, and chewiness were also higher compared to the bread baked in a traditional way.

Key words: bread, cracked oats, enzymatic preparations, postponed baking, crumb texture ☒

STANISŁAW KOWALSKI, MARCIN LUKASIEWICZ

WPLYW WARUNKÓW WYPIEKU KRUCHYCH CIASTEK NA POWSTAWANIE WYBRANYCH POCHODNYCH FURANOWYCH ORAZ ZMIANĘ POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu temperatury wypieku kruchych ciastek na powstawanie wybranych pochodnych furanowych, takich jak 5-hydroksy-2-metylofurfural (HMF), alkohol (F_{ol}) oraz aldehyd furfurylowy (F_{al}). Laboratoryjny wypiek ciastek przeprowadzono w temperaturach 200, 215, 230 oraz 245 °C. Zmianę temperatury wypiekanych ciastek monitorowano poprzez zastosowanie światłowodowego czujnika temperatury umieszczonego w centralnej części ciastka. Przeprowadzono również analizę potencjału antyoksydacyjnego ciastek po wypieku. Stwierdzono, że powstawanie pochodnych furanowych w ciastkach jest uzależnione od temperatury oraz od czasu wypieku, a największa kumulacja tych związków następuje po odparowaniu wody i związanym z tym nagłym zwiększeniem temperatury wewnątrz produktu. Wraz ze zwiększeniem temperatury wypieku do 245 °C w analizowanym produkcie stężenie F_{al} zwiększyło się do około 160 mg/kg, z kolei stężenie F_{ol} w tych samych warunkach nie przekroczyło 40 mg/kg. Niezależnie od stosowanej temperatury, spośród powstających pochodnych furanowych największy udział miał HMF, jego maksymalne stężenie w analizowanym materiale wynosiło ponad $4,5 \times 10^3$ mg/kg. Dłuższy czas wypieku skutkuje wzrostem potencjału antyoksydacyjnego produktu na skutek powstawania produktów reakcji Maillarda.

Słowa kluczowe: kruche ciastka, hydroksymetylofurfural, furfural, furfurol, potencjał antyoksydacyjny

Wprowadzenie

Procesy termiczne stosowane w technologii żywności można zaklasyfikować jako operacje jednostkowe np. w przypadku blanszowania, gotowania, smażenia czy pieczenia. W czasie ich przeprowadzania następuje wzrost temperatury produktu do zakładanego w danym procesie poziomu [29]. W czasie pieczenia zachodzi w produkcie szereg zmian, prowadzących m.in. do uzyskania pożądaných cech sensorycznych i teksturalnych. Ponadto, proces ten przyczynia się do ograniczenia lub wyeliminowa-

nia aktywności enzymatycznej produktu oraz wpływa na okres jego przydatności do spożycia [30]. Produkty pieczone podlegają intensywnej obróbce termicznej w czasie której zachodzą zarówno procesy karmelizacji, jak i reakcje Maillarda, a intensywność tych przemian jest największa na powierzchni produktu [25].

Cechy sensoryczne produktu, takie jak: aromat, smak czy barwa są ściśle powiązane z procesami chemicznymi zachodzącymi w podwyższonej temperaturze. Przykładem są reakcje Maillarda, w wyniku których powstają substancje nadające cechy sensoryczne takim produktom, jak: chleb, czekolada, kawa, słód czy grillowane produkty mięsne [18, 25].

Jednym z produktów reakcji Maillarda, a także karmelizacji, jest 5-hydroxymetylo-2-furfural (HMF). Synteza HMF przebiega szczególnie efektywnie w środowisku kwaśnym i w obecności cukrów prostych [6, 14, 24, 35]. Wpływ HMF na organizm człowieka nie jest jednoznacznie ustalony. Na podstawie badań na szczurach określono dawkę LD_{50} (powodującą śmierć 50% badanej populacji) na poziomie 3,1 g/kg masy ciała [32]. Podkreśla się także jego potencjalną kancerogenność i cytotoxycywność [4, 9, 21]. Istnieją również doniesienia podkreślające korzystny wpływ HMF lub jego pochodnych w terapii raka lub zakażeń wirusem A(H1N1) [8, 10, 28, 33, 34].

W wyniku degradacji HMF w wysokich temperaturach może powstawać inny związek z grupy furanów, czyli aldehyd furfurylowy (F_{al}). Związek ten, zwany potocznie furfurałem, powstaje także w wyniku degradacji kwasu askorbinowego, węglowodanów oraz produktów Amadori, podczas reakcji Maillarda oraz w wyniku karmelizacji cukrów [16, 27]. Pochodne furanowe (F_{al}) powstające w trakcie termicznego przetwarzania żywności mogą być też wynikiem utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w wysokiej temperaturze i rozkładu pochodnych kwasu askorbinowego [22].

Furfural należy do substancji drażniących, uczulających i toksycznych dla ośrodkowego układu nerwowego. Jest on metabolizowany w wątrobie i szybko wydalany z organizmu. W badaniach przeprowadzonych na gryzoniach zaobserwowano pewne symptomy działania rakotwórczego. Jednak w odniesieniu do ludzi furfural nie jest klasyfikowany jako substancja kancerogenna [3].

Alkohol furfurylowy (F_{ol}) jest kolejnym ważnym związkiem zawierającym heterocykliczny pierścień furanowy. Występuje w różnych artykułach spożywczych, zwłaszcza takich jak: kakao, kawa, chleb itp. Jest on bezbarwną cieczą o słabym zapachu spalenizny i gorzkim smaku. Wykazuje dobrą rozpuszczalność zarówno w wodzie, jaki i w wielu rozpuszczalnikach organicznych [22].

W badaniach przeprowadzonych na gryzoniach dowiedziono rakotwórczości furfurołu. Istnieją również dowody świadczące o wpływie furfurołu na zmianę struktury

chromosomów. Jednakże według Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności alkohol furfurylowy nie stwarza genotoksycznego zagrożenia dla ludzi [19].

Pochodne furanowe są wykorzystywane jako potencjalne wskaźniki przegrzewania i nieodpowiedniego czasu przechowywania produktów spożywczych, wśród których należy wymienić: soki owocowe, produkty alkoholowe, płatki śniadaniowe, miody czy produkty mleczne dla dzieci. Wysokie stężenie furfuralu i hydroksymetylofurfuralu jest wynikiem wystąpienia reakcji Maillarda lub degradacji cukrów katalizowanej kwasami. Reakcje te są głównym źródłem brązowienia nieenzymatycznego w przechowywanych środkach spożywczych i innych produktach naturalnych. Wpływają na zmiany smaku, zapachu, barwy oraz na teksturalne cechy produktów [26].

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu temperatury wypieku kruchych ciastek na powstawanie wybranych pochodnych furanowych.

Material i metody badań

Procedura wypieku

Ciastka wypiekano w piecu laboratoryjnym (Miwe Condo, Niemcy) w temp.: 200, 215, 230 i 245 °C. Jako środek słodzący zastosowano fruktozę (Chempur Piekary Śląskie) w ilości 20 % (m/m). Do przygotowania ciasta używano mąki pszennej typu 550 (PZZ Kraków) w ilości 50 % (m/m) oraz tłuszczu cukierniczego "Kasia" (Unilever, Polska) w ilości 30 % (m/m). Wszystkie ilości składników podano w stosunku do masy ciasta. Po odważeniu składniki były mieszane i zagniatane ręcznie aż do uzyskania jednolitej masy ciasta. Przygotowane ciasto umieszczano na 30 min w temp. 4 °C. Po tym czasie formowano ciastka (5 mm wysokości i 50 mm średnicy). Po rozpoczęciu pieczenia co minutę pobierano partię ciastek z komory wypiekowej i kierowano do analizy na zawartość pochodnych furanowych (HMF, F_{ol} oraz F_{al}). W czasie wypieku prowadzono pomiar temperatury wewnątrz ciastek za pomocą czujnika światłowodowego Reflex RFX-2 (Neoptix, Kanada).

Analiza chromatograficzna

Okolo 1 g zmielonych ciastek odważano na wadze analitycznej (z dokładnością do 0,1 mg) do naczynka wirówkowego o pojemności 25 cm³. Dodawano 20 cm³ mieszaniny (3-procentowy roztwór acetonitrylu w 0,1-procentowym kwasie mrówkowym) oraz po 1 cm³ roztworu Carreza I i Carreza II. Próbkę mieszano intensywnie przez 5 min. Otrzymaną zawiesinę wirowano przez 20 min przy 5000 × g (4 °C). Supernatant zlewano do kolby miarowej o poj. 25 cm³ i dopełniano eluentem do objętości. Bezpośrednio przed analizą chromatograficzną próbkę przesączało przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μm.

Analizę pochodnych furanowych wykonywano za pomocą zestawu chromatograficznego firmy Knauer, wyposażonego w detektor UV-VIS (Knauer, Niemcy). Parametry rozdziału chromatograficznego były następujące: szybkość przepływu: 1 cm³/min, λ = 285 nm (analiza HMF), λ = 250 nm (analiza F_{al}), λ = 215 nm (analiza F_{ol}), kolumna RP-18 Lichrosphere (250 × 4 mm, 5 μm średnica cząstek wypełnienia) (Knauer, Niemcy), objętość pętli nastrzykowej: 20 μl, temp. kolumny: 30 °C. Pomiary wykonywano w dwóch powtórzeniach, a otrzymane wykresy chromatograficzne analizowano za pomocą programu Eurochrom (Knauer, Niemcy).

Analizę pochodnych furanowych poprzedzono wykonaniem krzywych kalibracyjnych. Do oznaczania HMF wyznaczono krzywą opisaną równaniem $y = 0,3991x - 0,6899$ ($R^2 = 0,9997$), w przypadku F_{ol} $y = 0,493x + 0,1021$ ($R^2 = 0,9997$), a F_{al} $y = 0,2547x - 0,0562$ ($R^2 = 0,9998$). Kalibrację wykonano w zakresie stężeń od 0,25 do 25,0 mg/dm³ (HMF), od 0,5 do 5,5 mg/dm³ (F_{ol}) oraz od 0,6 do 6,0 mg/dm³ (F_{al}).

Analiza aktywności antyoksydacyjnej wobec DPPH

Analizę aktywności antyoksydacyjnej ciastek wykonywano wobec metanolowego roztworu DPPH^{*} na podstawie pracy Turkmena i wsp. [31]. Sporządzano ekstrakty metanolowe ciastek poprzez zmieszanie zmielonej próbki ciastek o masie około 1 g z 10 cm³ metanolu. Próbkę wytrząsano około 5 min, a następnie wirowano 20 min przy 5000 × g. Supernatant przenoszono do kolby miarowej o poj. 25 cm³. Materiał ekstrahowano dwukrotnie, a następnie kolbę miarową dopełniano metanolem. Z przygotowanych ekstraktów pobierano po 1 cm³ roztworu i dodawano do niego 1 cm³ roztworu DPPH^{*} o stężeniu 0,18 mM. W próbie zerowej ekstrakt zastępowano metanolem. Tak przygotowane próbki inkubowano bez dostępu światła w temp. 20 ± 2 °C przez 60 min, a następnie mierzono absorbancję przy użyciu spektrofotometru (Spectro UV-VIS Dual Beam UVS-2800, Labomed, Inc. USA) przy długości fali λ = 517 nm.

Aktywność antyoksydacyjną (AA) wyrażano jako procent redukcji DPPH^{*} i obliczano z równania:

$$AA[\%] = \frac{(Abs_{zero} - Abs_{próbka})}{Abs_{zero}} \times 100\%$$

gdzie: AA – stopień inibicji DPPH^{*}, Abs_{zero} – absorbancja próby zerowej, Abs_{próbka} – absorbancja próby właściwej. Oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Analogicznie przeprowadzono analizę potencjału antyoksydacyjnego wybranych pochodnych furanowych (HMF, F_{al}, F_{ol}), w stężeniach odpowiadających maksymalnym stężeniom tych związków obserwowanym w materiale badawczym. Oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Analiza całkowitej pojemności redukcyjnej

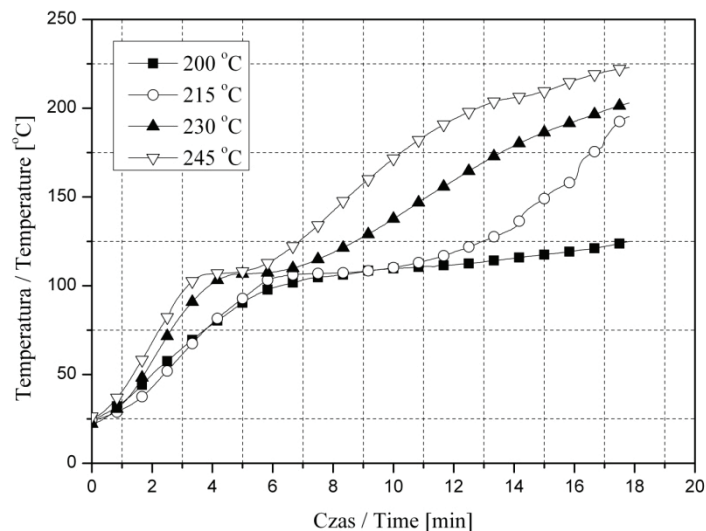
Analizę wykonywano z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu'a [12]. Próbki ciastek (1 g) ekstrahowano 40 cm³ 80-procentowego (v/v) wodnego roztworu metanolu przez 60 min. Otrzymaną zawiesinę wirowano przez 5 min przy 800 × g. Po przesączeniu supernatantu przez bibułę filtracyjną, 5 cm³ przesącza pobierano ilościowo do kolby miarowej o poj. 50 cm³ i uzupełniano do kreski wodą destylowaną. Z otrzymanego roztworu pobierano 5 cm³ i łączono z 0,25 cm³ odczynnika Folina-Ciocalteu'a (rozcieńczonego wodą dejonizowaną w stosunku 1:1 (v/v)), następnie dodawano 0,5 cm³ 7-procentowego roztworu węgla sodu i całość mieszano. Po 30 min przetrzymywania próbki bez dostępu światła mierzono absorbancję (Spectro UV-VIS Dual Beam UVS-2800, Labomed, Inc. USA) przy długości fali $\lambda = 760$ nm. Do wykonania krzywej kalibracyjnej użyto katechiny w zakresie stężeń od 2 do 250 mg/dm³. Wyznaczoną krzywą opisuje równanie $y = 0,05601x + 0,0124$ ($R^2 = 0,9994$). Wyniki wyrażano jako równoważnik katechiny (mg) na 100 g kruchych ciastek. Analizę wykonano w trzech powtórzeniach.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonywano za pomocą programu Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem Tukeya na poziomie istotności $p = 0,05$.

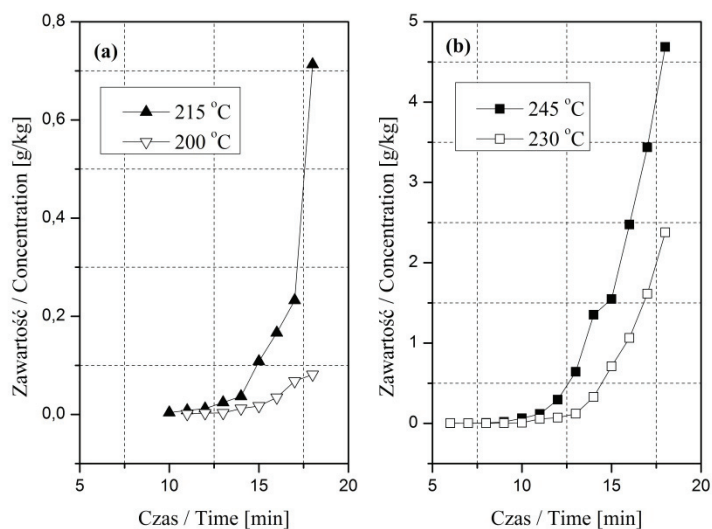
Wyniki i dyskusja

Podstawowymi czynnikami wpływającymi na ilość tworzących się w czasie wypieku pochodnych furanowych są czas i temperatura wypieku. Niektórzy autorzy zakładają, że synteza hydroksymetylofurfuralu przebiega zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu [2, 5]. Jednakże należy zauważyć, że synteza pochodnych furanowych, w tym HMF, w produktach spożywczych jest wieloetapowa i nie powinna być opisywana prostymi równaniami kinetycznymi [15]. Według Gökmena i wsp. [11] synteza HMF następuje przy średniej aktywności wody wynoszącej około 0,4 i jest to wartość niezależna od temperatury. Na wytworzenie jednego mola HMF z jednego mola heksozy wymagane jest uwolnienie trzech moli wody, dlatego jej obecność w początkowej fazie procesu pieczenia może hamować reakcję powstawania HMF (autoinhibicja). W czasie wypieku, po początkowym wzroście temperatury wewnątrz ciastek następuje jej stabilizacja przy wartości około 100 °C (rys. 1). Jest to wynikiem wyrównywania się szybkości procesów transportu ciepła do produktu z obniżeniem temperatury na skutek odparowania wody (wysoka entalpia parowania wody). Po pewnym czasie w układzie zaczyna dominować transport ciepła do produktu. Następuje wtedy, na skutek zmniejszenia zawartości wody, gwałtowny wzrost temperatury wewnątrz ciastka.



Rys. 1. Profile zmiany temperatury wewnątrz ciastek w czasie wypieku.

Fig. 1. Profiles of temperature changes inside the cookies during baking.



Rys. 2. Zmiany zawartości hydroksymetylofurfuralu w kruchych ciastkach w czasie wypieku.

Fig. 2. Changes in the concentration of hydroxymethylfurfural while baking crispy buttery cookies

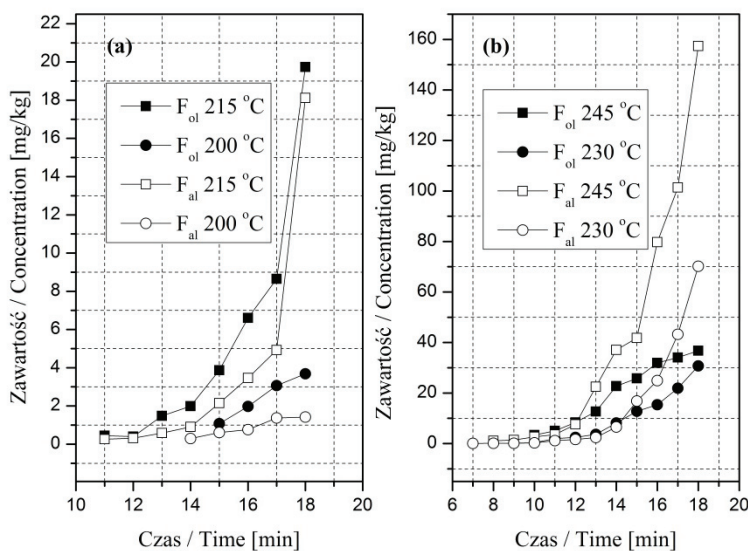
Wraz ze wzrostem temperatury następuje zwiększenie szybkości syntezy pochodnych furanowych, a zwłaszcza HMF. Po 10 min wypieku zawartość HMF w ciastkach wynosiła około $1,0 \times 10^{-3}$, $4,7 \times 10^{-3}$, $8,0 \times 10^{-3}$ i $60,0 \times 10^{-3}$ g/kg, odpowiednio w temp. od

200 do 245 °C. Z kolei po 15 min w tych samych temperaturach w ciastkach oznaczono HMF: 0,015, 0,1, 0,6 i 1,5 g/kg (rys. 2).

Powyższe obserwacje są zgodne ze spostrzeżeniami innych autorów, którzy również obserwowali wzrost zawartości HMF o dwa rzędy wielkości w czasie wypieku produktów ciastkarskich w temp. wyższych niż 200 °C [1].

Istotny wpływ na powstawanie pochodnych furanowych ma ponadto czas obróbki wysokotemperaturowej. W badaniach przeprowadzonych przez Ozolina i wsp. [23], dotyczących powstawania hydroksymetylofurfuralu w chlebie żytnim, stwierdzono około pięciokrotny wzrost zawartości HMF w czasie wypieku (75 min) przy stałej temp. 250 °C. Mniejszy wzrost zawartości HMF w tym przypadku należy wiązać z większą zawartością wody w pieczywie niż w produktach ciastkarskich.

Ciastka wypiekane w temp. 200 °C charakteryzowały się prawie trzykrotnie mniejszą zawartością aldehydu niż alkoholu furfurylowego. W temp. 215 °C również stwierdzono początkowo większą zawartość F_{ol} w porównaniu z F_{al} , chociaż pod koniec wypieku wartości te były do siebie zbliżone (rys. 3). W temp. 200 i 215 °C F_{ol} oraz F_{al} wykryto po jedenastej minucie wypieku. Natomiast w temp. 230 i 245 °C stwierdzono większą zawartość aldehydu aniżeli alkoholu furfurylowego, a pod koniec wypieku zaobserwowano ponad czterokrotnie większą zawartość F_{al} w stosunku do F_{ol} . Jest to wynikiem intensywnego utleniania alkoholu do aldehydu w wyższych temperaturach.

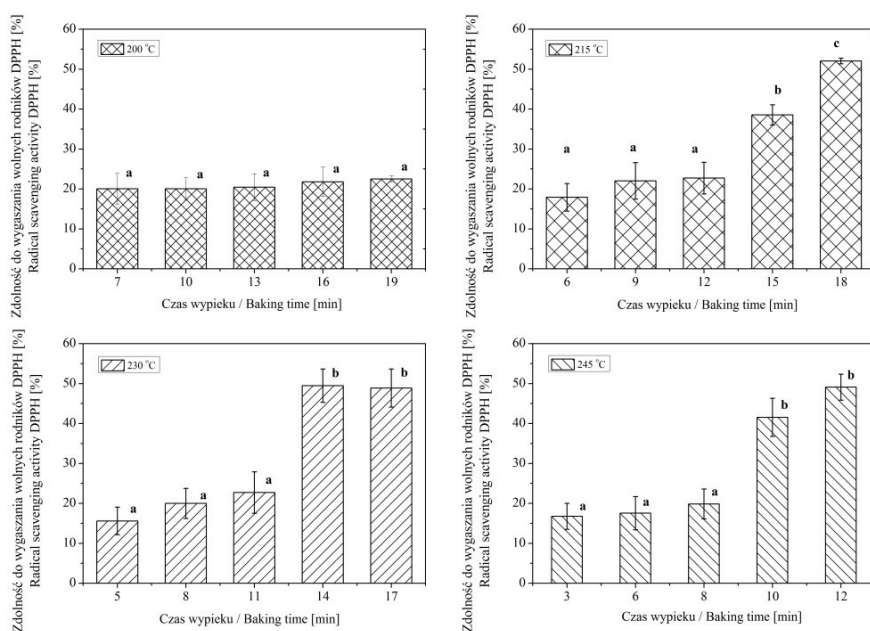


Rys. 3. Zmiany zawartości furfuralu i furfurylu w kruchych ciastkach czasie wypieku.

Fig. 3. Changes in the concentration of furfural and furfuryl alcohol in crispy buttered cookies during baking.

Aktywność antyoksydacyjna to jedna z właściwości funkcjonalnych produktów brązowienia nieenzymatycznego. Sądzi się, że produkty reakcji Maillarda mogą wpływać na lepszą stabilność oksydacyjną produktów [20]. Z przeprowadzonej analizy aktywności antyoksydacyjnej względem DPPH' wynika, że wraz z upływem czasu wypieku zwiększał się potencjał przeciwutleniający analizowanych ciastek (rys. 4).

W przypadku temp. 200 °C zaobserwowano wzrostową tendencję do wygaszania wolnych rodników, jednak zmiany te nie były statystycznie istotne. W wyższych temperaturach wypieku stwierdzono statystycznie istotny ($p = 0,05$) wzrost potencjału antyoksydacyjnego po 12, 11 i 8 min wypieku, odpowiednio w temp. 215, 230 i 245 °C. Równocześnie nie stwierdzono zdolności do wygaszania wolnych rodników przez roztwory HMF, F_{ol} i F_{al} , co wskazuje, że całkowity wzrost właściwości przeciwutleniających ciastek w czasie wypieku jest związany z powstawaniem melanoidyn oraz innych produktów syntezowanych, np. w reakcjach Maillarda. Odnosnie do zawartości hydroksymetylofurfuralu Morales i wsp. [20] stwierdzili, że aktywność antyoksydacyjna w ciastkach nie jest związana z jego tworzeniem.



Objaśnienie: / Explanatory notes:

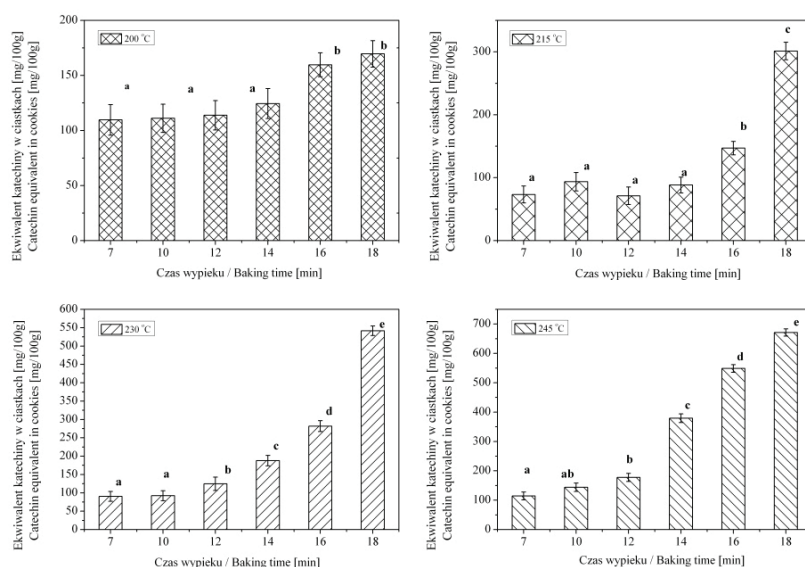
wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy $p = 0,05$ / mean values denoted by the same letter do not differ statistically significantly at $p = 0.05$.

Rys. 4. Aktywność antyoksydacyjna ciastek wypiekanych w temp. 200, 215, 230 i 245 °C.

Fig. 4. Antioxidant activity of cookies baked at temperatures of 200, 215, 230 and 245 °C.

Kolejnym etapem badań było wyznaczenie całkowitej aktywności redukcyjnej wypieczonych ciastek w reakcji z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a. Na podstawie badań mechanizmu reakcji stwierdzono, że z odczynnikiem tym reaguje szeroka gama związków, m.in. białka i jony metali, które wykazują właściwości redukujące oraz związki z grupy polifenoli. Na tej podstawie w literaturze sugeruje się odejście od nieprecyzyjnego określenia „oznaczenie zawartości polifenoli ogółem” na korzyść bardziej ścisłego terminu: „oznaczenie całkowitej aktywności redukcyjnej” [13].

Oznaczenie całkowitej aktywności redukcyjnej w badanych ciastkach pozwoliło stwierdzić, że wraz ze wzrostem temperatury i czasu jej działania zwiększała się ilość związków o charakterze wykazujących działanie redukcyjne (rys. 5). Z kolei nie stwierdzono, aby analizowane pochodne furanowe reagowały z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a.



Objaśnienie: / Explanatory notes:

wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie przy $p = 0,05$ / mean values denoted by the same letter do not differ statistically significantly at $p = 0.05$.

Rys. 5. Całkowita aktywność redukcyjna w ciastkach wypiekanych w temp.: 200, 215, 230 i 245 °C, wyrażona jako ekwiwalent katechiny.

Fig. 5. Total reducing capacity in cookies baked at temperatures of 200, 215, 230 and 245 °C, and expressed as catechin equivalent.

Wraz ze wzrostem czasu wypieku wzrastała całkowita aktywność redukcyjna niezależnie od zastosowanej temperatury wypieku (rys. 5). Najwyższy potencjał redukcyjny wykazano w próbkach ciastek wypiekanych w temp. 230 i 245 °C. Wyniki uzy-

skane w 200 i 215 °C również wykazują podobną, choć mniej znaczącą tendencję. Również inni autorzy stosowali tę samą metodę i obserwowali wzrost zdolności redukujących pod wpływem działania temperatury [7]. Może być to związane ze zwiększaniem się dostępności związków wchodzących w reakcję z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a poprzez uwalnianie się lub degradację związków z matrycy (mąki). Możliwą przyczyną może być także powstawanie nowych związków w reakcjach Maillarda.

Według Manzocco i wsp. [17] istnieje dodatnia korelacja liniowa pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a barwą produktu. Zauważono również spadek zdolności antyoksydacyjnej we wczesnych etapach reakcji Maillarda, co można również zaobserwować w badanych ciastkach wypiekanych w temp. 215 °C, chociaż zmiany te nie były statystycznie istotne ($p = 0,05$).

Morales i wsp. [20] stwierdzili, że na aktywność antyoksydacyjną produktów reakcji Maillarda wpływa wiele czynników, wśród których należy wymienić: rodzaj i proporcje związków aminowych do cukrów, temperaturę, pH i aktywność wody. Poza tym dowiedli, że w ciastkach słodzonych glukozą wytworzyło się więcej związków mających zdolność wygaszania wolnych rodników aniżeli w tych zawierających sacharozę. Według autorów związane jest to z wyższą reaktywnością cukrów prostych w reakcjach Maillarda i karmelizacji.

Wnioski

1. Synteza pochodnych furanowych w ciastkach jest uzależniona od temperatury oraz czasu wypieku. Największa kumulacja tych związków następuje po odparowaniu wody i nagłym zwiększeniu temperatury wewnątrz produktu.
2. Wraz ze zwiększaniem się temperatury wypieku zwiększa się stężenie aldehydu furfurylowego w analizowanych produktach. Niezależnie od stosowanej temperatury wypieku największy udział wśród powstających pochodnych furanowych ma hydroksymetylofurfural.
3. Dłuższy czasu wypieku skutkuje wzrostem potencjału antyoksydacyjnego ciastek na skutek powstawania produktów reakcji Maillarda.

Badania zrealizowano w ramach DS. 3700/WTŻ/2014

Literatura

- [1] Ameer L.A., Mathieu O., Lalanne V., Trystram G., Birlouez-Aragon I.: Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. *Food Chem.*, 2007, **4** (101), 1407-16.

- [2] Ameer L.A., Trystram G., Birlouez-Aragon I.: Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the baking process: Validation of an extraction method. *Food Chem.*, 2006, **4 (98)**, 790-796.
- [3] Arts J.H.E., Muijser H., Appel M.J., Frieke Kuper C., Bessems J.G.M., Woutersen R.A.: Subacute (28-day) toxicity of furfural in Fischer 344 rats: a comparison of the oral and inhalation route. *Food Chem. Toxicol.*, 2004, **9 (42)**, 1389-1399.
- [4] Bakhiya N., Monien B., Frank H., Seidel A., Glatt H.: Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate the cellular accumulation of 5-sulfooxymethylfurfural, a reactive, nephrotoxic metabolite of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, **4 (78)**, 414-419.
- [5] Capuano E., Ferrigno A., Acampa I., Serpen A., Açar Ö.Ç., Gökmen V., Fogliano V.: Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Res. Int.* 2009, **9 (42)**, 1295-302.
- [6] Capuano E., Fogliano V.: Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A Review on Metabolism, Toxicity, Occurrence in Food and Mitigation Strategies. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2011, **4 (44)**, 793-810.
- [7] Cho A.R., Park K.W., Kim K.M., Kim S.Y., Han J.: Influence of roasting conditions on the antioxidant characteristics of Colombian coffee (*Coffea arabica* L.) Beans. *J. Food Biochem.*, 2013, in press (DOI: 10.1111/jfbc.12045).
- [8] Chuda Y., Ono H., Ohnishi-Kameyama M., Matsumoto K., Nagata T., Kikuchi Y.: Mume-fural, citric acid derivative improving blood fluidity from fruit-juice concentrate of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **3 (47)**, 828-831.
- [9] Delgado-Andrade C., Seiquer I., Navarro M.P., Morales F.J.: Estimation of hydroxymethylfurfural availability in breakfast cereals. Studies in Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **5 (46)**, 1600-1607.
- [10] Ding X., Wang M-Y., Yao Y-X., Li G-Y., Cai B-C.: Protective effect of 5-hydroxymethylfurfural derived from processed *Fructus Corni* on human hepatocyte LO2 injured by hydrogen peroxide and its mechanism. *J. Ethnopharmacol.*, 2010, **2 (128)**, 373-376.
- [11] Gökmen V., Açar Ö.Ç., Köksel H., Acar J.: Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chem.*, 2007, **3 (104)**, 1136-1142.
- [12] Hillis W.E., Swain T.: Influence of illumination on the synthesis of leuco-anthocyanins in leaves. *Nature*, 1957, **179**, 586-587.
- [13] Huang D., Boxin O.U., Prior R.L.: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **6 (53)**, 1841-1856.
- [14] Kowalski S., Lukaszewicz M., Duda-Chodak A., Ziec G.: 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) – Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation - a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2013, **4 (63)**, 207-225.
- [15] Kowalski S., Lukaszewicz M., Juszcak L., Kutyla-Kupidura E.M.: Dynamics of 5-Hydroxymethylfurfural formation in shortbreads during thermal processing. *Czech J. Food Sci.*, 2013, **1 (31)**, 33-42.
- [16] Kroh L.W.: Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.*, 1994, **4 (51)**, 373-379.
- [17] Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli M.C., Lerici C.R.: Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 2000, **9-10 (11)**, 340-346.
- [18] Michalska A., Zielinski H.: Produkty reakcji Maillarda w żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **2 (51)**, 5-16.

- [19] Monien B.H., Herrmann K., Florian S., Glatt H.: Metabolic activation of furfuryl alcohol: formation of 2-methylfuranyl DNA adducts in *Salmonella typhimurium* strains expressing human sulfotransferase 1A1 and in FVB/N mice. *Carcinogenesis*, 2011, **10 (32)**, 1533-1539.
- [20] Morales F.J., Martin S., Açar Ö.Ç., Arribas-Lorenzo G., Gökmen V.: Antioxidant activity of cookies and its relationship with heat-processing contaminants: a risk/benefit approach. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **3 (228)**, 345-354.
- [21] NTP Technical Report. Toxicology and carcinogenesis studies of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural. U.S. Department of Health and Human Services, Waszyngton 2010.
- [22] Oliva-Teles M.T., Delerue-Matos C., Alvim-Ferraz M.C.M.: Determination of free furfuryl alcohol in foundry resins by chromatographic techniques. *Anal. Chim. Acta*, 2005, **1-2 (537)**, 47-51.
- [23] Ozolina V., Kunkulberga D., Cieslak B., Obiedzinski M.: Furan derivatives dynamic in rye bread processing. *Procedia Food Sci.*, 2011, **1**, 1158-1164.
- [24] Perez Locas C., Yaylayan V.: Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **15 (56)**, 6717-6723.
- [25] Richardson P.: *Thermal Technologies in Food Processing*. 1. Ed. CRC Press, New York 2001.
- [26] Rocha S.M., Coimbra M.A., Delgadillo I.: Occurrence of furfuraldehydes during the processing of *Quercus suber* L. cork. Simultaneous determination of furfural, 5-hydroxymethylfurfural and 5-methylfurfural and their relation with cork polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 2004, **3 (56)**, 287-293.
- [27] Rufián-Henares J.A., Delgado-Andrade C., Morales F.J.: Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *J. Cereal Sci.*, 2006, **1 (43)**, 63-69.
- [28] Sriwilaijaroen N., Kadowaki A., Onishi Y., Gato N., Ujike M., Odagiri T., Tashiro m., Suzuki Y.: Mumeifural and related HMF derivatives from Japanese apricot fruit juice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A (H1N1) virus. *Food Chem.*, 2011, **1 (127)**, 1-9.
- [29] Sun D-W.: *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality. Issues*. 1. Ed. CRC Press, Boca Raton 2005.
- [30] Tewari G., Juneja V.: *Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation*. 1. Ed. Wiley-Blackwell, Oxford 2007.
- [31] Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E.S., Velioglu Y.S.: Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.*, 2006, **4 (95)**, 653-657.
- [32] Ulbricht R.J., Northup S.J., Thomas J.A.: A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1984, **5 (4)**, 843-853.
- [33] Utsunomiya H., Takekoshi S., Gato N., Utatsu H., Motley E.D., Eguchi K., Fitzgerald T., Mifune M., Frank G.D., Eguchi S.: Fruit-juice concentrate of Asian plum inhibits growth signals of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II. *Life Sci.*, 2002, **6 (72)**, 659-667.
- [34] Wang M-Y., Zhao F-M., Peng H-Y., Lou C-H., Li Y., Ding X., Yu X-Y., Yang G-M., Xu D-Q., Jiang L-H., Zhang X., Ye L-X., Cai B-Ch.: Investigation on the morphological protective effect of 5-hydroxymethylfurfural extracted from wine-processed *Fructus corni* on human L02 hepatocytes. *J. Ethnopharmacol.*, 2010, **2 (130)**, 424-428.
- [35] Yaylayan V. Classification of the Maillard reaction: A conceptual approach. *Trends Food Sci. Technol.*, 1997, **1 (8)**, 13-18.

**EFFECT OF BAKING CONDITIONS OF SHORTBREAD-BISCUITS
ON FORMATION OF FURAN DERIVATIVES AND ON CHANGES
IN ANTIOXIDANT CAPACITY**

S u m m a r y

The objective of the research study was to analyze the effect of temperature while baking crispy buttery cookies on the formation of some selected furan derivatives, such as 5-hydroxy-2-methylfurfural (HMF), furfuryl alcohol (F_{ol}), and aldehyde (F_{al}). Shortbread-biscuits were baked under the laboratory conditions at a temperature of 200, 215, 230, and 245 °C. The changes in temperatures were monitored using a fibre optic sensor situated in the core of the cake. The baked cookies were analyzed for their antioxidant capacity. It was found that the formation of furan derivatives in cookies depended on the time and temperature of baking, and the biggest accumulation of those compounds occurred after water was evaporated and, as a result thereof, a sudden increase in the temperature inside the product occurred. The concentration of F_{al} in the product analyzed increased to ca. 160 mg/kg with the increase in the baking temperature to 245 °C, whereas, under the same conditions, the concentration of F_{ol} did not exceed 40 mg/kg. Regardless of the baking temperature, HMF was the major part of furan derivatives formed, and its maximum concentration in the analyzed material was more than 4.5×10^3 mg/kg. A longer baking time results in the increase in antioxidant capacity of the product due to the formation of Maillard products.

Key words: shortbread-biscuits, hydroxymethylfurfural, furfural, furfurol, antioxidant capacity ☒

DARIUSZ KIKUT-LIGAJ

PROGNOZOWANIE SMAKU GORZKIEGO CHROMONÓW I FUROCHROMONÓW NA PODSTAWIE PROSTEGO MODELU FARMAKOFOROWEGO (SPM)

Streszczenie

Chromony i furochromony charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną. Pochodne należące do tych grup związków wykazują zróżnicowane działanie farmakologiczne. Smak gorzki jest jednym z ważniejszych wyróżników sensorycznych determinujących cechy jakościowe żywności. Badania nad smakiem gorzkim mają kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia złożonej problematyki akceptacji i nieakceptowania kompozycji smakowych wielu produktów spożywczych. W celu wyznaczenia gorzkiej aktywności smakowej badanych związków zastosowano tzw. 3D modele farmakoforowe. Przeanalizowano takie „klasyczne” funkcje farmakoforowe, jak akceptory i donory wiązań wodorowych (HBA i HBD) oraz obszary grup halogenowych (HAL) i aromatyczno-hydrofobowych (AR/H). Uzyskane reprezentacje farmakoforowe badanych ligandów zawierają obszary o cechach nukleofilowych, jak i aromatyczno-hydrofobowych. Intensywność smaku gorzkiego (ISG) badanych związków jest bezpośrednio zależna od liczby reprezentacji farmakoforowych. Stwierdzono, że ligandy dysponujące kilkoma reprezentacjami farmakoforowymi szybciej i efektywniej aktywują białko receptorowe. Dowiedziono również, że najistotniejsza dla stymulacji smakowej jest liczba obszarów pobudzających receptor (LPI) oraz wyróżnik określający liczbę wpasowań pojedynczego liganda w hipotetyczny obszar receptorowy (LIS). Parametry LIS i LPI to molekularne deskryptory opisujące powinowactwo badanych związków do receptora. Deskryptory formułujące równanie smakowe umożliwiły wyznaczenie wielkości prognozowanych gorzkiej aktywności smakowej (ISG_p). Prognozowane wartości intensywności smaku gorzkiego (ISG_p) badanych związków potwierdzono za pomocą sensorycznych wartości intensywności smaku gorzkiego (ISG_s).

Słowa kluczowe: chromony, furochromony, percepcja smaku gorzkiego, gorzkie ligandy, prosty model farmakoforowy (SPM)

Wprowadzenie

Zróżnicowanie percepcji smakowej u ludzi uwarunkowane jest zmianami w środowisku naturalnym, dziedziczeniem zmysłów smaku, a także uzależnione jest od rodzaju dostępnego pożywienia, akceptacji i preferencji smakowych oraz wieku i stanu

Dr D. Kikut-Ligaj, Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości, Wydz. Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań. Kontakt: darek.kikut@ue.poznan.pl

zdrowia [15, 27, 31]. Powszechnie przyjmuje się pięć podstawowych wyróżników smaku tj. słodki, słony, umami, kwaśny i gorzki [33]. Wymienione cechy są wykorzystywane do oceny składu kalorycznego żywności (słodki, umami), podaży elektrolitów (słony), zagrożenia stwarzanego przez potencjalnie zepsute lub niedojrzałe produkty (kwaśny) oraz składników toksycznych (gorzki) [34]. Szczególną rolę w rozpoznawaniu walorów jakościowych spożywanej żywności pełni smak gorzki. Identyfikacja gorzkich składników pokarmowych przez system rozpoznania smakowego jest niezbędna do przetrwania i prawidłowej egzystencji wielu gatunków zwierząt [2]. Rolą smaku gorzkiego jest przede wszystkim ochrona przed toksycznymi komponentami żywności [34] oraz zapewnienie koniecznej ilości naturalnych metabolitów, leków oraz neuro- i psychostymulantów [2, 34]. Konsekwencją tego jest akceptacja małych stężeń goryczy w pożywieniu oraz odrzucanie pokarmu wykazującego silne jej natężenie [28].

Smak gorzki identyfikują wyspecjalizowane komórki smakowe. Subpopulacja komórek receptorowych smaku gorzkiego tworzy odrębną i odseparowaną od innych komórek smakowych grupę komórek chemosensorycznych [2]. Pojedyncza komórka smaku gorzkiego rozpoznaje informacje smakowe pochodzące od wszystkich gorzkich ligandów, ponieważ ma pełną pulę receptorów identyfikujących smak gorzki [1, 6]. Sygnały pochodzące od wszystkich gorzkich receptorów przekazywane są do jednego obszaru w mózgu, co sprawia, że czuje się wyłącznie smak gorzki bez możliwości odróżniania poszczególnych substancji gorzkich (np. kofeiny od atropiny). W mózgu impulsy smakowe są uśredniane, wytwarzając w ten sposób obraz całkowitej intensywności gorzkiej kompozycji smakowej. Intensywność smaku gorzkiego umożliwia rozróżnienie żywności o akceptowanej kompozycji smakowej od potencjalnie toksycznej. Kompozycje smakowe produktów spożywczych są zróżnicowane nie tylko pod względem ilościowego udziału poszczególnych wyróżników smakowych, ale także pod względem składu jakościowego. Odpowiednia domieszka smaku gorzkiego może zapewnić optymalne i pożądane cechy jakościowe żywności.

W rozpoznaniu smaku gorzkiego u ludzi pośredniczą receptory sprzężone z białkiem G, do których zaliczana jest rodzina receptorów smakowych TAS2R [36]. W ostatnich latach wiele prac poświęcono charakterystyce TAS2R ssaków, a w szczególności człowieka. Ludzki genom koduje około 25 funkcjonalnych TAS2R, zaliczanych do glikoprotein [29], które mają zdolność do tworzenia homo- i heterooligomerów [19]. Coraz lepiej poznane właściwości białek receptorowych TAS2R dostarczają informacji o złożoności percepcji smakowej związanej z rozpoznawaniem smaku gorzkiego. Najnowsze badania dowiodły, że połowa gorzkich związków rozpoznawana jest przez grupę trzech białek receptorowych TAS2R10, TAS2R14 i TAS2R46 [22]. Ważnym aspektem prac badawczych nad smakiem gorzkim są badania obszarów aktywacji białek receptorowych TAS2R przez różne grupy gorzkich ligandów [3].

Przewidywanie gorzkiej aktywności smakowej wymaga zastosowania właściwych technik modelowania komputerowego. W poszukiwaniu aktywnych biologicznie związków chemicznych wykorzystywany jest tzw. wirtualny skrining (VS, ang. *Virtual Screening*) [8]. Metody VS uwzględniają znaną strukturę receptora (SBVS, ang. *Structure-Based* oraz *Target-Based virtual screening*) lub bazują wyłącznie na strukturach ligandów danego receptora (LBVS, ang. *Ligand-Based Virtual Screening*) [8]. Techniki te polegają na badaniach fizykochemicznych właściwości (steryczno-strukturalnych i elektronowych) wirtualnych ligandów.

Podstawową techniką stosowaną do opisu interakcji małowcząsteczkowych ligandów z dowolnym celem makromolekularnym jest technika 3D farmakoforowa [30]. Odszukanie właściwego modelu farmakoforowego jest związane z rozpoznaniem przestrzennej reprezentacji tzw. funkcji farmakoforowych (grup funkcyjnych różniących się pod względem np. właściwości elektronowych), niezbędnych do wygenerowania lub zablokowania aktywności biologicznej [15, 21].

W rzeczywistości farmakofor przedstawia przestrzenne ułożenie wybranych cech budowy cząsteczki, jak np. gęstość ładunków, miejsca donorowe i akceptorowe wiązań wodorowych, ugrupowania hydrofobowe lub obszary aromatyczne [30]. Farmakofor stanowi poniekąd ogólną 3D "formę molekularną", eksponującą powtarzające się właściwości w określonym zbiorze aktywnych ligandów [4]. Istnieje szereg technik, takich jak: dokowanie molekularne (ang. *Molecular Docking*) [20], QSAR (ang. *Quantitative Structure-Activity Relationships*) [14] czy analiza porównawcza pól molekularnych CoMFA (ang. *Comparative Molecular Field Analysis*) [5], które uzupełniają techniki farmakoforowe [35]. Zastosowanie w badaniach tzw. prostego modelu farmakoforowego (SPM, ang. *Simple Pharmacophore Model*) [15] ułatwia ocenę gorzkich ligandów pod względem intensywności smaku gorzkiego. Technika 3D farmakoforowa umożliwia wgląd w interakcje ligandów z celami molekularnymi, co pozwala na wyznaczenie matematycznych deskryptorów kodujących gorzką aktywność smakową.

Celem pracy było rozpoznanie parametrów strukturalnych kodujących gorzką aktywność smakową serii badanych związków chemicznych pochodzenia naturalnego. Wyznaczone metodami modelowania komputerowego parametry strukturalne posłużą do matematycznego opisu różnic gorzkiej aktywności smakowej tych związków. Zrozumienie istoty różnic w aktywności gorzkich związków chemicznych umożliwi precyzyjne sterowanie składem gorzkich kompozycji smakowych produktów spożywczych.

Material i metody badań

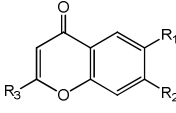
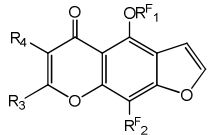
Badane związki i ich właściwości biologiczne

W badaniach użyto przedstawicieli dwóch pokrewnych klas związków chemicznych tj. pochodnych chromonowych oraz furochromonowych.

Chromony i ich furanowe pochodne (furochromony) odznaczają się zróżnicowaną aktywnością biologiczną. Wyizolowano je z roślin i metabolitów grzybowych [7]. Furochromony występują w aminku egipskim (*Ammi visnaga*), który jest rośliną dziko rosnącą w zachodniej Azji, północnej Afryce oraz w południowej Europie. Owoce i łodygi *Ammi visnaga* zawierają: pochodne furochromonów (kelinę – około 1 - 2 %, wisnaginę – do 0,1 %). Chromony i ich pochodne wykazują zróżnicowane funkcje farmakologiczne [10].

Pod względem aktywności biologicznej najlepiej rozpoznana jest kelina. Ma ona działanie przeciwbólowe, antyspastyczne, antyastmatyczne, bakteriobójcze, a ponadto reguluje poziom VLDL i LDL cholesterolu [10]. Wszystkie użyte w badaniach związki miały czystość HPLC. Przeważają je w tab. 1.

Tabela 1. Struktury związków użytych w badaniach (1-9).
Table 1. Structures of compounds used in research study (1-9).

Nr związku Compound number	Chromony / Chromones			
				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	-H	-H	-H	-
2	-CH ₃	-H	-H	-
3	-Cl	-H	-H	-
4	-Br	-H	-H	-
5	-Cl	-CH ₃	-H	-
6	-H	-H	-COOH	-
Nr związku Compound number	Furochromony / Furochromones			
				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
7	-CH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	-H
8	-CH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	-CH ₃
9	-CH ₃	-H	-H	-H

Struktura wyjściowa, jaką jest chromon (1), została poddana chemicznej modyfikacji w obszarach R_1 - R_4 oraz R^F_1 i R^F_2 . Chemiczna modyfikacja w wymienionych obszarach prowadzi do zmian właściwości nukleofilowych i elektrofilowych tych regionów.

Metody komputerowe stosowane w badaniach struktur związków 1-9

Modelowanie molekularne prowadzono przy użyciu pakietu programowego Gaussian 09W. Optymalizację geometrii struktur badanych ligandów (1-9) prowadzono stosując teorię funkcjonałów gęstości (DFT, ang. *Density Functional Theory*) z B3LYP funkcjonałem i 6-31G(2d,p) bazą [16], stymulując jednocześnie obecność wody jako rozpuszczalnika za pomocą modelu CPCM (ang. *Conducting Polarized Continuum Model*) [23, 32, 37]. Gęstość ładunków potencjału elektrostatycznego (ESP, ang. *Electrostatic Potential*) była kalkulowana i wizualizowana w pakiecie Gaussian 09W.

Funkcje farmakoforowe wyznaczono za pomocą programu LigandScout. Przeanalizowano "klasyczne" funkcje farmakoforowe, takie jak: ugrupowania będące akceptorami i donorami wiązania wodorowego (HBA i HBD, ang. *Hydrogen Bond Acceptors (Donors)*), obszary o właściwościach aromatyczno-hydrofobowych (AR/H) oraz regiony grup halogenowych (HAL). Wizualizacje prostego modelu farmakoforowego (SPM, ang. *Simple Pharmacophore Model*) [15] przeprowadzono za pomocą pakietu programowego ChemBioOffice.

Badania sensoryczne

W badaniach sensorycznych stosowano technikę przepłukiwania jamy ustnej (*sip-and-spit*) [9, 18] wodnymi roztworami badanych związków (1-9) [11, 12, 13, 17]. Przedmiotem badań były wodne roztwory chromonów i furochromonów (1-9) w stężeniach nadprogowych (0,002 g/100 ml wody dejonizowanej). Ocenę sensoryczną roztworów związków 1-9, przygotowanych metodą rozcieńczeń, przeprowadził 15-osobowy panel sensoryczny [24] tzw. „wybranych oceniających”. Zadaniem panelu sensorycznego było uporządkowanie związków 1-9 pod względem intensywności wrażenia smaku gorzkiego [24, 25, 26]. Uzyskane wyniki zostały przedstawione za pomocą skali liczbowej (0-100). Serie badawcze powtórzono trzykrotnie, a wyniki pomiarów opracowano statystycznie.

Wyniki i dyskusja

Otrzymywanie prostego modelu farmakoforowego (SPM) badanej grupy ligandów

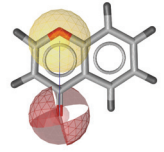
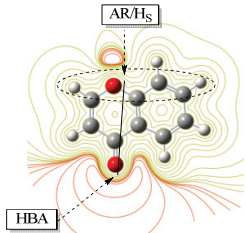
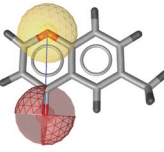
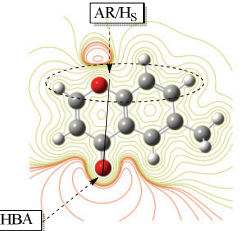
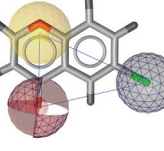
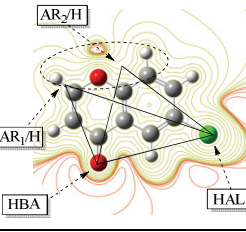
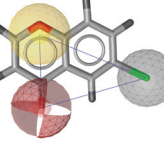
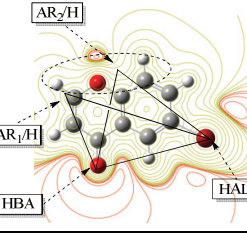
Szczegółowa definicja precyzuje farmakofor jako zespół cech sterycznych i elektronowych niezbędnych do uzyskania optymalnych oddziaływań supramolekularnych z odpowiednią strukturą biologiczną (celem molekularnym) [30]. Rozwój metod wizualizacji i modelowania komputerowego sprawił, że płaskie modele farmakoforowe (2D) zastępowane są modelami trójwymiarowymi, tzw. 3D farmakoforami [30]. Tech-

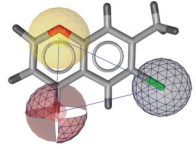
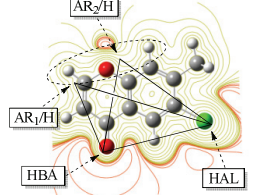
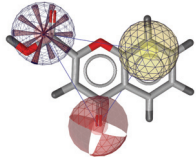
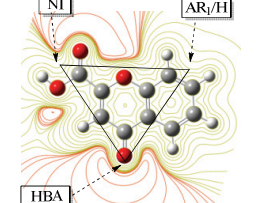
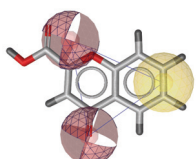
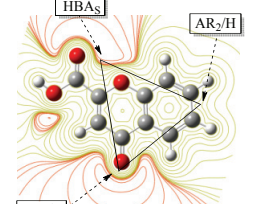
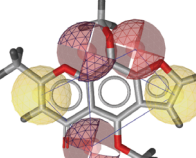
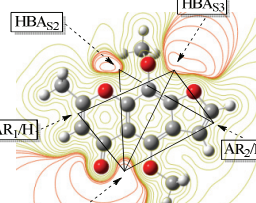
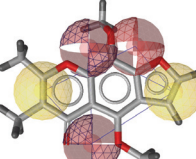
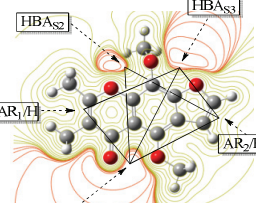
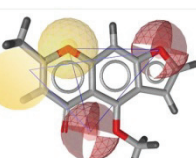
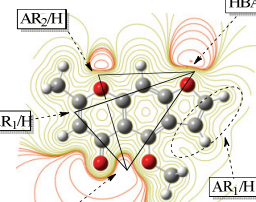
nika 3D farmakoforowa posługuje się kryterium podobieństwa, co oznacza, że podobne strukturalnie ligandy powinny wykazywać analogiczną aktywność biologiczną. Aczkolwiek pełne kryterium podobieństwa (w obrębie jednego receptora) wykazywać mogą jedynie układy multicentrowe. Reprezentacje trójcentrowe mogą różnić się między sobą, ponieważ przedstawiają jedną z kilku możliwych aktywacji siedmiomembranowego receptora. Rozpoznanie i wizualizację funkcji farmakoforowych dla związków (1-9) przeprowadzono za pomocą programu LigandScout (tab. 2). Wyjściowa struktura chromon (1) i jego strukturalne odpowiedniki (2-9) znacząco się różnią. Chromony i furochromony zawierają obszary: nukleofilowe (HBA) (w wielu przypadkach powstałe na skutek rozprzężenia kilku blisko położonych grup nukleofilowych – HBA_S), aromatyczno/hydrofobowe (AR/H) oraz regiony grup halogenowych (HAL – mające mniej elektroujemne potencjały od typowych regionów HBA).

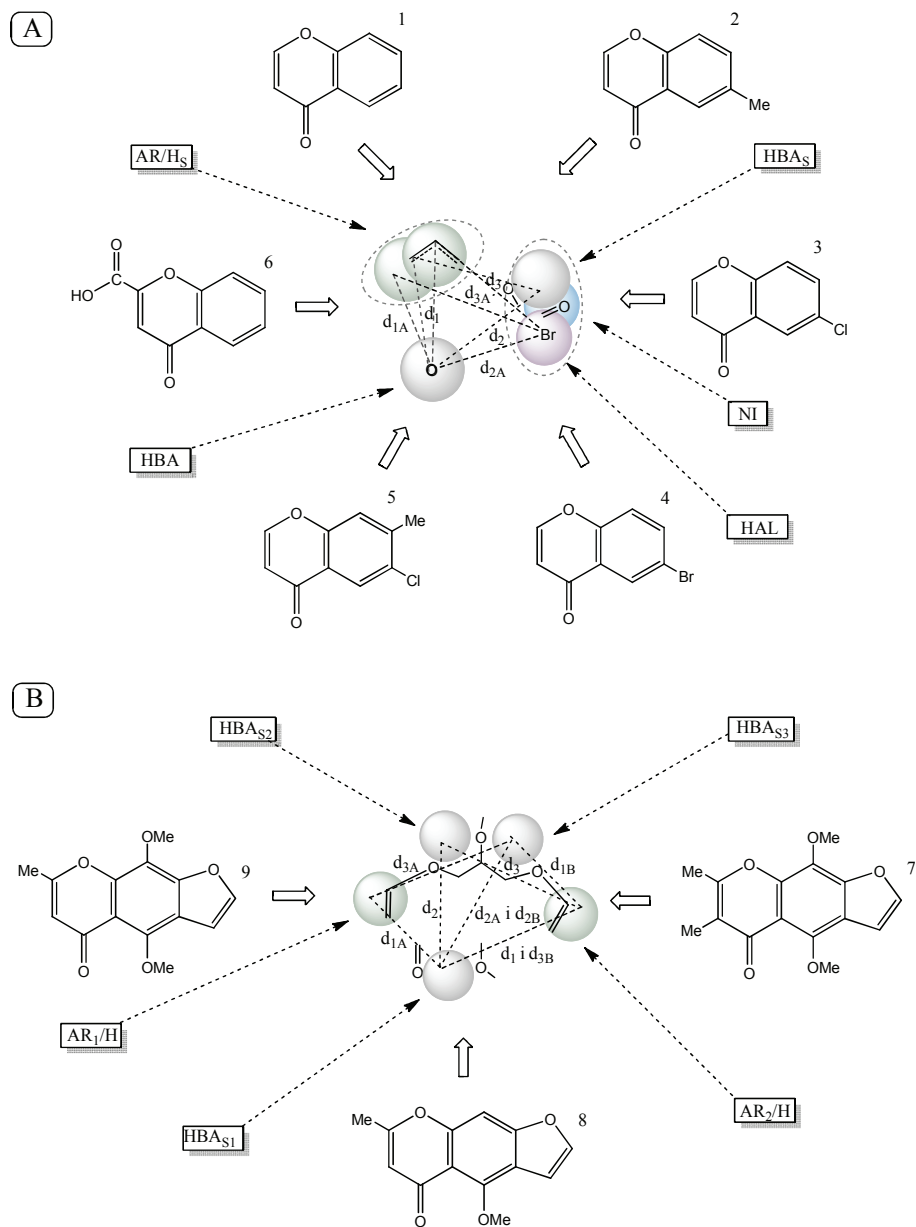
Analiza funkcji farmakoforowych (tab. 2) umożliwiła sprecyzowanie i pogrupowanie ogólnych cech powinowactwa ligandów (1-9) do receptora. Obszar grupy karbonylowej C₄=O w przypadku struktur związków 1-6 jest akceptorem wiązania wodorowego (HBA), w przypadku struktur związków 7-9 obszar ten (HBA_{S1}) jest rozmyty pomiędzy grupą karbonylową (C₄=O) i blisko położoną grupą metoksyową (O-CH₃). Pozostałe obszary HBA_S tworzą się na skutek zmian konformacyjnych, powodujących nakładanie się elektroujemnych obszarów zawierających ugrupowania C=O, O-CH₃ i -O- (6a, 7, 8). Obszary nukleofilowe modulują także liczbę tworzących się obszarów o charakterze aromatyczno-hydrofobowym (AR/H). W przypadku struktur 3-5 rozpoznano także mniej elektroujemne od obszarów HBA regiony grup halogenowych (HAL). Wizualizację przestrzennych relacji pomiędzy rozpoznanymi funkcjami farmakoforowymi (tab. 2) związków 1-9 przedstawiono za pomocą tzw. prostego modelu farmakoforowego (ang. SPM) (rys. 1).

Powyższe proste modele farmakoforowe (A i B) precyzują rozmieszczenie poszczególnych obszarów powinowactwa do obszaru receptorowego. W przypadku pochodnych chromonowych (1-6) (rys. 1A) można wyróżnić trzy obszary powinowactwa: akceptorowy (HBA), rozmyty aromatyczno-hydrofobowy (AR/H_S) oraz region o zróżnicowanej elektroujemności (HBA_S, HAL i NI). Reprezentacje farmakoforowe, jakie tworzą ligandy 7-9, są kompilacją obszarów będących akceptorami wiązań wodorowych (HBA_{S1}, HBA_{S2} i HBA_{S3}) oraz aromatyczno/hydrofobowych (AR₁/H i AR₂/H). Prosty model farmakoforowy dla furochromonów (rys. 1B, tab. 2) zawiera trzy trójcentrowe reprezentacje farmakoforowe HBA_{S1}-AR₁/H-HBA_{S3}, HBA_{S1}-AR₂/H-HBA_{S3} i HBA_{S1}-HBA_{S2}-AR₂/H. Reprezentacje farmakoforowe, takie jak: HBA-AR₁/H-HAL, (3-5) HBA-AR₂/H -HBA_S (6) i HBA_{S1}-AR₂/H-HBA_{S2} (7-8) są symetryczne, co oznacza, że aktywują receptor także reprezentacjami odwróconymi HAL-AR₁/H-HBA, (3-5) HBA_S-AR₂/H-HBA (6) i HBA_{S2}-AR₂/H-HBA_{S1} (7-8). Odległości pomiędzy poszczególnymi obszarami trójcentrowych farmakoforów podano w tab. 3.

Tabela 2. Identyfikacja funkcji farmakoforowych badanych związków (1-9).
 Table 2. Identification of pharmacophore features of compounds studied (1-9).

Nazwa/numer związku Name/Compound number	Funkcje farmakoforowe (kolor żółty - AR/H; czerwony - HBA; szary - HAL; niebieski - NI) Pharmacophoric features (yellow - AR/H; red - HBA; grey - HAL; blue - NI)	Rozkład potencjału elektrostatycznego (ESP) z rozpoznanymi funkcjami farmakoforowymi Distribution of electrostatic potential (ESP) with identified pharmacophoric features	Poszczególne reprezentacje far- makoforowe Individual pharmacophore representations
Chromon/1 Chromone/1			HBA-AR/H ₅
6-Metylochromon/2 6-Methylchromone/2			HBA-AR/H ₅
6-Chlorochromon/3 6-Chlorochromone/3			HBA-AR ₁ /H-HAL HAL-AR ₁ /H-HBA HBA-AR ₂ /H-HAL
6-Bromochromon/4 6-Bromochromone/4			HBA-AR ₁ /H-HAL HAL-AR ₁ /H-HBA HBA-AR ₂ /H-HAL

<p>6-Chloro-7-metylochromon/5 6-Chloro-7-methylchromone/5</p>			<p>HBA-AR₁/H-HAL HAL-AR₁/H-HBA HBA-AR₂/H-HAL</p>
<p>Chromokarb/6a Chromocarb/6a</p>			<p>HBA-AR₁/H-NI</p>
<p>Chromokarb/6b Chromocarb/6b</p>			<p>HBA-AR₂/H-HBA_S HBA_S-AR₂/H-HBA</p>
<p>Kelina/7 Khellin/7</p>			<p>HBA_{S1}-AR₁/H- HBA_{S3} HBA_{S1}-AR₂/H- HBA_{S3} HBA_{S2}-AR₂/H- HBA_{S1} HBA_{S1}-AR₂/H- HBA_{S2}</p>
<p>3-Metylokelina/8 3-Metylkhellin/8</p>			<p>HBA_{S1}-AR₁/H- HBA_{S3} HBA_{S1}-AR₂/H- HBA_{S3} HBA_{S2}-AR₂/H- HBA_{S1} HBA_{S1}-AR₂/H- HBA_{S2}</p>
<p>Wisnagina/9 Visnagin/9</p>			<p>HBA_{S1}-AR₂/H- HBA₂ HBA_{S1}-AR₁/H- HBA₂</p>



Rys. 1. Proponowane trzypunktowe modele farmakoforowe dla receptora smaku gorzkiego.
 Fig. 1. Suggested 3-point pharmacophore models for bitter taste receptor.

Tabela 3. Odległości pomiędzy obszarami aktywnymi badanych chromonów i furochromonów.

Table 3. Distances amongst areas in chromones and furochromones under study.

Nr związku Compound number	Odległości / Distances [nm]								
	d ₁	d ₂	d ₃	d _{1A}	d _{2A}	d _{3A}	d _{1B}	d _{2B}	d _{3B}
	Chromony / Chromones								
1	0,492	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,493	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,496	0,532	0,546	0,438	0,546	0,697	-	-	-
4	0,492	0,556	0,542	0,443	0,556	0,716	-	-	-
5	0,491	0,543	0,544	0,442	0,544	0,707	-	-	-
6	0,511	0,565	0,495	0,590	0,605	0,673	-	-	-
Średnia odległość Mean distance	0,496	0,549	0,532	0,478	0,563	0,698	-	-	-
	Furochromony / Furochromones								
7	0,526	0,496	0,556	0,436	0,544	0,591	0,367	0,544	0,525
8	0,544	0,495	0,562	0,449	0,551	0,608	0,378	0,551	0,544
9	-	-	-	0,451	0,545	0,701	0,417	0,545	0,487
Średnia odległość Mean distance	0,535	0,496	0,559	0,445	0,547	0,633	0,388	0,547	0,519

Odległości przedstawione w tab. 3. odczytano w przypadku struktur związków 1-9 zoptymalizowanych metodą DFT (B3LYP/6-31G (2d,p)) w wodzie. Wartości średnich odległości (d₁---d₂---d₃) (tab. 3) potwierdzają symetrię rozmieszczenia funkcji farmakoforowych w reprezentacjach, takich jak: HBA-AR₁/H-HAL, (3-5) HBA-AR₂/H-HBA_S (6) i HBA_{S1}-AR₂/H-HBA_{S2} (7-8). Pozostałe reprezentacje wyrażone odległościami d_{1A}---d_{2A}---d_{3A} i d_{1B}---d_{2B}---d_{3B} nie wykazują symetrycznego rozmieszczenia obszarów farmakoforowych.

Prognozowanie intensywności smaku gorzkiego ISG ligandów 1-9

Prognozowanie intensywności smaku gorzkiego (ISG_p) badanych ligandów przeprowadzono na podstawie tzw. deskryptorów molekularnych. Wszystkie ligandy (1-9) zostały scharakteryzowane deskryptorami określającymi liczbę miejsc aktywnych (LPI – liczba punktowych interakcji) oraz liczbę możliwych wpasowań (reprezentacji farmakoforowych) w teoretyczny obszar receptorowy (LIS – liczba interaktywnych sty-

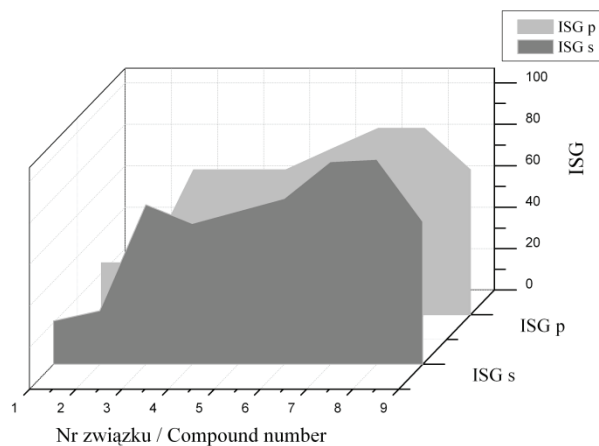
mulacji). Prognozowany indeks smaku gorzkiego wyrażano jako sumę deskryptorów LIS i LPI ($ISG_p = (\sum LPI + \sum LIS) \times 10$).

Tabela 4. Wartości prognozowanych i sensorycznych intensywności smaku gorzkiego (ISG) związków 1-9.

Table 4. Predicted and sensory values of intensity of bitter taste (IBT) of 1-9 compounds.

Numer związku Compound number	Deskryptory molekularne Molecular descriptors		Wartości prognozowane intensywności smaku gorzkiego (ISG _p)	Wartości sensoryczne intensywności smaku gorzkiego (ISG _s)
	LPI/LIS	LPI+LIS	Predicted values of intensi- ty of bitter taste (IBT _p)	Sensory values of intensity of bitter taste (IBT _s)
1	2/0,5	2,5	25	20,9 ± 3,2
2	2/0,5	2,5	25	25,8 ± 3,3
3	4/3	7	70	80,7 ± 4,2
4	4/3	7	70	68,0 ± 3,9
5	4/3	7	70	74,0 ± 4,1
6a	5/3	8	80	79,6 ± 4,1
6b				79,6 ± 4,1
7	5/4	9	90	97,8 ± 4,4
8	5/4	9	90	98,9 ± 4,5
9	5/2	7	70	68,9 ± 3,9

Wartości prognozowanych i sensorycznych intensywności smaku gorzkiego (ISG_p i ISG_s) ligandów 1-9 wykazują porównywalne wartości (tab. 4). Największą prognozowaną i sensoryczną intensywność smaku gorzkiego mają ligandy 7 i 8, odpowiednio: ISG_{p7} = 90 i ISG_{s7} = 97,8 oraz ISG_{p8} = 90 i ISG_{s8} = 98,9. Najmniejsze wartości prognozowanej i sensorycznej intensywności smaku gorzkiego mają zaś ligandy 1 i 2, odpowiednio: ISG_{p1} = 25 i ISG_{s1} = 20,9 oraz ISG_{p2} = 25 i ISG_{s2} = 25,8. Struktury związków 1 i 2 charakteryzują się brakiem typowego układu trójcentrowego, a ich stabilizacja w receptorze możliwa jest dzięki rozmyciu obszaru AR/H. Układy dwucentrowe wykazują mniej stabilne kotwiczenie od układów trójcentrowych, co przekłada się bezpośrednio na siłę powstającego wrażenia smakowego. Pozostałe ligandy (3-6 i 9) przedstawiają wysokie wartości prognozowanego ISG_p w zakresie od 70 do 80 i odpowiednio sensoryczny ISG_s w zakresie od 68,0 do 80,7. Porównanie wartości prognozowanej ISG_p i sensorycznej ISG_s przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Obraz prognozowanych i sensorycznych wartości intensywności smaku gorzkiego związków 1-9.

Fig. 2. Illustration of predicted and sensory values of the intensity of bitter taste (IBT) for compounds 1-9.

Zmiany prognozowanej intensywności smaku gorzkiego (ISG_p) związków 1-9 są proporcjonalne do zmian wartości sensorycznych intensywności smaku gorzkiego (ISG_s).

Podsumowanie

Koncepcja prostego modelu farmakoforowego (SPM) umożliwiła sprecyzowanie lokalizacji kluczowych obszarów powinowactwa serii pochodnych chromonów i furochromonów do hipotetycznego receptora. Reprezentacje farmakoforowe wszystkich badanych ligandów są kombinacjami obszarów o właściwościach nukleofilowych i aromatyczno-hydrofobowych. Intensywność smaku gorzkiego można bezpośrednio powiązać z liczbą reprezentacji farmakoforowych charakteryzującą poszczególne badane związki. Ligandy dysponujące kilkoma reprezentacjami farmakoforowymi mają zdolność do szybszej i efektywniejszej aktywacji białka receptorowego bez względu na to, jakim fragmentem skierowane są w obszar kieszeni receptorowej.

Przeprowadzone badania pozwoliły sformułować matematyczną zależność pomiędzy strukturami badanych związków a ich gorzką aktywnością ($ISG = \sum LPI + \sum LIS$). Proste równanie smakowe umożliwia przetworzenie danych zawartych w strukturze przestrzennej badanych ligandów w prognozowaną wartość intensywności smaku gorzkiego. Zidentyfikowane reprezentacje farmakoforowe dowodzą, że najistotniejsza dla stymulacji smakowej jest liczba obszarów pobudzających receptor (LPI) oraz wyróżnik określający ilość wpasowań pojedynczego liganda w hipotetyczny obszar receptorowy (LIS). Intensywność smaku gorzkiego przewidywaną za pomocą

równania smakowego potwierdziły wyniki analiz sensorycznych wodnych roztworów badanych związków.

Zrozumienie istoty różnic aktywności gorzkich związków jest szczególnie istotne do wyjaśnienia zależności pomiędzy składem a sensoryczną jakością gorzkich kompozycji smakowych produktów spożywczych. Eliminacja związków o wysokim ISG i zastąpienie ich mniej aktywnymi ligandami może ograniczyć negatywny wpływ gorzkich składników na jakość żywności oraz poprawić akceptację smakową takiej żywności.

Literatura

- [1] Behrens M., Foerster S., Staehler F., Raguse J.D., Meyerhof W.: Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogeneous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.*, 2007, **27** (46), 12630-12640.
- [2] Behrens M., Meyerhof W.: Bitter taste receptor research comes of age: from characterization to modulation of TAS2Rs. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2013, **24** (3), 215-21.
- [3] Biarnés X., Marchiori A., Giorgetti A., Lanzara C., Gasparini P., Carloni P., Born S., Brockhoff A., Behrens M., Meyerhof W.: Insights into the binding of Phenyltiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor. *PLoS One*. 2010; 5(8):e12394. doi: 10.1371/journal.pone.0012394.
- [4] Bielenica A., Kossakowski J.: Zastosowanie metod obliczeniowych do wyznaczania budowy modeli farmakoforowych receptorów 5-ht_{1a}, 5-ht_{2a} oraz 5-ht₇. *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2010, **1**, 1-12.
- [5] Caballero J.: 3D-QSAR (CoMFA and CoMSIA) and pharmacophore (GALAHAD) studies on the differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *J. Mol. Graph. Model.*, 2010, **29** (3), 363-371.
- [6] Caicedo A., Roper S.D.: Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. *Science*. 2001, **291** (5508), 1557-1560.
- [7] Chen X., Kagan J.: Photosensitized cleavage and cross-linking of pBR322 DNA with khellin and visnagin. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1993, **20** (2-3), 183-189.
- [8] Cortés-Cabrera A., Gago F., Morreale A.: A reverse combination of structure-based and ligand-based strategies for virtual screening. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2012, **26** (3), 319-327.
- [9] Delwiche J.F., Halpern B.P., Lee M.Y.: A comparison of tip of the tongue and sip and spit screening procedures. *Food Qual. Prefer.*, 1996, **7** (3-4), 293-297.
- [10] Ellenbogen W.C., Rump E.S., Geary P.A., Burke M.: Khellin. Part II. Method for the determination of two principles isolated from *Ammi visnaga* Lam. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1951, **40** (8), 287-290. doi: 10.1002/jps.3030400609.
- [11] Frank O., Blumberg S., Kunert C., Zehentbauer G., Hofmann T.: Structure determination and sensory analysis of bitter-tasting 4-vinylcatechol oligomers and their identification in roasted coffee by means of LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55** (5), 1945-1954.
- [12] Frank O., Blumberg S., Krümpel G., Hofmann T.: Structure determination of 3-O-caffeoyl-epiquinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56** (20), 9581-9585.
- [13] Jasiczak J., Kikut-Ligaj D.: Prediction of the Bitter Taste. Part III. Methodology. In: *Current Trends in Commodity Science*. Ed. R. Zieliński, Wyd. AE, Poznań, 2007, **2**, 855-862.
- [14] Kikut-Ligaj D., Jasiczak J.: The application of molecular mould of bitter taste receptor in combination with the QSAR method for prediction of taste. Part II. *Ann. Polish Chem. Soc.*, 2004, **3**, 675-679.


- [15] Kikut-Ligaj D., Jasiczak J.: Simple pharmacophore model for the prediction of bitter taste of caffeine derivatives. In: *New trends in food analytics*. Red. M. Szoltysik, A. Dąbrowska, Wyd. Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2011, pp. 85-98.
- [16] Kim J.H., Odutola J.A., Popham J., Jones L., von Laven S.: Tautomeric energetics of xanthine oxidase substrates: xanthine, 2-oxo-6-methylpurine, and lumazine. *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **84** (1-2), 145-150.
- [17] Klimacka-Nawrot E., Suchecka, W., Błońska-Fajfrowska B.: Przydatność gustometrii swoistej do oceny sprawności zmysłu smaku. *Wiad. Lek.*, 2007, **60** (9-10), 409-414.
- [18] Kreppenhofer S., Frank O., Hofmann T.: Identification of (furan-2-yl) methylated benzene diols and triols as a novel class of bitter compounds in roasted coffee. *Food Chem.*, 2011, **126** (2), 441-449.
- [19] Kuhn C., Bufe B., Batram C., Meyerhof W.: Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses*, 2010, **35** (5), 395-406.
- [20] Lauria A., Ippolito M., Fazzari M., Tutone M., Di Blasi F., Mingoia F., Almerico AM.: IKK-beta inhibitors: an analysis of drug-receptor interaction by using molecular docking and pharmacophore 3D-QSAR approaches. *J. Mol. Graph. Model.*, 2010, **29** (1), 72-81.
- [21] Martin Y.C.: Pharmacophore Modeling: 1-Methods. *Comprehensive Med. Chem. II*, 2007, **406**, 119-147.
- [22] Meyerhof W., Batram C., Kuhn C., Brockhoff A., Chudoba E., Bufe B., Appendino G, Behrens M.: The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses*, 2010, **35** (2), 157-170.
- [23] Nunes S.C., Jesus Lopes A.J., Ermelinda M., Eusébio S., Redinha J.S.: Conformational preferences of 2-isopropylaminoethanol in aqueous solution using the CPCM continuum solvation model. *J. Mol. Struct.*, 2008, **867** (1-3), 101-106.
- [24] PN-ISO 8586-1(2):1998. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania oceniających. Wybrani oceniający.
- [25] PN-ISO 8589:1998. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne dotyczące projektowania pracowni analizy sensorycznej.
- [26] PN-ISO 6658:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Wytyczne ogólne.
- [27] Reed D.R., Toshiko T., McDaniel A. H.: Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. *Physiol Behav.*, 2006, **88** (3), 215-226.
- [28] Reed D.R., Knaapila A.: Genetics of taste and smell: poisons and pleasures. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2010, **94**, 213-240.
- [29] Reichling C., Meyerhof W., Behrens M.: Functions of human bitter taste receptor depend on N-glycosylation. *J. Neurochem.*, 2008, **106** (3), 1138-1148.
- [30] Seidel T., Ibis G., Bendix F., Wolber G.: Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. *Drug Discov. Today Technol.*, 2010, **7** (4), 221-228.
- [31] Stevens D.A., Dooley D.A., Laird J.D.: Explaining individual differences in flavour perception and food acceptance. Ed. D.M.H. Thomson. *Food Acceptability*, Elsevier Applied Science, London 1988.
- [32] Takano Y., Houk K.N.: Benchmarking the Conductor-like Polarizable Continuum Model (CPCM) for aqueous solvation free energies of neutral and ionic organic molecules. *J. Chem. Theory Comput.*, 2005, **1** (1), 70-77.
- [33] Temussi P.A.: Sweet, bitter and umami receptors: a complex relationship. *Trends Biochem. Sci.*, 2009, **34** (6), 296-302.
- [34] Travers S.P., Geran L.C.: Bitter-responsive brainstem neurons: Characteristics and functions. *Physiol. Behav.*, 2009, **97** (5), 592-603.
- [35] Wolber G., Seidel T., Bendix F., Langer T.: Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discov. Today*, 2008, **13** (1-2), 23-29.

- [36] Yarmolinsky D.A., Zuker C.S., Ryba N.J.: Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 2009, **139** (2), 234-244.
- [37] Chen Z., Baker N.A., Wei G.W.: Differential geometry based solvation model I: Eulerian formulation. *J. Comput. Phys.*, 2010, **229** (22), 8231-8258.

PREDICTING BITTER TASTE OF CHROMONES AND FUROCHROMONES ON THE BASIS OF SIMPLE PHARMACOPHORE MODEL (SPM)

S u m m a r y

Chromones and furochromones are characterized by the high biological activity. Derivatives that belong to the groups of those chemical compounds show diverse pharmacological effects. Bitter taste is one of the more important sensory indicators to determine qualitative properties of food. The studies on bitter taste play a key role in accounting for complex issues involved in the acceptance (or non-acceptance) of flavour compositions of many food products. In order to assess the bitter taste activity of the compounds under study, the so-called 3D pharmacophore models were applied. A number of "conventional" pharmacophoric functions were analyzed, such as: acceptors and donors of hydrogen bonds (HBA and HBD), areas of halogen groups (HAL), and aromatic/hydrophobic groups (AR/H). The pharmacophoric representations of the ligands studied have areas of both nucleophilic and aromatic/hydrophobic properties. The intensity of bitter taste (IBT) of the compounds analyzed depends directly on the number of pharmacophore representations. The ligands with several pharmacophore representations were found to activate the receptor protein quicker and more effectively. It was also proved that the most significant for taste stimulation were the number of areas stimulating the receptor (NPI- number of point interactions) and the indicator to determine the number of possible alignments of a single ligand into a hypothetical receptor area (NIS- number of interactive stimulations). The NPI and NIS parameters are molecular descriptors defining the affinity of the compounds studied to the receptor. The descriptors formulating the taste equation made it possible to determine the predicted values of bitter taste activity. The predicted values of the intensity of bitter taste (IBT_p) of the compounds under study were successfully verified by sensory analyses of aqueous solutions of the study compounds (IBT_s).

Key words: chromones, furochromones, bitter taste perception, bitter ligands, simple pharmacophore model (SPM) 

HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA

INTERAKCJE SKŁADNIKÓW ŻYWNOŚCI

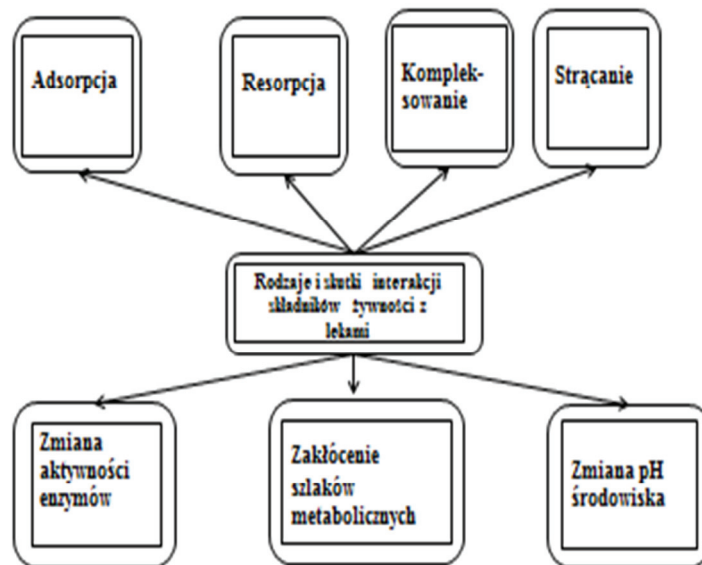
Prezentujemy 19. część cyklu nt.: „Interakcje składników żywności”. Druk materiałów z tego cyklu rozpoczęliśmy w Żywności nr 1 (74), 2011.

Dostępność i przyjmowanie leków wymaga starannej kontroli medycznej i edukacji zdrowotnej społeczeństwa. Dzięki lekom można wyzdrowieć – pod warunkiem ich prawidłowego stosowania. W przeciwnym razie skutki zażywania leków mogą być powodem pogorszenia stanu zdrowia człowieka. Dotyczy to tak ważnego zjawiska, jakim są interakcje leków ze składnikami żywności. Powstaje więc istotne **pytanie: dlaczego interakcje leków z składnikami żywności są niebezpieczne?**

Występują dwie przyczyny tego zjawiska. Po pierwsze, interakcje leków ze składnikami żywności mogą powodować osłabienie skuteczności działania leku lub jego nasilenie, co w konsekwencji powoduje zagrożenie zdrowia, a nawet życia człowieka. Tak więc nawet prozdrowotna żywność w określonych warunkach jej spożycia może okazać się dla człowieka czynnikiem przeciwdrozwrotnym, a nawet toksycznym. Z uwagi na to, kolejne części „interakcji składników żywności” będą poświęcone temu ważnemu zagadnieniu. Pod względem fizykochemicznym i biochemicznym interakcje składników żywności z lekami powstają w takich procesach, jak: adsorpcja, resorpcja, kompleksowanie, strącanie, zmiana pH, zmiana aktywności działania enzymów czy zakłócenie funkcjonowania szlaków metabolicznych (rys. 1).

Można stwierdzić, że interakcje składników żywności z aktywnymi składnikami leku są wynikiem oddziaływań fizycznych i reakcji chemicznych pomiędzy nimi. Oddziaływania te mogą mieć różnorodny charakter uwarunkowany środowiskiem przewodu pokarmowego człowieka. Z tego względu warto przytoczyć ogólne zasady funkcjonowania przewodu pokarmowego człowieka z uwzględnieniem pH i czasu transportu treści pokarmowej. Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego przedstawiono na rys. 2.

Prof. dr hab. H. Kostyra, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Oddział Nauki o Żywności, 10-747 Olsztyn, ul. Tuwima 10, prof. dr hab. E. Kostyra, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 7, 10-957 Olsztyn



Rys. 1. Rodzaje i skutki interakcji składników żywności z lekami.



Rys. 2. Układ pokarmowy człowieka.

Etapy czynności motorycznych przewodu pokarmowego człowieka są następujące: żucie pokarmu, mieszanie ze śliną i połykanie, rozdrabnianie i mieszanie treści pokarmowej w żołądku, transport przez odźwiernik do dwunastnicy, pasaż wzdłuż jelita cienkiego pokarmu poddawanego działaniu enzymów trzustkowych, jelitowych oraz żółci, zachodzenie procesów absorpcyjno-wydzielniczych, pasaż resztek pokarmu

wzdłuż jelita grubego, defekacja. Czas trwania etapów czynności motorycznej przewodu pokarmowego oraz pH środowiska zależy od metabolizmu oraz rodzaju, tempa i ilości spożywanych pokarmów. Na przykład woda przechodzi z żołądka bezpośrednio do jelit; owoce przebywają w żołądku od 15 - 40 min; warzywa od 15 - 60 min; zboża i nasiona od 90 min - 3 h; produkty mleczne od 2 - 4 h; produkty mięsne od 30 min - 4 h. Pasaż strawionego pokarmu przez jelita do momentu defekacji trwa od 1,5 - 2 h. Należy również pamiętać, że w jelicie istnieje różnorodny mikrobiologiczny ekosystem (mikrobiota), który w znacznym stopniu wpływa na efektywność trawienia pokarmu. Mając na uwadze te różnorodne czynniki, które mogą wpływać na interakcje leków ze składnikami żywności należy im poświęcić dużo większą uwagę w nauczaniu chemii i biochemii żywności oraz żywienia człowieka zdrowego i chorego. Kolejne artykuły będą przybliżać chemiczną i biochemiczną naturę tych zjawisk. ☒

GRAŻYNA MORKIS

PROBLEMATYKA ŻYWNOŚCIOWA W USTAWODAWSTWIE POLSKIM I UNIJNYM

Publikujemy kolejny przegląd aktów prawnych, które ukazały się w Dzienniku Ustaw RP i Dzienniku Urzędowym UE. Poniższe zestawienie zawiera akty prawne dotyczące szeroko omawianej problematyki żywnościowej wg stanu na dzień 31 stycznia 2014 r.

Polskie akty prawne

1. Ustawa z dn. 22 listopada 2013 r. o zmianie ustawy o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina (Dz. U. 2014 r., poz. 23).

W ustawie z dnia 12 maja 2011 r. o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina (Dz. U. Nr 120, poz. 690 i Nr 171, poz. 1016) wprowadzono zmiany. Dotyczą one m.in. wielkości wyrabianego wina, i tak przedsiębiorca, który wyrabia w danym roku kalendarzowym z przeznaczeniem do wprowadzenia do obrotu wino owocowe markowe albo cydr lub perry, uzyskane z własnych upraw drzew lub krzewów owocowych, może wyrobić nie więcej niż 5000 litrów wina owocowego markowego albo 10 000 litrów – w przypadku cydru lub perry; miód pitny markowy, przedsiębiorca może wyrobić nie więcej niż z 500 litrów miodu uzyskanego z własnej pasieki.

Producent wpisany do ewidencji składa Prezesowi Agencji deklarację o ilości win białych lub czerwonych wprowadzonych do obrotu w poprzednim roku gospodarczym (w terminie do dnia 31 sierpnia każdego roku); szacowanej ilości wina, jaka będzie wyrobiona w danym roku gospodarczym (w terminie do dnia 31 sierpnia każdego roku); szacowanej ilości winogron lub moszczu winogronowego, które będą wykorzystane do wyrobu wina w danym roku gospodarczym (w terminie do dnia 30 października każdego roku).

2. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dn. 13 stycznia 2014 r. w sprawie dokumentu potwierdzającego unieszkodliwienie zakaźnych odpadów medycznych lub zakaźnych odpadów weterynaryjnych (Dz. U. 2014 r., poz. 107).

Rozporządzenie określa m.in.:

- szczegółowy sposób wydawania dokumentu potwierdzającego unieszkodliwienie zakaźnych odpadów weterynaryjnych,
- terminy przekazywania dokumentu potwierdzającego unieszkodliwienie zakaźnych odpadów weterynaryjnych,
- wzór dokumentu potwierdzającego unieszkodliwienie zakaźnych odpadów weterynaryjnych.

Unijne akty prawne

1. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) NR 1321/2013 z dn. 10 grudnia 2013 r. ustanawiające unijny wykaz dozwolonych produktów początkowych dla środków aromatyzujących dymu wędzarniczego przeznaczonych do użycia w takiej postaci w środkach spożywczych lub na ich powierzchni lub do produkcji pochodnych środków aromatyzujących dymu wędzarniczego (Dz. Urz. UE L, 2013 r., Nr 333, s. 54).

Załącznik do niniejszego rozporządzenia zawiera wykaz dozwolonych w Unii produktów początkowych dla środków aromatyzujących dymu wędzarniczego, z wyłączeniem wszelkich pozostałych, stosowanych w środkach spożywczych lub na ich powierzchni lub do produkcji pochodnych środków aromatyzujących dymu wędzarniczego, o którym mowa w art. 6 rozporządzenia (WE) nr 2065/2003.

2. Rozporządzenie Komisji (UE) NR 59/2014 z dn. 23 stycznia 2014 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 w odniesieniu do stosowania dwutlenku siarki – siarczynów (E 220-228) w aromatyzowanych produktach na bazie wina (Dz. Urz. UE L, 2014 r., Nr 21, s. 9).

W załączniku II do rozporządzenia (WE) nr 1333/2008 wprowadzone są zmiany dotyczą ilości dopuszczalnej zawartości dwutlenku siarki – siarczanów (E 220-228) w winach aromatyzowanych, aromatyzowanych napojach na bazie wina i aromatyzowanych koktajli na bazie wina. ☒

NOWE KSIĄŻKI

Food Safety Management Programs: Applications, Best Practices, and Compliance

[Programy zarządzania bezpieczeństwem żywności: Zastosowanie, najlepsze praktyki i zgodność]

Newslow D.

Wydawnictwo: CRC Press, 2013, ISBN 9781439826799, stron 389, cena 89 £

Zamówienia: www.crcpress.com

Autorka dokonała syntezy wiedzy na temat opracowywania, wdrażania i utrzymania systemów zarządzania bezpieczeństwem żywności oraz systemu zarządzania jakością wg normy ISO 9001. Mając na uwadze różnorodność produktów spożywczych oraz wagę bezpieczeństwa żywności, przedstawiła ona charakterystykę wielu systemów: Global Food Safety Initiative (GFSI), która zawiera FSSC 22000, Safe Quality Food Code (SQF), British Retail Consortium Global Standard for Food Safety (BRC), International Featured Standards (IFS), Global Aquaculture Alliance (GAA) Seafood Processing Standard, Global Red Meat Standard (GRMS), Kanada GAP i PrimusGFS. Omówiła wymagania odnoszące się do każdego z powyższych systemów oraz możliwości integrowania tych systemów. Zawarła również wiele informacji praktycznych na temat systemów zarządzania bezpieczeństwem żywności.

Food Allergy: Adverse Reaction to Foods and Food Additives, 5th Edition

[Alergia pokarmowa: Reakcja niepożądana na żywność i dodatki do żywności Wyd. 5.]

Metcalf D. D., Sampson H. A., Simon R. A., Lack G.

Wydawnictwo: Wiley-Blackwell, 2014, ISBN: 978-0-470-67255-6, stron 624, cena 175 £

Zamówienia: <http://eu.wiley.com>

W opracowaniu monograficznym zawarto charakterystykę reakcji niepożądanych na żywność i na dodatki do żywności w przypadku dzieci i osób dorosłych. Materiał podzielono na pięć rozdziałów. Dwa rozdziały w piątym wydaniu zostały poświęcone

biotechnologii i inżynierii genetycznej. Książka stanowi wartościowy poradnik, który może być przydatny dla lekarzy, dietetyków, jak również technologów żywności.

Doskonalenie zarządzania jakością. Podstawy. Ocena. Perspektywy

Szczepańska K.

Wydawnictwo: Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2013, ISBN 978-83-7814-100-6, stron 492, cena 49 zł

Zamówienia: <http://www.wydawnictwopw.pl>

W książce szczegółowo scharakteryzowano zasady doskonalenia zarządzania jakością. Na podstawie literatury przedmiotu oraz własnych koncepcji autorka zaproponowała mierniki i wskaźniki. Omówione zostały podstawy kompleksowego i normatywnego zarządzania jakością, rozwój zasad zarządzania jakością, normatywne metody oceny zarządzania jakością. W książce zawarto również ocenę realizacji zasad zarządzania jakością. Wskazano również na możliwości zastosowania zasad zarządzania jakością w praktyce. Książka polecana jest dla studentów oraz praktyków z dziedziny zarządzania jakością.

Innowacyjność produktowa na przykładzie sektora piekarskiego

Borowska A., Kowrygo B.

Wydawnictwo: Wyd. SGGW, Warszawa 2013, ISBN 978-83-7583-516-8, stron 148, cena 20 zł

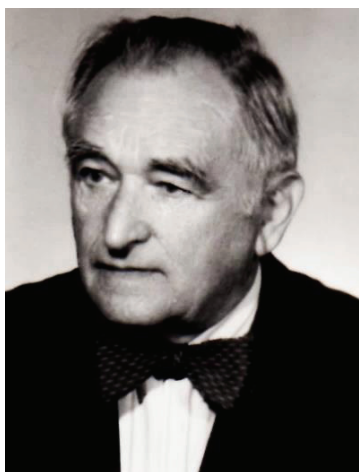
Zamówienia: www.wydawnictwosggw.pl

W monografii w sposób całościowy przedstawiono zagadnienie innowacyjności produktowej. Innowacyjność produktową rozpatrywano na podstawie sektora piekarskiego. Scharakteryzowano następujące zagadnienia: teoretyczne aspekty konkurencyjności przedsiębiorstw, innowacyjność produktową w przetwórstwie żywności, charakterystykę pieczywa oraz innowacyjność produktową przemysłu piekarskiego, sektor piekarski w Polsce (analiza i ocena wg modelu SCP), spożycie przetworów zbożowych i pieczywa, sektor piekarski w ocenie producentów (badania pierwotne), zachowania konsumentów na rynku pieczywa (badania pierwotne).

Opracowała: Magdalena Niewczas

TWÓRCY POLSKIEJ NAUKI O ŻYWNOSCI

POLSCY UCZENI PO II WOJNIE ŚWIATOWEJ PROF. DR STANISŁAW BUJAK (1914 - 2003)



Prof. dr Stanisław Bujak urodził się 31 sierpnia 1914 r. w Niemcach koło Lublina. W 1935 r. ukończył lubelskie Liceum Ogólnokształcące im. Stefana Batorego. Studia w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie rozpoczął w 1936 r., które przerwał wybuch II wojny światowej. W okresie okupacji prowadził gospodarstwo rolne wraz z gorzelnią na Podlasiu. Po zakończeniu wojny ukończył wcześniej rozpoczęte studia, specjalizując się w zakresie technologii przemysłów rolnych w Katedrze Mikrobiologii i Technologii Przemysłów Rolnych, kierowanej przez prof. dr Wacława Dąbrowskiego. Po ukończeniu studiów podjął pracę w Drożdżowni i Gorzelnii Lublin na stanowisku kierownika laboratorium, a następnie kierownika zakładu. Równoległe z pracą w drożdżowni podjął pracę w Katedrze Mikrobiologii i Technologii Przemysłów Rolnych UMCS na stanowisku starszego asystenta. Od 1950 r. skoncentrował się wyłącznie na pracy naukowej i dydaktycznej.

Prof. Bujak uzyskał stopień naukowy doktora nauk rolniczych w 1951 r. na podstawie rozprawy pt. „Przydatność wycierki ziemniaczanej i ługów posiarzynowych do produkcji drożdży paszowych”. Promotorem rozprawy była prof. dr hab. Jadwiga Ziemięcka.

W 1952 r. powołano Katedrę Technologii Rolnej na Wydziale Rolnym UMCS, której kierownikiem został dr S. Bujak. W kolejnym roku został powołany na stanowisko zastępcy profesora. Na podstawie uzyskanego dorobku naukowego i dydaktycznego dr S. Bujak otrzymał w roku 1955 tytuł naukowy docenta, natomiast Rada Państwa nadała Mu w 1963 r. tytuł naukowy profesora nadzwyczajnego, a 10 lat później otrzymał tytuł profesora zwyczajnego.

W badaniach naukowych Profesora z tamtego okresu można wyróżnić trzy zasadnicze nurty – zagadnienia o charakterze mikrobiologicznym, biotechnologicznym i związane z planowaniem gospodarczym w zakresie rozwoju przemysłu spożywczego. Prace o charakterze mikrobiologicznym dotyczyły zanieczyszczeń soków owocowych drożdżami rozsiewkowymi rozkładającymi kwas jabłkowy. Zbadano fizjologię tych drożdży i określono warunki hamujące ich rozwój. Kiedy zaczęto produkować zagęszczone soki owocowe, pojawił się problem drożdży osmofilnych. Określono ich przynależność systematyczną oraz stężenie ekstraktu hamujące rozwój tych drożdży. Prowadzono również prace nad kulturami starterowymi bakterii fermentacji mlekowej w procesie kiszenia ogórków. Poszukując drobnoustrojów przydatnych do syntezy białka na niekonwencjonalnych surowcach, zgromadzono kolekcję szczepów wykorzystujących węglowodory alifatyczne jako źródło węgla.

Z prac biotechnologicznych należy wymienić poszukiwanie szczepów aktywnie syntetyzujących enzymy celulolityczne, pektynolityczne i ksylanolityczne. Doskonalamo również metody wstępnej obróbki substratów lignocelulozowych i uboczne produkty mechanicznej obróbki drewna w celu powiększenia ich podatności na enzymatyczną hydrolizę. Zespół prof. Bujaka zajmował się również biosyntezą przez drożdże aminokwasów zawierających selenometioninę, a innych zawierających β -karoten.

Do ważniejszych osiągnięć można zaliczyć opracowanie technologii produkcji przemysłowej preparatów pektyny niskozestryfikowanej z wycieków jabłkowych. Pełnym powodzeniem zakończyły się również badania kierowane przez Profesora nad technologią sporządzania kiszzonek ziemniaczanych wzbogaconych podczas zakiszania witaminą B₁₂ dzięki użyciu bakterii propionowych. Opracowano technologię scukrzania gorzelnicznych zacierów ziemniaczanych i zbożowych przy użyciu preparatów amyloolitycznych zamiast słoju jęczmiennego.

W badaniach planistycznych Profesor określił zasadę, aby zakłady przemysłu spożywczego lokalizować w centrach baz surowcowych regionu środkowowschodniego.

Dalszy rozwój badań, ich wysoki poziom naukowy i oryginalność proponowanych rozwiązań doprowadziły do powstania szkoły naukowej liczącej się w kraju. Pod kierunkiem prof. Bujaka powstało 15 rozpraw doktorskich i 7 habilitacyjnych. Kilku Jego wychowanków uzyskało tytuły naukowe profesorów w różnych uczelniach naszego kraju. Profesor dokonywał oceny wielu rozpraw doktorskich i habilitacyjnych, oceny dorobku naukowego do tytułu profesora oraz recenzji prac przeznaczonych do druku i wyników badań prac zleconych.

Dorobek naukowy Profesora obejmuje łącznie 122 pozycje naukowe i opracowania dokumentacyjne.

Szeroki zasób wiedzy profesora był wykorzystywany w pracy dydaktycznej. Prowadził wykłady z przedmiotów: technologia rolna, mikrobiologia rolna, towaro-

znawstwo produktów pochodzenia zwierzęcego, przechowywalnictwo owoców i warzyw oraz wymagania surowcowe, bioinżynieria, mikrobiologia przemysłowa oraz ogólna technologia żywności.

Profesor Bujak pełnił wiele funkcji organizacyjnych w uczelni. Oprócz tego, że był kierownikiem Katedry Technologii Przemysłów Rolno-Spożywczych w latach 1955-1984, był też prodziekanem Wydz. Zootechnicznego, kierownikiem Rolniczych Studiów Zaocznych, prodziekanem, a następnie dziekanem Wydz. Rolniczego, prorektorem ds. nauki, pełnomocnikiem ds. organizacji Wydz. Ogrodniczego, a w latach 1976-82, w wyniku reorganizacji struktury Wydziału, dyrektorem Instytutu Chemii i Technologii Rolnej AR w Lublinie.

Profesor brał czynny udział w pracach komisji wydziałowych i senackich, takich jak: komisja dyscyplinarna dla studentów i pracowników naukowych. Pełnił także funkcję rzecznika dyscyplinarnego i do roku 1984 był członkiem Komisji dyscyplinarnej przy Radzie Głównej Ministerstwa Szkolnictwa Wyższego i Nauki. Był też aktywnym członkiem innych pozauczelnianych organizacji naukowych, takich jak: Centralna Komisja Kwalifikacyjna, Komitet Technologii i Chemii Żywności PAN – jako członek, zastępca przewodniczącego i przewodniczący, był członkiem honorowym: Komitetu Mikrobiologii PAN, Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Komitetu Biotechnologii przy Prezydium PAN. Od 1947 r. uczestniczył w pracach Stowarzyszenia Naukowo-Technicznego Inżynierów i Techników Przemysłu Spożywczego NOT i był również członkiem Zarządu Głównego tego Stowarzyszenia.

Oprócz tego Profesor Bujak był członkiem Rad Redakcyjnych czasopism: Przemysłu Fermentacyjnego i Owocowo-Warzywnego oraz *Acta Alimentaria Polonica*, jak też uczestniczył w pracach Rad Naukowych wielu instytucji np. Centralnego Lab. Przem. Paszowego, Zakładu Badawczo-Rozwojowego „Polmos” w Koninie i innych. Uczestniczył również w pracach branżowych zespołów konsultacyjnych przemysłu piwowarsko-słodowniczego oraz zespołu preparatów enzymatycznych.

Dorobek naukowy Profesora oraz udział w rozwoju kadry naukowej stał się podstawą nadania Mu zaszczytnego tytułu doktora honoris causa przez Akademię Rolniczo-Techniczną w Olsztynie (1988), Akademię Rolniczą w Poznaniu (1989) oraz przez Akademię Rolniczą w Lublinie (1989). Za osiągnięcia w pracy zawodowej i społecznej uhonorowany został m.in. Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, Złotym Krzyżem Zasługi, wieloma Medalami (Polskiej Akademii Nauk im. M. Oczapowskiego) za zasługi dla rozwoju nauki polskiej.

Pomimo tego, że w 1984 r. Pan Profesor przeszedł na emeryturę, pozostawał nadal czynnym w pracy naukowej i dydaktycznej.

Życiowym dążeniem Profesora było powołanie Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii w Akademii Rolniczej w Lublinie, co nastąpiło 1 stycznia 2006 r. Niestety, Profesor nie doczekał tego momentu, gdyż zmarł 17 grudnia 2003 r. Jest

twórcą nauki o żywności na obecnym Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie i ma znaczące zasługi w rozwoju technologii żywności w Polsce w okresie powojennym. Auli mieszczącej się w budynku Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie nadano imię prof. dra Stanisława Bujaka, a wmurowane popiersie upamiętnia Jego postać.

prof. dr hab. Zdzisław Targoński

TECHNOLOG ŻYWNOŚCI

INFORMATOR POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI

Rok 24 Nr 1

luty 2014

DZIAŁALNOŚĆ TOWARZYSTWA

Zarząd Główny

W dniu 18 lutego 2014 r. odbyło się w Warszawie Nadzwyczajne Walne Zebranie Delegatów Towarzystwa, które zostało zwołane w celu dostosowania statutu Towarzystwa do obecnych wymagań prawnych.

WAŻNIEJSZE MIĘDZYKRAJOWE I KRAJOWE KONFERENCJE NAUKOWE W 2014 r.

Maj

7 - 9 WARSZAWA = XIX Sesja Naukowa i III Międzynarodowa Sekcja Młodej Kadry Naukowej PTTŻ

Kontakt: Dr inż. Katarzyna Marciniak-Lukasiak,
mail: katarzyna_marciniak_lukasiak@sggw.pl

11 – 13 GDYNIA = Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Jakość towarów i usług w innowacyjnej gospodarce”

Organizatorzy: Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa Akademii Morskiej w Gdyni; Polskie Towarzystwa Towaroznawcze – Oddział Morski; Polskie Towarzystwo Technologów Żywności – Oddział Gdański.

Kontakt: Dr inż. Agnieszka Palka; e-mail: jak2014@conferences.am.gdynia.pl

12 – 14 BRUNÓW k. Lwówka Śląskiego = VIII Ogólnopolska Konferencja nt. „Ziemniak rośliną uprawną XXI wieku. Teraźniejszość i perspektywy”

Organizatorzy: Wydział Nauk o Żywności UP we Wrocławiu oraz Oddział Wrocławski PTTŻ

Informacje: <http://wnoz.up.wroc.pl/ziemniak>

22 – 23 KRAGUJEVAC, Serbia = 8th International Quality Conference (IQC 2014)

Kontakt: www.cqm.rs

Czerwiec

- 5 - 6 CZEŃSTOCHOWA = VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa z cyklu Turystyka – Żywnienie – Żywność nt. „Jakość żywności a żywienie w turystyce”.**
Organizatorzy: Wyższa Szkoła Hotelarstwa i Turystyki w Częstochowie i Polskie Towarzystwo Technologów Żywności.
Kontakt: e-mail: konferencja@wshit.edu.pl
- 16 – 17 KARPACZ = V Ogólnopolska Konferencja z cyklu: Kryteria zarządzania jakością według Modelu Doskonałości EFQM nt. „Zrównoważony rozwój – odpowiedzialność w relacjach z interesariuszami jako innowacyjne kryterium doskonałości”.**
Organizatorzy: Katedra Zarządzania Jakością i Środowiskiem, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Wydział Ekonomii Zarządzania i Turystyki w Jeleniej Górze.
Kontakt: e-mail: doskon14@gmail.com
- 26 – 27 WROCŁAW = VI Międzynarodowa Konferencja z cyklu: ”Quality and safety in food production chain”/„Jakość i bezpieczeństwo zdrowotne w łańcuchu produkcji żywności”.**
Informacje: <http://wnoz.up.wroc.pl/quality/>
Kontakt: e-mail: ktsz@wnoz.up.wroc.pl

Lipiec

- 1 - 2 WARSZAWA = IV Sympozjum Inżynierii Żywności**
Organizatorzy: Wydział Nauk o Żywności SGGW, PAN, Oddział Warszawski PTTŻ oraz Oddział Warszawski Polskiego Towarzystwa Agrofizycznego
Informacje: <http://kizop.sggw.pl/siz2014/>
Kontakt: kizopsiz@sggw.pl

Sierpień

- 17-21 MONTREAL, Kanada = 17 th World Food Congress**
Kontakt: <http://iufost.org/world-food-congress>

Wrzesień

- 15 -19 KRAKÓW = 19th IGWT Symposium Commodity Science in research and practice – current achievements and future challenges.**
Organizatorzy: Cracow University of Economics – Faculty of Commodity Science; International Society of Commodity Science and Technology.
Informacje: www.igwt2014.uek.krakow.pl
Kontakt: e-mail: igwt2014@uek.krakow.pl

Październik**16 – 17 GDYNIA = Zachowania konsumentów na rynku towarów i usług.**

Organizatorzy: Katedra Handlu i Usług, Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa Akademii Morskiej w Gdyni oraz Katedra Organizacji i Ekonomiki Konsumpcji, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW.

Kontakt: e-mail: konsument@wpit.am.gdynia.pl

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY POLSKIEGO TOWARZYSTWA
TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI

Przy Zarządzie Głównym: **TCHIBO – WARSZAWA Sp. z o.o. Marki, BUNGE POLSKA Sp. z o.o. Karczew, HORTIMEX Plus Spółka komandytowa Konin.**

Przy Oddziale Małopolskim: **ZAKŁADY PRZEMYSŁU TŁUSZCZOWEGO BIELMAR Sp. z o.o., Bielsko-Biała.**

Material zawarty w Nr 1 (92)/2014 Biuletynu podano według stanu informacji do 15 lutego 2014 r. Materiały do Nr 2 (93)/2014 prosimy nadsyłać do 1 kwietnia 2014 r. na adres Redakcji Czasopisma.

KOMUNIKAT

Informujemy P.T. Autorów, że *Informacje dla Autorów oraz wymagania redakcyjne* publikujemy na stronie <http://www.pttz.org/zyw/index.html>