



ŻYWNOŚĆ

Nauka Technologia Jakość

FOOD

Science Technology Quality

Nr 3 (100)

Kraków 2015

Rok 22

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Tadeusz Sikora; tel./fax. 12 293-50-54; e-mail: sikorat@uek.krakow.pl
Zastępca redaktora naczelnego: dr hab. inż. Lesław Juszczyk, prof. UR; tel. 12 662-47-78; e-mail: rrjuszczyk@cyf-kr.edu.pl

Sekretarz redakcji (kontakt z autorami): dr Ewa Ślowska; 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

Native speaker: Stanley Holt (Bolton, UK)

Redaktor statystyczny: dr Antoni Goryl

Stali współpracownicy: dr Grażyna Morkis (Kraków), dr inż. Magdalena Niewczas (Kraków)

Rada Naukowa: prof. dr Antoni Rutkowski (przewodniczący), dr hab. Kazimierz Dąbrowski (sekretarz), prof. dr hab. Barbara Baraniak, prof. dr hab. Nina Barylko-Pikielna, prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski, prof. dr hab. Józefa Chrzanoska, 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 Libudysz, 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 Sońnicki (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 ŻYWNOCI, WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994 - 1999 wydawcą kwartalnika był Oddział Małopolski PTTŻ

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2015
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. 608 024 572

e-mail: wn@akapit.krakow.pl; www.akapit.krakow.pl

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość

Organ naukowy PTTŻ – dwumiesięcznik

Nr 3 (100)

Kraków 2015

Rok 22

SPIS TREŚCI

Od Redakcji.....	3
JOANNA KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, MAGDALENA SZEJK, ANNA PAWLAK, HALINA M. ŻBIKOWSKA: Właściwości przeciwtleniające kwasu kawowego i jego pochodnych.....	5
ANNA BERTHOLD-PLUTA, ANTONI PLUTA, MICHAŁ OLKOWSKI, ANNA OSTROWSKA: Ciepłotoporność <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>	18
MAŁGORZATA DAREWICZ, JUSTYNA BORAWSKA, PIOTR MINKIEWICZ, ANNA IWANIAK, PIOTR STAROWICZ: Biologicznie aktywne peptydy uwalniane z białek żywności.....	26
ANNA RZEPKOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA: Przeżywalność szczepów <i>Lactobacillus</i> wyizolowanych z żywności w warunkach modelowego przewodu pokarmowego...42	42
MAGDALENA A. OLSZEWSKA, ALEKSANDRA KOCOT, MONIKA GRYN, ŁUCJA ŁANIEWSKA- TROKENHEIM: Odpowiedź komórek <i>Lactobacillus brevis</i> na stres osmotyczny zbadana metodą cytometrii przepływowej.....	53
MAŁGORZATA JAŁOSIŃSKA: Przeżywalność szczepu <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 w probiotycznym i synbiotycznym bananowo-mlecznym napoju fermentowanym podczas przechowywania.....	64
ANNA GRYGIER, MAŁGORZATA MAJCHER, KAMILA MYSZKA: Analysis of the ability to form 2-phenylethyl alcohol by <i>Galactomyces geotrichum</i> MK017.....	74
ELŻBIETA HAĆ-SZYMAŃCZUK, ANETA CEGIEŁKA: Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwtleniającej szalwii lekarskiej w produkcie mięsny.....	84
ANNA MIECZKOWSKA, DARIUSZ KOKOSZYŃSKI, RAFAŁ WASILEWSKI, ZENON BERNACKI: Skład tuszek i jakość mięsa bażantów zwyczajnych (<i>Phasianus colchicus colchicus</i>) w zależności od płci ptaków.....	95
AGNIESZKA RĘKAS, KATARZYNA WIŚNIEWSKA, MAŁGORZATA WRONIAK: Wpływ ogrzewania mikrofalowego nasion rzepaku na wydajność i jakość wytlóconego oleju.....	107
KAROLINA SIUCIŃSKA, BARBARA DYKI, ALEKSANDRA MURGRABIA, PIOTR M. PIECZYWEK, DOROTA KONOPACKA: Ocena zmian struktury suszonej tkanki wiśni poddanej wstępnie obróbce osmotycznej wspomaganą ultradźwiękami.....	123
MACIEJ BILEK, KINGA STAWARCZYK, ŁUKASZ ŁUCZAJ, EWA CIEŚLIK: Zawartość wybranych składników mineralnych i anionów nieorganicznych w sokach drzewnych z terenu Podkarpacia.....	138
DOROTA BONARSKA-KUJAWA, SYLWIA CYBORAN, JAN OSZMIAŃSKI, HALINA KLESZCZYŃSKA: Aktywność przeciwtleniająca ekstraktów polifenolowych z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny w odniesieniu do błony erytrocytów.....	148
ZUZANNA MAŁYSZEK, AGNIESZKA MAKOWSKA, JĘDRZEJ SMENTEK, PIOTR KUBIAK, JOANNA LE THANH-BLICHARZ, GRAŻYNA LEWANDOWICZ: Ocena czynników decydujących o prawidłowości pomiaru właściwości reologicznych skrobi modyfikowanych.....	160
ANNA PEKSA, ELŻBIETA RYTEL, AGNIESZKA TAJNER-CZOPEK, AGNIESZKA KITA, HONORATA DANILCENKO, ELVYRA JARENIE, ADAM FIGIEL, KRZYSZTOF LECH, JOANNA MIEDZIANKA, WIOLETTA DROŹDŹ: Wpływ surowca i parametrów procesu na cechy sensoryczne i fizyczne ekstrudowanych przekąsek.....	176
AGATA GÓRSKA, EWA OSTROWSKA-LIGEŻA, KAROLINA SZULC, MAGDALENA WIRKOWSKA- WOJDYŁA, JOANNA BRYŚ: Wpływ dodatku układu laktoza – maltodekstryna na właściwości termiczne i funkcjonalne kompleksów β-laktoglobuliny z palmitynianem retinylu.....	190
AGNIESZKA I. BARUK, SEBASTIAN BIAŁOSKURSKI: Wybrane determinanty wizerunku produktu spożywczego.....	203
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Interakcje składników żywności.....	215
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	218
MAGDALENA NIEWCZAS: Nowe książki.....	223
TWÓRCY POLSKIEJ NAUKI O ŻYWNOŚCI.....	225
MONIKA PRZEOR I MACIEJ KLUZ: XX Krajowa Konferencja Młodej Kadry Naukowej.....	228
Technolog Żywności.....	231

Zamieszczone artykuły są recenzowane

Czasopismo jest referowane przez: Chemical Abstracts Service, IFIS, Scopus, AGRO, BazEkon,
Index Copernicus, CrossRef

FOOD. Science. Technology. Quality

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

No 3 (100)

Kraków 2015

Vol. 22

CONTENTS

From the Editor.....	3
JOANNA KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, MAGDALENA SZEJK, ANNA PAWLAK, HALINA M. ŻBIKOWSKA: Antioxidant activity of caffeic acid and its derivatives	5
ANNA BERTHOLD-PLUTA, ANTONI PLUTA, MICHAŁ OLKOWSKI, ANNA OSTROWSKA: Thermal resistance of <i>Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis</i>	18
MAGDARZATA DAREWICZ, JUSTYNA BORAWSKA, PIOTR MINKIEWICZ, ANNA IWANIAK, PIOTR STAROWICZ: Biologically active peptides released from food proteins.....	26
ANNA RZEPKOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA: Survival of <i>Lactobacillus</i> strains isolated from food under conditions of simulated gastrointestinal tract model	42
MAGDALENA A. OLSZEWSKA, ALEKSANDRA KOCOT, MONIKA GRYN, ŁUCJA ŁANIEWSKA- TROKENHEIM: Response of <i>Lactobacillus brevis</i> cells to osmotic stress researched by flow cytometry	53
MĄGORZATA JAŁOSIŃSKA: Survival of <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 strain in probiotic and synbiotic fermented banana-milk drink during storage	64
ANNA GRYGIER, MĄGORZATA MAJCHER, KAMILA MYSZKA: Analiza zdolności produkcji 2-fenylloetanolu przez <i>Galactomyces geotrichum</i> MK017	74
ELŻBIETA HAĆ-SZYMAŃCZUK, ANETA CEGIEŁKA: Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of sage in meat product	84
ANNA MIECZKOWSKA, DARIUSZ KOKOSZYŃSKI, RAFAŁ WASILEWSKI, ZENON BERNACKI: Carcass composition and meat quality of common pheasants (<i>Phasianus colchicus colchicus</i>) depending on sex of birds	95
AGNIESZKA RĘKAS, KATARZYNA WIŚNIEWSKA, MĄGORZATA WRONIAK: Effect of microwave heat treatment of rapeseeds on oil yield and quality of pressed oil.....	107
KAROLINA SIUCIŃSKA, BARBARA DYKI, ALEKSANDRA MURGRABIA, PIOTR M. PIECZYWEK, DOROTA KONOPACKA: Assessment of changes in structure of dried tissue of sour cherry pretreated using ultrasound-assisted osmotic dehydration	123
MACIEJ BILEK, KINGA STAWARCZYK, ŁUKASZ ŁUCZAJ, EWA CIEŚLIK: Content of selected minerals and inorganic anions in tree saps from Podkarpacie region.....	138
DOROTA BONARSKA-KUJAWA, SYLWIA CYBORAN, JAN OSZMIĄŃSKI, HALINA KLESZCZYŃSKA: Antioxidant activity of polyphenolic extracts from red current and cranberry fruits with regard to erythrocytes membrane.....	148
ZUZANNA MAŁYSZEK, AGNIESZKA MAKOWSKA, JĘDRZEJ SMENTEK, PIOTR KUBIAK, JOANNA LE THANH-BLICHARZ, GRAŻYNA LEWANDOWICZ: Assessment of factors determining accuracy in measuring rheological properties of modified starches.....	160
ANNA PEKSA, ELŻBIETA RYTEL, AGNIESZKA TAJNER-CZOPEK, AGNIESZKA KITA, HONORATA DANILCENKO, ELVYRA JARENIE, ADAM FIGIEL, KRZYSZTOF LECH, JOANNA MIEDZIANKA, WIOLETTA DROŻDŻ: Effect of raw material and processing parameters on sensory and physical features of extruded snacks	176
AGATA GÓRSKA, EWA OSTROWSKA-LIGEŻA, KAROLINA SZULC, MAGDALENA WIRKOWSKA- WOJDYŁA, JOANNA BRYŚ: The influence of lactose/maltodextrin system addition on thermal and functional properties of beta-lactoglobulin and retinyl palmitate complexes	190
AGNIESZKA I. BARUK, SEBASTIAN BIAŁOSKURSKI: Selected determinants of food product image.....	203
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Interactions among food components.....	215
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish and EU legislation	218
MAGDALENA NIEWCZAS: Book reviews	223
Creators of the Polish food science.....	225
Monika Przeor i Maciej Kluz: The 20th Polish Conference of Young Academic Scientists.....	228
The Food Technologist.....	231

Only reviewed papers are published

Covered by: Chemical Abstracts Service, IFIS, Scopus, AGRO, BazEkon, Index Copernicus, CrossRef

OD REDAKCJI

Szanowni Czytelnicy,

przekazujemy Państwu nr **3 (100)** dwumiesięcznika *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, w którym zamieściliśmy różnorodnie tematycznie artykuły naukowe, prezentujące dorobek kilku krajowych środowisk nauki o żywności. Jak w każdym numerze, zamieściliśmy także interesujące informacje w stałych działach.

Otrzymujecie Państwo kolejny już setny numer naszego czasopisma, najpierw kwartalnika, a obecnie dwumiesięcznika. Oprócz wydanych kolejnych stu numerów, wydawaliśmy w przeszłości także suplementy i numery specjalne. W ciągu ponad 20 lat opublikowaliśmy 1890 artykułów naukowych z zakresu nauk o żywności i pokrewnych.

W związku z zawieszeniem indeksowania w bazie JCR artykułów ukazujących się w *Żywności*, zwracamy uwagę Autorów na zwiększenie **cytowania artykułów opublikowanych w naszym dwumiesięczniku w artykułach kierowanych do czasopism będących na tzw. liście filadelfijskiej**. Odpowiednio liczne cytowania pozwolą na ponowne indeksowanie publikowanych u nas artykułów. Jednocześnie prosimy Autorów o maksymalne ograniczenie cytowań artykułów pochodzących z *Żywności* w pracach kierowanych do nas do opublikowania – jesteśmy zmuszeni obniżyć liczbę **auto-cytowań**, gdyż negatywnie wpływają na obliczany IF.

Kraków, czerwiec 2015 r.

Redaktor Naczelny



Tadeusz Sikora

JOANNA KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, MAGDALENA SZEJK, ANNA PAWLAK,
HALINA M. ŻBIKOWSKA

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE KWASU KAWOWEGO I JEGO POCHODNYCH

Streszczenie

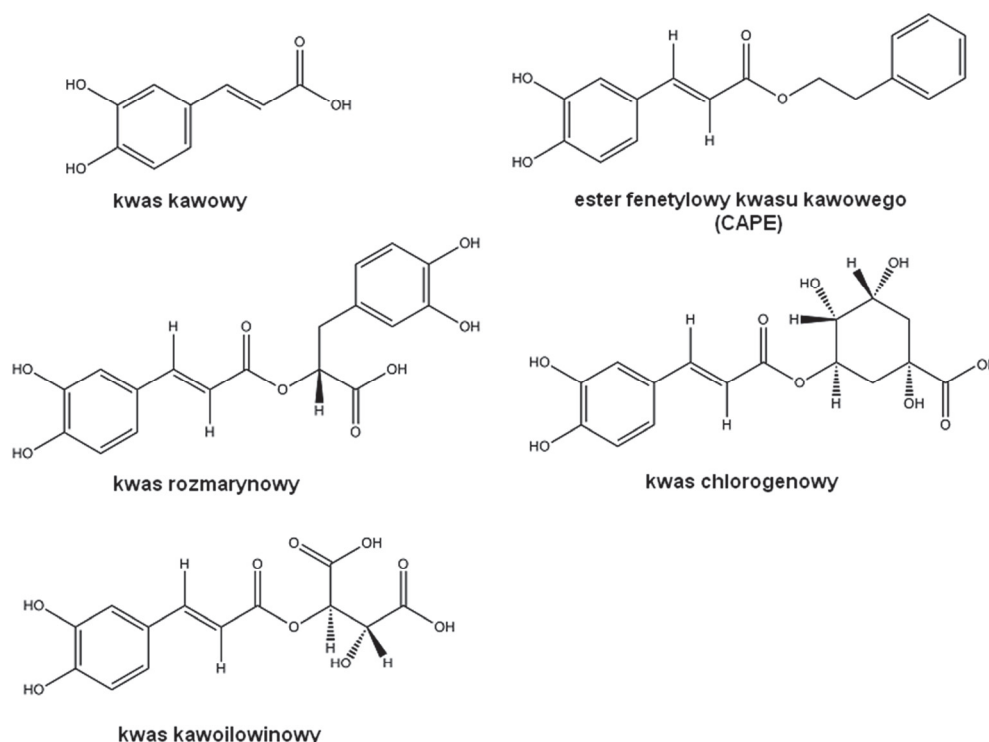
Kwas kawowy jest przedstawicielem kwasów hydroksycynamonowych, stanowiących podgrupę kwasów fenolowych. Syntetyzowany jest przez rośliny jako wtórny metabolit i występuje w postaci pochodnych, takich jak: glikozydy, amidy i estry. Najliczniejszą i najlepiej poznaną grupą pochodnych kwasu kawowego są estry utworzone z kwasem chinowym (kwas chlorogenowy), α -hydroksydihydrokawowym (kwas rozmarynowy) i winowym (kwas kawoilowinowy) oraz ester fenetylowy kwasu kawowego (CAPE). Związki te występują w wielu owocach i warzywach, stąd są naturalnymi składnikami diety. Kwas kawowy oraz jego naturalne pochodne i syntetyczne analogi są silnymi przeciwutleniaczami, które już w niewielkich stężeniach chronią komórki przed stresem oksydacyjnym. W wielu układach doświadczalnych wykazano, że kwas kawowy i jego pochodne skutecznie usuwają reaktywne formy tlenu (RFT) i syntetyczne rodniki, chelatują jony metali oraz wpływają na zahamowanie peroksydacji lipidów. Na szczególną uwagę zasługuje CAPE, wykazujący najsilniejszą aktywność przeciwutleniającą.

Słowa kluczowe: wtórne metabolity roślinne, fenolokwasy, kwas kawowy, właściwości przeciwutleniające

Wprowadzenie

Ze względu na istotną rolę stresu oksydacyjnego w starzeniu organizmu i patogenezie licznych schorzeń, prowadzone są badania dotyczące naturalnych substancji biologicznie czynnych, wykazujących właściwości przeciwutleniające. W fizjologii organizmu człowieka za główne źródła rodnikowych i nierodnikowych reaktywnych form tlenu (RFT) uważa się procesy biochemiczne, takie jak oddychanie mitochondrialne (ok. 2 % elektronów może „wyciekać” podczas fosforylacji oksydacyjnej, stając się przyczyną jednoelektronowej redukcji tlenu i powstania anionorodnika ponadtlenko-

wego ($O_2^{\bullet-}$), reakcje oksydazy ksantynowej, oksydazy NAD(P)H oraz syntaz tlenu azotu [4]. Organizm człowieka narażony jest również na zwiększenie generowania RFT na skutek ekspozycji na promieniowanie UV lub w wyniku metabolizmu ksenobiotyków [2]. Do nasilonego tworzenia RFT, prowadzącego do stresu oksydacyjnego, dochodzi ponadto w przebiegu procesów zapalnych towarzyszących różnorodnym schorzeniom, np. miażdżycy [27].



Rys. 1. Kwas kawowy i jego pochodne.

Fig. 1. Caffeic acid and its derivatives.

Dla funkcjonowania organizmu istotne znaczenie ma jakość spożywanej żywności – także narażonej na procesy utleniania. Zmiany oksydacyjne dotyczą zarówno tłuszczów [10], jak i białek [20], co wpływa znacząco na jakość produktów spożywczych. W wielu krajach ograniczane jest stosowanie syntetycznych przeciwutleniaczy do produkcji żywności, a coraz częściej stosuje się związki naturalne. Większość badań nad biologiczną aktywnością roślinnych związków fenolowych, będących składnikiem diety, koncentrowała się na działaniu różnorodnych flawonoidów. Wzrasta jednak zainteresowanie naturalnymi kwasami fenolowymi, stanowiącymi ważny składnik pokarmów pochodzenia roślinnego. Najbardziej rozpowszechnionymi w tkankach ro-

ślinnych fenolokwasami są kwasy hydroksycynamonowe, w tym kwas kawowy (3,4-dihydroksycynamonowy) [13]. Występuje on w roślinach w postaci pochodnych, takich jak: glikozydy, amidy i estry. Kwas kawowy najczęściej tworzy estry z kwasem chinowym, α -hydroksydihydrokawowym i winowym, wskutek czego powstają odpowiednio kwasy: chlorogenowy, rozmarynowy i kawoilowinowy (rys. 1). Pochodne te wykazują najczęściej wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z wolnym kwasem kawowym. Na szczególną uwagę zasługuje ester fenetylowy (CAPE, ang. *caffeic acid phenethyl ester*) (rys. 1), jeden z głównych biologicznie czynnych składników propolisu. Z dostępnych badań wynika, że wśród pochodnych kwasu kawowego, CAPE jest najsilniejszym przeciwutleniaczem [35].

Źródła kwasu kawowego i jego wchłanianie w przewodzie pokarmowym

Kwas kawowy syntetyzowany jest w roślinach jako produkt szlaku kwasu szikimowego. Prekursorem do syntezy kwasów hydroksycynamonowych są aminokwasy: tyrozyna lub fenyloalanina. Enzymem katalizującym deaminację L-fenyloalaniny jest amoniakolizaza fenyloalaninowa, a produktem reakcji – kwas *trans*-cynamonowy, będący związkiem wyjściowym w biosyntezie kwasu kawowego i innych kwasów hydroksycynamonowych [17]. Kwasy hydroksycynamonowe występują w roślinach w formie glikozydów lub depsydów, w mniejszym stopniu w postaci wolnej, przy czym zawartość poszczególnych form jest odmienna w różnych grupach surowców. Fenolokwasy te w formie estrów glukozy lub kwasu chinowego obecne są przeważnie w owocach, podczas gdy w ziarniakach zbóż większość fenolokwasów związana jest z arabinoksyłanami. Wolne kwasy hydroksycynamonowe występują w tkankach roślinnych zwykle w niewielkich ilościach, ich zawartość zależy ponadto od stopnia dojrzałości rośliny [13]. Ziarniaki zbóż są źródłem przede wszystkim kwasu ferulowego, ale w owsie zidentyfikowano unikatową grupę związków określanych jako awenantramidy, będących pochodnymi kwasów hydroksycynamonowych (w tym kwasu kawowego) i kwasów antranilowych [41].

Źródłem kwasu kawowego są m.in. warzywa strączkowe, pomidory, a także orzechy, ziarna zbóż, nasiona słonecznika oraz różne owoce. W większości owoców i warzyw jest on obecny w formie zestryfikowanej (depsydu) z kwasem chinowym, jako kwas chlorogenowy. Kwas kawowy spożywany jest z pokarmem roślinnym głównie w formie związanej, dlatego kluczowe dla jego biodostępności jest wchłanianie w jelicie cienkim. Wykazano, że ok. 95 % kwasu kawowego dostarczanego do organizmu w postaci wolnej ulega absorpcji w jelicie cienkim, natomiast podany jako kwas chlorogenowy jest w tym odcinku jelita wchłaniany tylko w ok. 33 % [26]. Dostępność związanych kwasów hydroksycynamonowych jest zależna od hydrolizy przy udziale enzymów mikroflory jelitowej – esterazy kwasu ferulowego (esterazy ferulowe, cynamonowe) [9]. Zarówno kwas kawowy, jak i metabolity kwasu chlorogenowego, po-

wstające pod wpływem aktywności mikroflory jelitowej (np. kwasy: *m*-kumarowy, ferulowy i 3-hydroksyfenylopropionowy) mogą wnikać do komórek przy udziale białek transportowych z rodziny MCT (ang. *monocarboxylic acid transporter*) [19]. W komórkach nabłonka jelita i w wątrobie kwas kawowy ulega glukuronidacji przy udziale UDP-transferazy glukuronowej. Może on również podlegać w wątrobie sulfonowaniu lub *o*-metylacji, prowadzącej do wytworzenia kwasu ferulowego lub izoferulowego. Kwas kawowy może wykazywać aktywność biologiczną w ścianie jelita oraz w innych tkankach i organach, glukuronidacja i sulfonowanie osłabiają jednak jego właściwości przeciwutleniające. Głównymi związkami, identyfikowanymi w osoczu krwi po podaniu kwasu kawowego, są glukuronidy kwasu ferulowego i izoferulowego [5]. Kwas kawowy, który nie został wchłonięty w jelicie, może natomiast ulegać redukcji do kwasu dihydrokawowego 3-(3,4-dihydroksyfenylo)-propionowego przy udziale mikroflory jelitowej, następnie w wyniku dehydroksylacji jest przekształcany do kwasu 3-(3-hydroksyfenylo)-propionowego i 3-fenylopropionowego. Związki te są wchłaniane w jelicie grubym i metabolizowane: w wątrobie ulegają β -oksydacji, tworząc kwas benzoesowy i hydroksybenzoesowy, które następnie są sprzęgane z glicyną, a ich produkty końcowe: kwas 3-hydroksyhipurowy i hipurowy są wydalane z moczem [5].

Właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego

Za zdolność neutralizowania rodników i przeciwdziałania reakcjom utleniania przez naturalne związki fenolowe, m.in. kwas kawowy, odpowiada liczba grup hydroksylowych oraz ich lokalizacja w strukturze cząsteczki fenolokwasu. W reakcjach z wolnymi rodnikami grupy -OH działają jako donory wodoru, co prowadzi do utworzenia rodnika fenoksylogo. Obecność grupy -OH w pozycji *orto* wpływa znacząco na zwiększenie właściwości przeciwutleniających fenolokwasów i ich zdolność neutralizowania RFT – m.in. H_2O_2 , a także rodnika DPPH $^{\bullet}$ (rodnik 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylu) [37]. Mechanizm ochronny naturalnych związków fenolowych w zapobieganiu utlenianiu lipidów polega na wychwytywaniu wolnych rodników alkiłowych i nadtlenkowych powstających w wyniku peroksydacji wywołanej działaniem RFT, autoksydacji tłuszczów lub ich utleniania fotosensybilizowanego. Rodniki fenoksyłowe, powstające z fenolokwasów, mogą reagować z innymi rodnikami alkiłowymi oraz nadtlenkowymi i wygaszać reakcje peroksydacji lipidów. Niektóre fenolokwasy, w tym kwas kawowy, mogą jednak działać prooksydacyjnie, w zależności od warunków reakcji. W przypadku kwasu kawowego efekt taki zaobserwowano w reakcji utleniania lipidów, katalizowanej jonami Fe^{3+} *in vitro*. W reakcji tej powstaje przejściowy kompleks kwas kawowy- Fe^{3+} , a w wyniku wewnątrzcząsteczkowego transferu elektronu dochodzi do uwolnienia jonów Fe^{2+} oraz rodnika semichinonowego [18]. Właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego są zależne także od temperatury. Andue

i wsp. [1] przeprowadzili ogrzewanie roztworu kwasu kawowego w temp. 90 °C, symulując przechowywanie kawy w termosie. Stwierdzono termiczną dekompozycję kwasu z wytworzeniem produktów o właściwościach proutleniających po godzinie ogrzewania. Dłuższe ogrzewanie powodowało natomiast wzrost aktywności przeciwutleniającej badanego płynu na skutek kondensacji produktów dekompozycji kwasu kawowego i tworzenia się polimerów o właściwościach przeciwutleniających.

Ograniczanie generowania wolnych rodników i neutralizowanie reaktywnych form tlenu

Przeciwutleniający efekt kwasu kawowego oceniano m.in. na poziomie hamowania aktywności oksydazy ksantynowej, która uważana jest za jeden z głównych mechanizmów molekularnych przyczyniających się do generowania RFT *in vivo*, m.in. w warunkach niedokrwienia i reperfuzji. Podczas reperfuzji tlen obecny we krwi aktywuje oksydazę ksantynową i dochodzi do tworzenia anionorodnika ponadtlenkowego. Działanie przeciwutleniające kwasu kawowego badano poprzez pomiar tworzenia $O_2^{\bullet-}$ w doświadczeniach z wykorzystaniem linii komórkowej Caco-2 (komórki nowotworowe nabłonka jelitowego). Zaobserwowano, że kwas kawowy hamuje aktywność oksydazy na poziomie porównywalnym z działaniem allopurynolu, silnego inhibitora oksydazy [32]. Badania *in vitro* dotyczące usuwania powstałego $O_2^{\bullet-}$ przez kwas kawowy (0,055 mM) wykazały 62 % inhibicji generowania rodnika, co stanowiło efekt zbliżony do aktywności związków referencyjnych – naturalnych (α -tokoferolu) i syntetycznych (BHA –butylohydroksyanizolu, BHT – butylohydroksytoluenu oraz troloksu) przeciwutleniaczy [15].

Kwas kawowy może również odgrywać istotną rolę w hamowaniu peroksydacji różnych lipidów. Utlenianie związków tłuszczowych zmienia właściwości fizyczne błon komórkowych, co wpływa na fizjologię komórek i tkanek. Proces nieenzymatycznej peroksydacji lipidów prowadzi do obniżenia hydrofobowości błon komórkowych i zmiany organizacji dwuwarstwy lipidowej. Skutkiem tych zmian jest wzrost niespecyficznego przepuszczalności błon i ich depolaryzacja, zaburzenia przekazywania sygnałów międzykomórkowych, zahamowanie aktywności enzymów błonowych i systemów transportu [25]. Ponadto, utlenianie tłuszczów jest także jednym z głównych procesów ograniczających trwałość przechowywanej żywności [36]. W doświadczeniach *in vitro* z zastosowaniem kwasu linolowego wykazano 68 i 76 % inhibicji peroksydacji kwasu linolowego po dodaniu do środowiska reakcji kwasu kawowego, odpowiednio do końcowego stężenia 0,055 i 1,65 mM. Kwas kawowy był najsilniejszym przeciwutleniaczem wśród porównywanych związków (BHA, BHT, α -tokoferol, troloks) [15]. Interesujących obserwacji dostarczyły również badania aktywności przeciwutleniającej kwasu kawowego i jego estru – kwasu chlorogenowego (0,28 ÷ 5,6 mM) w procesie autooksydacji triacylogliceroli oleju słonecznikowego. Utlenianie

składników tłuszczowych, takich jak: linolenian, oleinian czy palmitynian, stanowi jeden z czynników ograniczających trwałość przechowywanej żywności. Reakcję tę można jednak opóźnić poprzez dodanie substancji przeciwutleniających. W przeprowadzonych doświadczeniach badane związki w niższych stężeniach (~0,28 mM) wykazywały podobny efekt przeciwutleniający, natomiast zastosowanie kwasów w wyższych stężeniach ujawniło silniejsze działanie kwasu kawowego [21].

Kwas kawowy wykazuje *in vitro* zdolność hamowania utleniania osoczowych lipoprotein o małej gęstości (LDL). Związek ten powoduje 97,5-procentowe zahamowanie utleniania LDL już przy stężeniu 0,0075 mM [22]. Silne właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego i chlorogenowego zaobserwowano również w przeciwdziałaniu peroksydacji LDL, katalizowanej *in vitro* przez jony Cu^{2+} lub dichlorowodorek 2,2'-azo-bis-2-amidynopropanu (AAPH). Badane związki charakteryzowały się podobną aktywnością przeciwutleniającą – stwierdzono, że mogą włączać się w reakcje propagacji jako przeciwutleniacze interwencyjne. Ustalono, że każdy z badanych kwasów może wygaszać ok. 2 rodników nadtlenkowych, działając znacznie efektywniej niż inne kwasy hydroksycynamonowe, takie jak: synapinowy, ferulowy czy *p*-kumarowy [8].

Badania z zastosowaniem syntetycznych rodników

Kwas kawowy w porównaniu z innymi znanymi przeciwutleniaczami – BHA, BHT, α -tokoferolem i trolokssem – charakteryzuje się wysoką aktywnością redukcyjną w stosunku do rodnika DPPH \cdot . W przeprowadzonych doświadczeniach kwas kawowy (0,11 mM) powodował zmniejszenie ilości wolnego rodnika w środowisku reakcji o 93,7 %. Stwierdzono ponadto, że w warunkach metody efektywniejszy od kwasu kawowego wobec rodnika DPPH \cdot jest jedynie BHT (99,7 % inhibicji). Kwas kawowy wykazywał również wysoką zdolność redukcji kationowego rodnika ABTS \cdot^{+} . W badaniu porównawczym z BHA, BHT, trolokssem i α -tokoferolem, kwas kawowy (0,14 mM) w największym stopniu powodował zmniejszenie stężenia rodnika w środowisku reakcji (92,9 %) [15]. Silniejszą aktywność tego fenolokwasu w redukcji DPPH \cdot , w porównaniu z α -tokoferolem i trolokssem, stwierdziły Zych i Krzepińko [42]. W doświadczeniach tych oceniano również działanie kwasu askorbinowego, który okazał się mniej efektywnym przeciwutleniaczem niż kwas kawowy.

Właściwości chelatujące kwasu kawowego

Przeciwutleniające działanie kwasów fenolowych jest również wynikiem chelatowania jonów metali przejściowych, katalizujących reakcje generujące wolne rodniki. W układach biologicznych H_2O_2 może reagować z $\text{O}_2^{\cdot-}$, prowadząc do powstania wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego (OH \cdot). Reakcja ta, zwana reakcją Fentona, katalizowana jest głównie przez jony żelaza, ale w reakcjach generowania RFT mogą

również brać udział jony miedzi ($\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$), a także innych metali przejściowych [3]. W badaniach *in vitro* wykazano, że chelatowanie jonów metali przez fenolokwasy chroni błonę komórkową przed uszkodzeniami indukowanymi przez jony metali przejściowych. Kwas kawowy może tworzyć kompleksy z jonami Cu^{2+} , Fe^{2+} oraz Fe^{3+} [28]. Wiązanie jonów żelaza *in vitro* przez kwas kawowy badano, m.in. blokując ich reakcję z ferrozyną. Kwas kawowy hamował tworzenie kompleksu Fe^{3+} -ferrozyna w 53 %, co świadczy o wyższej zdolności wiązania jonów żelaza w porównaniu z ferrozyną. Silniejszymi chelatorami okazały się jedynie syntetyczne przeciwutleniacze – BHA i BHT [15].

Właściwości przeciwutleniające wybranych pochodnych kwasu kawowego

Ester fenetylowy kwasu kawowego (CAPE)

Ester fenetylowy kwasu kawowego stanowi główny składnik propolisu, wykazujący różnorodne właściwości biologiczne, w tym aktywność przeciwutleniającą [14]. Chen i Ho [7] wykazali aktywność CAPE w ograniczeniu procesu utleniania lipidów – tłuszczu wieprzowego oraz oleju kukurydzianego. Dodanie kwasu kawowego i innych kwasów hydroksycynamonowych oraz ich pochodnych, a także związków referencyjnych – BHT i α -tokoferolu, znacznie wydłużyło czas indukcji utleniania tłuszczu wieprzowego, a efektywność działania przeciwutleniającego kształtowała się następująco: kwas kawowy \sim α -tokoferol $>$ CAPE \sim kwas rozmarynowy $>$ kwas chlorogenowy \gg BHT $>$ kwas ferulowy \sim ester fenetylowy kwasu ferulowego. Po dodaniu badanych związków do oleju kukurydzianego, aktywność przeciwutleniająca CAPE i pozostałych związków gwałtownie zmalała. Zmiana ta spowodowana jest większym udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych w tłuszczach roślinnych w porównaniu ze zwierzęcymi. Dlatego też obserwuje się wyższy poziom inhibicji peroksydacji w przypadku smalcu, który w mniejszym stopniu ulega utlenianiu. Natomiast w układzie emulsji oleju kukurydzianego skuteczniejsze działanie zaobserwowano w przypadku przeciwutleniaczy hydrofilowych, dlatego w tym układzie badawczym wyższą skuteczność od CAPE wykazywały BHT i kwas kawowy [7]. CAPE ma także zdolność chelatowania jonów metali, w tym Fe^{2+} , katalizujących peroksydację lipidów. Aktywność wiązania jonów żelaza przez CAPE jest porównywalna z aktywnością silnych chelatorów – BHA, BHT, α -tokoferolu i troloksu. Dwie cząsteczki CAPE aktywnie wiążą Fe^{2+} dzięki obecności dwóch grup hydroksylowych w każdej z nich [14]. CAPE redukuje również syntetyczne rodniki: $\text{ABTS}^{\bullet+}$ i DPPH^{\bullet} . Wykazano, że CAPE redukuje rodnik DPPH^{\bullet} bardziej efektywnie niż związki referencyjne (BHA i BHT). W przypadku rodnika kationowego $\text{ABTS}^{\bullet+}$ skuteczniejsze efekty, w porównaniu z CAPE, uzyskano po zastosowaniu syntetycznych przeciwutleniaczy – BHA i BHT, ale różnice te były niewielkie [14].

Kwas rozmarynowy

Kwas rozmarynowy występuje powszechnie w ziołach, głównie w rozmarynie i szalwii. Wykazuje wysoką aktywność przeciwutleniającą ze względu na obecność grupy karboksylowej i czterech grup hydroksylowych [39]. W badaniu porównawczym *in vitro* zaobserwowano, że kwas rozmarynowy redukuje rodnik DPPH• efektywniej niż kwas kawowy i CAPE. W doświadczeniach z zastosowaniem tłuszczu wieprzowego stwierdzono znaczące zmniejszenie peroksydacji, przy czym kwas kawowy i CAPE wykazywały silniejszą aktywność niż kwas rozmarynowy. W układzie z olejem kukurydzianym działanie przeciwutleniające było natomiast słabsze, a efektywność poszczególnych związków kształtowała się następująco: kwas rozmarynowy > kwas kawowy > CAPE [7]. Obserwowane różnice aktywności w różnym środowisku wynikają z budowy chemicznej kwasu rozmarynowego. Cztery grupy hydroksylowe determinują silne właściwości hydrofilowe tego związku, dlatego działa on skuteczniej w emulsji oleju niż w tłuszczach stałych. W procesie trawienia lipidy w większości ulegają emulgacji, dlatego prawdopodobnie kwas rozmarynowy ma większe znaczenie w układach biologicznych niż kwas kawowy i CAPE [12]. Porównując *in vitro* działanie kwasu rozmarynowego ze znanymi silnymi przeciwutleniaczami, wykazano, że fenolokwas ten usuwa DPPH• w stężeniu niższym niż kwas askorbinowy, α -tokoferol i BHT, a jego aktywność jest trzykrotnie wyższa niż aktywność troloksu [39].

Budowa cząsteczki kwasu rozmarynowego odpowiada zarówno za jego aktywność przeciwutleniającą, jak i za działanie proutleniające. Kwas rozmarynowy, z wbudowanymi dwoma pierścieniami fenolowymi, jest substratem działania enzymu tyrozynazy, zaliczanego do oksydaz polifenolowych. Enzym ten w obecności tlenu przekształca difenole do *o*-chinonów z jednoczesnym wytwarzaniem RFT. Wykazano, że równowaga między pro- i przeciwutleniającą aktywnością kwasu rozmarynowego przesunięta jest w stronę działania przeciwutleniającego [23].

Kwas chlorogenowy

Kwas chlorogenowy ma charakter depsydu – w związku tym kwas kawowy jest połączony przez grupę karboksylową z grupą fenolową kwasu chinowego. Występuje głównie w zielonych liściach i owocach kawowca, głogu, karczocha, a także w popularnych warzywach, takich jak: sałata, pomidory, ziemniaki, seler. Badania epidemiologiczne wykazały, że spożycie kwasu chlorogenowego jako składnika kawy obniża poziom biomarkera wczesnej fazy stresu oksydacyjnego, jakim jest transpeptydaza γ -glutamylowa [5]. W badaniach *in vivo* wykazano, że kwas chlorogenowy podawany szczurom wpływa na obniżenie poziomu cholesterolu i triacylogliceroli w osoczu o ok. 44 i 58 %, a w wątrobie – o 24 % [30]. Związek ten charakteryzuje się również wysoką efektywnością w hamowaniu utleniania LDL *in vitro* [24, 34], porównywalną z działaniem kwasu kawowego.

Kwas kawoilowinowy

Kwas kawoilowinowy to jedna z najrzadziej występujących w przyrodzie pochodnych kwasu kawowego, obecny jest m.in. w winogronach. W warunkach *in vitro* kwas kawoilowinowy jest dwukrotnie silniejszym inhibitorem utleniania LDL, indukowanego przez Cu^{2+} , niż kwas kawowy, ale nieznacznie słabszym niż kwas rozmarynowy i chlorogenowy. Stwierdzono również, że kwas kawoilowinowy w niewielkim stopniu hamuje utlenianie LDL *in vitro*, indukowane dichlorowodorkiem 2,2'-azobis(2-amidynopropanu) (AAPH). Głównym mechanizmem odpowiadającym za zdolność hamowania peroksydacji lipidów przez ten fenolokwas jest aktywność chelatowania jonów metali [6].

Kwasy salwianolowe (szałwiowe)

Kwasy salwianolowe są polifenolowymi pochodnymi kwasu kawowego, a ich nazwa pochodzi od głównego miejsca występowania – różnych gatunków szalwii. Najwięcej dostępnych danych dotyczy aktywności biologicznej kwasów obecnych w *Salvia miltiorrhiza* Bunge (szałwia czerwonorzeniowa) [16]. Działanie przeciwutleniające wykazuje zarówno kwas salwianolowy A, jak i B [38]. W warunkach *in vitro* kwas salwianolowy B może efektywniej niż kwas askorbinowy redukować syntetyczne rodniki: DPPH^{\bullet} i ABTS^{\bullet} oraz neutralizuje RFT, takie jak $\text{O}_2^{\bullet-}$ i $^{\bullet}\text{OH}$, ale jego działanie w usuwaniu H_2O_2 było słabsze od witaminy C [40].

Syntetyczne pochodne kwasu kawowego

Przeprowadzono doświadczenia *in vitro* z użyciem serii amidów kwasu kawowego, w których sprawdzano aktywność hamowania peroksydacji lipidów. Wyniki inhibicji alifatycznych pochodnych były zbliżone do wartości kwasu kawowego i troloksu. Efektywniejszymi przeciwutleniaczami były pochodne aromatyczne z grupą aminofenolową, które wykazały 10-krotnie silniejsze działanie niż związek wyjściowy i troloks. Sugeruje się, że wpływ na właściwości przeciwutleniające, oprócz grup zdolnych do oddawania wodoru, ma również liczba grup katecholowych i lipofilność. W badaniach *in vitro*, w których amidowe analogi sprzęgano z grupami halogenowymi, sprawdzano inhibicję utleniania lipidów poprzez pomiar stężenia dialdehydu malonowego (MDA). Wszystkie zsyntetyzowane związki skuteczniej hamowały peroksydację lipidów niż kwas kawowy [29].

Na zwiększenie aktywności przeciwutleniającej kwasu kawowego wpływa także sprzęganie tego związku z peptydami, głównie zawierającymi histydynę, która efektywnie wychwytuje rodniki dzięki obecności ugrupowania imidazolowego. W badaniach *in vitro* oceniano zdolność usuwania wolnych rodników w reakcji z rodnikiem DPPH^{\bullet} . Badane dipeptydowe pochodne kwasu kawowego zawierające histydynę wykazały silniejszą aktywność przeciwutleniającą niż kwas kawowy. DPPH^{\bullet} najefektyw-

niej usuwany był przez związek zawierający prolinę i histydynę (kwas kawowy-Pro-His-NH₂). W teście hamowania peroksydacji lipidów (w emulsji kwasu linolowego) ten sam związek wykazał najwyższą wartość inhibicji w porównaniu z innymi analogami peptydowymi. Pochodna o identycznym składzie aminokwasowym, w której histydyna bezpośrednio sąsiaduje z kwasem kawowym (kwas kawowy-His-Pro-NH₂), nie wykazywała znaczącej aktywności przeciwutleniającej, dlatego autorzy sugerują, że oprócz składu aminokwasowego w tego typu reakcjach istotna jest również struktura przestrzenna cząsteczki. Prolina w związku: kwas kawowy-Pro-His-NH₂ zapewnia konformację przestrzenną, umożliwiającą stabilizację rodnika fenoksylogo kwasu kawowego, powstającego w reakcji wygaszania wolnych rodników. Struktura pochodnej peptydowej o budowie: kwas kawowy-His-Pro-NH₂ nie ma konformacji przestrzennej, pozwalającej na stabilizację rodnika fenoksylogo [33].

Działanie przeciwutleniające wykazują również syntetyczne koniugaty kwasu kawowego z chitozanami [11, 31]. Badania *in vitro* aktywności przeciwrodnikowej koniugatu kwas kawowy-chitoooligosacharyd wykazały odpowiednio 81,6 i 89,8 % neutralizacji rodnika DPPH• oraz tlenu azotu [11].

Podsumowanie

Kwas kawowy i jego pochodne, głównie estry, stanowią grupę naturalnych związków fenolowych pochodzenia roślinnego. Aktywność przeciwutleniająca tych substancji stanowi ważny mechanizm ich korzystnego działania na organizm człowieka, może ona również zostać w przyszłości wykorzystana w przemyśle spożywczym do przedłużania trwałości przechowywanej żywności.

Praca finansowana z badań statutowych Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego (506/1136)

Literatura

- [1] Andueza S., Manzocco L., de Peña M.P., Cid C., Nicoli C.: Caffeic acid decomposition products: Antioxidants or pro-oxidants? *Food Res. Int.*, 2009, **1** (42), 51-55.
- [2] Aseervatham G.S., Sivasudha T., Jeyadevi R., Arul Ananth D.: Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans - an overview. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2013, **7** (20), 4356-69.
- [3] Barbusiński K.: Fenton reaction – controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng.*, 2009, **3** (16), 347-36.
- [4] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 2003, ss. 144-226.
- [5] Budryn G., Nebesny E.: Fenolokwasy – ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2006, **2** (39), 103-110.
- [6] Cartron E., Carbonneau M.A., Fouret G., Descomps B., Léger C.L.: Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and

- decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. *J. Nat. Prod.*, 2001, **4** (64), 480-486.
- [7] Chen J.H., Ho Chi-Tang: Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **7** (45), 2374-2378.
- [8] Cheng J., Dai F., Zhou B., Yang L., Liu Z.: Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem.*, 2007, **1** (104), 132-139.
- [9] Chesson A., Provan G.J., Russell W.R., Scobbie L., Richardson A.J., Stewart C.: Hydrocinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 373-778.
- [10] Cichosz G., Czczot H.: Stabilność oksydacyjna tłuszczów jadalnych – konsekwencje zdrowotne. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2011, **1** (XLIV), 50-60.
- [11] Eom T.K., Senevirathne M., Kim S.K.: Synthesis of phenolic acid conjugated chitoooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2012, **2** (34), 519-527.
- [12] Erkan N., Ayrançi G., Ayrançi E.: Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.*, 2008, **1** (110), 76-82.
- [13] Gawlik-Dziki U.: Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4** (41), 29-40.
- [14] Göçer H., Gülçin I.: Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2011, **8** (62), 821-825.
- [15] Gülçin J.: Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, **2-3** (217), 213-220.
- [16] Hui-Chun Ho J., Hong C.Y.: Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *J. Biomed. Sci.*, 2011, **18** (30), 1-5.
- [17] Hyun M.W., Yun Y.H., Kim J.Y., Kim S.H.: Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycol.*, 2011, **4** (39), 257-265.
- [18] Kristinova V., Mozuraityte R., Storrø I., Rustad T.: Antioxidant activity of phenolic acids in lipid oxidation catalyzed by different prooxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **21** (57), 10377-10385.
- [19] Konishi Y., Kobayashi S.: Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **9** (52), 2518-2526.
- [20] Lund M.N., Heinonen M., Baron C.P., Estévez M.: Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, **1** (55), 83-95.
- [21] Marinova E.M., Toneva A., Yanishlieva N.: Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chem.*, 2009, **4** (114), 1498-1502.
- [22] Meyer A.S., Donovan J.L., Pearson D.A., Waterhouse A.L., Frankel E.N.: Fruit hydroxycinnamic acids inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 1783-1787.
- [23] Muñoz-Muñoz J.L., Garcia-Molina F., Ros E., Tudela J., García-Canovas F., Rodriguez-Lopez J.N.: Prooxidant and antioxidant activities of rosmarinic acid. *J. Food Biochem.*, 2012, **4** (37), 396-408.
- [24] Nakajima Y., Shimazawa M., Mishima S., Hara H.: Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects *via* antioxidant actions. *Life Sci.*, 2007, **4** (80), 370-377.
- [25] Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N.: Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **1** (338), 668-676.
- [26] Olthof M.R., Hollman P.C.H., Katan M.B.: Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.*, 2001, **1** (131), 66-71.
- [27] Pacher P., Beckman J.S., Liaudent L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 2007, **1** (87), 315-324.

- [28] Psotová J., Lasovský J., Vičar J.: Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers*, 2003, **2** (147), 147-153.
- [29] Rajan P., Vedernikova I., Cos P., Berghe D.V., Augustyns K., Haemers A.: Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **2** (11), 215-217.
- [30] Rodriguez de Sotillo D.V., Hadley M.: Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J. Nutr. Biochem.*, 2002, **12** (13), 717-726.
- [31] Ren J., Li Q., Dong F., Feng Y., Guo Z.: Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan: Synthesis and antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, **53**, 77-81.
- [32] Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M., Iseki K.: *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.*, 2010, **1-2** (403), 136-138.
- [33] Seo H.S., Kwak S.Y., Lee Y.S.: Antioxidative activities of histidine containing caffeic acid-dipeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **14** (20), 4266-4272.
- [34] Shahidi F., Chandrasekara A.: Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochem. Rev.*, 2010, **9**, 147-170.
- [35] Song J.-J., Lim H.W., Kim K., Kim K.-M., Cho S., Chae S.-W.: Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H₂O₂ induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int. J. Pediatric Otorhinolaryngol.*, 2012, **5** (76), 675-679.
- [36] Sosińska E., Wołosiak R.: Aktywność przeciwutleniająca koenzymu Q10, fitosteroli oraz glutationu w reakcji autooksydacji emulsji tłuszczu roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2** (47), 334-341.
- [37] Sroka Z, Cisowski W.: Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, 2003, **6** (41), 753-758.
- [38] Sun Y., Zhu H., Wang J., Liu Z., Bi J.: Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity. *J. Chromatogr. B*, 2009., 15, **8-9** (877), 733-737.
- [39] Tepe B., Eminagaoglu O., Akpulat Askin H., Aydin E.: Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chem.*, 2007, **100**, 985-989.
- [40] Zhao G.R., Zhang H.M., Ye T.X., Xiang Z.J., Yuan Y.J., Guo Z.X., Zhao L.B.: Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **1** (46), 73-81.
- [41] Zieliński H., Achremowicz B., Przygodzka M.: Przeciwutleniacze ziarniaków zbóż. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **1** (80), 5-26.
- [42] Zych I., Krzepiło A.: Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH. *Chemia. Dydaktyka. Ekologia. Metrologia*, 2010, **1** (15), 51-54.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CAFFEIC ACID AND ITS DERIVATIVES

Summary

Caffeic acid is one of the hydroxycinnamic acids, a subgroup of natural phenolic acids. It is synthesized by plants as a secondary metabolite and it naturally occurs in the form of derivatives, such as glycosides, amides, and esters. The largest and best-characterized group of caffeic acid derivatives are its esters formed with chinic (chlorogenic), α -hydroxydihydrocaffeic (rosmarinic), and tartaric (caffeoyltartaric)

acids as well as caffeic acid phenethyl ester (CAPE). Those compounds are present in a variety of fruits and vegetables, thus, they are natural components of the diet. Caffeic acid, its natural derivatives, and synthetic analogues are potent antioxidants, which, even in low concentrations, protect cells from oxidative stress. It was proved in many experimental systems that the caffeic acid and its derivatives effectively scavenge reactive oxygen species (ROS), chelate metal ions, and have an inhibiting effect on lipid peroxidation. CAPE deserves particular attention since it shows the strongest antioxidant activity.

Key words: secondary plant metabolites, phenolic acids, caffeic acid, antioxidant properties ☒

ANNA BERTHOLD-PLUTA, ANTONI PLUTA, MICHAŁ OLKOWSKI,
ANNA OSTROWSKA

CIEPŁOOPORNOŚĆ *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*

Streszczenie

W latach 90. XX w. ukazały się pierwsze publikacje wskazujące, że *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) są bardziej ciepłooporne niż *M. bovis* i przeżywają pasteryzację mleka HTST. Od tego czasu ukazało się wiele prac potwierdzających obecność *Map* w produktach mlecznych. Obecność żywych komórek tych drobnoustrojów stwierdzono w próbkach rynkowego mleka pasteryzowanego, a także w serach. Badania nad ciepłoopornością *Map* są niełatwe ze względu na uciążliwość hodowli, a porównanie i interpretacja danych literaturowych z tego zakresu są utrudnione z uwagi na różnice w stosowanych metodach eksperymentalnych. W badaniach przeprowadzanych z użyciem mleka ogrzewanego w probówkach, kapilarach lub w pasteryzatorach laboratoryjnych wykazano, że pasteryzacja w temp. 63 °C/30 min, jak i HTST zmniejszają liczbę *Map* o 4 - 7 rzędów logarytmicznych. Rozbieżne wyniki otrzymywano w doświadczeniach prowadzonych w warunkach pasteryzacji przemysłowej. Istnieje kilka hipotez oporności cieplnej *Map* w mleku, m.in. tworzenie skupisk komórek, adaptacja fizjologiczna prowadząca do nabycia ciepłooporności oraz fizykochemiczne zmiany we wnętrzu komórki.

Słowa kluczowe: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, obróbka cieplna, pasteryzacja, HTST

Wprowadzenie

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) jako pierwsi wyizolowali Johne i Frottingham w 1895 r. w badaniach przyczyn przewlekłej biegunki u bydła, nazwanej chorobą Johnego. Uważa się za prawdopodobne, że drobnoustroje te odpowiadają także za przewlekły stan zapalny przewodu pokarmowego człowieka (chorobę Crohna). Cechą charakterystyczną *Map* jest szczególna budowa 3-warstwowej ściany komórkowej złożonej w 30 ÷ 40 % z lipidów, dzięki której drobnoustroje te są odporne

Dr inż. A. Berthold-Pluta, dr hab. A. Pluta, prof. SGGW, mgr inż. M. Olkowski, inż. A. Ostrowska,
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Go-
spodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa.
Kontakt: anna_berthold@sggw.pl

na czynniki fizyczne i chemiczne. Wśród kwasów tłuszczowych ściany komórkowej występują kwasy nasycone spotykane u innych mikroorganizmów, jak: masłowy, palmitynowy, stearynowy, kapronowy, jak również charakterystyczne tylko dla omawianego gatunku: tuberkulostearynowy i ftionowy. Komórki *Map* mają także otoczkę z cukrów, lipoarabinianu i liposacharydów, która ułatwia im tworzenie skupisk [21, 32].

Pasteryzacja jest głównym procesem gwarantującym bezpieczeństwo i jakość mleka oraz produktów mlecznych. Pasteryzacja mleka spożywczego stała się obowiązkowa w pierwszej połowie XX w. Początkowo parametry pasteryzacji były tak ustalone, aby zniszczyć *Mycobacterium bovis*. Bakterie te uważano wówczas za najbardziej ciepłooporne drobnoustroje wśród patogenów obecnych w mleku. Dopiero w 1957 r., na podstawie wyników badań nad efektywnością niszczenia komórek *Coxiella burnetii*, które okazały się bardziej ciepłooporne od *M. bovis*, ustalono minimalne parametry pasteryzacji, tj. 71,7 °C przez 15 s (HTST) [21].

W 1996 r. Grant i wsp. [13] opublikowali jako pierwsi wyniki dowodzące, że *Map* są bardziej ciepłooporne niż *M. bovis* i mogą przeżyć pasteryzację mleka HTST (72 °C/15 s), jeśli ich liczba przekracza 10^3 jtk/ml. Od końca lat 90. XX w. ukazało się także wiele prac potwierdzających obecność *Map* w produktach mlecznych. Obecność żywych komórek tych drobnoustrojów stwierdzono w próbkach rynkowego mleka pasteryzowanego w Czechach, Wielkiej Brytanii, Stanach Zjednoczonych i Indiach [2, 6, 16, 28], a także w próbkach serów w Czechach i Grecji [19].

Z uwagi na dane dotyczące występowania *Map* w mleku surowym i przypuszczalnego ich związku z chorobą Crohna oraz izolowania żywych komórek *Map* z próbek rynkowych produktów mlecznych bliżej zainteresowano się skutecznością pasteryzacji mleka przy stosowanych wówczas jej parametrach.

Skuteczność różnych wariantów obróbki cieplnej mleka wobec *Map*

Prowadzenie badań nad opornością cieplną *Map* jest uciążliwe ze względu na trudności w hodowli tych drobnoustrojów w warunkach laboratoryjnych. Również interpretacja i porównanie danych literaturowych są trudne ze względu na różnice w metodach eksperymentalnych, stosowanych przez autorów.

W większości badań nad ciepłoopornością *Map* określano ich przeżywalność przy różnych wariantach obróbki cieplnej mleka, dodając te drobnoustroje do mleka w postaci pojedynczych szczepów lub mieszaniny kilku szczepów. Początkowa liczba *Map* wynosiła od 2 do 8 log jtk/ml. W nielicznych badaniach [np. 16] zastosowano mleko surowe naturalnie zainfekowane *Map* lub jako inokulum użyto kału krów z kliniczną postacią choroby Johnego [26]. W najwcześniejszych badaniach nad ciepłoopornością *Map* prowadzono ogrzewanie sztucznie zanieczyszczonego mleka w próbkach lub szklanych kapilarach [4, 13, 30]. W badaniach tych mleko poddawano pasteryzacji

długotrwałej (LTLT; 63 °C/30 min) lub krótkotrwałej (HTST; 72 °C/15 s) i osiągnięto stopień redukcji *Map* poniżej 2 rzędów logarytmicznych. Stabel i wsp. [30] stwierdzili, że *Map* przeżywały ogrzewanie mleka w probówkach w temp. 76 °C, natomiast w czasie doświadczeń przeprowadzonych w pasteryzatorze laboratoryjnym zniszczenie *Map* przekraczało 6 rzędów logarytmicznych nawet podczas łagodniejszej obróbki cieplnej mleka (65 °C/15 s).

W badaniach prowadzonych z użyciem mleka ogrzewanego w probówkach, kapi-larach lub pasteryzatorach laboratoryjnych wykazano, że zarówno pasteryzacja LTLT (63 °C/30 min), jak i HTST (72 °C/15 s), powoduje redukcję liczby *Map* o 4 do 7 rzędów logarytmicznych podczas pasteryzacji długotrwałej [8, 29] i o 6 rzędów logarytmicznych – w przypadku pasteryzacji krótkotrwałej [14, 15]. Gdy mleko pasteryzowano w urządzeniach przemysłowych, w temp. ≥ 72 °C przez ≥ 6 s, uzyskiwano zmniejszenie liczby *Map* do poziomu < 1 jtk/40 ml, przy początkowej ich liczbie $\leq 5 \log$ jtk/ml [22, 25, 26]. W innych badaniach, w podobnych warunkach doświadczalnych, w niektórych próbkach mleka pasteryzowanego wykrywano żywe komórki *Map* [11, 16, 23]. Z kolei Hammer i wsp. [17] stwierdzili obecność *Map* w próbkach mleka pasteryzowanego bez względu na początkową ich liczbę, temperaturę (68 ÷ 90 °C) oraz czas obróbki cieplnej (18 ÷ 60 s). Grant i wsp. [11] wykazali, że zwiększenie temperatury z 72 do 82 °C miało mały wpływ na stopień zniszczenia *Map*, a wydłużenie czasu obróbki cieplnej z 15 do 60 s nie miało żadnego wpływu na stopień ich zniszczenia. Grant i wsp. [15] podają, że przy liczbie ponad 100 jtk *Map* w 1 ml mleka drobnoustroje te przeżywiają pasteryzację HTST (72 °C/15 s). W wielu badaniach wykazano, że obróbka cieplna mleka w temp. 65 ÷ 70 °C stosowana czasami podczas produkcji serów (tzw. subpasteryzacja lub termizacja) nie jest wystarczająca do całkowitego zniszczenia *Map* [8, 23, 25, 26, 29].

Trudności w interpretacji wyników badań dotyczących ciepłooporności *Map* wynikają z faktu, że wprowadzanie do surowego mleka inokulum komórek wybranego szczepu *Map* nie oddaje w pełni warunków przypadkowego, naturalnego zanieczyszczenia mleka tymi drobnoustrojami. Szczepy laboratoryjne mogą wykazywać się mniejszą lub większą opornością na ogrzewanie, a także nie występować w skupiskach, a to uważa się za istotny czynnik ciepłooporności tych drobnoustrojów.

Pearce i wsp. [25] zastosowali pasteryzator laboratoryjny, zapewniający burzliwy przepływ mleka, co miało symulować warunki panujące w przemysłowym płytowym wymienniku ciepła. Do mleka surowego wprowadzili taką ilość inokulum, aby liczba *Map* wynosiła $10^3 \div 10^4$ jtk/ml. Mleko poddawali ogrzewaniu przez 15 s w temperaturze [°C]: 72, 69, 66 lub 63. Żaden z badanych szczepów *Map* nie przetrwał ogrzewania w temp. 72 °C, a tylko jeden – w temp. 69 °C. Osiągnięto redukcję liczby bakterii o 7 rzędów logarytmicznych. Podobne wyniki uzyskali McDonald i wsp. [23] oraz Stabel i Lambertz [29]. Ci ostatni autorzy [29] stwierdzili redukcję liczby *Map* w mleku

ogrzewanym w laboratoryjnym pasteryzatorze HTST (71,7 °C/15 s) na poziomie średnio 5 log przy liczbie w mleku surowym – 10^5 jtk/ml i 7,7 log przy liczbie – 10^8 jtk/ml. W mleku pasteryzowanym w minimalnych warunkach HTST *Map*. mogą więc przeżyć w niewielkiej liczbie.

Doświadczenia z zastosowaniem pasteryzatora przemysłowego pracującego w burzliwym przepływie cieczy, ale z mlekiem naturalnie zanieczyszczonym komórkami *Map*, przeprowadzili Grant i wsp. [16]. Część próbek mleka poddanych pasteryzacji w temp. 72 °C przez 15 lub 25 s zawierała *Map*. Badacze podkreślają, że wpływ na otrzymane wyniki mogło mieć przetrzymanie próbek mleka po pasteryzacji przez 24 ÷ 72 h, a przed wykonaniem oznaczeń liczby *Map*, co mogło spowodować regenerację komórek, które uległy subletalnemu uszkodzeniu w czasie obróbki cieplnej.

Wartości D (czas 10-krotnej redukcji liczby bakterii w danej temperaturze) wyliczane na podstawie badań nad termiczną inaktywacją *Map* w mleku podawane w różnych publikacjach znacznie różnią się między sobą. Wartość $D_{63\text{ °C}}$ zawiesiny komórek występujących w skupiskach wahała się od 2,7 do 2,9 min, a komórek poddanych dokładnemu rozbiciu i występujących pojedynczo – od 1,6 do 2,5 min [20]. Wyraźnie niższe wartości D otrzymali Foddai i wsp. [7] ($D_{63\text{ °C}}$ – 81,8 s). Rozbieżności pojawiają się nawet w badaniach nad tymi samymi szczepami. Przykładowo, dla szczepu *Map* ATCC 19698 Lynch i wsp. [22] podają wartość $D_{65\text{ °C}}$ równą 20 s, Pearce i wsp. [25] – $D_{66\text{ °C}}$ – 5 s, natomiast Foddai i wsp. [7] przy znacznie wyższej temp. 68 °C – 10,1 s. Wartości D w temp. 72 °C, obliczone jako średnie dla 4 szczepów *Map*, wynosiły $4,4 \pm 1,1$ s [7]. Z kolei dla szczepu *Map* wyizolowanego ze źródeł klinicznych wartość $D_{71\text{ °C}}$ wynosiła 11,7 s [31], a obliczona dla kilku szczepów przez Pearce'a i wsp. [25] $D_{72\text{ °C}}$ – 2,03 s.

Średnia wartość z (zmiana temperatury konieczna do 10-krotnej zmiany wartości D) mleka obliczona przez Foddaiego i wsp. [7] wynosiła 6,9 °C. Podobną wartość (7,11 °C) podają Sung i Collins [31], co potwierdza, że bakterie *Map* są bardziej ciepłooporne niż bakterie *M. bovis*, których średnia wartość z w mleku wynosi 5,0 °C.

Hipotezy ciepłooporności *Map*

Istnieje kilka hipotez dotyczących oporności cieplnej *Map* w mleku, m.in. tworzenie skupisk komórek, adaptacja fizjologiczna prowadząca do nabycia ciepłooporności oraz fizykochemiczne zmiany we wnętrzu komórki [1]. Bakterie *Map* mają naturalną tendencję do tworzenia skupisk dzięki hydrofobowości ich ściany komórkowej. Stwierdzono, że komórki, które przetrwały obróbkę cieplną występowały właśnie w formie niewielkich skupisk [17]. Wykazano także, że po mechanicznym wymieszaniu próbki mleka (umieszczonej w probówce ze szklanymi perełkami) w urządzeniu Vortex, sztucznie zanieczyszczonego *Map*, komórki były 2-krotnie bardziej wrażliwe na pasteryzację w warunkach 63°C/30 min niż w próbce niepoddawanej takiej obróbce

[27]. Z drugiej strony, czas konieczny do przeniknięcia ciepła do wnętrza skupiska komórek wynosi jedynie kilka setnych sekundy [5]. Liczba komórek tworzących skupiska pochodzące z kału nie była duża, ale znacznie większe, wielowarstwowe skupiska *Map* tworzą w zawiesinach wodnych [18], jakie wykorzystuje się do badań nad inaktywacją cieplną drobnoustrojów. Tworzenie skupisk może nie być więc jedyną przyczyną oporności cieplnej tych drobnoustrojów. Gould i wsp. [10] odrzucają hipotezę o adaptacji *Map* do stresu cieplnego. Wykazana przez Hammera i wsp. [17] przeżywalność *Map* w temp. 90 °C wiązałaby się z ponad 1000-krotnym wzrostem ciepłooporności, co jest mało prawdopodobne. Żaden z mechanizmów odpowiedzi na stres cieplny wykazany u innych gatunków bakterii nie powodował tak znacznego wzrostu ich oporności. Inny mechanizm oporności cieplnej *Map* może być związany z obecnością w mleku kuleczek tłuszczowych, w których wnętrzu bakterie znajdują środowisko o zmniejszonej zawartości wody, co zwiększa ich oporność na ciepło [1].

Obserwowana, nieliniowa zależność inaktywacji cieplnej *Map*, zjawisko wcześniej przypisywane tworzeniu skupisk, jest również charakterystyczna dla komórek występujących pojedynczo, a nie w skupiskach. W starszych kulturach *Mycobacterium marinum* i *M. bovis* BCG stwierdzono występowanie przetrwalników, a jednocześnie – podobnych w przebiegu krzywych inaktywacji cieplnej w czasie ogrzewania w temp. 65 °C/15 min, jakie obserwuje się w przypadku *Map* [9]. Hipoteza, że *Map* w warunkach niesprzyjających (np. przy wydłużonej hodowli) mogą tworzyć przetrwalniki, wymaga potwierdzenia dodatkowymi badaniami.

Wpływ innych procesów wstępnej obróbki mleka na ciepłooporność *Map*

Procesy oczyszczania, homogenizacji, normalizacji mleka czy ewentualnej mikrofiltracji mogą wpływać na liczbę *Map* w mleku pasteryzowanym. Dzięki połączeniu wirowania mleka i jego mikrofiltracji usuwa się od 95 do 99,9 % komórek *Map* [12]. Skuteczniejsze pod względem zniszczenia *Map* jest prowadzenie procesu homogenizacji mleka przed pasteryzacją niż po pasteryzacji [23]. Korzystny wpływ homogenizacji mleka (17 MPa) przed obróbką cieplną na zniszczenie *Map* wykazali także Grant i wsp. [11]. Natomiast Rademaker i wsp. [26] nie stwierdzili wpływu homogenizacji mleka na skuteczność pasteryzacji w stosunku do *Map*.

Podsumowanie

Wyniki badań nad cieplną inaktywacją *Map* nie są jednoznaczne. Nadal nie można podać przyczyny występowania tych drobnoustrojów w produktach rynkowych, gdyż nie ma pewności, czy *Map* przeżywają proces pasteryzacji mleka, czy mogą być wynikiem wtórnego zanieczyszczenia produktu. Na podstawie danych empirycznych stworzono matematyczny model opisujący prawdopodobieństwo występowania *Map* w pasteryzowanym mleku rynkowym. Zgodnie z nim dobra praktyka higieny doju

w połączeniu z prawidłowo przeprowadzoną przemysłową pasteryzacją mleka (72 °C/15 s) skutkuje bardzo niskim prawdopodobieństwem obecności żywych komórek *Map* w produkcie. Według innych badań prawdopodobieństwo wykrycia *Map* w próbce 50 ml mleka pasteryzowanego handlowego w krajach rozwiniętych wynosi 0,54 % (przy założeniu liczby *Map* w mleku surowym 10 jtk/ml). Przy założeniu, że prognozy te są prawidłowe i w mleku pasteryzowanym handlowym występuje bardzo mało żywych komórek *Map*, to zgodnie z wiedzą dotyczącą patogenności tych drobnoustrojów nie można określić ich wpływu na zdrowie konsumenta. *Map* izolowano również z tusz mięsnych [24, 33] i chociaż brakuje danych literaturowych na temat występowania tych drobnoustrojów w warzywach i owocach, to biorąc pod uwagę występowanie *Map* w środowisku, należy przyjąć, że produkty mleczne nie są jedynymi nośnikami tych patogenów.

Literatura

- [1] Anonim: Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*MAP*). J. Food Prot., 2010, **73**, 1357-1397.
- [2] Ayele W.Y., Svastova P., Roubal P., Bartos M., Pavlik I.: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. App. Environ. Microbiol., 2005, **71**, 1210-1214.
- [3] Cerf O., Griffiths M., Aziza F.: Assessment of the prevalence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk. Foodborne Pathog. Dis., 2007, **4**, 433-447.
- [4] Chodini R.J., Hermon-Taylor J.: The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. J. Vet. Diagn. Invest., 1993, **5**, 629-631.
- [5] Davey K.R.: Equilibrium temperature in a clump of bacteria heated in fluid. Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56**, 566-568.
- [6] Ellingson J.L., Anderson J.L., Koziczkowski J.J., Radcliff R.P., Sloan S.J., Allen S.E., Sullivan N.M.: Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. J. Food Prot., 2005, **68**, 966-972.
- [7] Foddai A., Elliot C.T., Grant I.R.: Rapid assessment of the viability of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* cells after heat treatment, using an optimized phage amplification assay. Appl. Environ. Microbiol., 2010, **76**, 1777-1782.
- [8] Gao A., Mutharia L., Chen S., Rahn K., Odumeru J.: Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. J. Dairy Sci., 2002, **85**, 3198-3205.
- [9] Ghosh J., Larsson P., Singh B., Pettersson B., Islam N., Sarkar S., Dasgupta S., Kirsebom L.: Sporulation in mycobacteria. PNAS, 2009, **106**, 10781-10786.
- [10] Gould G., Franken P., Hammer P.M., Shanahan F.: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*MAP*) and the food chain. ILSI Europe Report Series, August 2004.
- [11] Grant I.R., Williams A.G., Rowe M.T., Muir D.D.: Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Appl. Environ. Microbiol., 2005, **71**, 2853-2861.
- [12] Grant I.R., Williams A.G., Rowe M.T., Muir D.D.: Investigation of the impact of simulated commercial centrifugation and microfiltration conditions on levels of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. Int. J. Dairy Technol., 2005, **58**, 138-142.
- [13] Grant I.R., Ball H.J., Neill S.D., Rowe M.T.: Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in

- cow's milk at pasteurization temperatures. Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62**, 631-636.
- [14] Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T.: Effect of high temperature, short time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. Lett. Appl. Microbiol., 1998, **26**, 166-170.
- [15] Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T.: Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72°C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. Lett. Appl. Microbiol., 1999, **28**, 461-465.
- [16] Grant I.R., Hitchings E.I., McCartney A., Ferguson F., Rowe M.T.: Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. Appl. Environ. Microbiol., 2002, **68**, 602-607.
- [17] Hammer P., Kiesner C., Walte H.G., Knappstein K., Teufel P.: Heat resistance of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber., 2002, **54**, 275-303.
- [18] Hammer P., Kiesner C., Walte H.G., Teufel P.: Inactivation of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in whole milk, skim milk and cream in a pilot plant pasteurizer. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber., 2006, **58**, 17-40.
- [19] Ikonopoulous J., Pavlik I., Bartos M., Svastova P., Ayele W.Y., Roubal P., Lukas J., Cook N., Gazouli M.: Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Retail Cheeses from Greece and the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol., 2005, **71**, 8934-8936.
- [20] Keswani J., Frank J.F.: Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. J. Food Prot., 1998, **61**, 974-978.
- [21] Klijn N., Herrewegh A., de Jong P.: Heat inactivation data for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: implications for interpretation. J. Appl. Microbiol., 2001, **91**, 697-704.
- [22] Lynch D., Jordan K.N., Kelly P.M., Freyne T., Murphy P.M.: Heat sensitivity of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in milk under pilot plant pasteurization conditions. Int. J. Dairy Technol., 2007, **60**, 98-104.
- [23] McDonald W.L., O'Riley K.J., Schroen C.J., Condron R.J.: Heat inactivation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk. Appl. Environ. Microbiol., 2005, **4**, 1785-1789.
- [24] Meadus W.J., Gill C.O., Duff P., Badoni M., Saucier L.: Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* DNA. Int. J. Food Microbiol., 2008, **124**, 291-294.
- [25] Pearce L.E., Truong H.T., Crawford R.A., Yates G.F., Cavaignac S., De Lisle G.W.: Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* added to raw milk. Appl. Environ. Microbiol., 2001, **67**, 3964-3969.
- [26] Rademaker J.L., Vissers M.M., Te Giffel M.C.: Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected faeces. Appl. Environ. Microbiol., 2007, **73**, 4185-4190.
- [27] Rowe M.T., Grant I.R., Dundee L., Ball H.J.: Heat resistance of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk. Irish J. Agric. Food Res., 2000, **39**, 203-208.
- [28] Shankar H., Singh S.V., Singh P.K., Singh A.V., Sohal J.S., Greenstein R.J.: Presence, characterization and genotype profiles of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized and milk products in India by culture, PCR and PCR-REA methods. Int. J. Infect. Dis., 2010, **14**, 121-126.
- [29] Stabel J.R., Lambert A.: Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in milk. J. Food Prot., 2004, **67**, 2719-2726.
- [30] Stabel J.R., Steadham E.M., Bolin C.A.: Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**, 4975-4977.

- [31] Sung N., Collins M.T.: Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**, 999-1005.
- [32] Sztejn J., Wiszniewska-Łaszczyk A., Ruszczyńska A.: Występowanie *Mycobacterium paratuberculosis* w mleku surowym. Med. Weter., 2006, **10(62)**, 1186-1187.
- [33] Wells J.E., Bosilevac J.M., Kalchaganand N., Arthur T.M., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M.: Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes and on hides and carcasses from culled cows and fed cattle at commercial beef processing plants in the United States. J. Food Prot., 2009, **72**, 1457-1462.

THERMAL RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*

S u m m a r y

In the 1990s, first publications appeared where it was indicated that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) was more heat resistant than *M. bovis* and it could survive the HTST pasteurization of milk. Since then, there were many research studies published to confirm the presence of *Map* in dairy products. It was found that live cells of those micro-organisms were present in samples of marketed pasteurized milk and, also, in cheeses. It is not easy to study the thermal resistance of *Map*, because the cultivation of *Map* is an arduous process, and comparing and interpreting the data contained in the reference literature is impeded for reasons attributable to differences among experimental methods applied. The analyses performed with the use of milk heated in tubes, capillary tubes, or in laboratory pasteurizers proved that the pasteurization at a temperature of 63 °C/30 minutes as well as HTST caused the count of *Map* cells to decrease by 4 to 7 logarithmic orders. When the experiments were carried out under the conditions of industrial pasteurization, the results obtained were divergent. There are several hypotheses on the thermal resistance of *Map* in milk, among other things, the formation of clusters of bacteria, physiological adaptation of bacteria that allows them to acquire heat resistance, and physical-chemical changes inside the cells.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, heat processing, pasteurization, HTST ☒

MAŁGORZATA DAREWICZ, JUSTYNA BORAWSKA, PIOTR MINKIEWICZ,
ANNA IWANIAK, PIOTR STAROWICZ

BIOLOGICZNIE AKTYWNE PEPTYDY UWALNIANE Z BIAŁEK ŻYWNOŚCI

Streszczenie

Białka żywności charakteryzują się wieloma właściwościami odżywczymi i biologicznymi. Biologicznie aktywne peptydy to fragmenty sekwencji aminokwasowych białek żywności, które stają się aktywne po uwolnieniu. Zwykle są one uwalniane podczas procesów trawienia, fermentacji (dzięki aktywności proteolitycznej mikroorganizmów) lub procesów enzymatycznych *in vitro* i wówczas mogą wpływać na zdrowie człowieka. Z białek żywności wyizolowano szereg peptydów bioaktywnych, w tym: inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę, antyoksydacyjne, antymikrobiologiczne, antyamnezyjne, opioidowe, sensoryczne czy wiążące mikroelementy. Badane są także peptydy niekorzystnie oddziałujące na zdrowie człowieka, np. toksyczne dla osób chorych na celiakię. Obecnie kontynuowane są badania w celu wskazania nowych źródeł bioaktywnych peptydów, a także sposobów ich otrzymywania, biodostępności, aktywności biologicznej i mechanizmów działania. W artykule przedyskutowano sposoby otrzymywania bioaktywnych peptydów z białek żywności, wybrane rodzaje ich aktywności biologicznej oraz ich biodostępność.

Słowa kluczowe: białka żywności, bioaktywne peptydy, struktura bioaktywnych peptydów, biodostępność

Wprowadzenie

Żywność konwencjonalną rozpatruje się obecnie nie tylko jako źródło składników odżywczych niezbędnych do utrzymania homeostazy organizmu, ale również jako źródło składników bioaktywnych. Dowiedziono bowiem, że białka żywności są źródłem bioaktywnych peptydów, które mogą regulować procesy fizjologiczne ustroju, w tym wszystkich układów organizmu, np. hormonalnego, immunologicznego, krążenia, nerwowego czy pokarmowego, co wykorzystuje się obecnie m.in. w produkcji

Prof. dr hab. M. Darewicz, mgr inż. J. Borawska, dr hab. P. Minkiewicz, prof. UWM, dr hab. A. Iwaniak, prof. UWM, mgr inż. P. Starowicz, Katedra Biochemii Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn.
Kontakt: darewicz@uwm.edu.pl

żywności funkcjonalnej [4, 53]. Peptydy te mogą być stosowane w profilaktyce lub nawet terapii chorób dietozależnych [54]. Pierwszymi zbadanymi biologicznie aktywnymi peptydami pochodzącymi z kazeiny mleka krowiego były fosfopeptydy, które w 1950 roku Mellander [63] wskazał jako, niezależne od witaminy D, czynniki sprzyjające procesowi kalcyfikacji kości u niemowląt z krzywicą. W latach 70. XX w. naukowcy zaczęli rozpatrywać białka żywności nie tylko jako źródło aminokwasów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, ale też jako prekursorzy biologicznie aktywnych peptydów [67, 85]. Bioaktywne peptydy to fragmenty sekwencji aminokwasowych białek źródłowych, które pozostają nieaktywne w swoich prekursorach, natomiast po uwolnieniu z białek macierzystych przez enzymy proteolityczne mogą oddziaływać jako modulatory szeregu procesów zachodzących w organizmie. Biopeptyd powinien wykazywać efekt lub efekty biologiczne, które można potwierdzić za pomocą odpowiednich miar i testów (np. pomiar ciśnienia), a ponadto efekty te powinny być korzystne dla zdrowia [71]. Aktywność biologiczna biopeptydów jest podstawowym kryterium ich podziału. Mogą one oddziaływać na homeostazę organizmu człowieka i wpływać na obniżenie ciśnienia krwi, wykazywać aktywność antyoksydacyjną, przeciwdrobnoustrojową, antyamnezyjną, opioidową, kształtować właściwości sensoryczne żywności, wiązać jony metali i brać udział w ich transporcie [12, 13, 14, 26, 44, 48, 49, 67]. Informacje na temat innych rodzajów aktywności biopeptydów dostępne są w internetowych bazach danych [67, 69].

Otrzymywanie biologicznie aktywnych peptydów

Bioaktywne peptydy mogą być uwolnione z białek żywności podczas: 1) hydrolizy enzymami trawiennymi w układzie pokarmowym człowieka, 2) procesów fermentacji dzięki aktywności proteolitycznej mikroorganizmów, 3) enzymatycznej hydrolizy *in vitro*. W celu otrzymania biopeptydów o określonej aktywności do proteolizy stosowane są proteazy o szerokiej specyficzności działania. Są one otrzymywane z tkanek roślinnych (np. ficyna, papaina, bromelaina, serynowa proteinaza z dyni figolistnej), zwierzęcych (np. pepsyna, chymotrypsyna, trypsyna) oraz komórek mikroorganizmów (np. proteinaza K, pronaza, kolagenaza, subtilizyna A, Alcalase®, Flavourzyme®, Neutrase®). Krótkołańcuchowe peptydy otrzymywano skutecznie, stosując kombinację wyżej wymienionych metod. Biopeptydy mogą być także syntetyzowane chemicznie lub poprzez ekspresję odpowiednich genów [9, 15, 48, 92, 110]. Liczba znanych sekwencji biologicznie aktywnych peptydów pochodzących z białek żywności zwiększa się. Do tej pory zidentyfikowano je we wszystkich surowcach białkowych wykorzystywanych do produkcji żywności oraz w wielu produktach spożywczych, głównie w mleku, fermentowanych produktach mleczarskich i serze [1, 49, 56], surowcach i produktach roślinnych [48, 81], mięsie [86], jajach [18, 19, 82] i rybach [93]. Biologicznie aktywne peptydy pochodzące z białek żywności zawierają 2 ÷ 20 reszt amino-

kwasowych [49]. Występują wśród nich także takie, które mogą się składać z większej liczby reszt aminokwasowych. Przykładem może być glikomakropeptyd, wykazujący wiele rodzajów biologicznej aktywności i zawierający 64 reszty aminokwasowe [101] lub lunazyna – peptyd przeciwnowotworowy pochodzący z soi, składający się z 43 aminokwasów [92].

Inhibitory ACE – peptydy odpowiedzialne za obniżanie ciśnienia krwi

Inhibicja enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE; EC 3.4.15.1) przez niektóre peptydy żywności przyczynia się do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi u pacjentów z nadciśnieniem, a peptydy o aktywności inhibitora ACE, stanowiące składniki diety, mogą wspomagać terapię nadciśnienia tętniczego [14, 48, 49]. Informacje dotyczące wpływu struktury i sekwencji aminokwasowej na aktywność peptydów inhibitorów ACE zostały przedstawione i przedyskutowane w pracy przeglądowej autorstwa Iwaniak i wsp. [32]. Sekwencje aminokwasowe inhibitorów ACE są obecne w białkach żywności różnego pochodzenia. Efekt ich działania potwierdzono w badaniach na ludziach oraz w testach *in vitro* na szczurach rasy Wistar z wrodzonym nadciśnieniem tętniczym (SHR) [49]. Białka mleka oraz produktów mleczarskich pełnią wiodącą rolę wśród żywności będącej źródłem inhibitorów ACE [32]. Na rynku produktów funkcjonalnych dostępne są napoje mleczne „Calpis” (Japonia) i „Evolus” (Finlandia), zawierające peptydy VPP z β -kazeiny i IPP z κ -kazeiny. Codzienne picie 95 ml porcji napoju „Calpis” przez 4 do 8 tygodni obniżało skurczowe/rozkurczowe ciśnienie krwi u ludzi o 14,9/8,8 mm Hg [14, 97]. Badania szczurów z nadciśnieniem wykazały, że peptydy o sekwencjach YGLF i YLFF (β -laktorfiny), pochodzące z β -laktoglobuliny, poprawiały relaksację tętnic, a peptyd o sekwencji ALPM, zwany β -laktozyną, obniżał ciśnienie krwi u szczurów z wrodzonym nadciśnieniem [37]. Kovacs-Nolan i wsp. [50] oraz Pokora i wsp. [82] wykazali, że niektóre białka jaja kurzego mogą być dobrym źródłem peptydów redukujących ciśnienie krwi. Przykładem jest owoalbumina, w której zidentyfikowano następujące peptydy przeciwnadciśnieniowe: YAEERYPIL (31,6), IVF (31,7), RADHPFL (34,0) [65], RADHP (25,0) [64], FRADHPFL (18,0), RADHPF (10,6), LW (22,0) [58]. W nawiasach podano poziom redukcji ciśnienia tętniczego krwi u szczurów w mm Hg. Biopeptydy, w tym inhibitory ACE zidentyfikowano w białkach mięsa wieprzowego, wołowego, drobiowego [86] oraz w produktach mięsnych, np. w wędzonej szynce hiszpańskiej [20]. W hydrolizatach enzymatycznych miozyny wieprzowej (łańcuch ciężki) zidentyfikowano miopentapeptydy A (MNPPK) oraz B (ITTNP). Karmienie szczurów dawką 1 mg tych peptydów na kilogram masy ciała powodowało obniżenie skurczowego ciśnienia krwi odpowiednio o 23,4 oraz 21,0 mm Hg [72]. Źródłem inhibitorów ACE jest wędzona szynka hiszpańska. Wykazano, że wyizolowany z ekstraktów wodnych wędzonej szynki hiszpańskiej peptyd o sekwencji AAATP obniżał o $62 \pm 4,5$ mm Hg

skurczowe ciśnienie krwi u szczurów z nadciśnieniem. Redukcja ciśnienia krwi następowała po ośmiu godzinach od momentu bezpośredniej intubacji do żołądka dawki peptydu wynoszącej 1 mg/cm³ wody destylowanej [20, 21]. Białka ryb mogą być także źródłem peptydów przeciwnadciśnieniowych. Na przykład podanie pacjentom hydrolizatu tkanki mięśniowej sardynki zawierającego peptyd VY (4 g hydrolizatu/200 ml dziennie) powodowało redukcję skurczowego/rozkurczowego ciśnienia krwi o 9,3/5,2 mm Hg [62]. Na rynku azjatyckim dostępny jest produkt o nazwie Valtyron®, mający w Japonii status żywności „Food for Specified Health Use” (FOSHU). Preparat ten zawiera peptyd VT otrzymywany z białek tkanki mięśniowej sardynki [26]. Innym przykładem jest preparat „Katsuobushi oligopeptide”, zawierający sekwencję LKPNM, pochodzącą z termolizynowego hydrolizatu białek wędzonych sardynki. Spożywanie preparatu Katsuobushi przez osiem tygodni przez pacjentów z nadciśnieniem tętniczym obniżało ich ciśnienie o $12,55 \pm 1,5$ mm Hg [86]. Cennym źródłem peptydów – inhibitorów ACE są białka roślin [61]. Inhibitory ACE powstają podczas trawienia w przewodzie pokarmowym np. białek soi. Są to peptydy o sekwencji aminokwasowej: VLIVP, YLAGNQ, FFL, IYLL oraz VMNKPG [8]. Cztery inne peptydy, tj. IY, RIY, VWV, WIS otrzymane po hydrolizie białek rzepaku przez subtylizynę wykazują oporność na działanie enzymów przewodu pokarmowego. Dawka 0,15 g tego hydrolizatu na kilogram masy ciała obniżała ciśnienie krwi u szczurów [61]. Źródłem peptydów inhibitorów ACE są także α -zeina kukurydzy [6], karboksylaza rybulozo-1,5-bisfosforanu [E.C. 4.1.1.39] (in. RuBisCO) rzepaku [61], soczewica [35], groch [36]. Inhibitory ACE są składnikami roślinnych potraw kuchni azjatyckiej, jak natto (Japonia), tempe (Indonezja), douchi (zawiera chińską fermentowaną czarną fasolę), tofu „Tofuyo”, makaron i sos sojowy [111].

Peptydy antyoksydacyjne

Wolne rodniki są jednym z czynników etiologicznych wielu tzw. chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów, chorób układu krwionośnego, cukrzycy czy chorób reumatycznych. Uważane są za jedną z przyczyn chorób neurodegradacyjnych [83]. Hydrolizaty białek: mleka, pszenicy, soi, jaj, krewetek, ostroboka, kapeliny, makreli, śledzia, tuńczyka, soli czy mintaja wykazują aktywność antyoksydacyjną [46]. Składnikami peptydów antyoksydacyjnych są reszty aminokwasowe histydyny lub tyrozyny, które w postaci wolnej także wykazują aktywność przeciwutleniającą. Podobne właściwości mają też: metionina, lizyna, arginina, fenyloalanina i tryptofan [81, 87]. Mleko i produkty mleczarskie są podstawowym źródłem, z którego izolowano peptydy o właściwościach antyoksydacyjnych [99]. Aktywność taką wykazuje β -kazeina i uwalniane z niej peptydy, np. o sekwencji: VKEAMAPK, AVPYYPQR, KVLVPEK, VLPVPEK oraz α_{s1} -kazeina, np. o sekwencji YFYPEL [48]. W przypadku białek serwatkowych aktywność antyoksydacyjna związana jest z dużą zawartością reszt cystei-

ny wspomagającej syntezę glutationu – wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza [48]. Hernández-Ledesma i wsp. [28] wyizolowali i zidentyfikowali szereg biopeptydów przeciwutleniających z β -laktoglobuliny poddanej hydrolizie z udziałem preparatu Corolase PP. Peptydy o aktywności antyoksydacyjnej zidentyfikowano w hydrolizatach białek miofibrylarnych wieprzowiny otrzymanych z zastosowaniem papainy i aktyazy [87]. Były to sekwencje: DAQEKLE, DSGVT, IEAEGE, EELDNALN, VPSIDDQEELM. Aktywność antyoksydacyjną wykazują niektóre peptydy powstające podczas hydrolizy np. β -konglicyniny soi (LLPHH), białek mięsa mintaja (FPLEMMPF), owoalbuminy jaja kurzego (YAEERYPIL) [13] czy grochu [40]. Peptydy antyoksydacyjne w żywności mogą być stosowane jako czynniki zapobiegające niekorzystnym zmianom tekstury, cech sensorycznych, funkcjonalnych i odżywczych.

Peptydy antymikrobiologiczne

Peptydy antymikrobiologiczne pochodzące z żywności mogą zawierać nawet do 50 reszt aminokwasowych. W warunkach naturalnych występują zazwyczaj w formie kationowej, zawierają aminokwasy hydrofobowe i wykazują szerokie spektrum działania w stosunku do bakterii, wirusów i grzybów. Pomimo intensywnie prowadzonych badań, mechanizm ich działania nie jest do końca poznany [25]. Wśród najważniejszych efektów działania tych peptydów wymieniane są: zmiany przepuszczalności błony komórkowej, destabilizacja jej struktury lipidowej, tworzenie micel lub kanałów w błonie, wiązanie z lipopolisacharydem, zatrzymywanie replikacji DNA, hamowanie ekspresji białek oraz uwalnianie ATP, a w kolejnym etapie – liza komórek. Aktywność antymikrobiologiczna peptydów w stosunku do drobnoustrojów przypisywana jest także ich zdolności do przyjmowania amfipatycznej struktury α -helikalnej. [70]. Pierwszymi peptydami obronnymi były kazecydyny wyizolowane z kazeiny mleka krowiego poddanej hydrolizie chymozyną. Właściwości antymikrobiologiczne wykazuje także np. fragment 1-23 α_{s1} -kazeiny znany jako isracydyna [52], fragment α_{s2} -kazeiny (reszty 165-203) [113], fragment 184-209 β -kazeiny [66] czy kappacyna pochodząca z κ -kazeiny (pozbawiony reszt cukrowych fragment 106-169) [27]. Z α -laktoalbuminy wyizolowano trzy peptydy antybakteryjne: LDT1 (1-5), LDT2 (17-31)S-S(109-114), LDC (61-68)S-S(75-80) [80]. Dwa pierwsze powstają pod wpływem działania trypsyny, zaś trzeci – chymotrypsyny. Udowodniono, że pepsynowy hydroliżat laktoferryiny, zawierający w pozycjach od 17 do 41 fragment zwany laktoferycyzną, odznacza się większą aktywnością antymikrobiologiczną niż macierzysty peptyd [102]. Van der Kraan i wsp. [105] wyizolowali i scharakteryzowali nowy peptyd pochodzący z laktoferryiny – laktoferrampinę (fragment 268-284). Laktoferryina i jej peptydy wykazują również właściwości przeciwrzybicze [104]. Udowodniono obecność peptydów antybakteryjnych w sekwencjach lizozymu (fragment 98-112) i owotransfe-

ryny jaja kurzego (fragment 109-200) [57]. Aktywność antymikrobiologiczną wykazują także hydrolizaty kolagenu tuńczyka [24] i białek homara [2].

Peptydy antyamnezyczne i inne inhibitory enzymów proteolitycznych specyficznych względem wiązań tworzonych przez reszty proliny

Endopeptydaza prolinowa (EC 3.4.21.26) to enzym należący do klasy hydrolaz, katalizujący rozpad wiązań utworzonych przy udziale proliny w oligopeptydach i białkach. Enzym ten stosowany jest m.in. do modyfikowania właściwości immunoreaktywnych białek pszenicy w profilaktyce żywieniowej osób chorych na celiakię. Podwyższone stężenie endopeptydazy prolinowej w surowicy krwi zaobserwowano u pacjentów z zaburzeniami pamięci, w tym także u chorych na chorobę Alzheimera i schizofrenię [107]. Fragmenty β -kazeiny wykazujące aktywność hamującą wobec endopeptydazy prolinowej najprawdopodobniej przeciwdziałają utracie pamięci [98]. Dipeptydylopeptydaza IV (DPP4) (EC 3.4.14.5) jest najlepiej poznanym i najdokładniej opisanym enzymem z grupy peptydaz prolinowych, ze względu na jej istotną rolę w gospodarce glukozowej organizmu człowieka poprzez regulację wydzielania glukagonopodobnego peptydu insulintropowego [55]. Peptydowe inhibitory endopeptydaz prolinowych, w tym dipeptydylopeptydazy IV znajdują się m.in. w produktach zbożowych [7], czerwonym winie [108], mleku [73], zielonej herbacie, ziołach, jak również w rybach i owocach morza [107]. Przykładami inhibitorów endopeptydaz prolinowych pochodzących z żywności są peptydy: HLPPPV – produkt hydrolizy γ -zeiny przez subtylizynę oraz LLSPWNINA – peptyd wyizolowany z produktów ubocznych powstających przy produkcji sake [34].

Peptydy opioidowe

Peptydy opioidowe są ligandami receptorów opioidowych. Mają wpływ na funkcjonowanie układu nerwowego, m.in. osłabiają odczuwanie bólu, działają uspokajająco, wpływają na zachowania seksualne, wahania temperatury ciała, apetyt. Z drugiej strony ich wchłanianie z przewodu pokarmowego sprzyja zaburzeniom psychicznym [34]. Spośród białek żywności głównymi prekursorami peptydów opioidowych są białka mleka [34, 47], gluten pszeniczny [109], β -konglicynina soi [76], enzym RuBisCO pochodzący ze szpinaku [30] oraz krowia hemoglobina [112]. Charakterystyczne dla peptydów opioidowych pochodzących z bydlęcej kazeiny są m.in. sekwencje β -kazeiny: β -kazomorfiny-11 (YFPFGPIPNSL), β -kazomorfiny-7 (YFPFGPI) i β -kazomorfiny-5 (YFPFG). Aktywność opioidową wykazuje również fragment 90-96 α_{s1} -kazeiny (YLGYLE) [38]. Nydahl i wsp. [75] opisali przemiany hemorfin (peptydów opioidowych pochodzących z hemoglobiny) w mózgu szczura. Peptydy opioidowe pochodzące z gliadyny pszenicy stymulowały u szczurów rozwój neuronów [3]

oraz wydzielanie prolaktyny [22]. Peptydy te poprawiały też zdolność uczenia się u młodych szczurów [17]. Reichelt i Knivsberg [84] przedstawili hipotezę przedstawiającą peptydy opioidowe jako jeden z czynników wywołujących objawy autyzmu. Sevrance i wsp. [91] wymienili zapalenie jelita jako czynnik sprzyjający przedostawaniu się peptydów opioidowych pochodzących z mleka i glutenu do krwi i układu nerwowego. Wymienione zjawisko sprzyja rozwojowi schizofrenii.

Peptydy kształtujące wrażenia smakowe

Kamei i wsp. [39], stosując hydrolizę z udziałem proteazy V8 *Staphylococcus aureus*, endopeptydazy lizylowej oraz aminopeptydazy pyroglutamylowej wyizolowali z gurmaru (*Gymnema sylvestre*) polipeptyd gurmarnę o smaku słodkim. Gurmarnę o masie 4209 Da zawiera 35 reszt aminokwasowych oraz resztę pyroglutamylową w pozycji N-terminalnej. Peptydy o smaku słonym uznawane są za korzystną przyprawę kuchenną zastępującą sól kuchenną zwłaszcza dla diabetyków oraz pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [44]. Przykładami peptydów o smaku słonym są dipeptydy arginylowe zidentyfikowane w chymotrypsynowych i trypsynowych hydrolizatach białek ryb. Za najbardziej aktywne uznano następujące sekwencje aminokwasowe: RP, RA, AR, RG, RS, RV, VR oraz RM, a obecność L-argininy decydowała o aktywności wymienionych peptydów [89]. Z kolei aminokwasami decydującymi o kwaśnym smaku peptydów są reszty kwasu glutaminowego i/lub asparaginowego [44]. Wiele białek żywności jest także prekursorami peptydów o smaku gorzkim. Smak gorzki jest szczególnie niepożądany zwłaszcza w przypadku odżywek, których składnikiem są hydrolizaty białkowe [78] lub serów dojrzewających [5]. Według Kilary i Panyama [44] na goryczkę peptydów wpływa obecność następujących reszt aminokwasowych: L-Tyr, L-Phe, L-Leu. Przykładami peptydów o smaku gorzkim, pochodzących z kazeiny mleka krowiego, są sekwencje: AQTQSLVYFPFGPIPNSLPQNIPPLTQ, GPFVIPPVAPPEVPGK, PALPEYLK, RGPPFIV, VYFPFPPGINH oraz poddana cyklizacji LWLW [44]. W skład peptydów wywołujących wrażenie smakowe umami wchodzi glutaminiany. Wśród tych peptydów znajduje się tzw. pyszny peptyd (ang. *delicious peptide*) wyizolowany z bulionu wołowego i zbudowany z ośmiu reszt aminokwasowych KGDEESLA. Wrażenie smakowe umami przypisywane jest też krótszym fragmentom tej sekwencji, takim jak: GD, DE, EE, KG oraz sekwencjom: GDG, AEA, VEV, DL, EEE [100]. Analiza właściwości sensorycznych peptydów nie jest prosta. Przykładem są peptydy otrzymane z sosu rybnego w procesie długotrwałej fermentacji. Uzyskanych w ten sposób 17 sekwencji nie wykazywało żadnego wrażenia smakowego w środowisku pozbawionym chlorku sodu. W roztworze NaCl o stężeniu 0,3 % wszystkie peptydy wykazywały smak umami i słodki [33].

Peptydy wiążące mikro- i makroelementy

Przykładem peptydów wiążących jony metali są kazeinofosfopeptydy (ang. *caseinphosphopeptides*, CPPs). Są to następujące fragmenty α_{s1} -kazeiny: (59-79, 64-84), α_{s2} -kazeiny: (1-21, 46-70), β -kazeiny (1-25) oraz κ -kazeiny (147-153). Peptydy te są odpowiedzialne za remineralizację szkliwa oraz zwiększanie biodostępności wapnia i innych pierwiastków, jak: cynk, miedź, mangan i żelazo dla organizmu człowieka [79]. Innym źródłem peptydów wiążących jony wapnia są zidentyfikowane w trypsynowym hydrolizacie białek serwatkowych sekwencje aminokwasowe pochodzące z α -laktoalbuminy – FLDDLTD, ILDK oraz sekwencje IPAVFK i VYVEELK z β -laktoglobuliny [45]. Huang i wsp. [31] wyizolowali z białek krewetek heptapeptyd LPTGPKS odpowiedzialny za wiązanie jonów żelaza. Białka pochodzące ze szkieletu ryby hoki (*Johnius belengerii*) poddane działaniu enzymów wyizolowanych z jelita tuńczyka uwalniały fosfopeptyd (FSP, ang. *fish bone phosphopeptide*). Peptyd ten zawierał 23,6 % fosforu i był odpowiedzialny za wiązanie jonów wapnia, nie tworząc przy tym nierozpuszczalnego fosforanu wapnia [42]. Peptydy o właściwościach wiążących jony metali zidentyfikowano także w hydrolizatach białek kielków pszenicy [59]. Natomiast Torres-Fuentes i wsp. [103] w hydrolizatach białek grochu zidentyfikowali peptydy o zdolności chelatowania jonów miedzi i żelaza. Peptydy wiążące jony metali są dostępne na rynku w postaci składników past do zębów oraz mogą być składnikami odżywek dla niemowląt (CPP). Dodawanie CPP do odżywek sojowych zwiększa biodostępność pierwiastków [33].

Peptydy toksyczne dla osób chorych na celiakię

Peptydy biologicznie aktywne zwykle korzystnie oddziałują na organizm człowieka. Do wyjątków należą peptydy toksyczne dla osób chorych na celiakię. Definicja celiakii oraz terminologia dotycząca tej choroby były dyskutowane w pracy Ludvigsson i wsp. [60]. Zalecanym sposobem leczenia celiakii jest eliminacja z diety produktów zawierających gluten pszeniczny i homologiczne białka innych zbóż wykazujące reaktywność krzyżową z gliadynami [12]. Przedmiotem badań są także modyfikacje enzymatyczne glutenu. Peptydy pochodzące z gliadyn pszenicy wykazują toksyczność dla osób chorych na celiakię. Przykładem jest peptyd o sekwencji aminokwasowej: LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF [95]. Cechą charakterystyczną peptydów celiakiotoksycznych jest oporność na proteolizę w przewodzie pokarmowym [77]. Liczne peptydy zawierające wspólne epitopy z gliadynami pszenicy i wykazujące reaktywność krzyżową z wymienionym peptydem wykryto ostatnio w piwie [10]. Reakcje immunologiczne *in vitro* i *in vivo* są wywoływane także przez krótsze fragmenty gliadyn, np. LQLQPFQPQLPY, QPQSFPPQQQ czy PYPQPQLPY [11, 16]. Peptydami celiakiotoksycznymi są głównie fragmenty glutenu pszenicy, a także żyta i jęcz-

mienia. Opisano także toksyczność fragmentów zeiny kukurydzy [77]. Fragmenty białek nienależących do rodziny prolamin, np. kazeiny czy białek drożdży także oddziałują z immunoglobulinami A pacjentów chorych na celiakię [106].

Biodostępność peptydów bioaktywnych

Aktywność biologiczna peptydów, wykazywana w warunkach *in vitro*, nie zawsze przekłada się na efekty biologiczne *in vivo* ze względu na mechanizmy molekularne absorpcji i transportu biopeptydów oraz ich podatności na hydrolizę enzymatyczną do nieaktywnych fragmentów [29]. Zasadnicze znaczenie dla efektu fizjologicznego ma zachowanie stabilnej, natywnej struktury peptydów podczas interakcji z docelowym receptorem. Trawienie białek w przewodzie pokarmowym zaczyna się w żołądku od hydrolizy pepsyną [EC 3.4.23.1] i jest kontynuowane w jelicie cienkim z udziałem trzustkowych endopeptydaz – trypsyny [EC 3.4.21.4], chymotrypsyny [EC 3.4.21.1], elastazy [EC 3.4.21.36] oraz egzopeptydaz – karboksypeptydazy A [EC 3.4.17.1] i B [EC 3.4.17.2], a także peptydaz obecnych w rąbku szczoteczkowym błony śluzowej jelita, co prowadzi do wytworzenia mieszaniny oligopeptydów i wolnych aminokwasów [90]. Udowodniono, że obecność prolina na C-końcu peptydu chroni go przed hydrolizą enzymatyczną w układzie pokarmowym i pośrednio wpływa na jego biodostępność [23, 90]. Znaczna większość bioaktywnych peptydów stanowią krótkie fragmenty – di- oraz tripeptydy (np. duża część inhibitorów ACE), które mogą przekraczać barierę jelitową i docierać w postaci niezmienionej do miejsca oddziaływania, a następnie wpływać na funkcje fizjologiczne organizmu [41, 96]. Wchłanianie peptydów przez jednowarstwowe komórki nabłonka jelitowego może odbywać się w różny sposób [88]. Mechanizm transportu di- i tripeptydów polega głównie na obecności w komórkach nabłonka jelitowego protonozależnych nośników PepT1. Znajdują się one w obrębie rąbka szczoteczkowego jelita cienkiego i przenoszą krótkie peptydy wprost do jednowarstwowych komórek nabłonka jelitowego. Transportery te nie wykazują specyficzności względem sekwencji peptydów [23]. Wewnątrz komórki peptydy są hydrolizowane przez peptydazy cytoplazmatyczne do wolnych aminokwasów, które są transportowane wzdłuż błony boczno podstawnej z udziałem nośnika aminokwasów. Niektóre di- i tripeptydy odporne na działanie peptydaz wewnątrzkomórkowych mogą być przenoszone w niezmienionej formie za pomocą nośnika PepT1 do układu krwionośnego. Zachodzi także transport bierny di- i tripeptydów z jelita między komórkami nabłonka jelit do krwiobiegu. Transport ten polega na przenikaniu przez połączenia jelitowe tworzone przez białka membranowe sąsiadujących enterocytów. Pętle wewnątrzkomórkowe tych białek są ze sobą szczelnie połączone, ale na ich spojeniu znajdują się niewielkie pory umożliwiające przenikanie związków niskocząsteczkowych poprzez bierną dyfuzję [74, 90]. Wykazano, że peptydy przeciwnadciśnieniowe IPP oraz VPP z β -kazeiny ulegają wchłanianiu na drodze międzykomórkowej [51].

W wyjątkowych przypadkach oligopeptydy wykazujące powinowactwo do powierzchni błony komórkowej mogą być przenoszone przy wykorzystaniu mechanizmu transcytozy [90]. Przeprowadzono badania dotyczące mechanizmu transportu bioaktywnych peptydów z zastosowaniem linii komórkowej Caco-2. Wykazano, że peptydy przeciwnadciśnieniowe, w tym inhibitory ACE (np. IF, AF, IPP i VPP) oraz peptydy opioidowe, zachowują stabilną strukturę podczas przenikania przez monowarstwę nabłonka [23, 96]. Stwierdzono, że efektywność transportu zależy od ładunku, masy cząsteczkowej oraz hydrofobowości peptydów [96]. W celu poprawy biodostępności bioaktywnych peptydów prowadzone są badania nad stosowaniem odpowiednich nośników, które mogą chronić biopeptydy przed działaniem niskiego pH w żołądku, a po dostaniu się do jelit rozpuszczać je, umożliwiając ich wchłanianie [94]. W 2010 roku ukazał się patent opisujący możliwość zwiększenia biodostępności biopeptydów VPP, IPP oraz LPP poprzez zastosowanie dodatku błonnika pokarmowego ze zbóż, warzyw lub owoców [43]. Analizuje się także chemiczną modyfikację peptydów (np. poprzez glikozylację) i stosowanie emulsji lub procesu mikrokapsułkowania, które zmniejszyłyby wpływ enzymów trawiennych oraz zwiększyłyby wchłanianie biopeptydów do krwi [74, 81].

Podsumowanie

Przeprowadzono wiele badań, których celem było wykazanie, że żywność jest źródłem biopeptydów, które regulują działanie np. układu krążenia, pokarmowego systemu hormonalnego i nerwowego. Oznacza to, że bioaktywne peptydy mogą wpływać na psychofizyczną kondycję organizmu człowieka. Przyjmuje się również, że biopeptydy mogą chronić organizm przed rozwojem chorób lub nawet mogą być stosowane w terapii wielu schorzeń. Procedury otrzymywania biologicznie aktywnych peptydów o potencjalnym działaniu profilaktycznym obejmują wykorzystanie metod analitycznych, komputerowych oraz technik proteomicznych i peptydomicznych, stosowanych w warunkach *in vitro*, *in vivo* oraz *in silico*, obejmujących procesy hydrolyzy, rozdzielania, identyfikowania i oznaczania aktywności otrzymanych fragmentów białek wraz analizą zależności między strukturą a funkcją biologiczną.

Praca finansowana w ramach projektu NCN nr N N312 465240 i tematu statutowego Katedry Biochemii Żywności UWM w Olsztynie.

Literatura

- [1] Artym J., Zimecki M.: Milk-derived proteins and peptides in clinical trials. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013, **67**, 800-816.
- [2] Battison A.L., Summerfield R., Patrzykat A.: Isolation and characterization of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2008, **25**, 181-187.

- [3] Belyaeva Y.A., Dubynin V.A., Stovolosov I.S., Kamensky A.A.: Neurotropic activity of exorphins with different affinity to the opioid receptors of μ and δ -types. *Neurochem. J.*, 2008, **2**, 47-52.
- [4] Bleiel J.: Functional foods from the perspective of the consumer: How to make it a success? *Int. Dairy J.*, 2010, **20**, 303-306.
- [5] Broadbent J.R., Barnes M., Brennan C., Strickland M., Houck K., Johnson M.E., Steele J.L.: Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 1778-1785.
- [6] Byun H-G, Kim S-K.: Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from Alaskan pollack skin. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **35**, 239-243.
- [7] Cavazos A., Gonzalez de Meija E.: Identification of bioactive peptides from cereal storage proteins and their potential role in prevention of chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2013, **12**, 364-380.
- [8] Chen Z.-Y., Peng C., Jiao R., Wong Y. M., Yang N., Huang Y.: Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 4485-4499.
- [9] Choińska A., Łaba W., Rodziewicz A., Bogacka A.: Proteoliza keratyny piór kurzych z wykorzystaniem pozakomórkowych enzymów proteolitycznych szczepu *Bacillus cereus* B5E/SZ. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2011, **6 (79)**, 204-213.
- [10] Comino I., Real A., Moreno M., Montes R., Cebolla Á., Sousa C.: Immunological determination of gliadin 33-mer equivalent peptides in beers as a specific and practical analytical method to assess safety for celiac patients. *J. Sci. Food Agric.*, 2013, **93**, 933-943.
- [11] Darewicz M., Dziuba J., Minkiewicz P.: Computational characterisation and identification of peptides for *in silico* detection of potentially celiac-toxic proteins. *Food Sci. Technol. Int.*, 2007, **13**, 125-133.
- [12] Darewicz M., Dziuba J., Minkiewicz P.: Celiac disease-background, molecular, bioinformatics and analytical aspects. *Food Rev. Int.*, 2008, **24**, 311-329.
- [13] Darewicz M., Dziuba J.: Peptydy funkcjonalnie aktywne. W: *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. Red: J. Dziuba i Ł. Fornal. WNT, Warszawa 2009, ss. 71-109.
- [14] Darewicz M., Dziuba B., Minkiewicz P., Dziuba J.: The preventive potential of milk and colostrums proteins and protein fragments. *Food Rev. Int.*, 2011, **27**, 357-388.
- [15] Dąbrowska A., Szołtysik M., Babij K., Pokora M., Zambrowicz A., Chrzanowska J.: Application of Asianpumpkin (*Cucurbita ficifolia*) serine proteinase for production of biologically active peptides from casein. *Acta Biochim. Polon.*, 2013, **60**, 117-122.
- [16] Dewar D., Pereira S.P., Ciclitira P.J.: The pathogenesis of celiac disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004, **36**, 17-24.
- [17] Dubynin V.A., Malinovskaya I.V., Belyaeva Y.A., Stovolosov I.S., Bessalova Z.D., Andreeva L.A., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F.: Delayed effect of exorphins on learning of albino rat pups. *Biol. Bull.*, 2008, **35**, 43-49.
- [18] Eckert E., Zambrowicz A., Pokora M., Dąbrowska A., Szołtysik M., Chrzanowska J., Trziszka T.: Application of microbial proteases to obtain egg yolk protein hydrolysates with antioxidant and antimicrobial activity. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **1 (86)**, 105-118.
- [19] Eckert E., Zambrowicz A., Pokora M., Polanowski A., Chrzanowska J., Szołtysik M., Dąbrowska A., Różański H., Trziszka T.: Biologically active peptides derived from egg proteins. *World's Poultry Sci. J.*, 2013, **69**, 375-386.
- [20] Escudero A., Aristoy M.-C., Nishimura H., Arihara K., Toldrá F.: Antihypertensive effect and antioxidative activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat. Sci.*, 2012, **91**, 306-311.
- [21] Escudero E., Mora L., Fraser P.D., Aristoy M.-C., Arihara K., Toldrá F.: Purification and identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham. *J. Proteom.*, 2013, **78**, 499-507.
- [22] Fanciulli G., Dettori A., Demontis M.P., Anania V., Delitala G.: Serum prolactin levels after administration of the alimentary opioid peptide gluten exorphin B4 in male rats. *Nutr. Neurosci.*, 2004, **7**, 53-55.
- [23] Foltz M., Cerstiaens A., van Meensel A., Mols R., van der Pijl P.C., Duchateau G.S.M.J.E., Augustijns P.: The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro

- show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides*, 2008, **29**, 1312-1320.
- [24] Gómez-Guillén M.C., Giménez B., López-Caballero M.E., Montero M.P.: Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll.*, 2011, **25**, 1813-1827.
- [25] Hancock R.E., Sahl H.-G.: Antimicrobial and host-defence peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnol.*, 2006, **24**, 1551-1557.
- [26] Harnedy P.A., FitzGerald R.J.: Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *J. Funct. Foods*, 2012, **4**, 6-24.
- [27] Hayes M., Barrett E., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Hill C., Stanton C.: Evaluation of an antimicrobial ingredient prepared from a *Lactobacillus acidophilus* casein fermentate against *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Protect.*, 2009, **72**, 340-346.
- [28] Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B., Amigo L.: Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 588-593.
- [29] Hernández-Ledesma B., Quiros A., Amigo L., Recio I.: Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *Int. Dairy J.*, 2007, **17**, 42-49.
- [30] Hirata H., Sonoda S., Agui S., Yoshida M., Ohinata K., Yoshikawa M.: Rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating σ_1 and dopamine D₁ receptors. *Peptides*, 2007, **28**, 1998-2003.
- [31] Huang G.-R., Ren Z.-Y., Jiang J.-X., Chen W.-W.: Purification of a hepta-peptide with iron binding activity from shrimp processing by-products hydrolysates. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 2012, **4**, 207-212.
- [32] Iwaniak A., Minkiewicz P., Darewicz M.: Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Compr. Revs Food Sci. Food Saf.*, 2014, **13**, 114-134.
- [33] Iwaniak A., Minkiewicz P.: Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2007, **3** (6), 5-15.
- [34] Iwaniak A., Minkiewicz P.: Biologically active peptides derived from proteins – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2008, **58**, 289-294.
- [35] Jakubczyk A., Baraniak B.: Activities and sequences of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from the digested lentil (*Lens culinaris*) globulins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2013, **48**, 2363-2369.
- [36] Jakubczyk A., Karaś M., Baraniak B., Pietrzak M.: The impact of fermentation and *in vitro* digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chem.*, 2013, **141**, 3774-80.
- [37] Jäkälä P., Vapaatalo H.: Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals*, 2010, **3**, 251-272.
- [38] Jinsmaa Y., Yoshikawa M.: Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides*, 1999, **20**, 957-962.
- [39] Kamei K., Takano R., Miyasaka A., Imoto T., Hara S.: Amino acid sequence of sweet-taste-suppressing peptide (gurmarin) from the leaves of *Gymnema sylvestre*. *J. Biochem.* 1992, **1** (111), 109-112.
- [40] Karaś M., Jakubczyk A., Baraniak B.: Antiradical and antihypertensive activity of peptides obtained from proteins pea sprouts (*Pisum sativum*) by enzymatic hydrolysis. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska Lublin – Polonia*, 2010, **6** (23), 115-121.
- [41] Kawaguchi K., Nakamura T., Kamiye J., Takahashi T., Yamamoto N.: Accumulation of ACE inhibitory tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in vascular endothelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2012, **76**, 1792-1795.
- [42] Khora S.S.: Marine fish-derived bioactive peptides and proteins for human therapeutics. *Int. J. Pharmacy Pharmaceut. Sci.*, 2013, **5**, 31-37.
- [43] Kies A.K., van der Pijl P.C.: Improved peptide availability. Patent UE 2010, 26994-WO-PTC.

- [44] Kilara A., Panyam D.: Peptides from milk proteins and their properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2003, **43**, 607-633.
- [45] Kim S.B., Lim J.W.: Calcium-binding peptides derived from tryptichydrolysates of cheese whey protein. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, 2004, **17**, 1459-1464.
- [46] Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., Shahidi F.: Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.*, 2007, **102**, 1317-1327.
- [47] Kostyra E., Sienkiewicz-Szłapka E., Jarmołowska B., Krawczuk S., Kostyra H.: Opioid peptides derived from milk proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2004, **13**, 25-35.
- [48] Korhonen H., Pihlanto A.: Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 945-960.
- [49] Korhonen H.: Bioactive milk proteins and peptides: from science to functional applications. *Aust. J. Dairy Technol.*, 2009, **64**, 16-25.
- [50] Kovacs-Nolan J., Phillips M., Mine Y.: Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 8421-8431.
- [51] Kurosawa M.T., Nakamura Y., Yamamoto N., Yamada K., Iketani T.: Effects of Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro on nondipper patients: a preliminary study. *J. Med. Food*, 2011, **14**, 538-542.
- [52] Lahov E., Regelson W.: Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk, caseicin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.*, 1996, **34**, 131-145.
- [53] Lange E.: Produkty owsiane jako żywność funkcjonalna. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **3 (70)**, 7-24.
- [54] Lis J., Orczyk-Pawilowicz M., Kątnik-Prastowska I.: Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013, **67**, 529-547.
- [55] Lone A.M., Nolte W.M., Tinoco A.D., Saghatelian A.: Peptidomics of the prolyl peptidases. *The AAPS J.*, 2010, **12**, 483-491.
- [56] López-Expósito I., Amigo L., Recio I.: A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Sci. Technol.*, 2012, **92**, 419-438.
- [57] López-Expósito I., Recio I.: Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 1294-1305.
- [58] López-Fandiño R., Recio I., Ramos M.: Egg-protein-derived peptides with antihypertensive activity. In: *Bioactive egg compounds*. Eds. Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M. i Schade R. Springer-Verlag, Berlin 2010, Part III, Subpart IIIa, pp. 199-211.
- [59] Liu F.-R., Wang L., Wang R., Chen Z.-Z.: Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide-calcium complex. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 7537-7544.
- [60] Ludvigsson J.F., Leffler D.A., Bai J.C., Biagi F., Fasano A., Green P.H.R., Hadjivassiliou M., Kaukinen K., Kelly C.P., Leonard J.N., Aslaksen Lundin K.E., Murray J.A., Sanders D.S., Walker M.M., Zingone F., Ciacci C.: The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 2013, **62**, 43-52.
- [61] Marczak E.D., Usui H., Fujita H., Yang Y., Yokoo M., Lipkowski A.W., Yoshikawa M.: New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*, 2003, **24**, 791-798.
- [62] Matsui T., Kawasaki T.: Antihypertensive effects of bioactive peptides derived from food proteins. Development of antihypertensive food with bioactive sardine muscle peptide (Val-Tyr). *J. Japanese Soc. Nutr. Food Sci.*, 2000, **53**, 2, 77-85.
- [63] Mellander O.: The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Soc. Med. Ups.*, 1950, **55**, 247-255.
- [64] Miguel M., Aleixandre A.: Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *J. Nutr.*, 2006, **136**, 1457-1460.
- [65] Miguel M., López-Fandiño R., Ramos M., Aleixandre A.: Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *Brit. J. Nutr.*, 2005, **94**, 731-737.
- [66] Minervini F., Algaron F., Rizello G.C., Fox P.F., Monnet V., Gobbetti M.: Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 pro-

- teinase-hydrolysed caseins of milk from six species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 5297-5305.
- [67] Minkiewicz P., Dziuba J., Darewicz M., Iwaniak A., Dziuba M., Nałęcz D.: Food peptidomics. *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, **46**, 1-10.
- [68] Minkiewicz P., Dziuba J., Iwaniak A., Dziuba M., Darewicz M.: BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J. AOAC Int.*, 2008, **91**, 965-981.
- [69] Minkiewicz P., Miciński J., Darewicz M., Bucholska J.: Biological and chemical databases for research into the composition of animal source foods. *Food Revs Int.*, 2013, **29**, 321-351.
- [70] Mirski T., Gryko R., Bartoszcze M., Bielawska-Drózd A., Tyszkiewicz W.: Antimicrobial peptides: new possibilities to combat infections in humans and animals. *Med. Weter.*, 2011, **67**, 517-521.
- [71] Möller N.P., Scholz-Ahrens K.E., Roos N., Schrezenmeier J.: Bioactive peptides and proteins from foods: indications for health effects. *Eur. J. Nutr.*, 2008, **47**, 171-182.
- [72] Nakashima Y., Arihara K., Sasaki A., Mio H., Ishikawa S., Itoh M.: Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *J. Food Sci.*, 2002, **67**, 434-437.
- [73] Nongonierma A.B., FitzGerald R.J.: Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *J. Funct. Foods*, 2013, **5**, 1909-1917.
- [74] Norris R., FitzGerald R.J.: Antihypertensive peptides from food proteins. In: *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*. Eds.: Hernández-Ledesma B., Hsieh C.-C., InTech, 2013, pp. 45-72. Dostęp w Internecie [05.04.14.]: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-food-peptides-in-health-and-disease/antihypertensive-peptides-from-food-proteins>
- [75] Nydahl K.S., Pierson J., Nyberg F., Caprioli R.M., Andrén P.E.: *In vivo* processing of LVV-hemorphin-7 in rat brain and blood utilizing microdialysis combined with electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 838-844.
- [76] Ohinata K., Agui S., Yoshikawa M.: Soymorphins, novel opioid peptides derived from soy β -conglycinin β -subunit, have anxiolytic activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, **71**, 2618-2621.
- [77] Ortiz-Sánchez J.P., Cabrera-Chávez F., Calderón de la Barca A.M.: Maize prolamins could induce a gluten-like cellular immune response in some celiac disease patients. *Nutrients*, 2013, **5**, 4174-4183.
- [78] Pedrosa M., Pascual C.Y., Larco J.I., Esteban M.M.: Palatability of hydrolysates and other substitution formulas for cow's milk-allergic children: a comparative study of taste, smell, and texture evaluated by healthy volunteers. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2006, **16**, 351-356.
- [79] Phelan M., Aherne A., FitzGerald R.J., O'Brien N.M.: Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy J.*, 2009, **19**, 643-654.
- [80] Pellegrini A.: Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Des.*, 2003, **9**, 1225-1238.
- [81] Pihlanto A., Mäkinen S.: Antihypertensive properties of plant protein derived peptides. In: *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*. Eds. Hernández-Ledesma B., Hsieh C.C. InTech, 2013, pp. 144-182. Dostęp w Internecie [05.04.14.]: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-food-peptides-in-health-and-disease/antihypertensive-properties-of-plant-protein-derived-peptides>
- [82] Pokora M., Zambrowicz A., Dąbrowska A., Eckert E., Setner B., Szoltyś M., Szewczuk Z., Zabłocka A., Polanowski A., Trziszka T., Chrzanowska J.: An attractive way of egg white protein by-product use for producing of novel anti-hypertensive peptides. *Food Chem.*, 2014, **151**, 500-505.
- [83] Praticò D.: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2008, **29**, 609-615.
- [84] Reichelt K.L., Knivsberg A. M.: Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutr. Neurosci.*, 2003, **6**, 19-28.
- [85] Rutherford-Markwick K.J., Moughan P.J.: Bioactive peptides derived from food. *J. AOAC Int.*, 2005, **88**, 955-966.

- [86] Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C.: Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 2011, **3**, 765-791.
- [87] Saiga A., Tanabe S., Nishimura T.: Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 3661-3667.
- [88] Sarmadi B.H., Ismail A.: Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 2010, **31**, 1949-1956.
- [89] Schindler A., Dunkel A., Stähler F., Backes M., Ley J., Meyerhof W., Hofmann T.: Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauces by means of a sensomics approach. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 12578-12588.
- [90] Segura-Campos M., Chel-Guerrero L., Betancur-Ancona D., Hernandez-Escalante V.M.: Bioavailability of bioactive peptides. *Food Rev. Int.*, 2011, **27**, 213-226.
- [91] Severance E.G., Alaedini A., Yang S., Halling M., Gressitt K.L., Stallings C.R., Origoni A.E., Vaughan C., Khushalani S., Leweke F.M., Dickerson F.B., Yolken R.H.: Gastrointestinal inflammation and associated immune activation in schizophrenia. *Schizophrenia Res.*, 2012, **138**, 48-53.
- [92] Shahidi F., Zhong Y.: Bioactive peptides. *J. AOAC Int.*, 2008, **91**, 914-931.
- [93] Senevirathne M., Kim S.-K.: Development of bioactive peptides from fish proteins and their health promoting ability. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2012, **65**, 235-248.
- [94] Shaji J., Patole V.: Protein and peptide drug delivery: oral approaches. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2008, **70**, 269-277.
- [95] Shan L., Molberg Ø., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G.M., Sollid L.M., Khosla C.: Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 2002, **297**, 2275-2279.
- [96] Sienkiewicz-Szlapka E., Jarmołowska B., Krawczuk S., Kostyra E., Kostyra H., Bielikowicz K.: Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *Int. Dairy J.*, 2009, **19**, 252-257.
- [97] Silva S.V., Malcata X.: Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 1-15.
- [98] Sokołowska A., Bednarz R., Pacewicz M., Georgiades J., Wilusz T., Polanowski A.: Colostrum from different mammalian species – A rich source of colostrinin. *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 204-209.
- [99] Szołtyś M., Niedbalska J., Dąbrowska A., Kupczyński R., Zambrowicz A., Pokora M., Babij K., Chrzanowska J.: Zastosowanie enzymatycznej hydrolizy kazeiny do otrzymywania peptydów o aktywności przeciwutleniającej. *Przem. Chem.*, 2012, **91**, 1014-1019.
- [100] Temussi P.A.: The good taste of peptides. *J. Pept. Sci.*, 2012, **18**, 73-82.
- [101] Thomä-Wörringer C., Sørensen J., López-Fandiño R.: Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 1324-1333.
- [102] Tomita M., Wakabayashi H., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H.: Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications. *Biochem. Cell. Biol.*, 2002, **80**, 109-112.
- [103] Torres-Fuentes C., Alaiz M., Vioque J.: Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chem.*, 2012, **134**, 1585-1588.
- [104] Ueta E., Tanida T., Osaki T.: A novel bovine lactoferrin peptide, FKCRRWQWRM, suppresses *Candida* cell and activates neutrophils. *J. Pept. Res.*, 2001, **57**, 240-249.
- [105] Van der Kraan M.I., Groenink J., Nazmi K., Veerman E.C., Bolscher J.G., NieuwAmerongen A.V.: Lactoferrampin – novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, 2004, **25**, 177-183.
- [106] Vojdani A., Tarash I.: Cross-reaction between gliadin and different food and tissue antigens. *Food Nutr. Sci.*, 2013, **4**, 20-32.
- [107] Wilson J., Hayes M., Carney B.: Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by products. *Food Chem.*, 2011, **129**, 235-244.
- [108] Yanai T., Suzuki Y., Sato M.: Prolylendopeptidase inhibitory peptides in wine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, **67**, 380-382.
- [109] Yoshikawa M., Takahashi M., Yang S.: Delta opioid peptides derived from plant proteins. *Curr. Pharmaceut. Design.*, 2003, **9**, 1325-1330.

- [110] Zambrowicz A., Timmer M., Polanowski A., Lubec G., Trziszka T.: Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 2013, **44**, 315-320.
- [111] Zhang J.H., Tatsumi E., Ding C.H., Li L.T.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product. *Food Chem.*, 2006, **98**, 551-557.
- [112] Zhao Q., Garreau I., Sannier F., Piot J.M.: Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Biopolymers*, 1997, **43**, 75-98.
- [113] Zucht H.D., Raida M., Adermann K.J., Forssman W.G., Casocidin I.: A casein- α_{s2} derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.*, 1995, **372**, 185-188.

BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES RELEASED FROM FOOD PROTEINS

Summary

Food proteins are characterized by many nutritional and biological properties. The biologically active peptides are fragments of amino acid sequences of food proteins that become active upon release. Usually, they are released during the processes of gastrointestinal digestion and fermentation (through proteolytic activity of micro-organisms), or during the *in vitro* enzymatic processes and, then, they can affect human health. A number of bioactive peptides were isolated from food proteins including the following: angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, antioxidants, antimicrobial peptides as well as antiemetic, opioid, sensory, and micro-minerals binding peptides. Furthermore, those peptides are studied, which adversely affect human health, e.g. toxic to people with coeliac disease. Currently, research studies are carried on to identify new sources of bioactive peptides, to specify methods of producing them, and to determine their bioavailability, biological properties, and mechanisms of action. In the paper, there are discussed the methods of producing bioactive peptides from food proteins as are some selected types of their biological activity and their bioavailability.

Key words: food proteins, bioactive peptides, structure of bioactive peptides, bioavailability ☒

ANNA RZEPKOWSKA, DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

PRZEŻYWALNOŚĆ SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS* WYIZOLOWANYCH Z ŻYWNOŚCI W WARUNKACH MODELOWEGO PRZEWODU POKARMOWEGO

Streszczenie

Celem pracy było określenie przeżywalności szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wyizolowanych z żywności, w warunkach modelowego przewodu pokarmowego. Materiał do badań stanowiły 2 szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wyizolowane z oscypka i bundzu oraz probiotyczny szczep *Lactobacillus plantarum* 299v. Wykazano, że dodatek lizozymu i pepsyny do soku żołądkowego oraz dodatek pankreatyny do soku jelitowego nie miały istotnego wpływu na przeżywalność bakterii *Lactobacillus*. Istnieje związek pomiędzy żywotnością komórek bakterii a czasem inkubacji badanych szczepów. Inkubacja szczepów przez 5 h w modelowym przewodzie pokarmowym spowodowała obniżenie liczby komórek bakterii o 2 ÷ 3 rzędy logarytmiczne. Największy wpływ na przeżywalność badanych szczepów miało pH soku żołądkowego. Ponadto wykazano, że dodatek medium żywnościowego w postaci mleka UHT zwiększał tolerancję badanych szczepów bakterii na modelowy sok żołądkowy, działając w sposób ochronny. Stwierdzono także, że badane szczepy *Lactobacillus*, poddane działaniu soku jelitowego, tolerowały wysokie fizjologiczne stężenie soli żółciowych. Uzyskane wyniki badań mogą służyć do optymalizacji dyskryminacyjnych metod badań *in vitro* zdolności bakterii potencjalnie probiotycznych do przeżycia w warunkach stresowych przewodu pokarmowego człowieka.

Słowa kluczowe: bakterie kwasu mlekowego, *Lactobacillus*, przeżywalność, przewód pokarmowy, probiotyki, badania *in vitro*

Wprowadzenie

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) występują na powierzchni roślin, mięsa, w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt oraz w mleku i produktach fermentacyjnych.

Mgr inż. A. Rzepkowska, dr inż. D. Zielińska, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa.
Kontakt: anna_rzepkowska@sggw.pl

towanych, w tym w serach produkowanych metodą tradycyjną z mleka owczego: w oscypku i bundzu [14]. Badania mikroflory przewodu pokarmowego dorosłego człowieka wskazują, że bakterie pochodzące z żywności fermentowanej mogą zasiedlać jelito cienkie i wpływać na jego prawidłowe funkcjonowanie [16].

Właściwości probiotyczne LAB są szczepozależne. Zgodnie z definicją FAO/WHO [4] probiotyki to „żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej liczbie wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza”. Zgodnie ze schematem badań probiotyków, zaproponowanym przez FAO/WHO, po identyfikacji szczepu należy dokonać charakterystyki funkcjonalności, w tym przeprowadzić badania *in vitro* [4]. Wielu autorów podkreśla brak jednolitej metodyki badań *in vitro* dotyczącej probiotyków [2, 3, 5, 12]. Testy te umożliwiają szybką ocenę właściwości potencjalnie probiotycznych bakterii. Uważa się, że tolerancja na niskie pH żołądka i wysokie stężenie żółci są najważniejszymi kryteriami selekcji szczepów probiotycznych i te cechy można zbadać w testach *in vitro* [5, 12].

Zaleca się [4], aby probiotyki pochodziły z przewodu pokarmowego człowieka. Obecnie poszukuje się także organizmów potencjalnie probiotycznych wśród mikroflory naturalnie fermentowanych produktów roślinnych i zwierzęcych [7, 14]. Szczepy izolowane z żywności spontanicznie fermentowanej cechują się dobrą przeżywalnością w przechowywanym produkcie, jak również wysoką opornością na ekstremalne warunki panujące w przewodzie pokarmowym [10]. Tym samym mogą być cenne pod względem technologicznym.

Celem pracy była ocena przeżywalności szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności, w warunkach modelowego przewodu pokarmowego i wstępna ocena ich potencjalnych właściwości probiotycznych.

Material i metody badań

Material do badań stanowiły 3 szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowane z oscypka OS1 i bundzu B1 oraz szczep referencyjny pochodzenia ludzkiego *Lactobacillus plantarum* 299v, o potwierdzonych klinicznie właściwościach probiotycznych, wyizolowany z suplementu diety Sanprobi IBS. Szczepy pochodziły z kolekcji mikroorganizmów Zakładu Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW. Kultury muzealne przechowywano w temp. -80 °C w bulionie MRS (Merck) z 20-procentowym dodatkiem glicerolu. Szczepy ożywiano przez dwukrotny pasaż na bulionie MRS z dodatkiem 1 % inoculum i inkubację w temp. 37 °C przez 24 h.

Modelowy przewód pokarmowy przygotowywano z różnych roztworów elektrolitów (tab. 1). Każdorazowo pobierano po 1 ml 24-godzinnej hodowli badanych szczepów bakterii o początkowej gęstości 10^9 jtk/ml, odwirowywano ($8000 \times$ g/min), zlewano supernatant i dodawano po 5 ml soku żołądkowego. Próby inkubowano 2 h

w temp. 37 °C, następnie odwirowywano, zlewano supernatant i dodawano po 10 ml soku jelitowego. Próby inkubowano przez następne 3 h [2].

Tabela 1. Skład soku żołądkowego i jelitowego w zastosowanym modelowym przewodzie pokarmowym
Table 1. Composition of gastric and intestinal juices in simulated GI tract model applied

Typ soku Type of juice	Skład soku Composition of juice	Czas inkubacji w temp. 37 °C Incubation time at 37 °C	Źródło References
Sok żołądkowy* Gastric juice*	Sterylny roztwór 0,5 % NaCl z dodatkiem lizozymu (1 g/l) i pepsyny (0,3 g/l) doprowadzony do pH 2,0; 2,5 lub 3,0 przy użyciu 5 M HCl. Sterile 0,5 % NaCl solution, with lysozyme (1 g/l) and pepsin addition (0,3 g/l), adjusted to pH 2,0; 2,5 and 3,0 with 5M HCl.	2 h	[2, 6, 14]
Sok jelitowy* Intestinal juice*	Sterylny roztwór NaHCO ₃ (6,4 g/l), KCl (0,239 g/l), NaCl (1,28 g/l), o pH 7,8 z 0,15, 0,3 lub 0,5-procentowym dodatkiem żółci wołowej oraz pankreatyny (1 g/l). Sterile NaHCO ₃ (6,4 g/l), KCl (0,239 g/l), NaCl (1,28 g/l) solution, adjusted to pH 7,8 and with addition of 0,15 %, 0,3 % and 0,5 % bovine bile and pancreatin (1 g/l).	3 h	[1, 2, 3]

*Wszystkie odczynniki pochodziły z firmy Sigma Aldrich / All chemicals were obtained in Sigma Aldrich Co.

W celu sprawdzenia, czy medium żywnościowe wykazuje ochronny wpływ na komórki bakteryjne, do soku żołądkowego dodawano 15 % (m/v) bulionu MRS (Merck), mleka w proszku (SM Gostyń), mleka UHT o zawartości 3,2 % tłuszczu (Łaciate, SM Mlekoop) oraz bulionu wołowego [6, 14]. Badano wpływ następujących czynników na przeżywalność bakterii w modelowym przewodzie pokarmowym: wartość pH soku żołądkowego i dodatek medium żywnościowego, dodatek enzymów trawiennych, stężenie żółci w soku jelitowym oraz czas inkubacji w modelowym soku żołądkowym i jelitowym. Określano liczbę komórek bakterii zgodnie z PN-ISO 15214:2002 [12] na podłożu stałym MRS (Merck). Próbkę pobierano po 0, 1, 2 i 5 h inkubacji.

Wszystkie doświadczenia wykonano w 3 powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 10 (StatSoft®). Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (p = 0,05).

Wyniki i dyskusja

Wpływ pH soku żołądkowego i dodatku medium żywnościowego na przeżywalność szczepów LAB w modelowym przewodzie pokarmowym

Szacuje się, że w ciągu doby organizm dorosłego człowieka wydziela 2,5 l soku żołądkowego o pH 1 ÷ 3 i 0,5-procentowej zawartości związków mineralnych. Żywność trawiona jest w żołądku przez 1 ÷ 3 h, w zależności od rodzaju treści pokarmowej. Można więc przyjąć, że czas inkubacji komórek bakteryjnych w modelowym soku żołądkowym powinien wynieść ok. 2 h. Charteris i wsp. [2] wskazują, że wartość pH tego środowiska jest kluczowa dla przeżywalności bakterii w górnych odcinkach przewodu pokarmowego. Tolerancja szczepów na enzymy i niskie pH żołądka jest cechą szczepozależną [10].

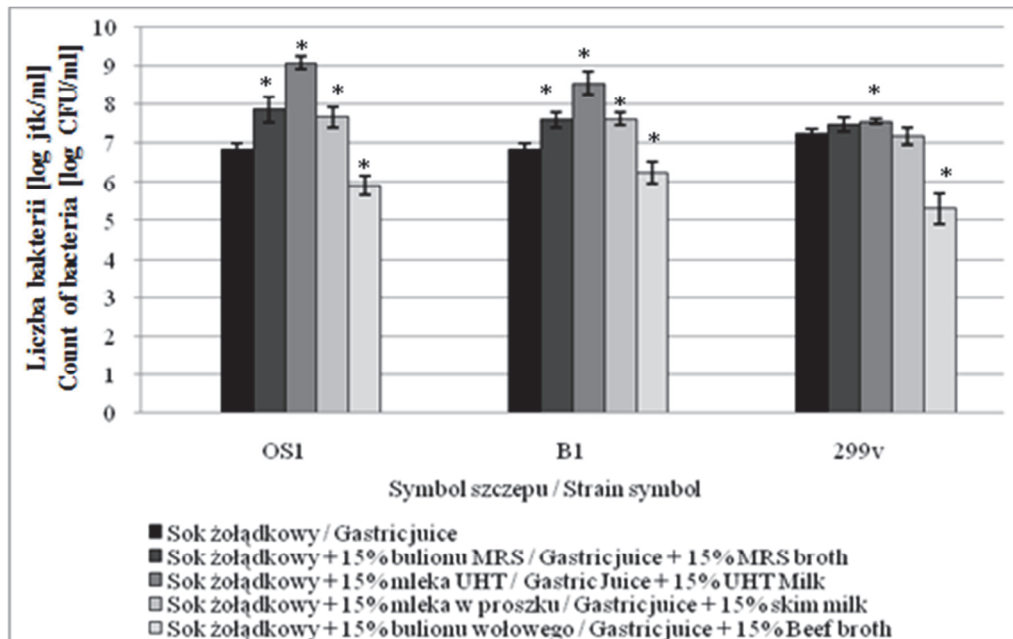
W wyniku przeprowadzonych badań wykazano statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) wpływ pH soku żołądkowego na przeżywalność badanych szczepów *Lactobacillus* (tab. 2). Zaobserwowano znaczne (o 7 log jtk/ml) obniżenie liczby komórek bakterii po 2 h inkubacji w soku o pH 2,0, w porównaniu z liczbą początkową (ponad 9 log jtk/ml). Po inkubacji szczepów w soku żołądkowym o pH 2,5 i 3,0 zaobserwowano obniżenie liczby komórek bakterii kolejno o 2 rzędy i 1 rząd log.

Wpływ zastosowania soku żołądkowego o pH 2,0 może posłużyć jako metoda dyskryminacyjna, gdyż tylko najbardziej odporne szczepy są w stanie przeżyć w tak ekstremalnych warunkach [8]. Autorzy podkreślają dużą wrażliwość szczepów bakterii fermentacji mlekowej na niskie pH soku żołądkowego [3]. Zaobserwowano, że probiotyczne szczepy, np. *Lactobacillus rhamnosus* GG wykazują oporność na kwasowość żołądka, a liczba żywych komórek po 3 h inkubacji obniża się o 3 rzędy log [2]. Z kolei Jensen i wsp. [5] wskazali na szczególnie wysoką tolerancję na sok żołądkowy szczepów z gatunku *Lactobacillus reuteri*, natomiast Schillinger i wsp. [13] podkreślili większą wrażliwość na niskie pH szczepów z gatunku *Lactobacillus casei* niż *Lactobacillus acidophilus*. Korelację pomiędzy żywotnością szczepów bakterii fermentacji mlekowej a wartością pH soku żołądkowego stwierdzili również Pitino i wsp. [11]. Wskazali oni na większą przeżywalność szczepów probiotycznych w stosunku do potencjalnie probiotycznych.

W badaniach własnych stwierdzono, że dodatkowe zastosowanie medium żywnościowego w czasie trawienia w modelowym soku żołądkowym ma istotny wpływ na przeżywalność bakterii (rys. 1). Po 2 h inkubacji liczba komórek bakterii wszystkich szczepów obniżyła się o ok. 2 rzędy logarytmiczne, z początkowej liczby powyżej 9 log jtk/ml. Najlepszą przeżywalność szczepów OS1, B1 i 299v zaobserwowano w soku żołądkowym z dodatkiem mleka UHT. Może to dowodzić, że składniki mleka wpływają ochronnie na żywotność tych bakterii. Natomiast bulion wołowy dodany do soku żołądkowego nie pełnił funkcji ochronnej.

Bakterie fermentacji mlekowej, w tym probiotyki, zwykle dodawane są do żywności lub występują w postaci suplementu diety. Obecność matrycy żywnościowej lub osłonki w suplementie diety korzystnie wpływa na żywotność komórek bakterii w przewodzie pokarmowym [3, 6, 10, 12, 14, 19]. Kos i wsp. [6] wykazali korzystny wpływ dodatku matrycy żywnościowej podczas symulacji pasażu bakterii *Lactobacillus acidophilus* M92 przez przewód pokarmowy. Stwierdzono hamowanie aktywności proteaz przez zastosowanie medium żywnościowego. Za najlepszy czynnik ochronny dla bakterii fermentacji mlekowej uznano białka serwatkowe.

Właściwości ochronne mleka wykazano także w innych badaniach [17]. Stwierdzono, że buforujące właściwości białek mleka korzystnie wpływają na przeżywalność probiotycznych kultur *Lactobacillus acidophilus*, co potwierdzono także w badaniach własnych.



*różnice statystycznie istotne pomiędzy próbkami z medium w odniesieniu do prób z samym sokiem żołądkowym, w obrębie jednego szczepu ($p < 0,05$) / statistically significant differences between applied medium in comparison to gastrin juice, within one strain samples ($p < 0.05$)

Rys. 1. Wpływ 15-procentowego dodatku medium żywnościowego na przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym soku żołądkowym po 2 h inkubacji w środowisku o pH 2,5

Fig. 1. Effect of addition of 15 % food medium on the viability of LAB strains studied in gastric juice simulant after 2 h of incubation in environment with pH equal 2.5

Tabela 2. Przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym soku żołądkowym, w zależności od jego pH
 Table 2. Survival of studied LAB strains in gastric juice simulant depending on its pH value

Symbol szczepu / Strain symbol	Liczba komórek bakterii [log jtk/ml] / Counts of bacterial cells [log CFU/ml]					
	Czas inkubacji 0 h / Incubation time 0 h		Czas inkubacji 2 h / Incubation time 2 h		Czas inkubacji 3 h / Incubation time 3 h	
	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0
OSI	9,24 ± 0,38	9,53 ± 0,24	9,21 ± 0,14	2,29* ± 0,12	7,91* ± 0,41	8,68* ± 0,22
B1	9,32 ± 0,38	9,62 ± 0,01	9,29 ± 0,31	2,43* ± 0,14	7,59* ± 0,20	8,39* ± 0,41
299v	9,19 ± 0,24	9,66 ± 0,04	9,31 ± 0,39	< 1,00*	7,47* ± 0,17	8,74 ± 0,09

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 3.
 *różnice statystycznie istotne pomiędzy kolumnami (p < 0,05) / statistically significant differences between the columns (p < 0.05).

Tabela 3. Przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym soku żołądkowym i soku jelitowym, w zależności od dodatku enzymów
 Table 3. Survival of studied LAB strains in gastric juice simulant and intestinal juice simulant depending on enzymes added

Symbol szczepu Strain symbol	Czas inkubacji 0 h Incubation time 0 h	Liczba bakterii [log jtk/ml] / Counts of bacteria [log CFU/ml]					
		Żołądek (pH 2,5) / Stomach (pH value 2,5) Czas inkubacji 2 h / Incubation time 2 h		Jelito cienkie (pH 7,8) / Intestine (pH value 7,8) Czas inkubacji 3 h / Incubation time 3 h			
		E	X	E	X	E	X
OSI	9,47 ± 0,33	7,72 ± 0,12	7,72 ± 0,11	7,37 ± 0,12	7,25 ± 0,06		
B1	9,30 ± 0,28	7,54 ± 0,17	7,58 ± 0,16	7,18 ± 0,07	7,16 ± 0,09		
299v	9,52 ± 0,23	7,49 ± 0,39	7,39 ± 0,28	7,44 ± 0,17	7,23 ± 0,20		

Objaśnienia / Explanatory notes:

E – sok żołądkowy i sok jelitowy z dodatkiem enzymów / gastric juice and intestinal juice with enzymes added; X – sok żołądkowy i sok jelitowy bez dodatku enzymów / gastric juice and intestinal juice with no enzymes added. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 3.

Wpływ dodatku wybranych enzymów trawiennych na przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym przewodzie pokarmowym

Lizozym to enzym, który odpowiada za hydrolizę ściany komórkowej bakterii. Występuje naturalnie w ślinie człowieka, a także w innych wydzielinach, np. w śluzie żołądka, a bakterie Gram-dodatnie są szczególnie wrażliwe na jego działanie. Pepsyna jest natomiast wydzielana przez komórki gruczołowe żołądka i jest składnikiem soku żołądkowego. Prowadzi hydrolizę białek do krótszych łańcuchów polipeptydowych. Oprócz pH soku żołądkowego, oddziaływanie tego enzymu może mieć istotny wpływ na żywotność bakterii podczas trawienia pokarmu w przewodzie pokarmowym [15].

W badaniach zaobserwowano obniżenie liczby komórek badanych bakterii o 2 rzędy log po 2 h inkubacji, w porównaniu z ich liczbą początkową. Stwierdzono, że dodatek lizozymu i pepsyny nie miał istotnego wpływu na przeżywalność badanych szczepów w modelowym soku żołądkowym o pH 2,5 (tab. 3).

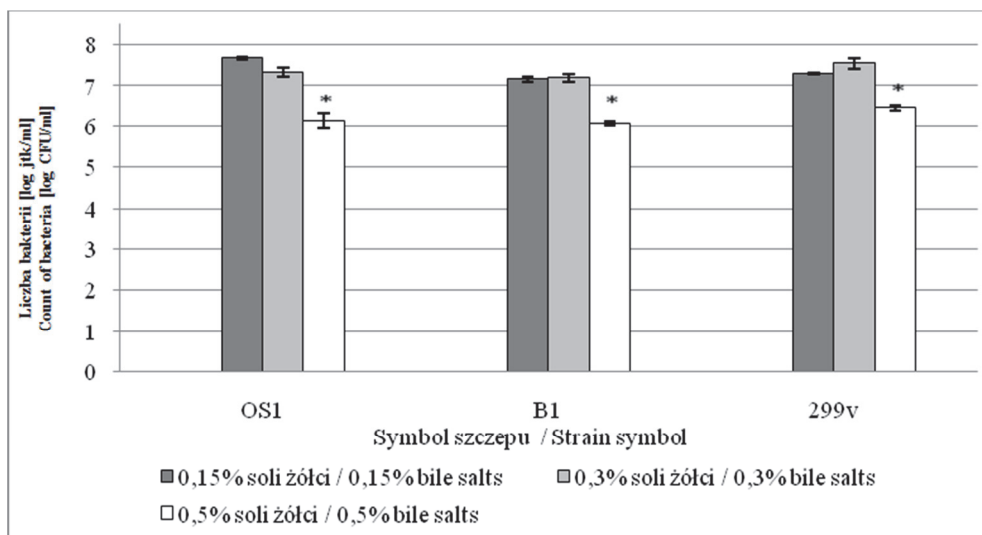
Pankreatyna jest mieszaniną enzymów (amylaz, lipaz i proteaz), wydzielaną przez zewnątrzwydzielnicze komórki trzustki. Ułatwia procesy trawienia i wchłaniania białek, tłuszczów i skrobi oraz może oddziaływać na komórki bakterii.

Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia wykazano, że liczba bakterii badanych szczepów nie różniła się, niezależnie od dodatku enzymów i stwierdzono, że dodatek pankreatyny do modelowego soku jelitowego nie miał statystycznie istotnego ($p < 0,05$) wpływu na przeżywalność szczepów (tab. 3). Monteagudo-Mera i wsp. [10] również wykazali brak wpływu enzymów trawiennych i stwierdzili, że bakterie fermentacji mlekowej wykazują naturalną oporność na pankreatynę soku jelitowego.

Wpływ stężenia soli żółci w soku jelitowym na przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym przewodzie pokarmowym

Sok jelitowy jest wydzielany w ilości 0,7 l/dzień. Jego pH wynosi ok. 8, a stężenie soli mineralnych to ok. 0,5 %. Czynniki determinującymi przeżywalność bakterii w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego są: żółć i obecność enzymów, które zasadniczo wpływają na lizę komórek oraz na przepuszczalność błon komórkowych [20]. Sole kwasów żółciowych są syntetyzowane z cholesterolu w wątrobie. Ich stężenie w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego oscyluje w granicach 0,15 ÷ 0,5 %, jednak naukowcy nie są zgodni co do stężenia soli żółciowych, które należałoby zastosować w badaniach *in vitro* [6, 7, 9]. Czas przebywania pokarmu w jelicie cienkim szacuje się na ok. 3 h [18], dlatego w niniejszej pracy zastosowano taki czas inkubacji.

Zaobserwowano istotny ($p < 0,05$), hamujący wpływ 0,5-procentowego dodatku żółci na przeżywalność badanych bakterii (rys. 2). Szczepy OS1, B1 i 299v cechowały się opornością na fizjologiczne stężenia żółci (0,15 ÷ 0,3 %).



*różnice statystycznie istotne pomiędzy próbami w obrębie jednego szczepu ($p < 0,05$) / statistically significant differences between measurements within one strain samples ($p < 0.05$)

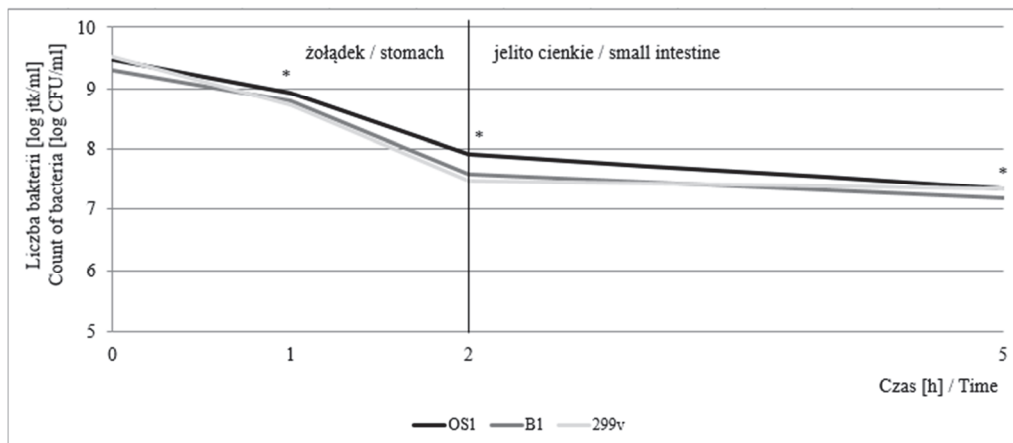
Rys 2. Wpływ stężenia soli żółciowych na przeżywalność badanych szczepów LAB po 3 h inkubacji w modelowym soku jelitowym

Fig 2. Effect of bile salts concentration on survival of studied LAB strains after 3 h incubation in intestinal juice simulant

Zaręba i wsp. [18] wykazali, że przeżywalność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w modelowym soku jelitowym zależy w głównej mierze od początkowej liczby bakterii, co potwierdzono także w badaniach własnych. Z kolei Ziarno [19] oraz Schillinger i wsp. [13] sugerują, że zdolność szczepów do wytwarzania BSH (hydrolazy soli żółci) ma istotny wpływ na oporność komórek bakterii na toksyczne działanie soli żółci. Enzym ten jest specyficznym czynnikiem obrony, a jego funkcją jest hydroliza soli żółciowych sprzężonych z tauryną lub glicyną do wolnych aminokwasów i do wolnych kwasów żółciowych. Możliwość regulacji aktywności BSH może być wykorzystana do badania zdolności zasiedlania układu pokarmowego przez *Lactobacillus*, ale jej brak nie dyskryminuje szczepów w kategorii probiotyczności, gdyż nadal mogą być odporne na wysokie, fizjologiczne stężenia żółci [13]. Dodatkowo stwierdzono, że poszczególne szczepy i gatunki *Lactobacillus* mogą wykazywać różną aktywność tej hydrolazy [1, 19].

Wpływ pasażu na przeżywalność badanych szczepów LAB w modelowym przewodzie pokarmowym

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że istnieje statystyczny związek pomiędzy żywotnością komórek bakterii a zastosowanymi warunkami pasażu badanych szczepów w modelowym przewodzie pokarmowym (rys. 3).



*różnice statystycznie istotne pomiędzy próbami w obrębie jednego szczepu ($p < 0,05$) / statistically significant differences between measurements within one strain samples ($p < 0.5$).

Rys 3. Wpływ zastosowanych warunków pasażu na przeżywalność szczepów LAB w modelowych warunkach przewodu pokarmowego

Fig 3. Effect of passage conditions applied on survival of LAB strains under simulated conditions of GI tract model

Zaobserwowano, że po 2 h inkubacji w soku żołądkowym, w przypadku wszystkich badanych szczepów, liczba komórek bakterii obniżyła się o ok. 2 rzędy log, a po 3 h inkubacji w soku jelitowym o niecały 1 rząd log.

Uzyskane wyniki badań mogą służyć do optymalizacji dyskryminacyjnych metod badań *in vitro* zdolności bakterii potencjalnie probiotycznych, do przeżycia w warunkach stresowych przewodu pokarmowego człowieka.

Wnioski

1. Największy wpływ na przeżywalność badanych szczepów bakterii miała wartość pH modelowego soku żołądkowego, przy czym dodatek mleka UHT jako medium żywnościowego zwiększał oporność badanych szczepów, działając w sposób ochronny.

2. Dodatek pepsyny i lizozymu do modelowego soku żołądkowego oraz pankreatyny do modelowego soku jelitowego nie miał istotnego wpływu na przeżywalność badanych szczepów *Lactobacillus*. Bakterie tolerowały fizjologiczne stężenie soli żółciowych w modelowym soku jelitowym.
3. Zaobserwowano statystycznie istotne ($p < 0,05$) zmniejszenie liczby komórek bakterii (do ok. $7 \log$ jtk/ml) w czasie pasażu w warunkach modelowego przewodu pokarmowego.
4. Udowodniono, że szczepy z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowane z żywności tradycyjnej wykazują jedną z cech probiotyczności, rekomendowanych przez FAO/WHO do badań probiotyków. W celu potwierdzenia właściwości probiotycznych badanych szczepów konieczne są dalsze badania, a szczególnie pożądane są testy *in vivo*.

Literatura

- [1] Casey P.G., Casey G.D., Gardiner G.E., Tangney M., Stanton C., Ross R.P., Hill C., Fitzgeralds G.F.: Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. Lett. Appl. Microbiol., 2004, **39**, 431-438.
- [2] Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K.: Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol., 1998, **84**, 759-768.
- [3] Del Piano M., Morelli L., Strozzi G.P., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso L.: Probiotics: from research to consumer. Digest Liver Dis., 2006, **2 (38)**, 248-255.
- [4] FAO/WHO: Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Canada 2002, pp. 1-56.
- [5] Jensen H., Grimmer S., Naterstad K., Axelsson L.: *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 2012, **153**, 216-222.
- [6] Kos B., Šušćkovic J., Goreta J., Matošić S.: Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. Food Technol. Biotechnol., 2000, **2 (38)**, 121-127.
- [7] Kumar M., Ghosh M., Ganguli A.: Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. World J. Microbiol. Biotechnol., 2012, **28**, 703-711.
- [8] Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Guigas C., Franz C., Holzapfel W.H.: Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. Curr. Microbiol., 2008, **56**, 315-321.
- [9] Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K., Holzapfel W.H.: Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. Int. J. Food Microbiol., 2008, **126**, 57-64.
- [10] Monteagudo-Mera A., Rodríguez-Aparicio L., Rúa J., Martínez-Blanco H., Navasa N., García-Armesto M.R., Ferrero M.A.: *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. J. Funct. Food, 2012, **4**, 531-541.
- [11] Pitino I., Randazzo C.L., Mandalari G., Lo Curto A., Faulks R.M., Le Marc Y., Bisignano C., Caggia C., Wickham M.S.: Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. Food Microbiol., 2010, **27**, 1121-1127.
- [12] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.

- [13] Schillinger U., Guigas C., Holzapfel W.H.: *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 1289-1297.
- [14] Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W.: Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*, 2012, **26**, 117-124.
- [15] Vizoso Pinto M.G., Franz C., Schillinger U., Holzapfel W.H.: *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **109**, 205-214.
- [16] Walter J.: The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract. In: *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. Ed. G.W. Tannock. Caister Academic Press, Norfolk 2005, pp. 51-82.
- [17] Zaręba D.: Przeżywalność probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* w mleku niefermentowanym i fermentowanym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5 (60)**, 189-196.
- [18] Zaręba D., Ziarno M., Strzelczyk B.: Przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej w warunkach modelowych jelita cienkiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5 (60)**, 197-205.
- [19] Ziarno M.: Znaczenie aktywności hydrolazy soli żółci u bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **3 (43)**, 285-296.
- [20] Ziarno M., Zaręba D., Jamiółkowska D.: Studia nad czynnikami determinującymi przeżywalność LAB w warunkach symulujących układ pokarmowy. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2009, **3 (42)**, 990-994.

SURVIVAL OF *LACTOBACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM FOOD UNDER CONDITIONS OF SIMULATED GASTROINTESTINAL TRACT MODEL

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the survival of strains of *Lactobacillus*, isolated from food, under the conditions of a gastrointestinal (GI) tract model. The research material constituted two strains of *Lactobacillus* isolated from oscypek and bundz cheeses, and a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* 299v. It was proved that the addition of lysozyme and pepsin to gastric juice and of pancreatin to intestinal juice had no significant effect on the survival of *Lactobacillus*. There is a relationship between the viability of cells and the incubation time of bacteria strains studied. The 5 h lasting incubation of strains in the simulated GI tract model caused the count of bacteria to decrease by 2 ÷ 3 logarithmic orders. The pH value of gastric juice had the greatest effect on the survival of the bacteria studied. Furthermore, it was found that the addition of a food medium in the form of UHT milk increased the tolerance of the bacteria studied to the gastric juice simulant and had a protective effect. Also, it was found that the *Lactobacillus* strains analyzed, when treated by intestinal juice, tolerated a high physiological concentration of bile salts. The results obtained can be applied to optimize discriminant methods in *in vitro* studies on the ability of potentially probiotic bacteria to survive under stress conditions of human GI tract.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, survival, gastrointestinal (GI) tract, probiotics, *in vitro* study ☒

MAGDALENA A. OLSZEWSKA, ALEKSANDRA KOCOT, MONIKA GRYN,
LUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

ODPOWIEDŹ KOMÓREK *LACTOBACILLUS BREVIS* NA STRES OSMOTYCZNY ZBADANA METODĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

Streszczenie

Pałeczki fermentacji mlekowej mogą wytrzymywać efekty stresu osmotycznego w naturalnym środowisku bytowania, jak również w procesie produkcji żywności. Złożoność zmian zachodzących w komórkach w wyniku działania tego stresu stwarza potrzebę poszerzenia wiedzy dotyczącej jego wpływu na stan fizjologiczny pałeczek *Lactobacillus*. Celem pracy było określenie wpływu chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 % na fizjologię komórek szczepu *Lactobacillus brevis*, które wyizolowano z żywności. Zastosowano cytometrię wielobarwną i dobrano barwienie CFDA/PI (diocyan karboksylfluoresceiny/jodek propidyny) do oznaczenia aktywności esterolitycznej i spójności błon cytoplazmatycznych komórek. Na podstawie analizy cytometrycznej wyodrębniono cztery grupy komórek o określonych parametrach: 1 – CFDA⁺PI⁺, 2 – CFDA⁺PI⁻, 3 – CFDA⁻PI⁺, 4 – CFDA⁻PI⁻, których udział zależał od dodatku chlorku sodu w badanych próbkach. Zaobserwowano zwiększony udział komórek w grupie 1. i zmniejszony – w grupie 4. w badanych próbkach, świadczące o wzroście udziału komórek z uszkodzeniami w błonach cytoplazmatycznych i obniżeniu udziału komórek aktywnych. Na podstawie wyników metody płytkowej dowiedziono, że część populacji *Lb. brevis* straciła tzw. hodowalność w środowisku o największym stężeniu chlorku sodu – 2,5 %. Stwierdzono, że szczep *Lb. brevis* wykazał znaczną tolerancję na działanie chlorku sodu w badanym zakresie i wiedza z tego zakresu może być przydatna w badaniach skринingowych nad przydatnością pałeczek *Lactobacillus* w przemyśle.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus brevis*, stres osmotyczny, cytometria przepływowa, tolerancja na działanie NaCl

Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zastosowane w przemysłowych procesach produkcyjnych napotykają na stresy środowiskowe, które mogą występować samodzielnie

Dr M. A. Olszewska, mgr A. Kocot, mgr M. Gryn, prof. dr hab. Ł. Łaniewska-Trokenheim, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn. Kontakt: magdalena.olszewska@uwm.edu.pl

lub w sprzężeniu z innymi czynnikami stresotwórczymi. Pałeczki fermentacji mlekowej uruchamiają różne mechanizmy odpowiedzi na stresse środowiskowe. Ich zdolność do znoszenia efektów stresu środowiskowego jest zróżnicowana, warunkuje przeżywalność, aktywność metaboliczną i przydatność technologiczną tych bakterii. Wiedza z tego zakresu może być zatem przydatna w pracach skринingowych nad użytecznością *Lactobacillus* spp. w przemyśle.

Jednym z czynników stresowych, który występuje w przemysłowych procesach produkcyjnych, a jednocześnie warunkuje prawidłowe funkcjonowanie pałeczek, jest ciśnienie osmotyczne środowiska [15]. Środowisko hiperosmotyczne powoduje wyciek wody na zewnątrz komórki bakteryjnej, doprowadzając do utraty turgoru [6]. Jednym z mechanizmów ochrony pałeczek przed negatywnym efektem stresu osmotycznego jest stałe utrzymywanie stosunkowo wysokiego stężenia jonów potasu [15]. Dowiedziono, że *Lactobacillus acidophilus* wykazuje przeżywalność na poziomie 46 % po 2-godzinnej inkubacji w środowisku o stężeniu 18 % NaCl [9]. *Lactobacillus alimentarius* wykazał większą przeżywalność, ale w subletalnych stężeniach soli (2 % NaCl przez 1 h) i jednocześnie zwiększoną tolerancję na sole żółci, kwas cytrynowy i kwas glukonowy, po wcześniejszej inkubacji w środowisku hiperosmotycznym [10]. Ocenia się, że szkodliwość skutków szoku osmotycznego wywołanego obecnością soli jest większa niż w obecności sacharydów. Wynika to z tego, że pałeczki mają zdolność regulowania wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego stężenia sacharydów, tj. laktozy i sacharozy, poprzez aktywne pobieranie sacharydów ze środowiska [6]. W środowisku z dodatkiem soli zaobserwowano natomiast, że może dochodzić do zjawiska poboru substancji osmoaktywnych, tj. glicyny, betainy i karnityny przez ułatwioną dyfuzję (tzw. system QacT). Taki mechanizm wykryto u *Lactobacillus plantarum*, ochronny efekt substancji osmoaktywnych powodował zwiększenie przeżywalności w wyższych stężeniach soli [7]. Po przeniesieniu szczepu do środowiska hipoosmotycznego dochodziło z kolei do szybkiego wypływu glicyny i betainy z komórek przez machanozależne kanały białkowe – system nie w pełni jeszcze poznany [8]. Badania odpowiedzi pałeczek fermentacji mlekowej na stres osmotyczny choć obszerne, wciąż są niewystarczające, wiele aspektów wymaga jeszcze poznania. Złożoność zmian zachodzących na poziomie komórkowym pod wpływem stresu osmotycznego stwarza potrzebę rozszerzenia wiedzy z tego zakresu. Kluczowy w takich badaniach jest dobór odpowiedniego narzędzia analitycznego. W badaniach odpowiedzi komórek na stres osmotyczny przydatna może być cytometria przepływowa. Metoda łączy w sobie czułość technologii fluorescencyjnej z analizą pojedynczych komórek. Przy zastosowaniu cytometrii wielobarwnej komórki pobierają różne barwniki fluorescencyjne, dzięki czemu można je odróżnić od siebie na podstawie barwy, wynikającej z emitowania widma o różnej długości fali. Rezultatem jest wykres kropkowy zabarwionych komórek, z których każda związana jest z inną barwą fluorochromu. Na podstawie ilości emitowanego

światła każdej barwy można zidentyfikować komórki różniące się aktywnością fizjologiczną [12].

Celem pracy było określenie wpływu chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 % na aktywność fizjologiczną komórek szczepu *Lactobacillus brevis*, który wyizolowano z żywności.

Material i metody badań

Zastosowano metodę barwienia fluorescencyjnego CFDA/PI (dioctan karboksyfluoresceiny-jodek propidyny) wraz z cytometrią przepływową oraz mikroskopią epifluorescencyjną. Barwienie CFDA/PI dobrano w celu oznaczenia aktywności esterolitycznej komórek oraz występowania uszkodzeń w ich błonach cytoplazmatycznych. Badania wpływu stresu osmotycznego rozszerzono o określenie zdolności *Lactobacillus brevis* do wzrostu na podłożach hodowlanych pod wpływem stresu z zastosowaniem posiewów płytkowych. Badania aktywności fizjologicznej uzupełniono o analizę subpopulacji komórek po dostarczeniu komórkom glukozy i wcześniejszym działaniu czynnika stresowego, w celu porównania efektów tego zabiegu z oddziaływaniem samego stresu osmotycznego.

W badaniach użyto szczepu *Lactobacillus brevis*, który wyizolowano z kiszonej kapusty. Po ocenie cech morfologiczno-fizjologicznych szczepu, jego przynależność gatunkową do *Lb. brevis* potwierdzono fluorescencyjną hybrydyzacją *in situ* (FISH) z użyciem wyszukanych w bazie danych probeBase sond oligonukleotydowych 16S RNA: sondy dla *Eubacteria* Eub338 GCT GCC TCC CGT AGG AGT, sondy nonsensownej Non338 ACT CCT ACG GGA GGC AGC, sondy dla rodzaju *Lactobacillus* Lab158 GGT ATT AGC AYC TGT TTC CA oraz sondy dla gatunku *Lactobacillus brevis* Lbrev CAT TCA ACG GAA GCT CGT TC.

Hodowlę szczepu *Lb. brevis* w pożywce MRS (Merck) przenoszono do probówek typu eppendorf, odwirowywano (3 min, 13 000 × g, MPW 65 R) i zawieszano w pożywce MRS z dodatkiem NaCl (POCH) o określonym stężeniu [%]: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 tak, aby uzyskać wielkość populacji rzędu $\sim 10^8$ komórek w badanych próbkach. Próbę kontrolną stanowiła taka sama objętość hodowli zawieszona w pożywce MRS bez dodatku chlorku sodu. Wszystkie próbki inkubowano w temp. 30 °C przez 30 min, a następnie odwirowywano (3 min, 13 000 × g) i zawieszano w buforze PBS (0,1 M, pH 7,8). Do oznaczeń fluorescencyjnych próbki barwiono najpierw 50 μM CFDA (dioctan karboksyfluoresceiny, Biochemika Fluka), inkubowano w temp. 37 °C przez 30 min w ciemności, następnie 30 μM PI (jodek propidyny, Biochemika Fluka) przez 10 min w łaźni lodowej, również w ciemności [17]. Przygotowane w ten sposób próbki poddawano analizie cytometrycznej z użyciem cytometru przepływowego MoFlo™ (XDP – Beckman Coulter), wyposażonego w laser argonowy 488 nm oraz w odpowiednie detektory fluorescencji: zielony (FL1) i czerwony (FL4). Przetworzenie sygna-

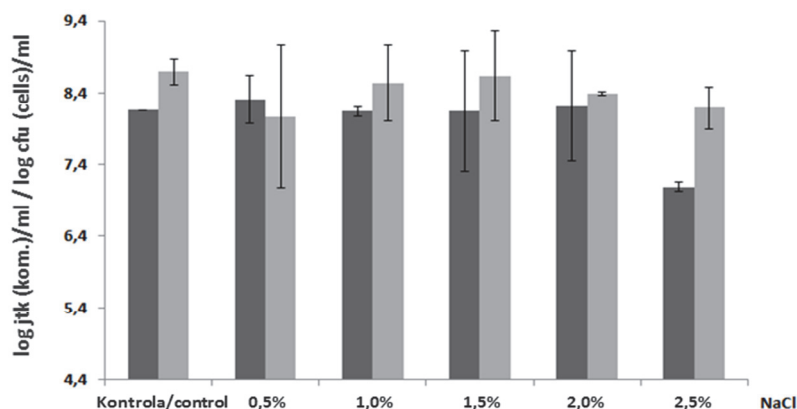
łu fluorescencyjnego na sygnał elektroniczny i obróbka z użyciem oprogramowania Summit Software 5.2 umożliwiło ilustrację wyników w postaci wykresów kropkowych. Pola ograniczone ramką na wykresach kropkowych pozwoliły na podział populacji komórek na subpopulacje i oszacowanie ich udziału procentowego. Ten sam materiał posłużył do przygotowania preparatów do oznaczeń mikroskopowych. W tym celu próbki filtrowano, używając czarnych filtrów poliwęglanowych typu: 0,2 μm , \varnothing 13 mm i aparatu filtracyjnego (Millipore). Do przygotowania preparatów mikroskopowych stosowano olejek niefluoryzujący BackLight™ Mounting Oil (Molecular Probes). Analizę preparatów mikroskopowych wykonywano w mikroskopie epifluorescencyjnym (Olympus BX51) zaopatrzonym we właściwe zestawy filtrów (U-MNB2: 470 ÷ 490 nm; U-MNG2: 530 ÷ 550 nm) i kamerę Digital Colour XC10 (Olympus). Uzyskane obrazy analizowano w programie cellSens Dimension wersja 1.5 (Olympus). Komórki zliczano z 10 obrazów mikroskopowych każdej badanej próbki i wyliczano logarytm komórek na mililitr (log kom./ml). Ponadto wykonywano posiewy powierzchniowe z odpowiednich rozcieńczeń próbek na podłoże MRS-agar (Merck). Inkubację prowadzono w temp. 30 °C przez 48 h, w warunkach beztlenowych (Anaerocult® C, Merck). Liczono kolonie i określano logarytm jednostek tworzących kolonie na mililitr (log jtk/ml). Te same próbki, po działaniu chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 %, poddawano następnie inkubacji z glukozą w stężeniu 20 mM w temp. 30 °C przez 30 min i poddawano powtórnej analizie cytometrycznej.

Zależność statystyczną między przeżywalnością *Lb. brevis* i stresem osmotycznych analizowano testem Kruskala-Wallisa na poziomie istotności $p = 0,05$, przy użyciu programu Statistica wersja 10 (StatSoft).

Wyniki i dyskusja

Średnie liczby bakterii *Lb. brevis* oznaczone dwiema metodami – płytkową i barwienia fluorescencyjnego CFDA – były zbliżone w próbkach: od kontrolnych do zawierających 2-procentowy dodatek NaCl (rys. 1). Największe różnice między dwiema metodami zaobserwowano w próbkach zawierających 2,5 % NaCl. Na podstawie liczby *Lb. brevis* oznaczonej metodą płytkową zaobserwowano, że przeżywalność szczepu zmniejszyła się w środowisku o największym stężeniu chlorku sodu (2,5 %) o $\log N/N' \sim -1,0$ (gdzie N to liczebność populacji oznaczona w próbkach z 2,5-procentowym NaCl, a N' to liczebność populacji oznaczona w próbkach kontrolnych). Na tej podstawie można przypuszczać, że część komórek poddanych stresowi 2,5-procentowego NaCl straciła tzw. hodowalność, zachowując aktywność esterolityczną. Ten stan nazywany jest stanem uśpienia lub VBNC (ang. *viable but nonculturable*), czyli żywe, ale nienadające się do hodowli [11]. Pomimo znacznego poziomu stresu osmotycznego wywołanego 2,5-procentowym dodatkiem NaCl, obniżenie przeżywalności, w odniesieniu do tzw. hodowalności populacji, o jeden rząd logarytmiczny (rys. 1) nie było

statystycznie istotne ($p = 0,5494$). Ta obserwacja pozwoliła stwierdzić, że szczep *Lb. brevis* wykazał znaczną tolerancję na działanie NaCl w badanym zakresie, co może czynić go przydatnym w przemysłowych procesach produkcyjnych o zwiększonym udziale soli.



Rys. 1. Liczba bakterii *Lactobacillus brevis* wyizolowanych z kiszzonej kapusty w próbkach kontrolnych oraz poddanych działaniu chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 %, oznaczona metodą płytkową (■) oraz barwienia fluorescencyjnego CFDA (▒)

Fig. 1. Count of *Lactobacillus brevis* bacteria isolated from fermented cabbage in control samples and in samples treated with sodium chloride ranging from 0.5% to 2.5%, assayed using plate (■) and CFDA fluorescent staining methods (▒)

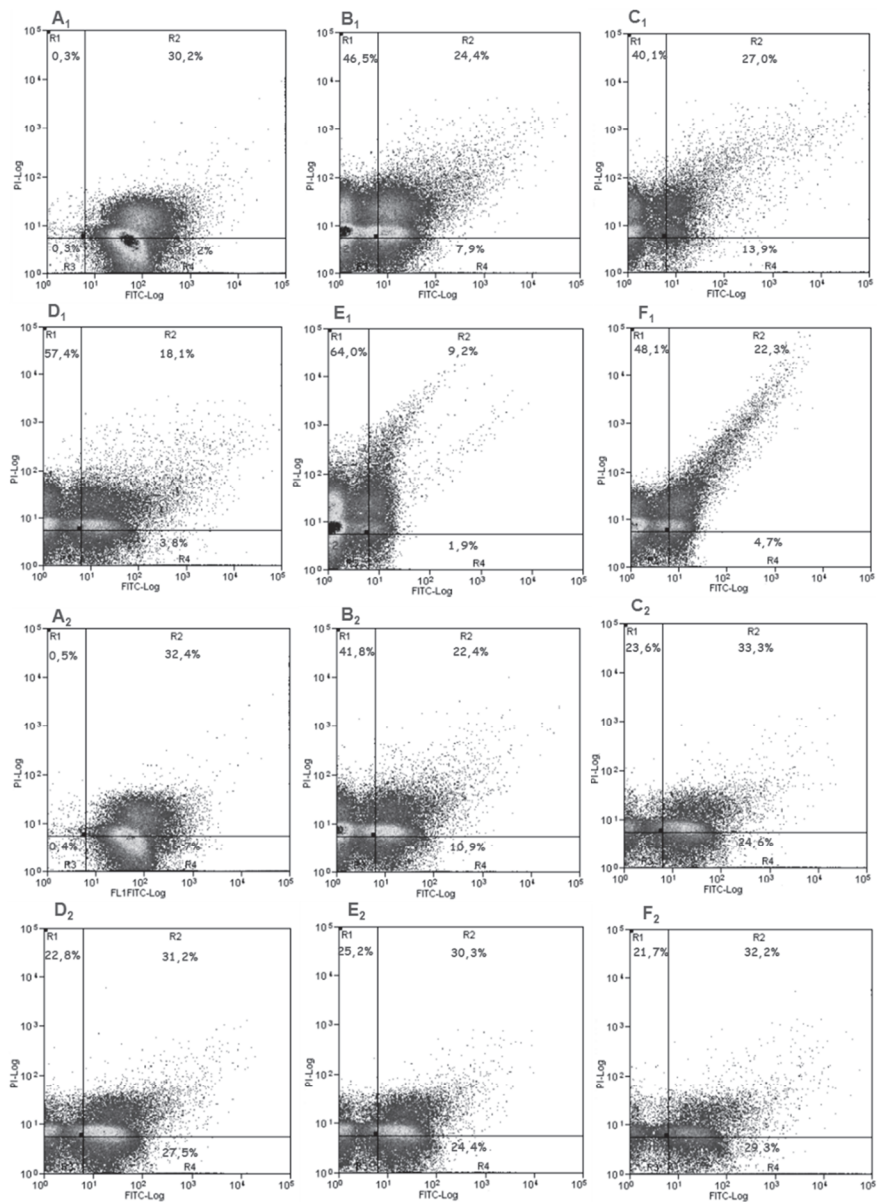
Badania stresu osmotycznego na przeżywalność szczepu *Lactobacillus rhamnosus*, wywołanego sacharozą w zakresie 0,1 ÷ 1,5 M, z użyciem metody płytkowej i technologii fluorescencyjnej podjęli także Sunny-Roberts i wsp. [17]. Autorzy wykazali, że część populacji straciła zdolność wzrostu na podłożach o znacznie zwiększonej osmolalności. W zależności od drobnoustroju, czynnikami obniżającymi tzw. hodowalność mogą być m.in. nieodpowiednia temperatura, kwasowość i osmolalność środowiska, niedobór składników pokarmowych [12]. Obniżenie tzw. hodowalności może być efektem stresów środowiskowych, więc zbadanie tego zjawiska wśród bakterii w różnych warunkach wymaga doboru odpowiedniego narzędzia analitycznego. Przydatność cytometrii przepływowej w badaniach wpływu stresów środowiskowych na przeżywalność bakterii wykazało wielu badaczy [2, 3, 4, 5, 13, 14].

Aby poznać zmiany aktywności fizjologicznej komórek szczepu *Lactobacillus brevis* wyizolowanego z żywności, próbki bez dodatku chlorku sodu i z jego dodatkiem, w zakresie od 0,5 ÷ 2,5 %, poddano analizie cytometrycznej. Do analizy cytometrycznej dobrano barwienie CFDA/PI (dioctan karboksylfluoresceiny/jodek propidyny)

w celu oznaczenia aktywności esterolitycznej i spójności błon cytoplazmatycznych komórek. Identyfikacja aktywności esterolitycznej polegała na przenikaniu prefluorochromu CFDA do wnętrza komórki, hydrolizy grupy dwuoctanowej przez esterazę i powstaniu karboksylfluoresceiny, która, gromadząc się we wnętrzu komórki, nadaje jej zieloną fluorescencję [13]. Komórki barwione PI to z kolei komórki fluoryzujące na czerwono, w wyniku przedostania się fluorochromu do wnętrza komórki i interkalacji jej DNA. Jodek propidyny o dużej masie cząsteczkowej może przedostawać się tylko przez uszkodzoną błonę cytoplazmatyczną, co pozwala uznać go za wskaźnik komórek uszkodzonych [12]. Na rys. 2. przedstawiono cytometryczne wykresy kropkowe przebadanych próbek z procentowym udziałem subpopulacji komórek, które analizowano bezpośrednio po działaniu czynnika stresowego oraz następującej po nim inkubacji z glukozą. Analiza cytometryczna pozwoliła wyodrębnić cztery subpopulacje komórek o następujących parametrach: CFDA⁻PI⁺ – komórki niewykazujące aktywności esterolitycznej z przerwana ciągłością błony cytoplazmatycznej (ramka 1), CFDA⁺PI⁺ – komórki wykazujące aktywność esterolityczną i z uszkodzeniami w błonach (ramka 2), CFDA⁻PI⁻ – komórki nieaktywne esterolitycznie lub po aktywnym wypompowaniu barwnika i z zachowaną ciągłością błon (ramka 3), CFDA⁺PI⁻ – komórki, które wykazują aktywność esterolityczną i spójność błon cytoplazmatycznych (ramka 4).

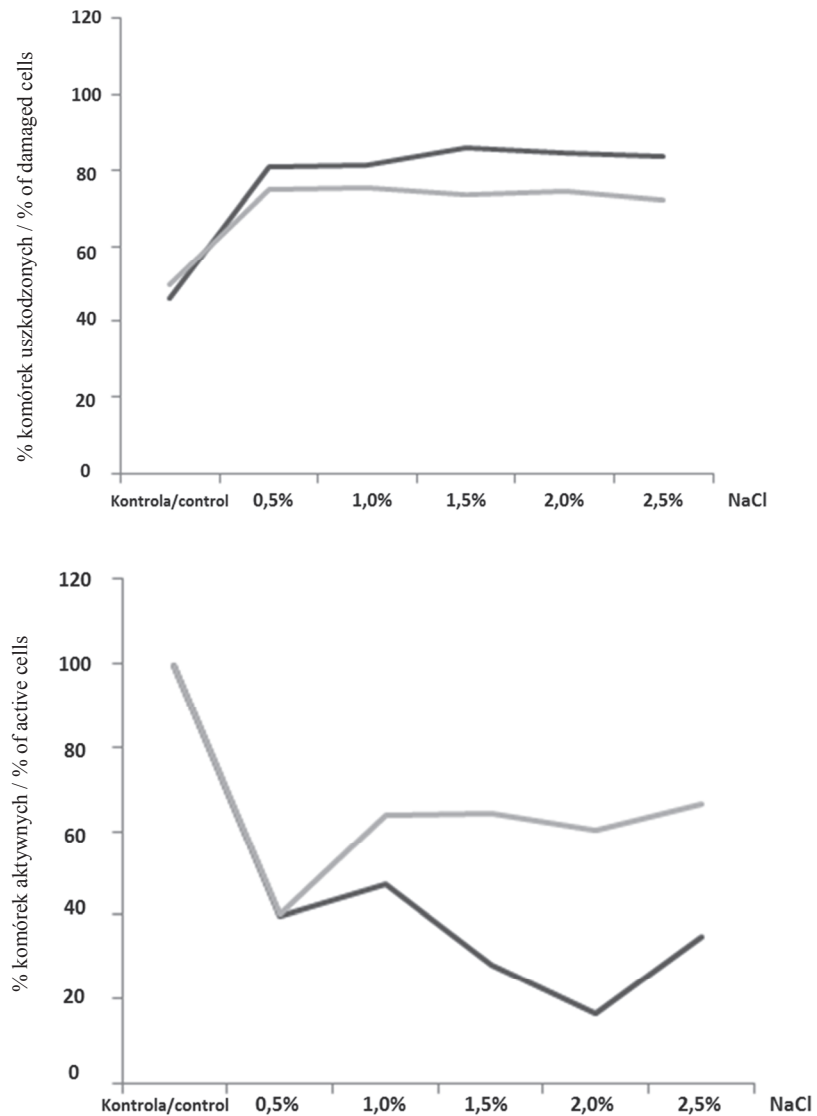
W próbkach kontrolnych, bez dodatku NaCl, wykazano przede wszystkim występowanie komórek o aktywności esterolitycznej, gdyż sumarycznie ponad 99 % populacji wystąpiła w ramce 4. oraz w ramce 2., niezależnie od etapu, po którym wykonano analizę (rys. 2 A₁₋₂). Próbkę z dodatkiem NaCl w zakresie 0,5 ÷ 2,5 % wykazywały odmienny stan fizjologiczny populacji. Znaczna część populacji (40 ÷ 60 %) to komórki po lizie błon cytoplazmatycznych z ramki 1., przy jednoczesnym zmniejszeniu udziału komórek aktywnych z ramki 4. oraz 2. i zwiększeniu udziału komórek w ramce 3. (rys. 2 B_{1-F₁}). Inkubacja z glukozą zmieniła proporcje subpopulacji w próbkach poddanych działaniu NaCl w zakresie 1,0 ÷ 2,5 %. Próbkę z dodatkiem NaCl w ilości [%]: 1,0, 1,5, 2,0 i 2,5 po inkubacji z glukozą cechowały się mniejszym udziałem komórek w ramce 1. oraz zwiększonym udziałem komórek w ramce 2. i ramce 4. (rys. 2 C_{2-F₂}) w porównaniu ze stanem przed dostarczeniem komórkom glukozy.

Wykresy przedstawiające udział komórek z uszkodzeniami (z ramki 1. i 2.) i z aktywnością esterolityczną (z ramki 2. i 4.) – rys. 3 – pozwalają stwierdzić, że udział komórek z uszkodzeniami był stosunkowo stały w próbkach z dodatkiem chlorku sodu, niezależnie od jego stężenia i etapu poddanego analizie. Świadczyć to może o nieodwracalności zjawiska lizy błon cytoplazmatycznych lub/i interkalacji DNA jodkiem propidyny wywołanym wpływem NaCl. Tendencje udziału komórek wykazujących aktywność w próbkach w zakresie 1,0 ÷ 2,5 % NaCl po inkubacji z glukozą różniły się od próbek przed inkubacją. Na tej podstawie można przypuszczać, że część populacji



Rys. 2. Cytometryczne wykresy kropkowe z próbek kontrolnych (A), próbek z dodatkiem 0,5 % NaCl (B), 1,0 % NaCl (C), 1,5 % NaCl (D), 2,0 % NaCl (E) i 2,5 % NaCl (F) po określonych etapach badawczych (bezpośrednio po działaniu stresu osmotycznego –₁ i następnie po inkubacji z glukozą –₂)

Fig. 2. Cytometris scatter-plots ref. to: (A) control samples, (B) samples with addition of 0.5 % NaCl, (C) 1.0 % NaCl, (D) 1.5 % NaCl, (E) 2.0 % NaCl, and (F) 2.5 % NaCl after specific research stages (immediately after osmotic stress action –₁ and, next, after incubation with glucose –₂)



Rys. 3. Zmiany udziału komórek uszkodzonych (górny) oraz aktywnych (dolny) po określonych etapach badawczych (bezpośrednio po działaniu stresu osmotycznego — i następnie po inkubacji z glukozą —)

Fig. 3. Changes among percent contents of damaged (up) and active (down) cells after specific research stages (immediately after osmotic stress action — and, next, after incubation with glucose —)

odzyskała aktywność esterolityczną po przywróconym dostępie do źródła węgla, stymulując aktywność metaboliczną. Liżę błon cytoplazmatycznych pałeczek w wyniku stresu osmotycznego pod wpływem trehalozy, ale nie pod wpływem sacharozy, potwierdzają Sunny-Roberts i wsp. [16, 17, 18]. Stres szczepu *Lb. rhamnosus* wywołany sacharozą nie zmienił istotnie aktywności metabolicznej komórek, w przeciwieństwie do trehalozy, której zwiększenie stężenia powodowało zmniejszenie udziału komórek aktywnych esterolitycznie na rzecz komórek z uszkodzeniami w błonach. Inne badania, spójności błony cytoplazmatycznej *Lb. rhamnosus* pod wpływem ultradźwięków wykazały, że czynnik ten nie wywołał w błonach prawie żadnych uszkodzeń [1].

Porównania te potwierdzają, że zdolność pałeczek *Lactobacillus* do znoszenia efektów stresu środowiskowego są różnicowane i gatunkowo zależne. Coraz więcej wiadomo o zachowaniu się pałeczek w środowisku hiperosmotycznym, ale wiele aspektów jest jeszcze niezbadanych i niewyjaśnionych. Złożoność zmian zachodzących na poziomie komórkowym pod wpływem różnych czynników osmotycznych stwarza potrzebę dalszego rozszerzenia badań z tego zakresu.

Wnioski

1. Na podstawie porównania wyników oznaczeń fluorescencyjnych z wynikami metody płytkowej stwierdzono, że część populacji *Lactobacillus brevis* straciła tzw. hodowalność w środowisku o największym stężeniu chlorku sodu, tj. 2,5 %. Jednocześnie wykazano znaczną tolerancję *Lb. brevis* na działanie chlorku sodu w zakresie poniżej tego stężenia.
2. Metodą cytometrii wielobarwnej wykazano wzrost udziału komórek *Lb. brevis* z uszkodzeniami w błonach cytoplazmatycznych i zmniejszenie udziału komórek aktywnych esterolitycznie pod wpływem stresu osmotycznego. Zaobserwowano, że część populacji komórek *Lb. brevis* odzyskiwała aktywność esterolityczną w obecności glukozy, po ustąpieniu stresu osmotycznego. Wiedza z tego zakresu przyczynić się może do wyboru odpowiednich szczepów w konkretnych procesach biotechnologicznych.
3. Stres osmotyczny wywołany chlorkiem sodu uruchamia mechanizmy odpowiedzi pałeczek, które determinują ich funkcjonowanie, uwarunkowane zmianami w aktywności metabolicznej i spójności błon cytoplazmatycznych.

Pracę zaprezentowano podczas V Sympozjum Naukowego nt. „Probiotyki w żywności” Kiry k. Zakopanego, 23 - 25.04.2014 r.

Literatura

- [1] Ananta E., Voigt D., Zenker M., Heinz V., Knorr D.: Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **99**, 271-278.
- [2] Ben Amor K., Breeuwer P., Verbaarschot P., Rombouts F.M., Akkermans A.D.L., De Vos W.M., Abee T.: Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead Bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 5209-5216.
- [3] Bunthof C., Abee T.: Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 2934-2942.
- [4] Bunthof C., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F., Abee T.: Flow cytometric assessment of viability of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 2326-2335.
- [5] Bunthof C., Braak S., Breeuwer P., Rombouts F., Abee T.: Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 3681-3689.
- [6] De Angelis M., Gobetti M.: Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 2004, **4**, 106-22.
- [7] Glaasker E., Heuberger E.H., Konings W.N., Poolman B.: Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 1998, **180**, 5540-5546.
- [8] Glaasker E., Konings W.N., Poolman B.: Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 575-582.
- [9] Kim W.S., Perl L., Park J.H., Tandianus J.E., Dunn N.W.: Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Curr. Microbiol.*, 2001, **43**, 346-350.
- [10] Lemay M.J., Rodrigue N., Gariépy C., Saucier L.: Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **55**, 249-253.
- [11] Oliver J.D.: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, 2005, **43**, 93-100.
- [12] Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Metody fluorescencyjnego barwienia komórek w badaniach stanu fizjologicznego bakterii. *Post. Mikrobiol.*, 2013, **52**, 409-418.
- [13] Papadimitriou K., Pratsinis H., Nebe-Von-Caron G., Kletsas D., Tsakalidou E.: Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **111**, 197-205.
- [14] Rault A., Beal C., Ghorbal S., Ogier J.-C., Bouix M.: Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, 2007, **55**, 35-43.
- [15] Sadowska J., Grajek W.: Odpowiedź komórkowa bakterii kwasu mlekowego na stresy środowiskowe. *Biotechnologia*, 2009, **87**, 115-132.
- [16] Sunny-Roberts E.O., Ananta E., Knorr D.: Flow cytometry assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) response to non-electrolytes stress. *Nut. Food Sci.*, 2007, **37**, 184-200.
- [17] Sunny-Roberts E.O., Knorr D.: Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.*, 2008, **25**, 183-189.
- [18] Sunny-Roberts E.O., Knorr D.: Physiological analysis of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800: Adaptive response to osmotic stress induced by trehalose. *B. Food J.*, 2007, **109**, 735-748.

RESPONSE OF *LACTOBACILLUS BREVIS* CELLS TO OSMOTIC STRESS RESEARCHED BY FLOW CYTOMETRY

Summary

Lactic acid rod-shaped bacteria stand the effects of osmotic stress in natural living environments as well as in food production process. The complexity of changes occurring in cells as a result of osmotic stress creates the need for extending the knowledge of its effect on the physiological condition of rod-

shaped *Lactobacillus* bacteria. The objective of the study was to determine the effect of sodium chloride ranging from 0.5 to 2.5 % on the physiology of cells of *Lactobacillus brevis* strain isolated from food. A flow cytometry was applied and a fluorescent staining CFDA / PI (carboxyfluorescein diacetate / propidium iodide) was chosen to determine the metabolic activity and integrity of cytoplasmic membranes of cells. Based on the cytometric analysis, four groups were identified of cells with particular parameters: 1: CFDA⁻PI⁺; 2: CFDA⁺PI⁺; 3: CFDA⁻PI⁻; and 4: CFDA⁺PI⁻, and their percent content depended on the sodium chloride added to the samples analyzed. In the samples studied, it was found that the content of cells in group 1 increased and in group 4 decreased; this was evidence of the increase in the percent content of cells with damages in cytoplasmic membranes and of the decrease in the percent content of active cells. Based on the plate count results, it was proved that part of the *L. brevis* population lost culturability in the environment with the highest concentration of sodium chloride: 2.5 %. Furthermore, it was found that the *L. brevis* strain showed a considerable tolerance to the action of sodium chloride within the range studied and the knowledge in this area might be useful to research the suitability of *Lactobacillus* strains for industrial processes using screening methods.

Key words: *Lactobacillus brevis*, osmotic stress, flow cytometry, tolerance to NaCl action ☒

MAŁGORZATA JAŁOSIŃSKA

**PRZEŻYwalNOŚĆ SZCZEPU *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ATCC 25923 W PROBIOTYCZNYM I SYNBIOTYCZNYM
BANANOWO-MLECZNYM NAPOJU FERMENTOWANYM
PODCZAS PRZECHOWYWANIA**

Streszczenie

Celem pracy było określenie przeżywalności szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 w bananowo-mlecznym napoju fermentowanym z udziałem szczepu probiotycznego *Lactobacillus casei* Łock 0900, podczas przechowywania w temp. 15 °C. Zbadano także wpływ dodatku prebiotyku (oligofruktozy) w ilości 3 i 5 % na przeżywalność patogenu. Próbą kontrolną był napój niefermentowany (bez dodatku probiotyku i prebiotyku). Dodatkowo określono przeżywalność szczepu *S. aureus* w produkcie niezawierającym probiotyku, ale o takim pH, jaki miał napój probiotyczny po fermentacji.

Stwierdzono, że warunki panujące w produkcie fermentowanym z udziałem probiotyku były letalne dla szczepu *S. aureus*. W ciągu 6 dni analizy nastąpiła bowiem redukcja liczby żywych komórek patogenu o 2 rzędy logarytmiczne. Nie stwierdzono natomiast, aby dodatek oligofruktozy miał wpływ na redukcję żywych komórek patogenu. W produkcie niefermentowanym nastąpił wzrost liczby komórek *S. aureus* o 6 rzędów logarytmicznych w ciągu 21 dni. Zaobserwowano znaczne obniżenie pH produktu z poziomu 5,02 (przed fermentacją) do 3,90 (ostatniego dnia badania), niezależnie od stężenia oligofruktozy. Wyniki badania kontrolnego wskazują na prawdopodobny brak wpływu innych metabolitów niż kwas mlekowy na zamieranie szczepu *S. aureus*.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, probiotyki, oligofruktoza, mleczny napój fermentowany

Wprowadzenie

Zainteresowanie mikroorganizmami probiotycznymi związane jest z ich właściwościami prozdrowotnymi. Drobnoustroje te, poprzez swoją aktywność metaboliczną, w sposób pośredni lub bezpośredni korzystnie oddziałują na organizm człowieka.

Wciąż prowadzone są badania na ten temat, jak również izolowane są nowe szczepy, które spełniają kryteria stawiane szczepom probiotycznym [1].

Zastosowanie odpowiednich szczepów bakterii mlekowych (LAB) przyczynia się do wyeliminowania lub zahamowania rozwoju drobnoustrojów patogennych, toksynotwórczych oraz powodujących psucie się żywności. Potencjał antybakteryjny bakterii mlekowych związany jest z produkcją przez nie kwasu mlekowego oraz innych metabolitów, takich jak bakteriocyny lub nadtlenek wodoru. Stwarzają one warunki środowiska niekorzystne dla rozwoju innej mikroflory bakteryjnej, w tym chorobotwórczej. Konkurencyjność probiotyków można zwiększyć przez dodatek do produktów prebiotyków, czyli związków stymulujących wzrost i metabolizm bakterii probiotycznych [4, 6].

Badanie wpływu probiotyków na patogeny w żywności nie jest łatwe. Produkty spożywcze stanowią złożone środowiska, zróżnicowane pod względem składu surowcowego, składu mikroflory oraz warunków przechowywania. Badania genetyczne i biochemiczne dowodzą, że zarówno zdolność do produkcji określonych substancji przeciwbakteryjnych, jak i wrażliwość na nie, są uwarunkowane nie tylko gatunkowo, ale również szczepowo, a ekspresja genów odpowiedzialnych za daną cechę zależy w dużym stopniu od środowiska bytowania danego mikroorganizmu. Istnieje więc potrzeba poszerzania wiedzy na temat charakterystyki poszczególnych szczepów oraz występujących między nimi interakcji w różnych produktach spożywczych [8, 11].

Celem pracy było określenie przeżywalności szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 w bananowo-mlecznym napoju fermentowanym z udziałem szczepu probiotycznego *Lactobacillus casei* Łock 0900, przechowywanym w temp. 15 °C. Ponadto zbadano wpływ dodatku prebiotyku (oligofruktozy) w ilości 3 i 5 % na przeżywalność tego patogenu.

Material i metody badań

Materiałem do badań były napoje bananowo-mleczne fermentowane szczepem probiotycznym *Lactobacillus casei* Łock 0900, bez dodatku oligofruktozy oraz z jej udziałem w ilości 3 i 5 %. Szczep probiotyczny pochodził z kolekcji muzealnej Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Próbką kontrolną były dwa napoje niefermentowane, w tym jeden z nich zawierał kwas mlekowy (Sigma-Aldrich, Germany). Posłużył on do obniżenia pH tego napoju do wartości, jaką miały napoje fermentowane po zakończeniu fermentacji. Wszystkie badane produkty były zanieczyszczone szczepem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Szczep pochodził z kolekcji muzealnej Zakładu Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW w Warszawie.

Napoje bananowo-mleczne sporządzano z mleka UHT o 2-procentowej zawartości tłuszczu i z pasteryzowanego nektaru bananowego. Zarówno mleko, jak i nektar

pochodziły z handlu detalicznego. Mieszano je w warunkach jałowych w stosunku 2 : 3 i do części z nich dodawano oligofruktozę (Raftilose P95, ORAFTI, Belgia) w ilości 3 i 5 %. Mleko oraz nektar nie były poddawane dodatkowej obróbce, natomiast oligofruktoza po rozpuszczeniu w mleku została poddana sterylizacji metodą mikrofiltracji, z wykorzystaniem pompy próżniowej i membran z octanu celulozy (firmy Corning), o średnicy 70 mm i średnicy porów 0,22 μm . Wszystkie próbki zaszczepiano 24-godzinną hodowlą szczepu probiotycznego *L. casei* Łock 0900 o gęstości zawiesiny 10^9 jtk/ml. Szczep był uprzednio ożywiany w bulionie MRS (MerckKGaA, Germany), a gęstość zawiesiny sprawdzano, posiewając hodowlę na agarze MRS (MerckKGaA, Germany). Przygotowane napoje poddawano 12-godzinnej fermentacji w temp. 37 °C. Po zakończeniu fermentacji próbki bez dodatku oligofruktozy, z 3-procentowym dodatkiem oligofruktozy, z 5-procentowym dodatkiem oligofruktozy oraz próbki kontrolne niefermentowane, w tym jedna z dodatkiem kwasu mlekowego, zaszczepiano hodowlą szczepu *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 (zawiesina o gęstości 10^5 jtk/ml). Zawiesinę wyjściową przygotowywano, wykonując naprzemienny pasaż na bulionie i agarze odżywczym (MerckKGaA, Germany), a jej gęstość sprawdzano, posiewając hodowlę na podłożu Baird-Parker (MerckKGaA, Germany). W tak przygotowanych próbkach oznaczano liczbę komórek *S. aureus*, liczbę *Lb. casei* Łock 0900 oraz mierzono pH. Następnie próbki przechowywano w temp. 15 °C. Produkty fermentowane i produkt niefermentowany z dodatkiem kwasu mlekowego przechowywano do uzyskania jak najmniejszej liczby komórek, możliwej do oznaczenia metodą płytkową – do 6 dni, produkt niefermentowany bez dodatku probiotyku i prebiotyku przechowywano do uzyskania fazy zamierania populacji – do 21 dni. Co 24 h oznaczano liczbę komórek gronkowca i mierzono pH, a w ostatnim dniu przechowywania dodatkowo określano liczbę komórek szczepu probiotycznego. Wykonano trzy serie badawcze, po 10 próbek w każdej serii.

Liczbę komórek szczepu *S. aureus* oznaczano metodą płytkową powierzchniową, z zastosowaniem podłoża selektywnego Baird-Parker (MerckKGaA, Germany). Inkubację prowadzono w temp. 37 °C przez 48 h. Liczbę komórek szczepu probiotycznego (*Lb. casei* Łock 0900) oznaczano metodą płytkową wgłębną, na podłożu MRS (MerckKGaA, Germany). Stosowano identyczne warunki inkubacji: temp. 37 °C, 48 h. Wyniki oznaczeń podawano jako log liczby jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1 ml danego produktu.

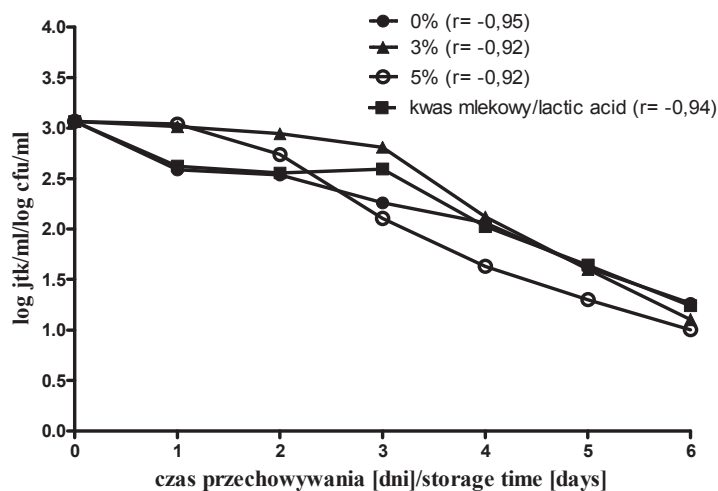
Pomiar pH produktów podczas trwania doświadczenia przeprowadzano metodą potencjometryczną przy użyciu aparatu Lab 860, firmy Schott Instruments (Germany), po jego wcześniejszej kalibracji. Wynik odczytywano z dokładnością do 0,01 jednostki pH.

Opracowanie statystyczne wyników przeprowadzono w programach Statistica 10 (StatSoft, Polska) i Graph Pad 6.0. Zastosowano analizę korelacji i regresji oraz jednoczynnikową analizę wariancji z testem Tukeya ($p < 0,05$).

Wyniki i dyskusja

We wszystkich produktach fermentowanych z udziałem szczepu probiotycznego *L. casei* Łock 0900 liczba komórek szczepu *S. aureus* została zredukowana w ciągu 6 dni o ok. 2 rzędy logarytmiczne (rys. 1).

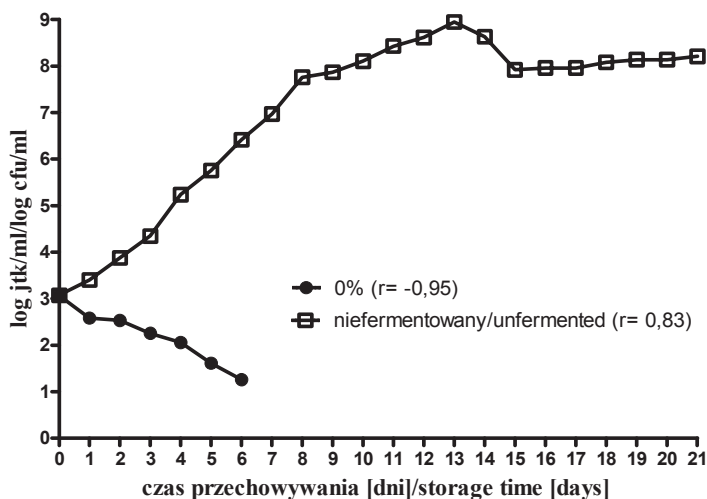
Wykazano silną zależność pomiędzy czasem przechowywania produktów a przeżywalnością szczepu gronkowca. Współczynniki korelacji kształtowały się w zakresie od $r = -0,92$ do $r = -0,95$ ($p < 0,05$) – rys. 1. Zależności te zostały potwierdzone wynikami regresji liniowej. Równocześnie wykazano brak statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) pomiędzy wartościami uwzględnionymi na poszczególnych krzywych przeżywalności. Przeżywalność badanego szczepu gronkowca była zbliżona we wszystkich rodzajach napojów: probiotycznym i synbiotycznym, niezależnie od stężenia prebiotyku.



Rys. 1. Krzywe przeżywalności szczepu *Staphylococcus aureus* w produkcie niefermentowanym z kwasem mlekowym oraz w produktach fermentowanych, różniących się dodatkiem oligofruktozy (0, 3 i 5 %), podczas przechowywania w temp. 15 °C – z zaznaczonymi współczynnikami korelacji (r)

Fig. 1. Survival curves of *Staphylococcus aureus* strain in unfermented product with lactic acid and in fermented products with varying amounts of oligofructose added (0, 3, 5 %) during storage at temp. of 15 °C – with marked correlation coefficients (r)

W próbie kontrolnej niefermentowanej liczba żywych komórek *S. aureus* zwiększała się systematycznie do 13. doby. W porównaniu z początkowym poziomem (3,07 log jtk/ml) liczba komórek gronkowca zwiększyła się o prawie 6 rzędów logarytmicznych, osiągając wartość 8,95 log jtk/ml. Od 13. doby przechowywania liczba komórek badanego szczepu obniżała się nieznacznie, aby 15. dnia osiągnąć wartość 7,92 log jtk/ml. Do ostatniego dnia przechowywania liczba żywych komórek gronkowca utrzymywała się na poziomie ok. 8 log jtk/ml. Potwierdzono silny, wprost proporcjonalny, związek pomiędzy czasem badania a liczbą komórek gronkowca ($p < 0,05$) – rys. 2. Dla porównania, na rys. 2. przedstawiono ponownie krzywą przeżywalności badanego szczepu w produkcie probiotycznym.



Rys. 2. Krzywe przeżywalności szczepu *Staphylococcus aureus* w produkcie niefermentowanym oraz w fermentowanym bez dodatku oligofruktozy (0 %), podczas przechowywania w temp. 15 °C – z zaznaczonymi współczynnikami korelacji (r)

Fig. 2. Survival curves of *Staphylococcus aureus* strain in unfermented product and in fermented product without oligofructose added (0 %) during storage at temp. of 15 °C – with marked correlation coefficients (r)

Szczep *S. aureus* intensywnie namnażał się w produkcie charakteryzującym się tym samym składem surowcowym, ale bez dodatku probiotyku, czyli niefermentowanym (rys. 2). Jak można sądzić, bezpośrednią przyczyną zamierania patogenu w produkcie fermentowanym było oddziaływanie szczepu probiotycznego *L. casei* Łock 0900. Może być kilka przyczyn tego zjawiska. Bakterie LAB zapewniają ochronę przed wzrostem gronkowca złocistego poprzez aktywność antagonistyczną ich metabo-

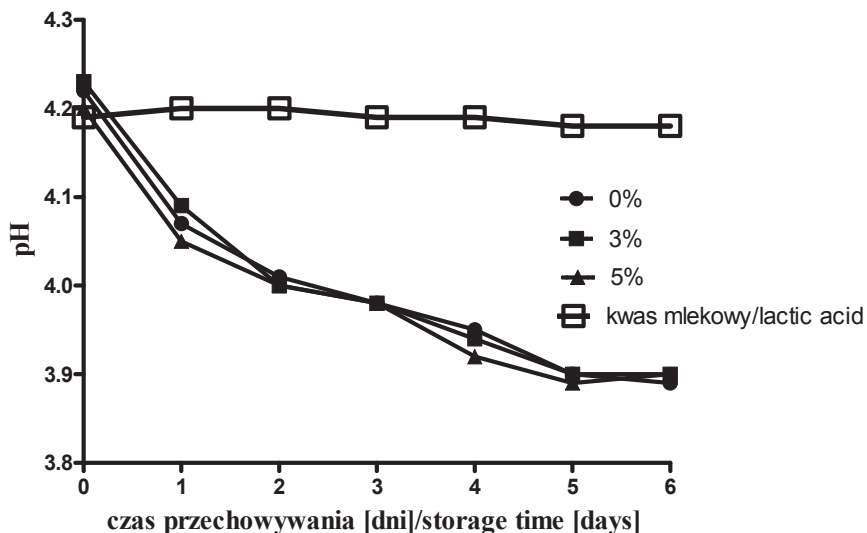
litów, konkurowanie o składniki odżywcze oraz powodowanie zmian środowiska niekorzystnych dla tego patogenu. Jednak jako podstawowy czynnik hamowania mikroflory patogennej przez bakterie LAB podaje się obniżanie pH produktu, wskutek produkcji kwasów organicznych [10, 12].

Zamieranie szczepu *S. aureus* bezpośrednio w żywności, spowodowane obecnością bakterii fermentacji mlekowej, wykazali m.in. Anas i wsp. [5]. Autorzy stwierdzili, że szczep należący do gatunku *L. plantarum* wykazał zdolność do ograniczania wzrostu *S. aureus* w odtłuszczonym mleku i spowodował redukcję liczby komórek *S. aureus* o ok. 2 rzędy logarytmiczne w ciągu 24 h, natomiast brak patogenu stwierdzono już w 3. dniu badania. W innych badaniach, dotyczących wpływu LAB na różne patogeny w żywności, potwierdzono ich antybakteryjne właściwości. Wykazano je wobec takich patogenów, jak: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio* spp., *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Cl. perfringens*. Wyniki uzyskane przez różnych badaczy trudno jest ze sobą porównać, gdyż nie istnieje żaden standard przeprowadzania tego typu badań. W niektórych doświadczeniach stwierdzono tylko zahamowanie wzrostu patogenów, zaś w innych bakterie LAB oddziaływały bakteriobójczo lub też nie stwierdzono jakichkolwiek interakcji [2, 14].

Podczas przechowywania fermentowanych produktów co 24 h mierzono ich kwasowość czynną. Dowiedziono, że w każdym z trzech składowanych napojów fermentowanych pH ulegało systematycznemu obniżaniu (rys. 3). Wykazano silną zależność pomiędzy czasem przechowywania a wartościami pH ($r = -0,92$ do $r = -0,94$). Równocześnie stwierdzono brak statystycznie istotnych ($p < 0,05$) różnic pomiędzy średnimi wartościami pH, co świadczy o braku wpływu stężenia prebiotyku na zmianę wartości tego wskaźnika.

W niniejszej pracy określono również liczbę komórek szczepu probiotycznego bezpośrednio po fermentacji produktów oraz w ostatnim dniu badania. Stwierdzono nieznaczne zmniejszenie liczby komórek *L. casei* Łock 0900 we wszystkich produktach, niezależnie od stężenia oligofruktozy, ale jedynie o niecałe pół rzędu logarytmicznego (z 8,95 log jtk/ml do 8,63 log jtk/ml). Uzyskane wyniki świadczą o dobrej przeżywalności szczepu probiotycznego w badanym produkcie, niezależnie od stężenia prebiotyku i prowadzenia procesu fermentacji do końca trwania doświadczenia, co potwierdzają wyniki kwasowości czynnej (rys. 3).

W przedstawionych badaniach nie stwierdzono wpływu dodatku oligofruktozy na przeżywalność szczepu *S. aureus* w produkcie fermentowanym. Analiza wyników zmiany pH produktów oraz wyników dotyczących liczby bakterii szczepu probiotycznego pozwala stwierdzić, że oligofruktoza nie wpłynęła na intensyfikację fermentacji oraz wzrostu liczby komórek probiotyku w produktach. Wiele badań potwierdza korzystne działanie prebiotyków na wzrost i aktywność przeciwbakteryjną LAB, jednak



Rys. 3. Krzywe zmian pH produktu niefermentowanego z dodatkiem kwasu mlekowego oraz produktów fermentowanych różniących się dodatkiem oligofruktozy (0, 3 i 5 %), podczas przechowywania w temp. 15°C

Fig. 3. Curves of changes in pH of unfermented product with lactic acid added and in fermented products with varying amounts of oligofructose added (0 %, 3 %, 5 %) during storage at temp. of 15°C

często jest to zależne od szczepu probiotycznego czy stężenia prebiotyku. Zastosowanie prebiotyku (FOS) w celu zahamowania wzrostu patogenów badali m.in. Lim i wsp. [13]. Autorzy wykazali że dodatek prebiotyku wzmacnia działanie szczepów *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus paracasei* przeciwko szczepom *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*. Jednak w większości przypadków zwiększenie dodatku oligofruktozy z 1 do 2 % nie powodowało dalszej intensyfikacji tego zjawiska. Autorzy nie stwierdzili także znaczących różnic pod względem wzrostu biomasy tych szczepów podczas inkubacji w bulionie MRS o różnym stężeniu prebiotyku (0, 1 i 2 %). Dodatni wpływ fruktooligosacharydów na produkcję biomasy oraz kwasu mlekowego nie jest oczywiste, na co wskazują Munoz i wsp. [15]. Autorzy ci zaobserwowali, że wzrost poziomu prebiotyku oddziaływał niejednakowo na różne szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus*. W niektórych przypadkach stwierdzono wzrost liczby żywych komórek bakterii przy zwiększaniu stężenia FOS, zaś w innych wykazano odwrotną zależność. Podobne wyniki uzyskali w stosunku do ilości wytwarzanego kwasu mlekowego. Ponadto niektóre szczepy namnażały się intensywniej w produkcie zawierającym 2 % oligofruktozy niż w produkcie z 5-procentową zawartością FOS. Powyższe wyniki świadczą więc o tym, że istnieje możliwość zwiększenia działania antagonistycznego LAB poprzez dodatek prebiotyku. Nie bez znaczenia jest jednak

rodzaj użytego prebiotyku oraz zastosowana matryca, a różne wykorzystanie prebiotyku można tłumaczyć uwarunkowaniami szczepowymi. W niniejszych badaniach stymulujący wpływ oligofruktozy na liczbę LAB mógłby być bardziej widoczny, gdyby podłoże było mniej zasobne w węglowodany. Można przypuszczać, że szczep *L. casei* Łock 0900 fermentował zawartą w produkcie laktozę, sacharozę oraz inne cukry proste wchodzące w skład zarówno mleka, jak i nektaru bananowego użytych do przygotowania napoju fermentowanego. Przy tak bogatym w węglowodany podłożu, dodatek oligofruktozy nie wpłynął już znacząco na fermentację, obniżenie pH i wzrost biomasy szczepu probiotycznego.

Przeżywalność szczepu *S. aureus* ATCC 25923 została zbadana także w napoju bananowo-mlecznym niefermentowanym, do którego dodano roztwór kwasu mlekowego. Celem tego badania było sprawdzenie, czy czynnikiem hamującym wzrost był tylko kwas mlekowy produkowany przez szczep probiotyczny (bakterie należące do gatunku *Lactobacillus casei* są homofermentatywne, co oznacza, że podczas fermentacji wytwarzają głównie kwas mlekowy), czy też inne metabolity uwalniane przez ten szczep do produktu. W tym celu do napoju niefermentowanego dodany został kwas mlekowy w takiej ilości, aby jego pH miało taką samą wartość jak pH produktu probiotycznego po fermentacji. Przez cały okres trwania doświadczenia kwasowość czynna utrzymywała się na zbliżonym poziomie – pH = 4,2 (rys. 3).

Liczba komórek szczepu *S. aureus* w napoju niefermentowanym z dodatkiem kwasu mlekowego została zredukowana o ok. 2 rzędy logarytmiczne (z 3,06 log jtk/ml do 1,24 log jtk/ml) (rys. 1). Wykazano silną zależność pomiędzy liczbą komórek badanego szczepu gronkowca a czasem przechowywania. Wyniki przeżywalności badanego patogenu w produkcie z dodatkiem kwasu mlekowego oraz probiotycznym poddano analizie wariancji. Wykazano brak statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) pomiędzy średnimi wartościami przeżywalności bakterii w obu produktach.

Podobne wyniki uzyskali inni autorzy. Alomar i wsp. [3] stwierdzili, że bakterie LAB ograniczały wzrost *S. aureus* w mleku tylko w wyniku wytworzonych kwasów organicznych. Charlier i wsp. [7] również potwierdzili, że zakwaszenie mleka kwasem mlekowym do pH 4,4 - 4,5 całkowicie hamuje wzrost, a wartości pH poniżej 4,0 są letalne dla szczepów należących do gatunku *S. aureus*. Można więc stwierdzić, że główną przyczyną redukcji liczby żywych komórek szczepu *S. aureus* było znaczne obniżenie pH produktu.

Przeciwbakteryjny wpływ związków innych niż kwas mlekowy stwierdzono natomiast w badaniach innych autorów. Guessas i wsp. [9] zaobserwowali, że 96 szczepów LAB, wyizolowanych z 12 próbek koziego i owczego surowego mleka, wykazywało właściwości antagonistyczne w stosunku do szczepu *S. aureus* podczas wspólnej inkubacji w sterylizowanym mleku. W większości było to spowodowane obniżeniem pH produktu, jednak w przypadku dwóch szczepów alkalizowany supernatant uzyska-

ny przez odwirowanie kultury bakteryjnej wykazywał właściwości hamujące wzrost *S. aureus*, co sugeruje wpływ innych substancji aniżeli kwasy organiczne. Sip i wsp. [16] wykazali wpływ innych związków o aktywności przeciw bakteriom z rodzaju *Listeria*, ale tylko w przypadku 2,5 % przebadanych szczepów. Na podstawie analizy genomu dowiedziono, że szczepy te posiadały geny odpowiedzialne za produkcję bakteriocyn. Białka te są bakteriobójcze tylko wobec niektórych rodzajów i gatunków bakterii. Bardzo często charakteryzują się one wąskim spektrum oddziaływania [12]. W niniejszych badaniach przeżywalność szczepu *S. aureus* nie różniła się w produkcie probiotycznym i z dodatkiem kwasu mlekowego, co może wskazywać na brak bakteriocynogenności zastosowanego szczepu probiotycznego. Wymaga to jednak potwierdzenia odpowiednimi badaniami genetycznymi.

Wnioski

1. Liczba komórek szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 w probiotycznym i synbiotycznych produktach fermentowanych została zredukowana w ciągu 6 dni o dwa rzędy logarytmiczne, niezależnie od dodatku prebiotyku.
2. Liczba komórek szczepu *L. casei* Łock 0900 podczas 21 dni przechowywania produktów fermentowanych uległa nieznacznej redukcji w każdym z nich, o niecałe 0,5 rzędu logarytmicznego, niezależnie od dodatku prebiotyku.
3. Wartość pH wszystkich produktów fermentowanych, zarówno bez dodatku oligofruktozy, jak i z jej udziałem, uległa obniżeniu z ok. 4,20 do ok. 3,90, natomiast pH napoju niefermentowanego, do którego dodany został kwas mlekowy, nie zmieniało się podczas przechowywania i wynosiło średnio 4,19.
4. Szczep probiotyczny *L. casei* Łock 0900 podczas przechowywania stworzył warunki letalne dla szczepu *S. aureus* ATCC 25923, w porównaniu z warunkami panującymi w produkcie niefermentowanym. Redukcja liczby komórek patogenu nie była prawdopodobnie spowodowana obecnością innych metabolitów niż kwas mlekowy.

Literatura

- [1] Adam J.K., Odhav B., Naidu K.S.B.: Probiotics: recent understandings and biomedical applications. *Curr. Trends Biotechnol. Pharmacy*, 2012, **1** (6), 1-14.
- [2] Adams M.R., Nicolaides L.: Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 1997, **5/6** (8), 227-239.
- [3] Alomar J., Loubiere P., Delbes C., Nouaille S., Montel M.C.: Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiol.*, 2008, **5** (25), 502-508.
- [4] Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I.: Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility – screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 2006, **4** (17), 454-461.
- [5] Anas M., Eddine H.J., Kihal M.: Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw Goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy Food Sci.*, 2009, **2** (3), 39-49.

- [6] Champagne C.P.: Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Foods. In: Prebiotics and Probiotics. Science and Technology. Eds. D. Charalampopoulos, R.A. Rastal. Springer Science+Business Media LLC, New York 2009, pp. 591-637.
- [7] Charlier C., Cretenet M., Even S., Le Loir Y.: Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. Int. J. Food Microbiol., 2009, **11 (131)**, 30-39.
- [8] Del Piano M., Morelli L., Strozzi G.P., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garello E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso L.: Probiotics: from research to consumer. Digest. Liver Dis., 2006, **4 (38)**, 248-255.
- [9] Guessas B., Hadadji M., Saidi N., Kihal M.: Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by lactic acid bacteria in milk. African Crop Science Conference Proceedings, 2007, **8**, 1159-1163.
- [10] Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A.: Modern Food Microbiology. Springer Science+Business Media LLC, New York 2005.
- [11] Kneifel W., Mettina-Sandholm T., Wright A.: Probiotic Bacteria. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Ed. R.K. Robinson. Academic Press, London 2000, pp. 1783-1789.
- [12] Leroy F., Vuyst L.: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci. Technol., 2004, **15**, 67-78.
- [13] Lim S., Jeong K., Lee N., Park S., Ahn D.: Synergy effects by combination with lactic acid bacteria and fructooligosaccharides on the cell growth and antimicrobial activity. Food Sci. Biotechnol., 2011, **5 (20)**, 1389-1397.
- [14] Mensah P.: Fermentation-the key to food safety assurance in Africa. Food Control, 1997, **5/6 (8)**, 271-278.
- [15] Munoz M., Mosquera A., Almeciga-Diaz C.J., Melendez A.P., Sanchez O.F.: Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. Anaerobe, 2012, **18**, 321-330.
- [16] Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W.: Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. Food Control, 2012, **26**, 117-124.

SURVIVAL OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 STRAIN IN PROBIOTIC AND SYNBIOTIC FERMENTED BANANA-MILK DRINK DURING STORAGE

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the survival of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain in banana-milk drink fermented using *Lactobacillus casei* Lock 0900 strain, during its storage at a temperature of 15 °C. Moreover, the effect was investigated of the addition of prebiotic (oligofructose), its concentration rate being 3 and 5 %, on the survival of the pathogen. An unfermented drink (neither probiotic nor prebiotic were added) was a control sample. Furthermore, the survival of *S. aureus* strain was determined in a product that contained no probiotic, but its pH value was similar to that of the probiotic drink after fermentation.

It was found that the conditions in the fermented probiotic product were lethal for the *S. aureus* strain. During a 6 day period of analysis, the amount of living cells of the pathogen was reduced by 2 logarithmic orders. On the other hand, it was reported that the addition of oligofructose had no effect on the reduction in the living cells of that pathogen. In the unfermented product, during a 21-day period, the amount of *S. aureus* cells increased by 6 logarithmic orders. Regardless of the oligofructose concentration, a significant decrease was reported in the pH value of the product: from 5.02 (prior to fermentation) to 3.9 (on the last day of the analysis). The results of the control analysis show that the metabolites other than lactic acid have no impact on the dying of *S. aureus* strain.

Key words: *Staphylococcus aureus*, probiotics, oligofructose, fermented milk drink ☒

ANNA GRYGIER, MAŁGORZATA MAJCHER, KAMILA MYSZKA

ANALYSIS OF THE ABILITY TO FORM 2-PHENYLETHYL ALCOHOL BY *GALACTOMYCES GEOTRICHUM* MK017

Streszczenie

The aim of the study was to evaluate the ability of *Galactomyces geotrichum* MK017 for the biosynthesis of 2-phenylethyl alcohol and optimization of the culture medium composition in order to increase the yield of the product. The culture of *Galactomyces geotrichum* MK017 strain was carried out in the laboratory scale. For isolation of volatiles Solid Phase Microextraction (SPME) has been used. The identification and quantification of aroma compounds produced by examined microflora was determined by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) system. The results showed that the tested mould *Galactomyces geotrichum* MK017 shows the potential for the production of 2-phenylethyl alcohol, but also for the synthesis of phenylacetaldehyde, phenylacetic and phenyllactic acids. For the optimization of the 2-phenylethyl alcohol production yield four different medium composition have been tested. The bioprocess of aroma compound production by tested microorganism was the most efficient on the medium composed of sucrose (80 g/l) and L-phenylalanine (21 g/l) and pH value of 5.0. Using this composition in a batch culture of 770 ml volume the highest concentration of 2-phenylethyl alcohol has been obtained – 6 mg/l. At the same time amount of phenylacetaldehyde, phenylacetic acid and phenyllactic acid has reached 2.2 mg/l, 10.66 mg/l and 32.3 mg/l respectively.

Słowa kluczowe: *Galactomyces geotrichum*, 2-phenylethyl alcohol, GC/MS, SPME

Introduction

In recent years there has been an increase worldwide demand for aroma compounds. Their presence and diversity enhance the sensory attractiveness of a product, while simultaneously raising its price. For this reason natural aromas obtained from plant tissue extracts are frequently replaced with cheaper aroma compounds produced

Mgr inż. A. Grygier, dr inż. M. Majcher, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, dr inż. K. Myszka, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań.
Kontakt: agrygier@up.poznan.pl

by chemical synthesis. At the same time, the manufacturing process of flavors using chemical methods leads to the formation of many noxious waste products [3].

At present public attention has been increasingly focused on the composition of purchased products and consumer awareness of harmfulness of certain components has been growing. For this reason possibly the most natural products, sold at affordable prices are in greatest demand. In the case of production of aroma compounds an alternative is provided by the application of methods based on biotechnology [1]. Although these processes are connected with the need for adequate selection and optimization of strains capable of production aroma compounds at the genotype and phenotype levels, a process competitive in relation to conventional technologies may be developed thanks to the appropriate selection of medium composition and physical parameters of culture.

Eukaryotic microorganisms are valued producers of aroma compounds. The process of microbiological synthesis of these substances is relatively well described in yeasts. However, available literature provided limited information evaluating the above mentioned capacity in non-pathogenic moulds, common in the natural environment. Rapid growth of moulds and their relatively low growth requirements seem to guarantee high efficiency of synthesis in the case of aroma compounds.

2-phenylethyl alcohol is a fragrance compound with flowery/honey odor note, one of the most widely used in the food industry. Natural 2-phenylethyl alcohol obtained in the course of biotransformation may be a valuable alternative for consumers. The main goal of this study was analysis of the ability to produce 2-phenylethyl alcohol by a mould *Galactomyces geotrichum* MK017 and optimization of the culture medium composition in order to increase the yield of the product.

Materials and methods

Analyses were conducted on a strain *Galactomyces geotrichum* MK017, coming from the collection of the Flavors and Fragrances Group, the Faculty of Food Science and Nutrition, the Poznań University of Life Sciences. The tested strain was stored on solid medium with chloramphenicol (BTL, Łódź, Poland) at 4 °C. Solvents, such as ethyl acetate and hexane; the reference aroma compounds: 2-phenylethyl alcohol, phenylacetaldehyde, phenylacetic acid, phenyllactic acid and [²H₆]-phenol were purchased from Sigma-Aldrich (Poznań, Poland). The purity of solvents and reference standards was no lower than 99 and 97 %, respectively.

For the medium optimization, every vial was inoculated with *Galactomyces geotrichum* mould. The inoculum was retrieved from a culture of microorganisms using a sterile smear loop. For each vial containing medium one tube with *Galactomyces geotrichum* MK017 moulds was used. Tested microorganisms were inoculated in the 40 ml vials containing 20 ml of different media and cultured at 30 °C for 18 days with

aeration. Four variants of culture media, pre-selected in terms of environment optimization for the synthesis of 2-phenylethyl alcohol, were tested. The composition of the media was presented in Tab. 1.

Table 1. The composition of the media 1 - 4 used for the culture of *Galactomyces geotrichum* MK017 to produce 2-phenylethyl alcohol

Tabela 1. Skład pożywek 1 - 4 wykorzystanych do produkcji 2-fenyletanolu w hodowli *Galactomyces geotrichum* MK017

Composition of the media [g/l] Skład pożywek [g/l]	Medium 1 Pożywka 1	Medium 2 Pożywka 2	Medium 3 Pożywka 3	Medium 4 Pożywka 4
Glucose / Glukoza	10	-	10	-
Sucrose / Sacharoza	-	60	-	120
L-phenylalanine / L-feniloalanina	-	7	10	10
Yeast extract / Ekstrakt drożdżowy	3	0,17	-	5
Soy peptone / Peptone sojowy	5	-	-	-
Maltose extract / Ekstrakt maltozowy	3	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	-	22,8	-	-
Citric acid / Kwas cytrynowy	-	10,3	-	-
MgCl ₂	-	0,5	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	1	7,5
Urea / mocznik	-	-	1	-
MgSO ₄	-	-	0,3	-
CaCl ₂	-	-	0,2	-
K ₂ HPO ₄	-	-	-	9,6
MgSO ₄ x7H ₂ O	-	-	-	0,5
Distilled water / Woda desytlowana	1	1	1	1

The concentration of 2-phenylethyl alcohol was estimated using Solid Phase Microextraction (SPME) with gas chromatography and mass spectrometry analysis. For the compound isolation Carboxene/PDMS fiber (Supelco, Bellefonte, USA) was exposed in the vial for 30 min at 30 °C. Before SPME extraction 100 µl of internal standard (IS) of [²H₆]-phenol has been added reaching the concentration of 2.5 mg/l. Next the efficiency of synthesis was assessed using gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS) performed on an Agilent Technologies 7890A GC coupled to an Agilent Technologies 5975 VL MSD (Agilent, Santa Clara, USA). The chromatograph was equipped with DB-5 MS columns (30 m × 250 µm × 0.25 µm, Agilent, Santa Clara USA). The initial oven temperature was 40 °C, followed by an increase in temperature by 8 °C/min to 180 °C and next by 35 °C/min and it was maintained for 3 min.

The temperature at the injection port was 260 °C. Separation was performed using helium at a flow rate of 1.5 ml/min. Compounds extracted using SPME fiber were analyzed in the splitless mode (1 min). In the course of separation the temperature of the transfer line was 300 °C. The mass spectrometer worked in the scan mode. Ions were collected between 30 and 330 m/z. The ion source temperature was 220 °C. Volatiles were identified by a comparison of mass spectra with the NIST library and respective standards.

Quantification of odorants has been done by stable isotope dilution assay with an IS [²H₆]-phenol using characteristic ions presented in Tab. 2. The obtained results were adjusted by the detector response factor between labelled and unlabelled compound presented in Tab. 2.

Table 2. Characteristic ions and response factors (Rf) used for the quantitation of analyzed volatiles
Tabela 2. Charakterystyczne jony oraz współczynnik odpowiedzi wykorzystane do ilościowej analizy związków lotnych

No. / Nr	Compound Związek	Ions Jony	Rf
1.	phenylacetaldehyde aldehyd fenyloctowy	120	3,1
2.	2-phenylethyl alcohol 2-fenyloetanol	122	3,2
3.	phenylacetic acid kwasfenyloctowy	136	2,4
4.	phenyllactic acid kwasfenyloctowy	148	8,7
5.	IS – phenol [² H ₆] IS – fenol [² H ₆]	99	-

In the second stage of the study the culture was scaled-up to bioreactors with max. capacity of 1 l (Duran, Wertheim, Germany). Total culture volume was 770 ml and included 700 ml of optimized medium and 70 ml of the inoculate. The culture was run on the media composed of: 80 g/l of sucrose (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) and 21g/l of L-phenylalanine (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland) and pH value of 5.0, which has been optimized and selected in the previous stage of the study and described as medium 2. The experiments were run for 120 h. It was a batch culture. Samples for analyses were collected at fixed intervals throughout the culture period and identification and quantitation of volatiles was determined. Aeration rate in the bioreactor was 0.52 l/dm³/min at 30 °C. Extraction was performed using 5 ml of ethyl acetate added to 20 ml of the culture medium. Additionally, for the purpose of quantitative analyses of

determined compounds an internal standard was introduced, i.e. [$^2\text{H}_6$] phenol at 100 μl . Next the solution was mixed for 30 min and then centrifuged for 7 min at 1000 rpm. The amount of 1 μl was collected from the supernatant and it was injected into the injection port of the gas chromatograph. The results were statistically analyzed using the standard deviation.

Results and discussion

In the first stage of the study the optimal growth environment was selected for the synthesis of 2-phenylethyl alcohol by *Galactomyces geotrichum* MK017. For the optimization purposes four different mediums previously used for the production of 2-phenylethyl alcohol by yeast were evaluated. Media compositions were selected on the basis of published papers by Białecka-Florjańczyk [1], Etschmann [4], Mei [7] and Wang [9] with small modifications. Preparing medium 1 bacto-peptone was changed into soy peptone and 3 g/l maltose extract was added. In medium 3 dose of L-phenylalanine was decreased into 10 g/l. The biggest difference in between selected mediums was in the course of the carbon and nitrogen source, the quantity of L-phenylalanine and a mineral composition. For many microorganisms saccharides are the basic energy compounds and the source of a carbon. In turn, L-phenylalanine is the most important component in the production of 2-phenylethyl alcohol, since in the Ehrlich pathway [2] it is the precursor of the process. Minerals are required for growth and proliferation. Phosphorus is used to build cell membranes and certain enzymes. Magnesium, another component of the medium, activates numerous enzymes and stabilizes nucleic acids [8].

Comparing chosen media. The results have shown that the most efficient synthesis of 2-phenylethyl alcohol, based on the peak area, was obtained when using medium 2 containing 60 g/l of sucrose and 7 g/l of L-phenylalanine (Fig. 1). Based on those results medium 2 was selected for further optimization. The experiments were conducted changing the composition of medium constituents, i.e. sucrose at 60 g/l, 80 g/l and 100 g/l, L-phenylalanine at 7 g/l, 14 g/l and 21 g/l, and pH at the value of 4, 5, 6 and 7.

Varying the amount of sucrose added into the medium no significant effect on the efficiency of 2-phenylethyl alcohol synthesis by a mould *Galactomyces geotrichum* MK017 was recorded – Tab. 3. Therefore the average sucrose content in the culture medium of 80 g/l was chosen for further experiments. In the experiment with a variable content of L-phenylalanine in the medium the highest level of 2-phenylethyl alcohol was recorded at the substrate concentration of 21 g/l. The next experiment assessed the effect of culture medium pH on the capacity of a mould *Galactomyces geotrichum* MK017 to synthesize 2-phenylethyl alcohol. Results have shown that the highest

In further experiment culture of a mould *Galactomyces geotrichum* MK017, containing 700 ml of previously optimized medium with 80 g/l sucrose, 21 g/l L-phenylalanine, 3 g/l yeast extract, 22,8 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10,3 g/l citric acid, 0,5 g/l MgCl_2 ; 1 g/l distilled water was prepared. The experiment have been conducted through four days and it confirmed the capacity of selected moulds to synthesize the following compounds: phenylacetaldehyde, phenylethyl alcohol, phenylacetic acid and phenyllactic acid, which corresponds to the Ehrlich pathway [2], (Fig 2). According to described pathway, the first transformation product is phenylpyruvate, followed by phenylacetaldehyde, 2-phenylethyl alcohol, which with the participation of dehydrogenase may again convert 2-phenylethyl alcohol to phenylacetaldehyde and further to phenylacetic acid. However it does not describe further transformation into phenyllactic acid. Generally in the Ehrlich pathway amino acids are slowly assimilated by microorganisms during fermentation. Prior to the secretion of the product outside the cell the compound is converted to alcohol or acid [5].

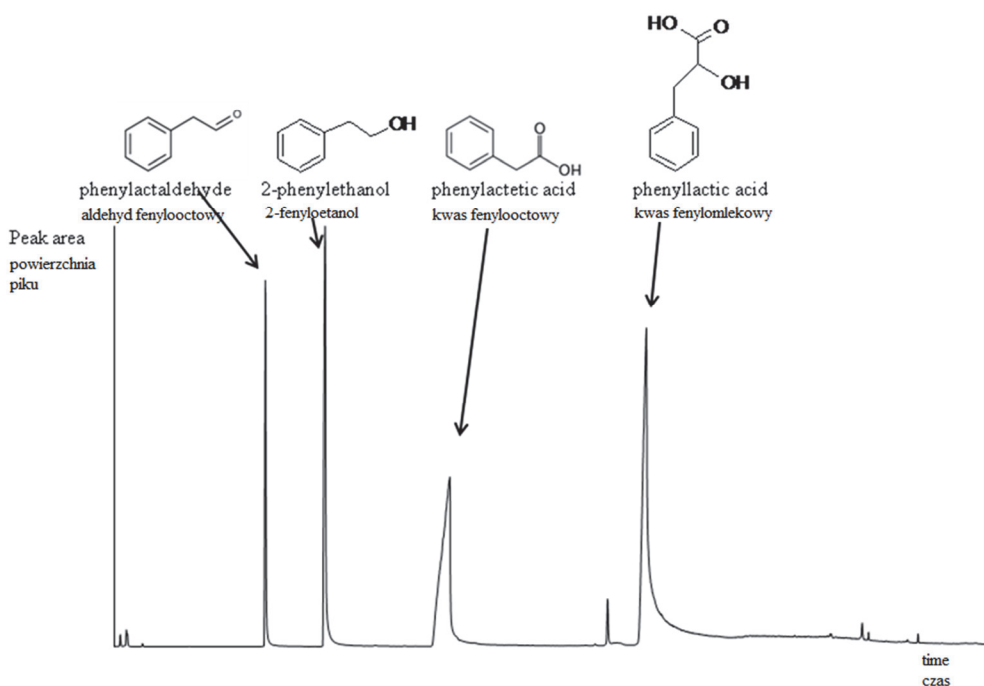


Fig. 2. Exemplary chromatogram (extracted ion 91) obtained from the extract of 4 days biomass production by *Galactomyces geotrichum* MK017 in a 1000 ml bioreactor

Rys. 2. Przykładowy chromatogram (wybranych 91 jonów) uzyskany z ekstraktu z biomasy z 4. dnia hodowli *Galactomyces geotrichum* MK017 w 1000 ml bioreaktorze

In the presented experiment, during the four days of the bioreactor culture low concentrations of phenylacetaldehyde and 2-phenylethyl alcohol were already produced in the first hours of the trial (1.6 and 2.0 mg/l respectively). The amount of phenylacetaldehyde did not change significantly later on. On the other hand the concentration of 2-phenylethyl alcohol almost tripled after the first day up to 5.9 mg/l and remained at the same level in the course of successive days (Fig. 3).

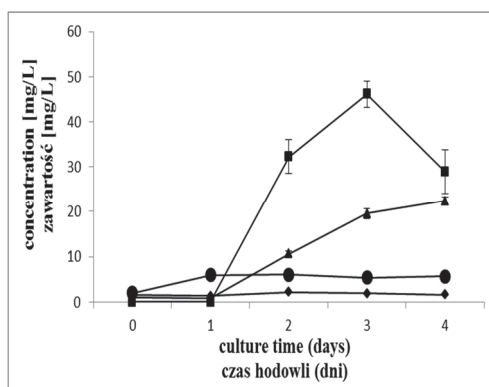


Fig. 3. Changes in concentration of 2-phenylethyl alcohol, phenylacetaldehyde, phenylacetic acid and phenyllactic acid content, during culture of *Galactomyces geotrichum* MK017 in bioreactor. Phenylacetaldehyde – diamonds; 2-phenylethyl alcohol – circles; phenylacetic acid – triangles; phenyllactic acid – squares

Rys. 3. Zmiany zawartości 2-fenyletanolu, aldehydu fenyletanolowego, kwasu fenyletanolowego i kwasu fenylmlekowego w hodowli *Galactomyces geotrichum* MK017 w bioreaktorze. Aldehyd fenyletanolowy – romby; 2-fenyletanol – koła; kwas fenyletanolowy – trójkąty; kwas fenylmlekowy – kwadraty

At the same time observation of the phenylacetic and phenyllactic acids has revealed very small amounts of phenylacetic acid during the first day of the trial. However, starting from the second day of the culture its quantity considerably increased up to 22.4 mg/l at the fourth day of biosynthesis. In compare, during the first hours of the culture phenyllactic acid was not detected, while at day 2 it was found at a concentration of 7.6 mg/l which stayed at similar level till the completion of the trial. The presence of the following compounds: 2-phenylethyl alcohol, phenylacetaldehyde, phenylacetic and phenyllactic acids, confirms the transformation of L-phenylalanine by the *Galactomyces geotrichum* MK017 in the Ehrlich pathway (Fig. 3).

In the course of the experiment the highest concentration of 2-phenylethyl alcohol was 6 mg/l culture medium. At the same time this sample contained 2.2 mg/l phenylacetaldehyde, 10.66 mg/l phenylacetic acid and 32.3 mg/l phenyllactic acid, which gives mainly acids (84 %). In contrast, Hazelwood et al. [5] showed that in the case of *Sac-*

Saccharomyces cerevisiae grown in a batch culture with L-phenylalanine a mixture of 90 % of alcohol (2-phenylethyl alcohol) and only 10 % of acids has been obtained. Higher results of the biosynthesis of 2-phenylethyl alcohol were acknowledged by Lomascolo et al. [6]. In this case the moulds *Aspergillus niger* grown in the medium consisting of 60 g/l glucose and 6 g/l L-phenylalanine, production of 2-phenylethyl alcohol was obtained at the 1375 mg/l. In this study the optimal substrate for the synthesis of 2-phenylethyl alcohol by a mould *Galactomyces geotrichum* MK017 was provided by the medium composed of sucrose, L-phenylalanine, yeast extract, citric acid, MgCl₂ and Na₂HPO₄ x 2H₂O. A very similar composition of the medium was used by Etschmann et al. [4]. In that study the researchers assessed the capacity to synthesize 2-phenylethyl alcohol by 14 microbial strains. The best among the tested strains was *Kluyveromyces marxianus* CBS 600, which produced 1.8 g/l 2-phenylethyl alcohol and the culture medium contained sucrose from molasses, L-phenylalanine, Na₂HPO₄ x 2H₂O, citric acid, MgSO₄ 7H₂O and Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids and ammonium sulfate [4]. The amount of 2-phenylethyl alcohol obtained by Etschmann was much higher than the one achieved in this research, however the authors did not mention any other compounds such as phenylacetic acid or phenyllactic acid, which were synthesized by *Galactomyces geotrichum* MK017.

Summary

The bioprocess of aroma compound production by tested microorganism was most efficient on the medium composed of sucrose (80 g/l) and L-phenylalanine (21 g/l) and pH value of 5.0. Additionally the tested mould *Galactomyces geotrichum* MK017 shows the potential for the production of 2-phenylethyl alcohol, but also for the synthesis of phenylacetic and phenyllactic acids.

This research has been financed by the Polish National Science Center project: N N312 157 134

Literatura

- [1] Białecka-Florjańczyk E., Krzyczkowska J., Stolarzewicz L., Kapturowska A.: Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass. *J Mol. Catal B-Enzym*, 2012, **74**, 241-245.
- [2] Ehrlich F.: Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Ber Dtsch. Chem. Ges*, 1907, **40**, 1027-1047.
- [3] Etschmann M.M.W., Bluemke W., Sell D., Schrader J.: Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl. Microbiol. Biot*, 2002, **59**, 1-8.
- [4] Etschmann M.M.W., Sell D., Schrader J.: Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnol. Lett*, 2003, **25**, 531-536.

- [5] Hazelwood L.A., Daran J.M., Maris A., Pronk J.T., Dickinson J.R.: The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolism. Appl Environ Microb*, 2008, **74**, 2259-2266.
- [6] Lomascolo A., Lesage-Meessen L., Haon M., Navarro D., Antona C., Faulds C., Marcel A.: Evaluation of the potential of *Aspergillus niger* species for the bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol. *World J. Microb. Biot*, 2001, **17**, 99-102.
- [7] Mei J., Min H., Lu Z.: Enhanced biotransformation of L-phenylalanine to 2-phenylethanol using an in situ product adsorption technique. *Process Biochemistry*, 2009, **44**, 886-890.
- [8] Raczyńska-Cabaj A., Lipińska E., Sobczak E., Stosio A.: Wpływ jonów magnezu na rozwój bakteryjnej mikroflory występującej w prasowanych drożdżach piekarskich. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2004, **3**, 111-118.
- [9] Wang H., Dong Q., Meng C., Shi X., Guo Y.: A continuous and adsorptive bioprocess for efficient production of the natural aroma chemical 2-phenylethanol with yeast. *Enzyme Microbiol. Technol*, 2011, **48**, 404-407.

ANALIZA ZDOLNOŚCI PRODUKCJI 2-FENYLOETANOLU PRZEZ *GALACTOMYCES GEOTRICHUM* MK017

S u m m a r y

Celem pracy było określenie zdolności pleśni *Galactomyces geotrichum* MK017 do biosyntezy 2-fenyloetanolu oraz optymalizacja składników podłoża produkcyjnego w celu zwiększenia ilości uzyskanego produktu. Hodowlę pleśni *Galactomyces geotrichum* MK017 przeprowadzono w skali laboratoryjnej. Do identyfikacji związków lotnych zastosowano metodę mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Identyfikacji oraz oceny ilościowej uzyskanego związku zapachowego dokonano z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS). Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność badanej pleśni *Galactomyces geotrichum* MK017 do produkcji 2-fenyloetanolu oraz do syntezy aldehydu fenylooctowego, kwasu fenylooctowego oraz kwasu fenylolekowego. W celu optymalizacji produkcji 2-fenyloetanolu przetestowano cztery różne podłoża hodowlane. Największą produkcję 2-fenyloetanolu otrzymano na pożywkę zawierającą sacharozę (80 g/l) i L-fenyloalaninę (21 g/l) oraz przy pH pożywki na poziomie 5.0. Uwzględniając powyższe zawartości poszczególnych składników pożywki, uzyskano w hodowli okresowej w 770 ml pożywki, najwyższą koncentrację 2-fenyloetanolu – 6 mg/l. Równocześnie w próbce otrzymano aldehyd fenylooctowy, kwas fenylooctowy oraz kwas fenylolekowy odpowiednio w ilościach: 2.2 mg/l, 10.66 mg/l i 32.3 mg/l.

Key words: *Galactomyces geotrichum*, 2-fenyloetanol, GC/MS, SPME ☒

ELŻBIETA HAĆ-SZYMAŃCZUK, ANETA CEGIELKA

OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ I PRZECIWUTLENIAJĄCEJ SZAŁWII LEKARSKIEJ W PRODUKCIE MIĘSNYM

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu dodatku szałwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.) na jakość mikrobiologiczną oraz przebieg procesów utleniania lipidów w produkcie wytworzonym z mięsa wieprzowego, po 1, 5 i 10 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych (4 - 6 °C). Szałwia jest rośliną przyprawową dodawaną m.in. do żywności z uwagi na właściwości przeciwutleniające i przeciwbakteryjne. Do produktów mięsnych dodawano szałwię w postaci suszonej przyprawy (0,5 %) i ekstraktów: wodnego (2,0 %) oraz 40- i 70-procentowego alkoholowego (2,0 %). Zakres badań mikrobiologicznych obejmował oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów, drobnoustrojów psychrotrofowych, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz enterokoków. Ponadto oznaczono wskaźnik TBA.

Stwierdzono, że najsłabszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym charakteryzował się susz z szałwii, ponieważ w produkcie z jego udziałem oznaczono większą liczbę drobnoustrojów psychrotrofowych, z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz enterokoków w porównaniu z pozostałymi produktami. Ekstrakty z szałwii, zarówno wodne, jak i alkoholowe, skutecznie hamowały wzrost większości oznaczanych drobnoustrojów w porównaniu z produktem kontrolnym, co stwierdzono w czasie całego okresu przechowywania zapakowanych próżniowo produktów. Ponadto wykazano, że szałwia, niezależnie od rodzaju preparatu, może być stosowana w celu spowolnienia procesów oksydacji lipidów w produktach z rozdrobnionego mięsa wieprzowego. Świadczyły o tym wartości wskaźnika TBA, które po 10 dniach przechowywania produktów z dodatkiem szałwii były co najmniej trzykrotnie niższe niż w produkcie kontrolnym.

Słowa kluczowe: szałwia, ekstrakty alkoholowe, właściwości przeciwdrobnoustrojowe, wskaźnik TBA

Dr inż. E. Hać-Szymańczuk, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, dr hab. A. Cegielka, Katedra Technologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa.

Kontakt: elzbieta_hac_szymanczuk@sggw.pl

Wprowadzenie

Przedłużanie okresu trwałości produktów mięsnych jest przedmiotem badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych. Obniżanie jakości produktów mięsnych wynika z przebiegających równocześnie przemian mikrobiologicznych i chemicznych. Spośród procesów chemicznych przemianą ograniczającą w znacznym stopniu stabilność przechowalniczą przetworów mięsnych jest utlenianie lipidów. Jest to złożony proces, którego przebieg zależy m.in. od składu produktu mięsnego, w tym zawartości tłuszczu, dostępu światła oraz wysokości temperatury podczas przechowywania [10, 15].

Jedną z metod zapobiegania procesom oksydacji lipidów w żywności jest stosowanie przeciwutleniaczy [11, 12, 24]. Zastosowanie przeciwutleniaczy syntetycznych do przetworów mięsnych jest regulowane przepisami prawa [25]. Z uwagi jednak na nieufność konsumentów wobec wielu substancji dodatkowych obecnych w żywności, producenci coraz częściej zastępują je przeciwutleniaczami pochodzenia naturalnego [9, 27]. Są one bardziej akceptowane, gdyż kojarzy się je z pozytywnym oddziaływaniem na organizm człowieka [13].

Dobrym źródłem przeciwutleniaczy w żywności są rośliny oraz zioła przyprawowe. Przez stulecia stosowano je w celu poprawy cech sensorycznych żywności. Stosowane były także do utrwalania żywności, mimo że mechanizm ich konserwującego oddziaływania wyjaśniono stosunkowo niedawno [3, 24, 27].

Przeprowadzono wiele badań dotyczących skuteczności działania oraz możliwości aplikacyjnych różnego typu preparatów roślinnych: suszonych części roślin, ekstraktów wodnych i alkoholowych oraz olejków eterycznych do mięsa i produktów mięsnych. Określano możliwości hamowania procesów utleniania lipidów i barwników oraz spowalniania rozwoju mikroflory. Wykazano, że do produkcji różnego typu przetworów mięsnych mogą być stosowane ekstrakty roślinne pozyskiwane z roślin przyprawowych, takich jak: rozmaryn, oregano czy mięta. Dowiedziono skuteczności działania ekstraktów otrzymywanych z innych surowców roślinnych, m.in. pestek winogron, zielonej herbaty czy granatu. Wyniki wskazujące na możliwość wydłużenia okresu trwałości przechowalniczej mięsa lub jego przetworów świadczą jednak o konieczności indywidualnego doboru rodzaju oraz ilości dodatku preparatu roślinnego [2, 15, 27].

Rośliną przyprawową szeroko stosowaną jest szalwia lekarska (*Salvia officinalis* L.) należąca do rodziny *Lamiaceae*. Zarówno roślina, jak i olejki eteryczne z niej pozyskiwane wykazują właściwości przeciwutleniające i przeciwbakteryjne, które przemawiają za jej stosowaniem w przetwórstwie mięsa [4, 9, 11, 14].

Celem pracy było określenie wpływu dodatku szalwii lekarskiej w postaci suszonej przyprawy oraz ekstraktów (wodnego i alkoholowego) na jakość mikrobiologiczną

oraz przebieg procesów utleniania lipidów w produkcji z mięsa wieprzowego po 1, 5 i 10 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych.

Material i metody badań

Surowcem do produkcji wyrobów mięsnych było mięso wieprzowe z szynki (65,0 %) oraz podgardle (35,0 %) rozdrobnione w wilku laboratoryjnym (\emptyset oczek 4,5 mm). Do surowców mięsno-tłuszczowych dodawano chlorek sodu (2,0 %), wodę (25,0 %) i szalwię w postaci suszonej przyprawy („Kotányi”) oraz ekstraktów (wodnego i alkoholowego).

Przed przystąpieniem do otrzymania ekstraktów oznaczano zanieczyszczenie mikrobiologiczne suszu z szalwii. W badanym materiale nie stwierdzono obecności pałeczek *Salmonella* w 25 g [20]. Ogólna liczba drobnoustrojów w suszonej szalwii kształtowała się na poziomie $7,8 \times 10^3$ jtk·g⁻¹ [19], bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* – $9,1 \times 10^2$ jtk·g⁻¹ [23], zaś liczba grzybów i pleśni wynosiła $6,4 \times 10^2$ jtk·g⁻¹ [21].

Ekstrakty z suszu szalwii otrzymywano metodą ekstrakcji w automatycznym aparacie Soxhleta [7]. Do przygotowania każdego ekstraktu używano po 40 g suszu szalwii rozłożonego do 8 gilz ekstrakcyjnych (po 5 g w każdej gilzie). Jako rozpuszczalnika używano odpowiednio: wody destylowanej oraz 40- lub 70-procentowego alkoholu etylowego. Surowiec w pojedynczej gilzie ekstrahowano 150 cm³ odpowiedniego rozpuszczalnika przez 15 cykli, utrzymując temperaturę wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskane porcje łączono, otrzymując po około 550 cm³ ekstraktów surowych, które przesączono przez filtr bibułowy. Następnie każdy z ekstraktów zagęszczano w rotacyjnej wyparce Rotovaporator R-205 (Büchi Labortechnik AG) do uzyskania 40 g, odpowiadających masie suszu użytego do otrzymania ekstraktu.

Kolejność czynności wykonywanych przy wytwarzaniu modelowych produktów mięsnych obejmowała odważenie surowców mięsno-tłuszczowych, chlorku sodu oraz wody i wymieszanie w mieszarce laboratoryjnej. W każdej serii doświadczalnej przygotowywano 5 próbek produktu różniących się postacią dodanej szalwii, a wielkość jej dodatku ustalono na podstawie dostępnej literatury [4, 5, 11, 12, 27] oraz własnych badań wstępnych (wyniki niepublikowane).

Przygotowano następujące próbki produktu mięsnego:

- K – produkt kontrolny, bez dodatku szalwii,
- S – produkt z dodatkiem suszu z szalwii (0,5 %),
- EW – produkt z dodatkiem ekstraktu wodnego z suszu z szalwii (2,0 %),
- EA40 – produkt z dodatkiem 40-procentowego alkoholowego ekstraktu z suszu z szalwii (2,0 %),
- EA70 – produkt z dodatkiem 70-procentowego alkoholowego ekstraktu z suszu z szalwii (2,0 %).

Ilość dodatku szałwii odnoszono do masy surowców mięsnych. Przygotowane próbki farszu mięsnego umieszczano w szklanych zlewkach o poj. 100 cm³. Następnie poddawano je obróbce cieplnej w łaźni wodnej o temp. 72 °C, do uzyskania 68 °C w centrum geometrycznym wyrobu. Produkty wychładzano przez 24 h w temp. 4 - 6 °C i pakowano próżniowo. Próbkę przechowywano w warunkach chłodniczych (4 - 6 °C) przez 10 dni.

Badania mikrobiologiczne obejmowały oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów [19], liczby drobnoustrojów psychrotrofowych [22], bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* [23] oraz enterokoków [18]. Szybkość utleniania lipidów określano na podstawie oznaczenia wskaźnika TBA [17]. Oznaczenia wykonywano w próbkach kontrolnych (K) oraz w próbkach z dodatkiem szałwii (S, EW, EA40 i EA70) po 1, 5 i 10 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych (4 - 6 °C). Doświadczenie powtórzono czterokrotnie.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego Statgraphics 4.1.Plus (Manugistics Inc., USA), stosując jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Tukeya do określenia istotności różnic między wartościami średnimi na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wyniki dotyczące oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów w badanych próbkach produktów mięsnych przedstawiono w tab. 1. Po upływie 10 dni przechowywania ogólna liczba drobnoustrojów w próbkach z dodatkiem szałwii (S, EW, EA40 i EA70) była niższa niż w próbce kontrolnej (K) – bez dodatku szałwii, ale stwierdzone różnice nie były statystycznie istotne ($p > 0,05$). Wraz z upływem czasu przechowywania produktów stwierdzono statystycznie istotny ($p < 0,05$) wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów jedynie w próbce kontrolnej. Karpińska-Tymoszczyk [12] podaje, że zastosowanie dodatku ekstraktu z szałwii znacząco ograniczyło wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów w surowych kulkach z mięsa indyczego, co wpłynęło pozytywnie na trwałość przechowalniczą produktu.

We wszystkich badanych próbkach wyrobów mięsnych, niezależnie od rodzaju dodatku szałwii, obecne były drobnoustroje psychrotrofowe (tab. 1). Po 10 dniach przechowywania istotnie ($p < 0,05$) wyższym, w porównaniu z pozostałymi próbkami (K, EW, EA40 i EA70), zanieczyszczeniem drobnoustrojami psychrotrofoвыми charakteryzował się wyrób z dodatkiem suszu z szałwii (S). W przeciwieństwie do produktu z dodatkiem suszu z szałwii (S), wydłużenie czasu przechowywania z 1 do 10 dni nie spowodowało istotnego ($p > 0,05$) wzrostu liczby drobnoustrojów psychrotrofowych w produkcie kontrolnym (K) oraz w produktach z dodatkiem ekstraktów: wodnego i alkoholowych (EW, EA40 i EA70).

Tabela 1. Ogólna liczba drobnoustrojów oraz liczba drobnoustrojów psychrotrofowych w produkcie mięsnym z dodatkiem szałwii, przechowywanym w warunkach chłodniczych [jtk·g⁻¹]
 Table 1. Total number of microbes and psychrotrophic bacteria in meat product with added sage and stored under chilled conditions [cfu·g⁻¹]

Czas przechowywania [dni] Storage duration [days]	Produkt mięsny / Meat product				
	kontrolny control (K)	susz z szałwii dried sage (S)	ekstrakt wodny aqueous extract (EW)	ekstrakt alkoholowy alcoholic extract (EA40)	ekstrakt alkoholowy alcoholic extract (EA70)
	Ogólna liczba drobnoustrojów ($\bar{x} \pm s$ /SD) Total count of bacteria				
1	$1,8 \times 10^4$ $\pm 1,2 \times 10^2$ a AB	$1,5 \times 10^4$ $\pm 2,3 \times 10^3$ a AB	$5,7 \times 10^3$ $\pm 3,3 \times 10^2$ a A	$3,4 \times 10^4$ $\pm 2,8 \times 10^3$ a B	$6,7 \times 10^2$ $\pm 4,1 \times 10^1$ a A
5	$3,4 \times 10^5$ $\pm 7,8 \times 10^4$ b B	$3,4 \times 10^4$ $\pm 6,48 \times 10^2$ a A	$4,3 \times 10^4$ $\pm 4,2 \times 10^3$ a A	$8,3 \times 10^4$ $\pm 5,1 \times 10^3$ a A	$8,8 \times 10^4$ $\pm 3,2 \times 10^3$ a A
10	$3,5 \times 10^5$ $\pm 2,1 \times 10^4$ b A	$2,5 \times 10^4$ $\pm 1,8 \times 10^2$ a A	$6,6 \times 10^4$ $\pm 2,4 \times 10^3$ a A	$2,8 \times 10^4$ $\pm 2,5 \times 10^3$ a A	$2,5 \times 10^5$ $\pm 4,6 \times 10^4$ a A
	Liczba drobnoustrojów psychrotrofowych ($\bar{x} \pm s$ / SD) Count of psychrotrophic bacteria				
1	$6,3 \times 10^3$ $\pm 1,8 \times 10^2$ a A	$6,7 \times 10^3$ $\pm 2,4 \times 10^2$ a A	$3,4 \times 10^3$ $\pm 1,3 \times 10^2$ a A	$2,8 \times 10^4$ $\pm 2,4 \times 10^3$ a A	$7,1 \times 10^3$ $\pm 3,4 \times 10^2$ a A
5	$4,4 \times 10^4$ $\pm 2,0 \times 10^3$ a A	$2,7 \times 10^4$ $\pm 1,4 \times 10^3$ a A	$5,1 \times 10^3$ $\pm 3,8 \times 10^2$ a A	$2,9 \times 10^4$ $\pm 2,6 \times 10^3$ a A	$3,3 \times 10^4$ $\pm 1,4 \times 10^3$ a A
10	$2,4 \times 10^5$ $\pm 6,4 \times 10^3$ a A	$3,1 \times 10^5$ $\pm 2,4 \times 10^3$ b B	$1,1 \times 10^5$ $\pm 3,4 \times 10^4$ a A	$3,1 \times 10^4$ $\pm 1,6 \times 10^3$ a A	$2,7 \times 10^4$ $\pm 1,8 \times 10^2$ a A

Objaśnienia: / Explanatory notes:

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

K – produkt kontrolny / control sample; S – produkt z dodatkiem suszu z szałwii (0,5 %) / product with dried sage added (0.5 %); EW – produkt z dodatkiem wodnego ekstraktu z suszu szałwii (2.0 %) / product with added aqueous extract of dried sage (2.0 %); EA40 – produkt z dodatkiem 40-procentowego alkoholowego ekstraktu z suszu szałwii (2.0 %) / product with added 40 % aqueous extract of dried sage (2.0 %); EA70 – produkt z dodatkiem 70-procentowego alkoholowego ekstraktu z suszu szałwii (2.0 %) / product with added 70% aqueous extract of dried sage (2.0 %); W tabeli przedstawiono wartości średnie (n = 4) i odchylenie standardowe / Table shows mean values (n = 4) and standard deviation;

a, b – wartości średnie oznaczone różnymi literami w tej samej kolumnie różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) / mean values in the same column and denoted by different letters differ statistically significantly ($p < 0,05$); A, B – wartości średnie oznaczone różnymi literami w tym samym wierszu różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) / mean values in the same row and denoted by different letters differ statistically significantly ($p < 0,05$).

Gutierrez i wsp. [6] prowadzili badania nad właściwościami olejków eterycznych z rozmarynu, szałwii, majeranku oraz oregano. Autorzy podają, że zarówno olejek z szałwii, jak i mieszanina tego olejku z pozostałymi hamowała wzrost drobnoustrojów

psychrotrofowych, zdolnych do rozmnażania się w niskiej temperaturze. Według Abdel-Hamieda i wsp. [1] łączny dodatek ekstraktów z rozmarynu i szałwii działał hamująco na wzrost drobnoustrojów psychrotrofowych w mięsie mielonym przechowywanym w temp. 4 i -18 °C. W wyniku dodatku takiej mieszanki, w ilości 0,05 %, do mięsa przechowywanego w warunkach chłodniczych przez 10 dni liczba drobnoustrojów psychrotrofowych wynosiła 14,12 log jtk·g⁻¹, a w próbie kontrolnej – 31,64 log jtk·g⁻¹. W mięsie mrożonym przez 100 dni liczba tych drobnoustrojów wynosiła odpowiednio 7,16 log jtk·g⁻¹ i 20,31 log jtk·g⁻¹.

W każdej z badanych próbek produktów, niezależnie od rodzaju dodatku szałwii, stwierdzono obecność drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* (tab. 2). Czas przechowywania był czynnikiem istotnie ($p < 0,05$) różnicującym liczbę drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* jedynie w produktach z dodatkiem suszu z szałwii (S). W próbce z dodatkiem suszu z szałwii (S) po 1 dniu przechowywania oznaczono istotnie ($p < 0,05$) większą liczbę drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* niż w produktach z dodatkiem ekstraktów alkoholowych (EA40 i EA70) oraz w produkcie kontrolnym (K). Stwierdzone różnice między produktem z dodatkiem suszu (S) a produktem kontrolnym (K) oraz z dodatkiem ekstraktów (EW, EA40 i EA70) nie były jednak statystycznie istotne ($p < 0,05$) po 5 i 10 dniach przechowywania. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że skuteczność preparatów z szałwii w hamowaniu wzrostu drobnoustrojów zależała od sposobu ich pozyskania. Należy przypuszczać, że ekstrakty z szałwii charakteryzowały się mniejszym zanieczyszczeniem początkowym tymi drobnoustrojami niż suszona przyprawa.

Petrova i wsp. [16] podają, że 2-procentowy dodatek olejku eterycznego z szałwii, łącznie z EDTA, istotnie ograniczył wzrost drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* w mięsie piersiowym kurcząt pakowanym próżniowo, przechowywanym 16 dni w warunkach chłodniczych. Natomiast Hayouni i wsp. [8] stwierdzili, że zastosowanie olejku eterycznego z szałwii zahamowało wzrost bakterii *Salmonella* w mielonym mięsie wołowym.

Dodatek szałwii do produktów mięsnych, niezależnie od rodzaju preparatu, istotnie ($p < 0,05$) ograniczył wzrost enterokoków po 10 dniach przechowywania (tab. 2). Najskuteczniejsze w hamowaniu wzrostu tych drobnoustrojów po 5 dniach przechowywania były ekstrakty alkoholowe, zarówno EA40, jak i EA70. Wraz z upływem czasu przechowywania liczba enterokoków wzrastała istotnie ($p < 0,05$) jedynie w próbce kontrolnej (K) oraz w produkcie z dodatkiem suszu (S).

Dane literaturowe dotyczące przeciwdrobnoustrojowego działania szałwii w stosunku do bakterii z rodzaju *Enterococcus* są rozbieżne. Skuteczność działania hamującego zależała od rodzaju preparatu (ekstrakty etanolowe i wodne, olejki eteryczne) i wielkości jego dodatku do produktów mięsnych [8, 26].

Tabela 2. Liczba drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* i enterokoków w produkcie mięsny z dodatkiem szalwii, przechowywanym w warunkach chłodniczych [$\text{jtk} \cdot \text{g}^{-1}$]
 Table 2. Count of bacteria of *Enterobacteriaceae* and enterococci families in meat product with added sage and stored under chilled conditions [$\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$]

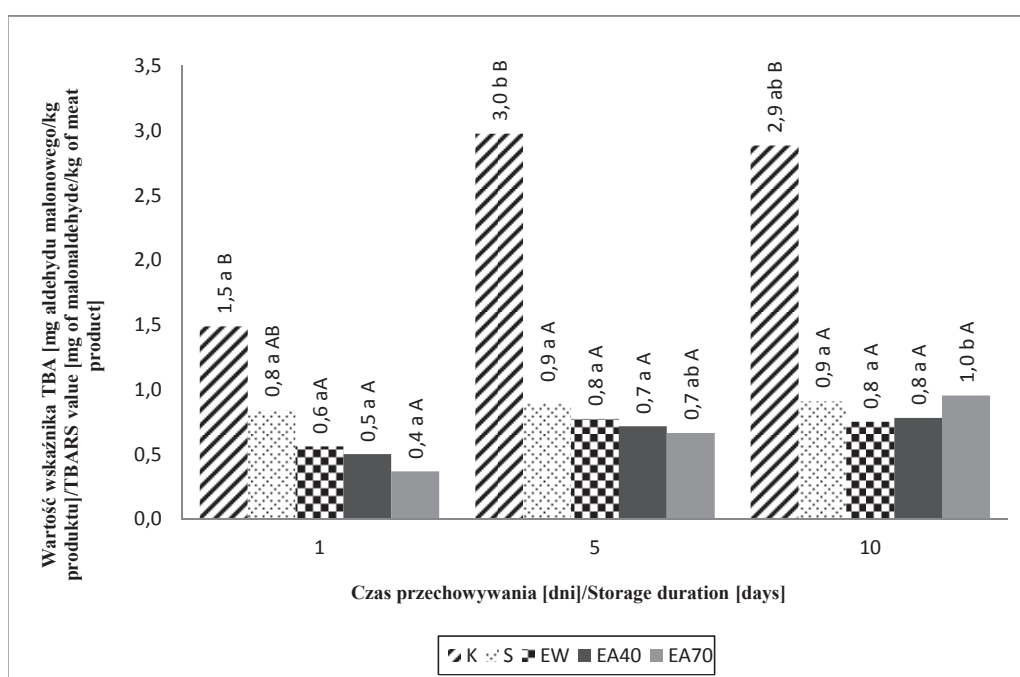
Czas przechowywania [dni] Storage duration [days]	Produkt mięsny / Meat product				
	K	S	EW	EA40	EA70
	Liczba drobnoustrojów z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> ($\bar{x} \pm s / \text{SD}$) Count of <i>Enterobacteriaceae</i> bacteria				
1	$7,4 \times 10^2$ $\pm 2,1 \times 10^1 \text{ aA}$	$5,8 \times 10^3$ $\pm 1,3 \times 10^2 \text{ bB}$	$2,4 \times 10^3$ $\pm 1,8 \times 10^2 \text{ aAB}$	$2,4 \times 10^2$ $\pm 2,0 \times 10^1 \text{ aA}$	$5,8 \times 10^2$ $\pm 1,5 \times 10^1 \text{ aA}$
5	$7,3 \times 10^2$ $\pm 8,1 \times 10^1 \text{ aA}$	$1,9 \times 10^2$ $\pm 1,3 \times 10^1 \text{ aA}$	$2,8 \times 10^2$ $\pm 8,1 \times 10^1 \text{ aA}$	$2,2 \times 10^2$ $\pm 4,1 \times 10^1 \text{ aA}$	$4,4 \times 10^2$ $\pm 2,1 \times 10^1 \text{ aA}$
10	$2,1 \times 10^2$ $\pm 1,1 \times 10^1 \text{ aA}$	$4,2 \times 10^2$ $\pm 1,8 \times 10^1 \text{ aA}$	$1,7 \times 10^2$ $\pm 2,2 \times 10^1 \text{ aA}$	$4,4 \times 10^2$ $\pm 7,0 \times 10^1 \text{ aA}$	$6,3 \times 10^2$ $\pm 3,0 \times 10^1 \text{ aA}$
	Liczba enterokoków ($\bar{x} \pm s / \text{SD}$) Count of enterococci				
1	$6,1 \times 10^2$ $\pm 2,1 \times 10^1 \text{ aA}$	$3,6 \times 10^2$ $\pm 3,7 \times 10^1 \text{ aA}$	$5,4 \times 10^2$ $\pm 7,1 \times 10^1 \text{ aA}$	$5,2 \times 10^2$ $\pm 1,0 \times 10^1 \text{ aA}$	$6,0 \times 10^2$ $\pm 8,1 \times 10^1 \text{ aA}$
5	$2,6 \times 10^4$ $\pm 3,5 \times 10^2 \text{ aB}$	$2,5 \times 10^4$ $\pm 4,1 \times 10^3 \text{ bB}$	$2,9 \times 10^3$ $\pm 1,1 \times 10^1 \text{ aAB}$	$3,5 \times 10^2$ $\pm 8,3 \times 10^1 \text{ aA}$	$3,5 \times 10^2$ $\pm 2,5 \times 10^1 \text{ aA}$
10	$2,4 \times 10^5$ $\pm 6,3 \times 10^3 \text{ bB}$	$2,3 \times 10^4$ $\pm 1,1 \times 10^2 \text{ bA}$	$1,8 \times 10^4$ $\pm 3,2 \times 10^3 \text{ aA}$	$3,6 \times 10^3$ $\pm 2,5 \times 10^2 \text{ aA}$	$3,9 \times 10^3$ $\pm 1,8 \times 10^2 \text{ bA}$

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

Na podstawie oznaczenia wskaźnika TBA (rys. 1) stwierdzono, że dodatek szalwii istotnie ($p < 0,05$) ograniczył procesy utleniania lipidów w badanych produktach z mięsa wieprzowego – wartość wskaźnika TBA oznaczona po 5 i 10 dniach przechowywania była co najmniej trzykrotnie niższa w porównaniu z próbkami kontrolnymi (K). Najbardziej efektywnie w tym kierunku działały ekstrakty, zarówno alkoholowe (EA40 i EA70), jak i wodny (EW). Również dodatek suszu z szalwii (S) hamował procesy utleniania lipidów w produktach. Najniższe wartości wskaźnika TBA oznaczono we wszystkich próbach po 1 dniu przechowywania, natomiast wraz z upływem czasu przechowywania istotny ($p < 0,05$) wzrost tego wskaźnika stwierdzono jedynie w produkcie z dodatkiem ekstraktu alkoholowego EA70.

Fasseas i wsp. [5] wykazali, że 3-procentowy dodatek olejku z szalwii istotnie zahamował procesy utleniania lipidów w mielonym mięsie wieprzowym i wołowym poddanym lub niepoddanym obróbce termicznej, przechowywanym przez 12 dni w temp. 4 °C. Zdaniem autorów, przeciwutleniające działanie olejków z szalwii ma

większe znaczenie w przypadku mięsa poddanego obróbce termicznej w porównaniu z mięsem surowym. Właściwości przeciwutleniające olejków z szalwii potwierdzili również Estevez i wsp. [4] w badaniach trwałości przechowalniczej pasztetów wieprzowych. Autorzy wykazali, że 0,1-procentowy dodatek olejku z szalwii istotnie ograniczył procesy utleniania lipidów, w tym cennych żywieniowo wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Zastosowanie naturalnego przeciwutleniacza (olejek z szalwii) było nawet bardziej skuteczne niż przeciwutleniacza syntetycznego (BHT).



Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b – różnice statystycznie istotne dotyczą czasu przechowywania ($p < 0,05$) / statistically significant differences refer to storage duration ($p < 0,05$); A, B – różnice statystycznie istotne dotyczą formy szalwii ($p < 0,05$) / statistically significant differences refer to preparation form of sage ($p < 0,05$); Na rysunku przedstawiono wartości średnie i odchylenie standardowe/ Figure shows mean values and standard deviation; $n = 4$.

Rys. 1. Wartość wskaźnika TBA mierzony w produkcie mięsnym wytworzonym z dodatkiem szalwii, przechowywanym w warunkach chłodniczych [mg aldehydu malonowego/kg produktu]

Fig. 1. Value of TBARS measured in meat product produced with added sage preparation and stored under chilled conditions [mg of malonaldehyde/kg of meat product]

Wnioski

1. Dodatek szałwii wpłynął na zahamowanie wzrostu większości oznaczanych drobnoustrojów w produktach z mięsa wieprzowego. Spośród zastosowanych preparatów szałwii najslabszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym w badanych produktach mięsnych charakteryzował się susz.
2. Zastosowanie szałwii ograniczało istotnie procesy oksydacyjne lipidów zachodzące w produktach z mięsa wieprzowego. Po 10 dniach przechowywania produktów z dodatkiem preparatów z szałwii, zapakowanych próżniowo, wartość wskaźnika TBA była w nich co najmniej trzykrotnie niższa niż w produkcie kontrolnym.
3. Szałwia może być stosowana nie tylko jako dodatek służący do wykształcenia określonej smakowości produktów mięsnych, ale także jako składnik spowalniający niekorzystne zmiany oksydacyjne lipidów i zmiany mikrobiologiczne produktów podczas chłodniczego przechowywania. W celu uzyskania pożądanego efektu istotny jest indywidualny dobór rodzaju dodatku szałwii oraz jego dawki.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego własnego nr N N312 257040

Literatura

- [1] Abdel-Hamied A.A., Nassar A.G., El-Badry N.: Investigations on antioxidant and antibacterial activities of some natural extracts. *World J. Dairy Food Sci.*, 2009, **4** (1), 1-7.
- [2] Adaszyńska M., Swarczewicz M., Markowska-Szczupak A., Jadcak D.: Skład chemiczny i właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku eterycznego i ekstraktu z mięty pieprzowej odmiany 'Asia'. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **2** (87), 116-125.
- [3] Czapska A., Bałasińska B., Szczawiński J.: Działanie przeciwbakteryjne i przeciwutleniające ekstraktów przypraw żywnościowych. *Med. Weter.*, 2006, **62** (3), 302-305.
- [4] Estevez M., Ramirez M., Ventanas S., Cava R.: Sage and rosemary essential oils versus BHT for inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *LWT*, 2007, **40**, 58-65.
- [5] Fasseas M.K., Mountzouris K.C., Tarantilis P.A., Polissiou M., Zervas G.: Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chem.*, 2007, **106**, 1188-1194.
- [6] Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P.: The antimicrobial efficacy of plant essential oils combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, **1** (124), 92-97.
- [7] Hać-Szymańczuk E., Lipińska E., Grzegorzółka O.: Ocena aktywności przeciwbakteryjnej oregano (*Origanum vulgare* L.). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, **XLV** (3), 308-314.
- [8] Hayouni E.I.A., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J.Y., Mohammed H., Hamdi M.: Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical composition and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, **125**, 242-251.
- [9] Hygreeva D., Pandey M.C., Radhakrishna K.: Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Sci.*, 2014, **98**, 47-57.
- [10] Kanner J.: Oxidative processes in meat products: Quality implications. *Meat Sci.*, 1994, **36**, 169-174.
- [11] Karpińska M., Borowski J., Danowska-Oziewicz M.: The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chem.*, 2001, **72**, 5-9.

- [12] Karpińska-Tymoszczyk M.: Effect of sage extract (*Salvia officinalis* L.) and a mixture sage extract and sodium ascorbate on the quality and the shelf life of vacuum-packed turkey meat balls. *J. Muscle Food*, 2007, **18** (4), 420-434.
- [13] Lindenschmidt R.C., Trika A.F., Guard M.E., Witschi H.P.: The effect of butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicol.*, 1986, **38**, 151-160.
- [14] Longaray Delamare A.P., Moschen-Pistorello I.T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S.: Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.*, 2007, **100**, 603-608.
- [15] Macura R., Michalczyk M., Banaś J.: Wpływ olejków eterycznych kolendry siewnej (*Coriandrum-sativum* L.) i melisy (*Melissa officinalis* L.) na jakość przechowywanego mielonego mięsa cielęcego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **4** (77), 12-137.
- [16] Petrová J., Pavelková A., Hleba L., Pochop J., Rovná K., Kačaniová M.: Antimicrobial effect of *Salvia officinalis* L. against selected group of bacteria isolated from chickens meat. *Animal Sci. Biotechnol.*, 2013, **46** (2), 123-127.
- [17] Pikul J., Leszczyński D., Kummerow F.A.: Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, (37), 1309-1313.
- [18] PN-A 82055-7:1997. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności i oznaczanie liczby enterokoków.
- [19] PN-EN ISO 4833:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [20] PN-EN ISO 6579:2003. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.
- [21] PN-EN ISO 7954:1999. Mikrobiologia. Ogólne zasady oznaczania drożdży i pleśni. Metoda płytkowa w temperaturze 25 °C.
- [22] PN-ISO 17410:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów psychrotrofowych.
- [23] PN-ISO 21528-2:2005. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby Enterobacteriaceae.
- [24] Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M.: Antioxidants in food. Practical applications. Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC, Cambridge 2001, pp. 25-78.
- [25] Rozporządzenie (WE) nr 1333/2008 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności. *Dz. Urz. UE L 354*, s. 16, z 31.12.2008.
- [26] Salehi P., Sonboli A., Ebrahimi S.N., Yousefzadi M.: Antibacterial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Salvia sahendica* in different phenological stages. *Chem. Natural Comp.*, 2007, **43** (3), 328-330.
- [27] Shah M.A., Bocso S.J.D., Mir S.A.: Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci.*, 2014, **98**, 21-33.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SAGE IN MEAT PRODUCT

Summary

The objective of the research study was to determine the effect of sage on the microbiological quality and lipid oxidation processes in a pork product after 1, 5, and 10 days of chilled storage (4 - 6 °C). Sage is a spice plant herb added, among other things, to food on account of its antioxidant and antibacterial properties. The sage was added to food products in the form of dried spice (0.5 %) and extracts (2.0 %): aque-

ous and 40- and 70%- alcoholic. The range of microbiological analyses included the determination of the total count of bacteria, psychrotrophic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and enterococci. Moreover, the TBARS values were determined.

It was found that the dried sage was characterized by the lowest antimicrobial effectiveness, because more psychrotrophic microorganisms of the *Enterobacteriaceae* and enterococci families were determined in the product containing dried sage compared to other products. Compared to the control product, the extracts of sage, both aqueous and alcoholic, effectively inhibited the growth of the majority of the assayed micro-organisms; this fact was reported with regard to the whole storage period of vacuum packed products. Furthermore, it was proved that the sage, regardless of the type of its form, could be used to inhibit the process of lipid oxidation in comminuted pork products. The TBARS values evidenced this conclusion since their levels, after a 10 day period of storing the products with sage added, were at least three times lower than those as reported for the control product.

Key words: sage, alcoholic extracts, antimicrobial activity, TBARS value ✕

ANNA MIECZKOWSKA, DARIUSZ KOKOSZYŃSKI, RAFAŁ WASILEWSKI,
ZENON BERNACKI

SKŁAD TUSZKI I JAKOŚĆ MIĘSA BAŻANTÓW ZWYCZAJNYCH (*PHASIANUS COLCHICUS COLCHICUS*) W ZALEŻNOŚCI OD PŁCI PTAKÓW

Streszczenie

Celem pracy była ocena składu tuszek i jakości mięsa 16-tygodniowych kogutów i kur bażantów rzeźnych (*Phasianus colchicus colchicus*) odchowywanych w systemie intensywnym. Badaniami objęto 80 bażantów zwyczajnych, które przez cały okres doświadczenia przebywały w pomieszczeniu zamkniętym. Ptaki żywiono *ad libitum* przemysłowymi pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi dla bażantów rzeźnych zgodnie z zaleceniami hodowlanymi. Po 16 tygodniach odchowu wybrano do uboju po 16 samców i 16 samic o masie ciała zbliżonej do średniej dla danej płci. W wieku 16 tygodni samce cechowały się istotnie ($p \leq 0,01$) większą: masą ciała (1251,4 g), masą tuszki patroszonej z szyją (870,9 g) i masą podrobów (46,7 g) w porównaniu z samicami (odpowiednio: 903,7, 628,9 i 37,9 g). Wydajność rzeźna 16-tygodniowych samców i samic bażantów była taka sama i wynosiła 69,6 %. Odsetek mięśni nóg w patroszonej tuszce samców był istotnie ($p \leq 0,05$) większy (25,2 %) niż samic (23,7 %). Płeć ptaków nie miała istotnego wpływu na wartości pH₁₅ i zmienne barwy L*, a* i b*, a także na profil kwasów tłuszczowych i udział Na, K, Zn, Mg, Ca i Fe w mięśniach piersiowych i mięśniach nóg bażantów zwyczajnych w wieku 16 tygodni. Udział kwasów tłuszczowych nienasyconych (UFA) w lipidach mięśni ocenianych ptaków był większy niż kwasów nasyconych (SFA). Mięśnie piersiowe zawierały więcej kwasów UFA niż mięśnie nóg.

Słowa kluczowe: bażant, skład tuszki, pH, barwa mięsa, kwasy tłuszczowe

Wprowadzenie

Wzrost zainteresowania żywnością o wysokiej jakości sprawia, że częściej zwraca się uwagę na mięso bażantów. Mięso tych ptaków ma cenne walory smakowe. Charak-

Mgr inż. A. Mieczkowska, dr hab. D. Kokoszyński, mgr inż. R. Wasilewski, prof. dr hab. Z. Bernacki,
Katedra Hodowli Drobiu i Oceny Surowców Zwierzęcych, Wydz. Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz.
Kontakt: annam127@wp.pl

teryzuje się wysoką wartością odżywczą, wynikającą z dużej zawartości białka i małej ilości tłuszczu. W porównaniu z mięsem kurcząt brojlerów, kaczek czy gęsi, zawiera znacznie więcej jednonienasyconych kwasów tłuszczowych [5]. Mięśnie piersiowe bażantów zawierają $29 \div 47,9$ mg cholesterolu/100 g, natomiast mięśnie nóg – $67 \div 71,3$ mg/100 g [7, 23]. Zbliżoną zawartość cholesterolu mają mięśnie piersiowe ($35,9 \div 43,1$ mg/100 g) i mięśnie nóg ($50,9 \div 76,1$ mg/100 g) kurcząt brojlerów [20, 21]. Wysoki poziom witamin B₆, B₁₂ oraz niacyny w mięsie bażantów, stanowiący odpowiednio 37, 14 i ponad 40 % dziennego zapotrzebowania człowieka [27], a także dość duża zawartość selenu i fosforu sprawiają, że mięso tych ptaków stanowi cenny artykuł spożywczy, który może konkurować z mięsem kurcząt, gęsi czy kaczek [26].

Pod względem struktury włókien mięśnie piersiowe bażantów najbardziej zbliżone są do mięśni kur perlic. Udział włókien białych w mięśni piersiowym powierzchniowym bażantów wynosi 68 %, a kur perlic – 76 %. Pozostałe włókna to włókna czerwone. Mięsień *pectoralis major* kurcząt brojlerów i kur niosek charakteryzuje się większą zawartością włókien białych (po 96 %), natomiast gęsi i przepiórek – znacznie mniejszą (odpowiednio: 17 i 13 %). W mięśniach nóg bażantów włókna białe stanowią 43 % ogółu włókien mięśniowych, kurcząt brojlerów – 56 %, kur niosek – 62 %, gęsi – 52 %, przepiórek – 55 %, kur perlic – 54 %. Mięśnie piersiowe bażantów mają delikatną strukturę włókien – średnica włókien białych (72,7 μ m) i czerwonych (47,5 μ m) jest zbliżona do średnicy włókien kurcząt brojlerów (białe – 68,2 μ m, czerwone – 48,1 μ m). Większą średnicę włókien ma mięsień piersiowy powierzchniowy kur perlic (włókna białe – 83,6 μ m, czerwone 51,0 μ m), a mniejszą – gęsi i przepiórek (odpowiednio: 57,1 i 27,0 μ m oraz 47,0 i 23,0 μ m) [14].

Odczyn mięśni piersiowych bażantów łownych mierzony 15 min od uboju ($5,70 \div 5,84$) jest zbliżony do pH₁₅ filetów piersiowych przepiórek ($5,92 \div 5,98$) i kaczek ($5,92 \div 6,00$), a mniejszy niż kurcząt brojlerów ($6,16 \div 6,26$), indyków (6,47) i gęsi ($6,12 \div 6,33$). Dużą rolę w kształtowaniu wielkości pH₁₅ mięśni piersiowych wymienionych trzech pierwszych gatunków ptaków użytkowych odgrywają jednak: ich duża podatność na stres i płochliwość. Kijowski [15] podaje, że im większa jest wartość pH, tym ciemniejsza barwa mięsa i na odwrót. Pochodzenie ptaków (gatunek, rasa, ród) jest jednym z ważniejszych czynników wpływających na wartości zmiennych barwy L* (jasność barwy), a* (natężenie barwy czerwonej) i b* (natężenie barwy żółtej). Podczas oceny instrumentalnej wykazano, że mięśnie piersiowe bażantów łownych cechuje jaśniejsza barwa (L* = $51,4 \div 52,1$) niż mięśnie pozyskane z piersi kaczek (L* = $37,9 \div 39,1$) czy gęsi (L* = 38,5), natomiast ciemniejsza – niż mięśnie kurcząt brojlerów (L* = 57,1). Pod względem natężenia barwy czerwonej mięśnie piersiowe bażantów (a* = $16,0 \div 18,8$) są zbliżone do mięśni kaczek (a* = $17,3 \div 18,8$), gęsi (a* = 17,0) i przepiórek (a* = $13,1 \div 16,0$), a znacznie przewyższają mięśnie kurcząt (a* = 1,7) i indyków (a* = 5,49). Poziom wysycenia barwą żółtą filetów piersiowych bażan-

tów ($b^* = 4,8 \div 7,0$) jest podobny jak mięśni kaczek ($b^* = 6,2 \div 7,3$) i kurcząt ($b^* = 5,2$), natomiast większy niż filetów indyków (bliskie 0) i gęsi ($b^* = 3,8$) [2, 8, 11, 17, 33].

Bażanty charakteryzuje wysoka wydajność rzeźna ($70,4 \div 73,4$ %), zbliżona do kurcząt brojlerów ($70,5 \div 73,3$ %) [9, 17, 18, 22]. Pod względem wydajności rzeźnej ustępują jedynie młodym indykom rzeźnym ($78 \div 84$ %), przewyższając kaczki brojlerzy ($67,0$ %) i młode gęsi rzeźne ($63,5$ %) [13].

Mimo dużej wartości odżywczej i dietetycznej, mięso bażancie ciągle pozostaje produktem niszowym. Wynika to głównie ze stosunkowo wysokiej ceny tuszek bażancich (w 2014 r. tuszka o masie $600 \div 800$ g kosztowała od 22 do 35 zł), która obok smaku i wartości odżywczej uważana jest za najważniejszy czynnik determinujący zakup produktu żywnościowego [28]. Czynnikiem ograniczającymi produkcję i popyt na mięso bażancie w kraju są także m.in. sezonowość produkcji bażantów rzeźnych, nieliczne grono przedsiębiorstw zajmujących się pozyskiwaniem i przetwórstwem dzicyzny, w tym mięsa bażanciego [34].

Młode bażanty rzeźne ubijane są zazwyczaj w wieku $12 \div 20$ tygodni, kiedy ważą ok. 1 kg i odznaczają się pełnym upierzeniem. Spełnienie obu tych warunków uzależnione jest od wielu czynników, z których do najważniejszych, obok wieku, zalicza się: gatunek, płeć, zastosowany sposób żywienia i utrzymania ptaków [27].

Celem niniejszej pracy była ocena jakości mięsa i tuszek 16-tygodniowych bażantów zwyczajnych utrzymywanych systemem intensywnym w zależności od płci ptaków.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiło 80 bażantów zwyczajnych (*Phasianus colchicus colchicus*). Ptaki przebywały do 16. tygodnia życia w budynku zamkniętym, w 4 kojcach o powierzchni 12 m^2 każdy (po 20 sztuk w jednym kojcu). Przez pierwsze 4 tygodnie stosowano promienniki podczerwieni. Bażanty żywiono do woli przemysłowymi pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi dla bażantów rzeźnych, stosując do 4. tygodnia życia włącznie mieszanki zawierające 26,5 % białka ogólnego i 11,8 MJ EM, a w okresie od 5. do 9. tygodnia włącznie odpowiednio: 19,0 % białka ogólnego i 12,3 MJ EM w 1 kg paszy. Od 10. do 16. tygodnia życia podawano ptakom mieszankę paszową o zawartości 18,0 % białka ogólnego i 11,5 MJ EM. W wieku 16 tygodni bażanty ważono indywidualnie na wadze elektronicznej WGJ-R do ważenia drobiu (Jotafan, Kraków, Polska) z dokładnością do 1 g. Badania wykonywano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 0127 (uchwała nr 27/2012).

Po zważeniu ptaków wybrano do uboju 16 samców i 16 samic o masie ciała zbliżonej do wartości średniej dla danej płci. Płeć ptaków określano na podstawie różnic

w barwie upierzenia. Podczas patroszenia bażantów wyodrębniano m.in. jadalne podroby, tj. serce, wątrobę i żołądek mięśniowy. Tuszki patroszone z szyją i jadalne podroby schładzano w temp. 4 °C przez 18 h. Schłodzone tuszki poddawano rozbiorowi. Dysekcję wykonywano według zaleceń Zioteckiego i Doruchowskiego [35]. Z każdej tuszki wydzielano, a następnie ważono na wadze elektronicznej Mediat 5/12 (Mediat. Zurich, Szwajcaria) z dokładnością do 0,1 g: szyję bez skóry, skrzydła ze skórą, mięśnie piersiowe, mięśnie nóg, tłuszcz sadelkowy, skórę z tłuszczem podskórnym i pozostałości tuszki. Na tej samej wadze określano również masę podrobów, tj. łączną masę serca, wątroby i żołądka mięśniowego. Po zważeniu elementów tuszki określano ich udział [%] w masie tuszki patroszonej z szyją.

Przed rozbiorem tuszki, 15 min od uboju ptaków oznaczano pH mięśni piersiowych i mięśni nóg. Pomiary pH_{15} mięśni wykonywano za pomocą pH-metru pH-Star CPU, wyposażonego w zespoloną szklaną elektrodę do badania pH mięsa (Ingenierburno R. Matthäus, Nobitz, Niemcy). Elektrodę umieszczano pod kątem 45 ° w połowie grubości mięśnia. Wartości pH odczytywano na wyświetlaczu elektronicznym z dokładnością do 0,01 [29]. Za pomocą fotokolorymetru CR310 firmy Minolta (Konica Minolta, Japonia) określano parametry barwy L^* , a^* i b^* na wewnętrznej powierzchni surowych mięśni piersiowych i nóg 16-tygodniowych bażantów, 24 h od uboju. Stosowano iluminację szerokokątową, geometria 0° kąt projekcji, obszar pomiarowy o średnicy 50 mm, źródło światła D_{65} . Miernik kalibrowano przy użyciu białej płytki wzorcowej CR310 o danych kalibracyjnych $Y = 92,80$, $x = 0,3175$ i $y = 0,3333$.

W pobranych po dysekcji próbkach mięśni piersiowych i mięśni nóg oznaczano skład i strukturę kwasów tłuszczowych we frakcji lipidowej oraz zawartość niektórych składników mineralnych. Analizę składu kwasów tłuszczowych wykonywano metodą chromatograficzną po przeprowadzeniu ich w estry metylowe, przy użyciu chromatografu gazowego firmy Varian 3800 GC, wyposażonego w detektor FID. Zastosowano kolumnę Supercowax o długości 30 m, temperatura detektora wynosiła 250 °C, a dozownika – 230 °C. Do identyfikacji estrów metylowych wykorzystano wzorce Supelco PUFA-2 Animal Source oraz Supelco 37 component FAME MIX. Zawartość składników mineralnych oznaczano zgodnie z PN-EN 14084:2003 [30] i PN-EN 15505:2008 [31]. W celu oznaczenia zawartości Na, K, Zn, Mg, Ca, i Fe próbki poddawano liofilizacji i mineralizacji na mokro w mineralizatorze mikrofalowym Ethos Plus (Milestone, Sorisole, Włochy). Analizę prób wykonywano techniką płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS) w aparacie Solaar 969, firmy Unicam (Thermo Electron Corporation, USA).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu komputerowego SAS [32]. Istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem Tukeya ($p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$).

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. zestawiono dane dotyczące masy ciała, wydajności rzeźnej i składu tuszki 16-tygodniowych bażantów zwyczajnych. Samce, w porównaniu z samicami, charakteryzowały się istotnie ($p \leq 0,01$) większą średnią masą ciała przed ubojem (1251,4 g) i masą tuszki (870,9 g). Uzyskane wartości obu omawianych cech były większe niż w ocenie Biesiady-Drzazgi i wsp. [2], przeprowadzonej na bażantach łownych odchowanych w systemie wolierowym i żywionych w końcowym okresie odchovu paszami gospodarskimi.

Tabela 1. Masa ciała, wydajność rzeźna i skład tuszki 16-tygodniowych bażantów, w zależności od ich płci

Table 1. Body weight, dressing percentage, and carcass composition of 16-week-old pheasants depending on their sex

Masa tuszki i elementów tuszki Weight of carcass and carcass elements	Samce / Males (n = 16)		Samice / Females (n = 16)	
	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
Masa ciała przed ubojem[g] Body weight before slaughter [g]	1251,4 ^A	19,9	903,7 ^B	18,8
Masa tuszki [g] / Carcass weight [g]	870,9 ^A	9,2	628,9 ^B	24,3
Wydajność rzeźna [%] Dressing percentage [%]	69,6	2,2	69,6	1,3
Szyja [%] / Neck [%]	4,6	0,4	4,3	0,3
Skrzydła [%] / Wings [%]	11,0	0,8	11,7	0,7
Mięśnie piersiowe [%] Breast muscles [%]	33,1	1,6	31,7	1,1
Mięśnie nóg [%] / Leg muscles [%]	25,2 ^a	0,8	23,7 ^b	1,1
Skóra z tłuszczem podskórnym [%] Skin with subcutaneous fat [%]	6,1	1,4	7,2	1,2
Tłuszcz sadelkowy [%] Abdominal fat [%]	0,2	0,1	0,2	0,2
Pozostałości tuszki [%] Carcass leftovers [%]	19,8	1,6	21,2	1,1
Podroby [g] / Giblets [g]	46,7 ^A	5,5	37,9 ^B	3,5

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie (\bar{x}) \pm odchylenia standardowe (s) / Table shows mean values (\bar{x}) and standard deviations (SD); a, b (A, B) – wartości średnie poszczególnych cech samców i samic oznaczone małymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ ($p \leq 0,01$) / mean values of individual traits of males and females, denoted using small letters, differ statistically significantly at $p \leq 0,05$ ($p \leq 0,01$).

Jak podają Górecki i wsp. [10], 16-tygodniowe samce i samice bażantów zwyczajnych ważą od 999,8 (♀) do 1349,4 g (♂). Wydajność rzeźna badanych ptaków,

niezależnie od płci, wynosiła 69,6 % i była mniejsza niż bażantów ocenianych we wcześniejszych eksperymentach [1, 18, 22]. Ci sami autorzy stwierdzili jednak większe wartości wydajności rzeźnej samców niż samic, czego nie stwierdzono w niniejszych badaniach. Wykazano większy udział mięśni piersiowych i mięśni nóg w przypadku samców (33,1 i 25,2 %), w porównaniu z samicami (odpowiednio: 31,7 i 23,7 %). Udział szyi w tuszce patroszonej samców był większy niż w tuszce samic, natomiast odsetek skóry z tłuszczem podskórnym i pozostałości tuszki – na odwrót. Samce charakteryzowały się również istotnie ($p \leq 0,01$) większą masą podrobów niż samice. Pod względem zawartości mięśni piersiowych i mięśni nóg oceniane bażanty były najbardziej zbliżone do młodych indyków rzeźnych i kurcząt brojlerów, przewyższając znacząco kaczki brojlery i młode gęsi rzeźne [6, 17, 18, 19].

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne mięśni piersiowych i mięśni nóg 16-tygodniowych bażantów, w zależności od ich płci

Table 2. Physical-chemical properties of breast and leg muscles of 16-week-old pheasants depending on their sex

Cecha Trait	Symbol próbki Sample sign	Samce / Males (n = 16)		Samice / Females (n = 16)	
		\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
pH ₁₅	MP	5,91	0,15	5,91	0,17
pH ₁₅	MN	6,50	0,13	6,56	0,15
L* – jasność barwy	MP	50,5	3,4	49,9	4,1
L* – colour brightness	MN	42,9	1,2	43,7	2,1
a* – natężenie barwy czerwonej	MP	15,6	0,9	16,5	1,2
a* – red colour intensity	MN	17,3	1,2	16,6	0,9
b* – natężenie barwy żółtej	MP	5,5	3,1	5,2	3,3
b* – yellow colour intensity	MN	2,1	0,8	2,0	1,5

Objaśnienia / Explanatory notes:

MP – mięśnie piersiowe / breast muscles; MN – mięśnie nóg / leg muscles; W tabeli przedstawiono wartości średnie (\bar{x}) \pm odchylenia standardowe (s) / Table shows mean values (\bar{x}) and standard deviations (SD).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych ($p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$) różnic w odniesieniu do właściwości fizykochemicznych mięśni piersiowych i mięśni nóg między 16-tygodniowymi samcami i samicami bażantów (tab. 2). Wartości pH₁₅ były wyższe w mięśniach nóg ($\sigma - 6,50$; $\text{♀} - 6,56$) niż w mięśniach piersiowych (σ i ♀ po 5,91), co związane jest z mniejszą zawartością glikogenu w mięśniach nóg wykazujących większą aktywność ruchową przed ubojem bażantów. Według Kijowskiego [15] wielkość pH₁₅ mięsa drobiowego jest dobrym syntetycznym wskaźnikiem jego jakości, pozwala-

jącym na rozróżnienie mięsa normalnego od mięsa z wadą PSE lub DFD. Uzyskane w badaniach własnych wartości pH mięśni były zbliżone do wyników przedstawionych przez Kokoszyńskiego i wsp. [18]. Z kolei Kuźniacka i wsp. [24] wskazują na wartość pH_{15} nieprzekraczającą 5,0 w obu rodzajach mięśni. Mięśnie piersiowe, w porównaniu z mięśniami nóg, charakteryzowały się jaśniejszą barwą ($L^* = 49,9 \div 50,5$), ponad dwukrotnie większym natężeniem barwy żółtej ($b^* = 5,2 \div 5,5$), a jednocześnie mniejszym wysyceniem barwy czerwonej ($a^* = 15,6 \div 16,5$). Ma to potwierdzenie w badaniach innych autorów [18, 24] i wynika prawdopodobnie z mniejszej zawartości mioglobiny i słabszego unaczynienia mięśni piersiowych niż mięśni nóg. Kokoszyński i wsp. [18] stwierdzili większe wartości L^* , a^* i b^* mięśni piersiowych bażantów niż

Tabela 3. Profil kwasów tłuszczowych lipidów mięśni piersiowych i mięśni nóg 16-tygodniowych bażantów, w zależności od ich płci

Table 3. Fatty acid profile of breast and leg muscle lipids of 16-week-old pheasants depending on their sex

Kwasy tłuszczowe Fatty acids	Symbol próbki Sample sign	Samce / Males (n = 16)		Samice / Females (n = 16)	
		\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
C14:0 – mirystynowy Miristic – C14:0	MP	0,53	0,22	0,58	0,16
	MN	0,72	0,24	0,83	0,23
C16:0 – palmitynowy Palmitic – C16:0	MP	30,46	2,34	29,60	2,56
	MN	28,24	3,61	29,80	5,11
C16:1 – palmitooleinowy Palmitoleic – C16:1	MP	3,68	2,00	4,59	1,44
	MN	4,46	1,73	5,44	0,91
C17:0 – heptadekanowy Heptadecanoic – C17:0	MP	0,21	0,04	0,18	0,03
	MN	0,21	0,04	0,19	0,05
C18:0 – stearynowy Stearic – C18:0	MP	6,28	1,92	10,45	2,57
	MN	15,96	6,39	13,21	6,81
C18:1 – oleinowy Oleic – C18:1	MP	32,82	4,08	28,96	6,73
	MN	29,53	5,00	30,18	5,52
C18:2 – linolowy Linoleic – C18:2	MP	22,31	5,21	22,02	8,18
	MN	16,40	6,77	16,84	6,99
C18:3 – linolenowy Linolenic – C18:3	MP	1,10	0,42	0,84	0,37
	MN	0,40	0,31	0,51	0,18
C20:4 – arachidonowy Arachidonic – C20:4	MP	2,61	1,22	2,78	1,73
	MN	4,08	2,58	3,00	1,19

Objaśnienia / Explanatory notes:

MP – mięśnie piersiowe / breast muscles; MN – mięśnie nóg / leg muscles; W tabeli przedstawiono wartości średnie (\bar{x}) \pm odchylenia standardowe (s) / Table shows mean values (\bar{x}) and standard deviations (SD).

uzyskane w ocenie własnej. Mięśnie piersiowe badanych bażantów cechowało pH₁₅ zbliżone do odczynu filetów przepiórek i kaczek, oznaczone 15 min od uboju [12, 31].

Tabela 4. Struktura kwasów tłuszczowych lipidów mięśni piersiowych i mięśni nóg 16-tygodniowych bażantów, w zależności od ich płci

Table 4. Structure of fatty acids in breast and leg muscle lipids of 16-week-old pheasants depending on their sex

Kwasy tłuszczowe Fatty acids	Symbol próbki Sample sign	Samce / Males (n = 16)		Samice / Females (n = 16)	
		\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
Kwasy nasycone [%] Saturated acids [%] – SFA	MP	37,48	5,14	40,81	9,86
	MN	45,13	2,53	44,03	7,05
Kwasy nienasycone [%] Unsaturated acids [%] – UFA	MP	62,52	5,14	59,19	9,86
	MN	54,87	2,53	55,97	11,04
Kwasy jednonienasycone [%] Monounsaturated acids [%] – MUFA	MP	36,50	3,19	33,55	4,89
	MN	33,99	3,58	35,62	6,69
Kwasy wielonienasycone [%] Polyunsaturated acids [%] – PUFA	MP	26,02	5,33	25,64	8,87
	MN	20,88	4,67	20,35	5,35
Stosunek UFA/ SFA UFA to SFA ratio	MP	1,67 ^a	0,67	1,45 ^b	0,39
	MN	1,22	0,19	1,27	0,51
Stosunek PUFA/ SFA PUFA to SFA ratio	MP	0,69	0,18	0,63	0,25
	MN	0,46	0,17	0,46	0,15
DFA (UFA + C _{18:0}) Hipocholesterolemiczne Hypocholesterolemic [%]	MP	66,96	5,04	62,89	4,82
	MN	79,13 ^a	7,26	67,28 ^b	6,23
OFA (C _{14:0} + C _{16:0}) Hipercholesterolemiczne Hypercholesterolemic [%]	MP	30,99	3,01	30,18	4,12
	MN	28,96	2,74	30,63	4,64

Objaśnienia / Explanatory notes:

MP – mięśnie piersiowe / breast muscles; MN – mięśnie nóg / leg muscles; W tabeli przedstawiono wartości średnie (\bar{x}) ± odchylenia standardowe (s) / Table shows mean values (\bar{x}) and standard deviations (SD); a, b – wartości średnie kwasów tłuszczowych samców i samic oznaczone małymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values of fatty acids in males and females, denoted using small letters, differ statistically significantly ($p \leq 0.05$).

O jakości mięsa w dużej mierze decyduje zawartość kwasów tłuszczowych, szczególnie tych najbardziej pożądanych – nienasyconych. Wykazano, że samce i samice nie różniły się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$) pod względem zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych lipidów (tab. 3). Mięśnie nóg, niezależnie od płci, charakteryzowały się większą zawartością kwasów: mirystynowego, palmitoleinowego, stearynowego, arachidonowego, natomiast mięśnie piersiowe zawierały więcej kwasu linolowego i linolenowego. Na uwagę zasługuje poziom kwasu steary-

nowego, który w badaniach własnych był wyraźnie niższy od uzyskanego przez Kotowicza i wsp. [22]. Udziałem kwasu palmitynowego i oleinowego mięśnie piersiowe samców przewyższały mięśnie nóg. Odwrotną tendencję obserwowano w odniesieniu do samic.

Niezależnie od płci, mięśnie nóg 16-tygodniowych bażantów charakteryzowały się wyższym poziomem kwasów nasyconych, natomiast mięśnie piersiowe zawierały więcej kwasów nienasyconych, w tym więcej kwasów jednonienasyconych (tab. 4). Prawidłowość taka znajduje potwierdzenie w badaniach innych autorów [22, 25]. Udział kwasów DFA (♂ – 66,96 %, ♀ – 62,89 %) i stosunek nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) do nasyconych (SFA) były większe w mięśniach piersiowych samców (1,67), w porównaniu z samicami (1,45). Istotne zróżnicowanie stwierdzono w przypadku stosunku kwasów UFA/SFA. Litwińczuk i wsp. [25] wskazują na wyższy niż w badaniach własnych stosunek UFA/SFA (1,64) w mięśniach piersiowych samic bażantów.

Tabela 5. Zawartość niektórych składników mineralnych w mięśniach piersiowych i mięśniach nóg 16-tygodniowych bażantów, w zależności od ich płci

Table 5. Content of some minerals in breast and leg muscles of 16-week-old pheasants depending on their sex

Zawartość składników mineralnych [g/kg s.m.] Content of minerals [g/kg d.m.]	Symbol próbki Sample sign	Samce / Males (n = 16)		Samice / Females (n = 16)	
		\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
Na	MP	1,76	0,62	1,75	0,74
Na	MN	2,27	0,37	2,50	0,45
K	MP	13,23	1,24	12,66	0,80
K	MN	12,72	0,84	11,05	3,99
Zn	MP	0,04	0,02	0,07	0,11
Zn	MN	0,07	0,02	0,07	0,02
Mg	MP	1,01	0,13	0,69	0,47
Mg	MN	0,94	0,14	0,86	0,22
Ca	MP	0,09	0,08	0,18	0,17
Ca	MN	0,11	0,06	0,21	0,55
Fe	MP	0,07	0,03	0,06	0,02
Fe	MN	0,11	0,03	0,10	0,03

Objaśnienia / Explanatory notes:

MP – mięśnie piersiowe / breast muscles; MN – mięśnie nóg / leg muscles; W tabeli przedstawiono wartości średnie (\bar{x}) \pm odchylenia standardowe (s) / Table shows mean values (\bar{x}) and standard deviations (SD).

Mięśnie nóg w porównaniu z piersiowymi charakteryzowały się wyższym poziomem sodu, wapnia i żelaza (tab. 5). Pod względem udziału wapnia w mięśniach piersiowych i mięśniach nóg samice dwukrotnie przewyższały samce. Poziom cynku w mięśniach 16-tygodniowych bażantów, niezależnie od płci wynosił 0,07 g. Mięśnie samców cechowała większa zawartość magnezu ($0,94 \div 1,01$ g/kg s.m.), w porównaniu z samicami ($0,69 \div 0,86$ g/kg s.m.). Mięśnie piersiowe ptaków zawierały więcej potasu niż mięśnie nóg, przy czym większą zawartością tego pierwiastka charakteryzowało się mięso samców. Jego udział w mięśniach 16-tygodniowych bażantów był najwyższy spośród wszystkich badanych składników mineralnych. Wykazane różnice zawartości oznaczonych składników mineralnych w mięśniach piersiowych i nóg między samcami i samicami bażantów nie były jednak potwierdzone statystycznie ($p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$). Filety piersiowe ocenianych bażantów zwyczajnych zawierały mniej żelaza, sodu i potasu niż mięso z piersi kaczek i perlic [3, 16].

Wnioski

1. Odchów bażantów zwyczajnych systemem intensywnym (pasze przemysłowe, budynek zamknięty) do 16. tygodnia życia umożliwił uzyskanie ptaków cechujących się dużą masą ciała (σ 1251,4 g, ϕ 903,7 g) i wydajnością rzeźną na poziomie 69,6 %.
2. Tuszki 16-tygodniowych bażantów charakteryzowało bardzo dobre umięśnienie, wyrażone ponad 31-procentowym udziałem mięśni piersiowych i 23-procentowym udziałem mięśni nóg.
3. Płeć ptaków nie miała istotnego wpływu na wartość cech fizykochemicznych, profil kwasów tłuszczowych lipidów mięśni piersiowych i nóg oraz udział w nich wybranych składników mineralnych. Mięśnie piersiowe 16-tygodniowych bażantów charakteryzowały się większą zawartością kwasów nienasyconych, a mniejszą zawartością wapnia, sodu i żelaza niż mięśnie nóg.

Praca została wykonana w ramach badań statutowych jednostki (BS-13/2009) finansowanych ze środków budżetu państwa.

Literatura

- [1] Adamski M., Kuźniacka J.: The effect of age and sex on slaughter traits of pheasants (*Phasianus colchicus* L.). Anim. Sci. Pap. Rep., 2006, **24**, 11-18.
- [2] Ali S., Kang G.H., Yang H.S., Jeong J.Y., Hwang Y.H., Park G.B., Joo S.T.: A comparison of meat characteristics between duck and chicken breast. Asian Australas. J. Anim. Sci., 2007, **6 (20)**, 1002-1006.
- [3] Bernacki Z., Bawej M., Kokoszyński D.: Quality of meat from two guinea fowl (*Numida meleagris*) varieties. Arch. Geflügelk., **3 (76)**, 203-207.

- [4] Biesiada-Drzazga B., Socha S., Janocha A., Banaszkiwicz T., Koncerewicz A.: Ocena wartości rzeźnej i jakości mięsa bażantów łownych (*Phasianus colchicus*). Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2011, **1 (74)**, 79-86.
- [5] Brudnicki A., Kułakowska A.: Różnice w składzie aminokwasowym mięśnia piersiowego *Phasianus colchicus* i *Phasianus colchicus* var. *tenebrosus*. Pr. Kom. Nauk Rol. BTN, 2010, **B 68**, 7-11.
- [6] Chodová D., Tůmová E., Svobodová J., Uhlířová L.: Differences in carcass composition of males and females of two turkey hybrids. Acta Fytotechn. Zootechn., 2014, **3 (17)**, 72-74.
- [7] Franco D., Lorenzo J.M.: Meat quality and nutritional composition of pheasant (*Phasianus colchicus*) reared in an extensive system. Brit. Poult. Sci., 2013, **4 (54)**, 592-602.
- [8] Fraqueza M.J., Cardoso A.S., Ferreira M.C., Barreto A.S.: Incidence of pectoralis major turkey muscles with light and dark color in a Portuguese slaughterhouse. Poult. Sci., 2006, **8 (85)**, 1992-2000.
- [9] Gornowicz E., Lewko L., Pietrzak M., Gornowicz J.: The effect of broiler chicken origin on carcass and muscle yield and quality. J. Cent. Eur. Agric., 2009, **3 (10)**, 193-200.
- [10] Górecki T.M., Nowaczewski S., Kontecka H.: Body weight and some biometrical traits of ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*) at different ages. Folia Biol., 2012, **60**, 79-84.
- [11] Gumulka M., Wojtysiak D., Kapkowska E., Połtowicz K., Rabsztyń A.: Microstructure and technological meat quality of geese from conservation flock and commercial hybrids. Ann. Anim. Sci., 2009, **2 (9)**, 205-213.
- [12] Heo K.N., Hong E.C., Kim C.D., Kim H.K., Lee M.J., Choo H.J., Choi H.C., Mushtaq N.M.H., Parvin R., Kim J.H.: Growth performance, carcass yield, and quality and chemical traits of meat from commercial Korean native ducks with 2-way crossbreeding. Asian Australas. J. Anim. Sci., 2015, **3 (28)**, 382-390.
- [13] Jankowski J.: Mięśne użytkowanie drobiu. W: Hodowla i użytkowanie drobiu. Red. E. Świerczewska. Wyd. SGGW, Warszawa 1994, ss. 173-183.
- [14] Kiessling K.H.: Muscle structure and function in the goose, quail, pheasant, guinea hen and chicken. Comp. Biochem. Physiol., 1977, **57 B**, 287-292.
- [15] Kijowski J.: Czynniki przyżyciowe wpływające na jakość mięsa drobiowego. W: Mięso i przetwory drobiowe. Red. T. Grabowski i J. Kijowski. WNT, Warszawa 2004, ss. 170-183.
- [16] Kokoszyński D., Bernacki Z.: Comparison of meat traits in ducks from two conservative flocks. Arch. Tierz., 2010, **4 (53)**, 484-493.
- [17] Kokoszyński D., Bernacki Z., Korytkowska H., Krajewski K., Skrobiszewska L.: Carcass composition and physicochemical and sensory properties of meat from broiler chickens of different origin. J. Centr. Eur. Agric., 2013, **2 (14)**, 781-793.
- [18] Kokoszyński D., Bernacki Z., Duszyński Ł.: Body conformation, carcass composition and physicochemical and sensory properties of meat from pheasants of different origin. Czech J. Anim. Sci., 2012, **3 (57)**, 115-124.
- [19] Kokoszyński D., Bernacki Z., Grabowicz M., Stańczak K.: Effect of corn silage and quantitative feed restriction on growth performance, body measurements, and carcass tissue composition in White Kołuda W31 geese. Poult. Sci., **8 (93)**, 1993-1999.
- [20] Komprda T., Zelenka J., Tieffová P., Štohandlová M., Foltyn J.: Effect of the growth intensity on cholesterol and fatty acids content in broiler chicken tissues. Arch. Geflügelkd., 1999, **1 (63)**, 36-43.
- [21] Komprda T., Zelenka J., Tieffová P., Štohandlová M., Foltyn J., Fajmová E.: Effect of age on total lipid, cholesterol and fatty acids content in tissues of fast and slow growing chickens. Arch. Geflügelkd., 2000, **3 (64)**, 121-128.
- [22] Kotowicz M., Lachowicz K., Lisiecki S., Szczygielski M., Żych A.: Characteristics of common pheasant (*Phasianus colchicus*) meat. Arch. Geflügelkd., 2012, **4 (76)**, 270-276.
- [23] Kuźniacka J.: Ocena cech reprodukcyjnych i mięsnych bażantów łownych (*Phasianus colchicus* L.). Wyd. ATR, Bydgoszcz 2005.
- [24] Kuźniacka J., Adamski M., Bernacki Z.: Effect of age and sex of pheasants (*Phasianus colchicus* L.) on selected physical properties and chemical composition of meat. Ann. Anim. Sci., 2007, **1 (7)**, 45-53.

- [25] Litwińczuk A., Dziedzic R., Litwińczuk Z., Grodzicki T., Kędzierska-Matysek M.: Comparison of nutritional value of meat of wild and farm pheasants. *Fleischwirtschaft Intern.*, 2007, **2** (22), 50-52.
- [26] Łukasiewicz M., Michalczuk M., Głogowski R., Balcerak M., Popczyk B.: Carcass efficiency and fatty acid content of farmed pheasants (*Phasianus colchicus*) meat. *Ann. Warsaw Univ. of Life Sci. – SGGW, Anim. Sci.*, 2011, **49**, 199-203.
- [27] Nowaczewski S.: Cechy rzeźne oraz charakterystyka mięsa bażantów łownych. *Polskie Drobiarstwo*, 2010, **5**, 52-55.
- [28] Nowak M., Trziska T.: Zachowanie konsumentów na rynku mięsa drobiowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **1** (68), 144-120.
- [29] PN-ISO 2917:2001/Ap1:2002P. Mięso i przetwory mięsne. Pomiar pH. Metoda odwoławcza.
- [30] PN-EN 14084:2003. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie pierwiastków śladowych. Oznaczanie zawartości ołowiu, kadmu, cynku, miedzi i żelaza metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) po mineralizacji mikrofalowej.
- [31] PN-EN 15505:2008. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie pierwiastków śladowych. Oznaczanie zawartości sodu i magnezu metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) po mineralizacji mikrofalowej.
- [32] SAS Institute Inc. SAS/STAT User's guide, 2003, version 9.1.
- [33] Wilkanowska A., Kokoszyński D.: Comparison of slaughter value in Pharaoh quail of different ages. *J. Cent. Eur. Agric.*, 2011, **1** (12), 145-154.
- [34] Ziemińska A., Krasnowska G.: Zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego w obrocie tuzzkami zwierząt łownych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **1** (50), 16-25.
- [35] Ziółcki J., Doruchowski W.: Metody oceny wartości rzeźnej drobiu. Wyd. COBRD, Poznań 1989.

CARCASS COMPOSITION AND MEAT QUALITY OF COMMON PHEASANTS (*PHASIANUS COLCHICUS COLCHICUS*) DEPENDING ON SEX OF BIRDS

S u m m a r y

The objective of the research study was to evaluate the carcass composition and meat quality of 16-week-old male and female meat pheasants (*P. colchicus colchicus*) reared using an intensive breeding system. The research study comprised 80 common pheasants, which were penned in a confined space throughout the entire experiment. The birds were fed *ad libitum* complete commercial diets for meat pheasants in accordance with the breeding instructions. After a 16 week rearing period, 16 males and 16 females with the body weight close to the mean weight of each sex were selected for slaughter. At the age of 16 weeks, the males were characterized by a significantly ($p \leq 0.01$) higher weight of: body (1251.4 g), eviscerated carcass with neck (870.9 g), and giblets (46.7 g) compared to the females (903.7, 628.9 and 37.9 g, respectively). The dressing percentage values of the 16-week-old male and female pheasants were alike and equalled to 69.6 %. The leg muscle percentage in eviscerated carcass of the males was significantly higher (25.2 %) than that of the females (23.7 %). The sex of the birds had no significant effect on the pH₁₅ value, L*, a* and b* colour coordinates, fatty acid profile, nor on the percent rate of Na, K, Zn, Mg, Ca and Fe in the breast and leg muscles of the pheasants aged 16 weeks. The percent rate of unsaturated fatty acids (UFA) in the muscle lipids of the birds studied was higher than that of the saturated fatty acids (SFA). The breast muscles contained more UFA than the leg muscles.

Key words: pheasant, carcass composition, pH, meat colour, fatty acids ☒

AGNIESZKA RĘKAS, KATARZYNA WIŚNIEWSKA,
MAŁGORZATA WRONIAK

WPLYW OGRZEWANIA MIKROFALOWEGO NASION RZEPAKU NA WYDAJNOŚĆ I JAKOŚĆ WYTŁOCZONEGO OLEJU

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu wstępnej obróbki termicznej nasion rzepaku z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego na wydajność, właściwości fizykochemiczne i cechy sensoryczne uzyskanego oleju typu *virgin*. Odmiany rzepaku ozimego ‘Kana’ i ‘Bakara’ nawilżano do wilgotności 6,5 i 8,5 %, następnie ogrzewano w kuchence mikrofalowej (800 W, 2450 MHz) przez 3 i 7 min, po czym olej tłoczono w prasie ślimakowej Farmer 10. Otrzymane oleje oceniano pod względem: stopnia hydrolizy (LK), pierwotnego (LOO) i wtórnego stopnia utlenienia (LA), zawartości sprzężonych dienów i trienów, stabilności oksydacyjnej w teście Rancimat – w temp. 130 °C, zawartości barwników karotenoidowych i chlorofilowych. Przeanalizowano również wpływ ogrzewania mikrofalowego na kształtowanie się smaku i zapachu otrzymanych olejów typu *virgin* (metodą profilowania), oceniono również stopień ich akceptacji konsumenckiej.

Wykazano, że ogrzewanie mikrofalowe nasion rzepaku, po uprzednim ich nawilżeniu, wpłynęło na zwiększenie wydajności tłoczenia oleju w stosunku do próby kontrolnej. Największy wzrost wydajności tłoczenia stwierdzono w olejach z nasion o wilgotności 8,5 %, ale ogrzewanych w krótszym czasie (3 min). W przypadku nasion odmiany ‘Bakara’ wydajność tłoczenia była większa o 19 %, a odmiany ‘Kana’ – o 16 %. Wymienione oleje charakteryzowały się najwyższym stopniem akceptacji konsumenckiej spośród olejów z nasion ogrzewanych (‘Bakara’ – 5,4 j.u.; ‘Kana’ – 5,5 j.u.). Równocześnie zaobserwowano obniżenie jakości fizykochemicznej tych olejów, przy jednoczesnym podwyższeniu stabilności oksydacyjnej w teście Rancimat (‘Bakara’ z 1,8 do 5,7 h; ‘Kana’ z 2,3 do 5,1 h). Ogrzewanie nasion o mniejszej wilgotności (6,5 %), ale dłużej (7 min) wywarło największy wpływ na zmniejszenie wydajności tłoczenia, obniżenie stopnia akceptacji konsumenckiej oraz obniżenie jakości fizykochemicznej olejów.

Słowa kluczowe: nasiona rzepaku, ogrzewanie mikrofalowe, tłoczenie, olej rzepakowy, właściwości fizykochemiczne, jakość sensoryczna

Mgr inż. A. Rękas, mgr inż. K. Wiśniewska, dr hab. inż. M. Wroniak, Katedra Technologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-787 Warszawa. Kontakt: malgorzata_wroniak@sggw.pl

Wprowadzenie

Wstępna obróbka hydrotermiczna nasion oleistych jest bardzo ważnym etapem procesu pozyskiwania oleju. W przemyśle olejarskim stosuje się kondycjonowanie wstępne (temp. $30 \div 40$ °C), które ma na celu ujednoczenie temperatury i wilgotności masy nasiennej i zapewnienie prawidłowego przebiegu procesu rozdrabniania. Z kolei kondycjonowanie zasadnicze (prażenie) miazgi nasiennej (temp. $80 \div 100$ °C) ma ułatwić wydobycie tłuszczu, a tym samym zwiększyć wydajność tłoczenia [10].

Prowadzone są badania nad możliwością zastosowania innych, alternatywnych metod wstępnej obróbki termicznej nasion rzepaku, które są mniej czasochłonne i wymagają mniejszych nakładów energii. Wśród tych metod wyróżnia się obróbka termiczna z wykorzystaniem mikrofal, która w porównaniu z klasycznym konwekcyjnym ogrzewaniem zapewnia uzyskanie wyższej temperatury (powyżej 160 °C) w krótszym czasie (tylko kilka minut) [1, 23, 30].

Mikrofale to rodzaj promieniowania elektromagnetycznego o częstotliwości drgań od 300 MHz do 300 GHz, co odpowiada długości fal od 1 m do 1 mm. Przy przetwarzaniu żywności najczęściej wykorzystuje się dwa zakresy: 915 i 2450 MHz [26, 34]. Mechanizm ogrzewania nasion w wyniku działania mikrofal polega na oddziaływaniu związków polarnych (w szczególności wody i oleju) i jonów z polem elektromagnetycznym. Pod wpływem mikrofal dipole cząsteczek wody ulegają rotacji i oscylują, a przyspieszane w polu elektromagnetycznym jony przemieszczają się zgodnie z kierunkiem zmiennego pola elektrycznego, zderzają się z cząsteczkami wody i przekazują im energię kinetyczną. Tarcie wewnętrzne powstające w wyniku tych zjawisk generuje ciepło prowadzące do ogrzania produktu [12, 28]. Mikrofałe przenikające przez produkt ogrzewają go wewnątrz, w wyniku czego następuje częściowe odparowanie wody z wnętrza nasion, czemu towarzyszy wzrost ciśnienia wewnątrzkomórkowego. Mechaniczna dezintegracja struktury komórkowej potęgowana obniżeniem ciśnienia oraz towarzyszącym mu rozpadem membran komórkowych zwiększa powierzchnię wypływu oleju z nasion, przyczyniając się do podwyższenia wydajności tłoczenia [2, 33]. Ogrzewanie mikrofalowe nasion rzepaku, poprzedzające operację tłoczenia, pozwala nie tylko na zwiększenie wydajności tego procesu, ale również, dzięki intensywnej wymianie masy i ciepła oraz dostarczaniu energii bezpośrednio do materiału, sprzyja skróceniu czasu ogrzewania, czemu towarzyszy mniejsze zużycie energii [1, 2, 29].

Obróbka termiczna nasion rzepaku przed tłoczeniem, z zastosowaniem ogrzewania mikrofalowego, prowadzona jest głównie w celu określenia wpływu tego rodzaju ogrzewania na wydajność procesu tłoczenia, jakość wytłoczonego oleju, zawartość związków wykazujących działanie przeciwutleniające oraz ich wpływu na wartość odżywczą i stabilność oksydacyjną oleju [1, 2, 7, 11, 23, 33]. Podczas analizy składu oleju rzepakowego uzyskanego z nasion poddanych obróbce termicznej obserwuje się

zmiany zarówno korzystne, jak i niepożądane. Dzięki większej ekstraktywności związków biologicznie czynnych: tokoferoli, steroli, fosfolipidów, związków fenolowych oraz dzięki powstawaniu nowych związków o właściwościach przeciwutleniających, np. kanololu – 4-vinylo-2,6-dimetoksyfenolu (powstającego w wyniku dekarboksylacji kwasu synapinowego) czy produktów reakcji Maillarda, a także w wyniku inaktywacji enzymów i mikroorganizmów z powierzchni nasion, następuje wzrost stabilności oksydacyjnej badanych olejów, jak również podwyższenie ich wartości żywieniowej. Czas indukcji olejów w teście Rancimat może być nawet do ośmiu razy dłuższy w porównaniu z czasem olejów tłoczonych na zimno [1, 10]. Obróbka termiczna nasion rzepaku może być jednak przyczyną wielu niekorzystnych zmian zachodzących we frakcji lipidowej, objawiających się zarówno zwiększonym stopniem hydrolizy oleju, jak również powstawaniem pierwotnych i wtórnych produktów utleniania. Ponadto obserwuje się pociemnienie barwy oleju z nasion uprzednio ogrzewanych, w wyniku wyższej ekstraktywności i termicznej degradacji barwników chlorofilowych i karotenoidowych. Ciemniejsza barwa oleju może być spowodowana również obecnością produktów nieenzymatycznego brunatnienia i termicznej degradacji fosfolipidów [1, 2, 7, 11, 24, 28].

Celem pracy było określenie wpływu wstępnej obróbki termicznej nasion rzepaku z zastosowaniem ogrzewania mikrofalowego na wydajność, właściwości fizykochemiczne i cechy sensoryczne wytłoczonego oleju typu *virgin*.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym były nasiona dwóch odmian rzepaku ozimego „00”: ‘Bakara’ i ‘Kana’ (Hodowla Roślin Strzelce, grupa IHAR) pochodzące ze zbiorów z 2013 r. Użyte w pracy nasiona rzepaku były czyste, zdrowe i nieuszkodzone. Ilość zanieczyszczeń w każdej z odmian wynosiła poniżej 1 %. Nasiona rzepaku nawilżano do wilgotności 6,5 i 8,5 %, pakowano w torebki z tworzywa sztucznego i przechowywano przez dobę w warunkach chłodniczych (temp. 4 ± 2 °C) w celu wyrównania stopnia nawilżenia. Następnie nasiona poddawano ogrzewaniu mikrofalowemu (800 W, 2450 MHz) w kuchence mikrofalowej przez 3 i 7 min. Ogrzewanie surowca ($2 \times 0,5$ kg nasion) prowadzono w szklanym naczyniu w cienkiej warstwie, bez przykrycia, z mieszaniem w połowie danego czasu, na koniec dokonywano pomiaru temperatury masy nasion bezdotykowym termometrem laserowym, typ KC 180B firmy Tynaxtools (Polska). Po ostygnięciu nasiona poddawano tłoczeniu w prasie ślimakowej Farmer 10 (Farmet, Czechy) do tłoczenia na zimno o wydajności $9 \div 12$ kg nasion/h. W trakcie tłoczenia używano dyszy o średnicy 8 mm. Wszystkie uzyskane oleje pozostawiano do naturalnej sedimentacji osadu przez 3 dni w warunkach chłodniczych. Następnie olej rozlewano do butelek z brązowego szkła o pojemności 65 ml i prze-

chowowano w temp. 4 ± 2 °C. Tłoczenie nasion i analizę olejów przeprowadzano w dwóch seriach w ciągu czterech tygodni.

W nasionach rzepaku i w wyłokach oznaczano zawartość wody – metodą suszarkową [16] oraz tłuszczu w aparacie Soxtec™ 2050 – za pomocą zautomatyzowanej ekstrakcji według metody Soxhletha [14]. Wydajność tłoczenia [%] obliczano na podstawie zawartości tłuszczu w nasionach i wyłokach, korzystając z równania [25]:

$$W = 100 \times (1 - R_n/R_w),$$

gdzie: R_n – stosunek zawartości nietłuszczowych składników w nasionach do zawartości tłuszczu w nasionach; R_w – stosunek zawartości nietłuszczowych składników w wyłokach do zawartości tłuszczu reszkowego w wyłokach.

Właściwości fizykochemiczne otrzymanych olejów rzepakowych typu *virgin* określano poprzez oznaczanie zawartości: wolnych kwasów tłuszczowych – liczba kwasowa [15], nadtlenków – liczba nadtlenkowa [18], aldehydów – liczba anizydynowa [19] oraz obliczenie wskaźnika TOTOX [19]. Zawartość skoniugowanych dienów i trienów oznaczano spektrofotometrycznie, mierząc absorbancję w ultrafiolecie, odpowiednio przy $\lambda_{\max} = 232$ i 268 nm [17]. Oznaczano barwę spektrofotometrycznie, określając udział barwników karotenoidowych ($\lambda = 442$ nm) i chlorofilowych ($\lambda = 668$ nm) [13]. Stabilność oksydacyjną olejów oznaczano w teście Rancimat w aparacie typu 679 (Methrom) w temp. 130 °C [20].

Do oceny jakości sensorycznej badanych olejów stosowano metodę profilową [3], korzystając z definicji wyróżników sensorycznych charakterystycznych dla olejów rzepakowych typu *virgin*, opracowanych przez Brühla i Matthäusa [4]. Określano intensywność cech sensorycznych zdefiniowanych jako: typowy dla nasion, orzechowy, drewniany, cierpki, zleżały, stęchły, spalony. W ocenie brało udział 10 przeszkolonych osób z Zakładu Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych (SGGW). Na początku wybierano wyróżniki sensoryczne smaku i zapachu, a następnie oceniano ich intensywność. W pierwszej kolejności porównywano oleje tłoczone na zimno (próby kontrolne) i oleje z różnych wariantów nawilżenia i ogrzewania w ramach jednej odmiany. Następnie oceniano oleje dwóch różnych odmian uzyskanych z tego samego wariantu. Intensywność wyróżników zaznaczano na niestrukturyzowanej skali ciągłej ($0 \div 10$ j.u., gdzie 0 – niewyczuwalny, 10 – bardzo intensywny). Dodatkowo określano stopień akceptacji konsumenckiej przy użyciu niestrukturyzowanej skali z określeniami brzegowymi „lubię” – „nie lubię”.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzano w dwóch seriach, a oznaczenia w co najmniej trzech powtórzeniach ($n = 2 \times 3$). Wyniki poddano analizie statystycznej. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z wykorzystaniem testu Tukeya przy $p \leq 0,05$. Obliczenia wykonywano w programie Statgraphics 4.1.

Wyniki i dyskusja

Początkowa zawartość wody i tłuszczu (oleju) w nasionach rzepaku odmiany ‘Bakara’ wynosiła odpowiednio: 5,5 i 40,9 %, natomiast w nasionach odmiany ‘Kana’ – 5,7 % i 42,4 % (tab. 1). Nasiona przed ogrzewaniem nawilżono do 6,5 i 8,5 %, by uniknąć spalenia nasion i problemów technicznych z przepustowością prasy ślimakowej. Bezpośrednio po ogrzaniu mikrofalowym nawilżonych nasion rzepaku mierzono temperaturę osiągniętą wewnątrz nasion. Średnia temperatura nasion ogrzewanych przez 3 min wynosiła od $88 \div 90$ °C (wilgotność 8,5 %) do $98 \div 99$ °C (wilgotność 6,5 %), a przez 7 min – od $115 \div 117$ °C (wilgotność 6,5 %) do $135 \div 137$ °C (wilgotność 8,5 %) (rys. 1). Przed tłoczeniem ogrzewane mikrofalowo nasiona były studzone do temperatury 20 ± 2 °C, natomiast średnia temperatura wypływającego oleju mierzona bezpośrednio pod cedzidłem prasy we wszystkich otrzymanych próbach olejów wynosiła ok. 40 ± 2 °C.

Tabela 1. Zawartość wody i tłuszczu w nasionach badanych odmian rzepaku

Table 1. Water and fat content in seeds of rape cultivars analysed

Wyszczególnienie Specification	Odmiana rzepaku / Rape cultivar	
	‘Bakara’	‘Kana’
	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$
Zawartość wody w nasionach Water content in seeds [%]	$5,5 \pm 0,06$	$5,7 \pm 0,05$
Zawartość oleju w nasionach Fat content in seeds [%]	$40,9 \pm 0,13$	$42,4 \pm 0,06$

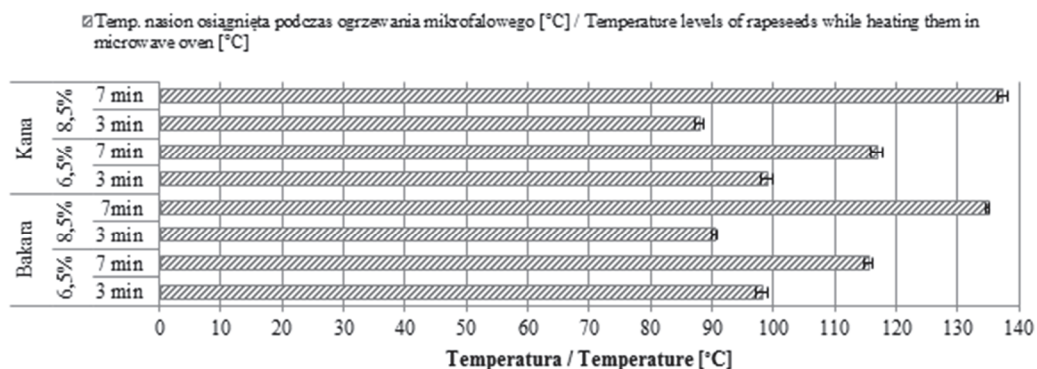
Objaśnienia: / Explanatory notes:

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

Zawartość wody w wyciekach malała wraz ze wzrostem temperatury ogrzewania nasion (tab. 2). Najwięcej wody zawierały wycieki otrzymane z nasion dowilżonych do 8,5 % i bez obróbki termicznej – próby kontrolne (9,5 i 9,7 % odpowiednio w odmianie rzepaku ‘Bakara’ i ‘Kana’), a najmniej – z nasion o wilgotności 6,5 %, ogrzewanych przez 7 min (2,5 i 3,1 %, odpowiednio w nasionach odmiany ‘Bakara’ i ‘Kana’).

Zawartość tłuszczu w wyciekach uzyskanych z nasion bez obróbki termicznej wynosiła: ‘Bakara’ – 24,7 %, ‘Kana’ – 24,9 %. Najwięcej tłuszczu znajdowało się w wyciekach otrzymanych z nasion o wilgotności 6,5 %, ogrzewanych przez 7 min. Wycieki te zawierały 29,8 i 33,0 % tłuszczu, odpowiednio w nasionach: ‘Bakara’ i ‘Kana’. Zwiększający się udział tłuszczu w wyciekach, wraz z wydłużaniem czasu ogrzewania nasion, można przypisać zbyt małej wilgotności i zbyt długiemu czasowi ogrzewania nasion, co skutkowało tworzeniem struktur włóknisto-granularnych, po-

wstających w wyniku rozpadu małych kulistych ciał białkowych i tworzeniem w ich miejsce włóknistych form częściowo połączonych ze ścianami komórkowymi, utrudniających wypływanie oleju z nasion [6]. Natomiast zbyt duża wilgotność nasion, dowilżonych do 8,5 %, niepoddanych ogrzewaniu, zwiększyła elastyczność nasion, czyli zdolność do odkształceń, utrudniając tym samym wydobycie oleju z miazgi nasiennej [27], co skutkowało większą zawartością tłuszczu w wytlókach, na poziomie 25,5 i 26,2 %, odpowiednio: z nasion odmian ‘Bakara’ i ‘Kana’. W pozostałych przypadkach stwierdzono zmniejszenie zawartości tłuszczu w wytlókach w porównaniu z wytlókami otrzymanymi z nasion nieogrzewanych, w związku z czym stwierdzono wzrost wydajności tłoczenia (tab. 2). Największą wydajność tłoczenia uzyskano po nawilżeniu nasion rzepaku do wilgotności 8,5 %, a następnie ogrzewaniu przez 3 min (temp. $88 \div 90$ °C). Wzrost wydajności tłoczenia, w stosunku do próby kontrolnej, wyniósł 19 % w przypadku nasion ‘Bakara’ oraz 16 % – nasion ‘Kana’. Dłuższe ogrzewanie nasion (7 min) w niewielkim stopniu przyczyniło się do zwiększenia wydajności tłoczenia, której wzrost sięgał 6,8 % w przypadku nasion ‘Kana’ i 8,2 % – ‘Bakara’. Po nawilżeniu nasion do 6,5 %, a następnie poddaniu ich dłuższemu ogrzewaniu, tj. przez 7 min, większość oleju została w wytlókach, z uwagi na zbyt długi czas ogrzewania i zbyt małą wilgotność surowca. Takie parametry hydrotermicznej obróbki wstępnej nasion przed tłoczeniem, zarówno odmiany ‘Bakara’, jak i ‘Kana’, przyczyniły się do zmniejszenia wydajności tłoczenia niemal o połowę w stosunku do próby kontrolnej, odpowiednio: z 54,9 do 23,6 % i z 55,0 do 22,3 % (tab. 2).



Rys. 1. Temperatura nasion rzepaku osiągnięta podczas ogrzewania mikrofalowego

Fig. 1. Temperature levels of rapeseeds while heating them in microwave oven

Tabela 2. Wydajność tłoczenia w zależności od zawartości tłuszczu i wody w wytlókach rzepakowych
 Table. 2. Oil extraction yield depending on oil and water contents in rapeseed oil cake

Odmiana rzepaku Rape cultivar	Stopień nawilżenia rzepaku Moisture content in rapeseeds [%]	Czas ogrzewania mikrofalowego Microwave heating time [min]	Zawartość wody w wytlókach Water content in cake [%]	Zawartość tłuszczu w wytlókach Fat content in cake [%]	Wydajność tłoczenia Oil yield [%]
			$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$
	-	-	6,2 ^a ± 0,05	24,7 ^a ± 0,17	54,9 ^a ± 0,62
'Bakara'	6,5	0	7,4 ^b ± 0,05	24,4 ^{ab} ± 0,18	55,7 ^{ab} ± 0,29
		3	5,8 ^c ± 0,08	23,9 ^b ± 0,22	57,9 ^{bc} ± 0,38
		7	2,5 ^d ± 0,05	29,8 ^c ± 0,41	23,6 ^d ± 3,39
	8,5	0	9,5 ^e ± 0,24	25,5 ^d ± 0,26	53,9 ^a ± 0,85
		3	9,0 ^f ± 0,22	20,2 ^e ± 0,21	65,3 ^e ± 0,71
		7	5,3 ^g ± 0,33	22,2 ^f ± 0,22	59,8 ^c ± 3,54
'Kana'	-	-	6,4 ^a ± 0,21	24,9 ^a ± 0,13	55,0 ^{ab} ± 1,13
	6,5	0	7,7 ^b ± 0,15	24,3 ^b ± 0,13	55,1 ^{ab} ± 0,57
		3	5,9 ^c ± 0,05	23,6 ^c ± 0,15	58,5 ^a ± 2,69
		7	3,1 ^d ± 0,24	33,0 ^d ± 0,10	22,3 ^c ± 2,94
	8,5	0	9,7 ^e ± 0,05	26,2 ^e ± 0,08	53,3 ^b ± 2,55
		3	9,4 ^f ± 0,10	21,3 ^f ± 0,05	63,8 ^d ± 0,85
		7	5,4 ^g ± 0,16	22,8 ^g ± 0,19	59,1 ^{ad} ± 0,71

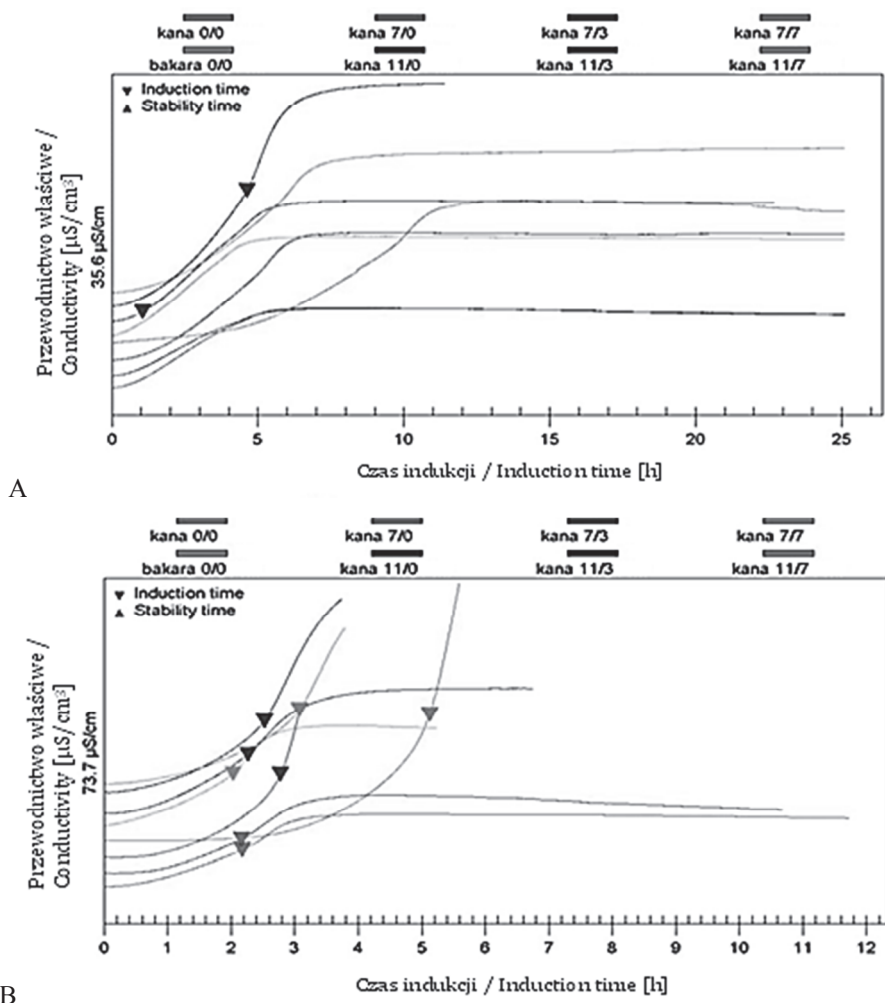
Objaśnienia: / Explanatory notes:

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

a, b, ... – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w kolumnie nie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values in columns and denoted by the same letters do not differ statistically significantly at $p \leq 0,05$; n = 6.

Analiza stabilności oksydacyjnej otrzymanych olejów dowiodła, że zastosowane parametry hydrotermicznej obróbki wstępnej nasion przed tłoczeniem (nawilżenie i ogrzewanie) przyczyniły się do wydłużenia czasu indukcji badanych olejów rzepakowych typu *virgin* z obu odmian nasion. Największy przyrost czasu indukcji w teście Rancimat w temp. 130 °C zaobserwowano w olejach z nasion o wilgotności 6,5 %, ogrzewanych przez 7 min. W tym wariantcie w oleju 'Bakara' zaobserwowano wydłużenie czasu indukcji z 1,8 do 5,7 h, a w oleju 'Kana' – z 2,3 do 5,1 h, w porównaniu z olejem kontrolnym (tab. 3, rys. 2B). W literaturze również odnotowano wzrost stabilności oksydacyjnej oleju uzyskanego z prażonych mikrofalowo nasion, ale wielo-

krotnie większy, co wynika prawdopodobnie z zastosowanego wyższego zakresu temperatury, sięgającego $160 \div 200 \text{ }^\circ\text{C}$. Veldsink i wsp. [30] zaobserwowali w teście Rancimat, w temp. $110 \text{ }^\circ\text{C}$, wydłużenie czasu indukcji olejów rzepakowych z 5,3 h w olejach tłoczonych na zimno do 38 h w olejach z nasion poddanych obróbce mikrofalami w temp. $225 \text{ }^\circ\text{C}$. Natomiast Azadmard-Damirchi i wsp. [1] podają, że czas indukcji olejów rzepakowych z prażonego surowca był nawet do ośmiu razy dłuższy. Prawdopodobnie obserwowany wzrost stabilności oksydacyjnej tych olejów to zsumowany



Rys. 2. Przykładowy wykres przebiegu krzywych utleniania oleju rzepakowego w teście Rancimat, w temp. $120 \text{ }^\circ\text{C}$ (A) i w $130 \text{ }^\circ\text{C}$ (B).

Fig. 2. Example of characteristic curves of rapeseed oil oxidation (Rancimat test) at $120 \text{ }^\circ\text{C}$ (A) and $130 \text{ }^\circ\text{C}$ (B).

Tabela 3. Właściwości fizykochemiczne analizowanych olejów rzepakowych typu *virgin*Table 3. Physical-chemical properties of *virgin* rapeseed oils analysed

Odmiana rzepaku Rape cultivar	Stopień nawilżenia rzepaku Moisture content in rapeseeds [%]	Czas ogrzewania mikrofalowego Microwave heating time [min]	LK AV [mg KOH/g]	LOO PV [mEq O ₂ /kg]	LA AnV	Wskaźnik TOTOX TOTOX Index	K ₂₃₂	K ₂₆₈	Czas indukcji Induction period [h]	
			$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$
'Bakara'	-	-	0,67 ^b ± 0,02	0,79 ^b ± 0,00	0,14 ^b ± 0,01	1,72 ^b ± 0,01	1,60 ^{bb} ± 0,02	0,18 ^b ± 0,01	1,82 ^a ± 0,3	
	6,5	0	0,67 ^b ± 0,01	0,86 ^b ± 0,01	0,16 ^b ± 0,02	1,88 ^b ± 0,02	1,55 ^{bb} ± 0,01	0,17 ^b ± 0,01	1,72 ^a ± 0,22	
		3	0,78 ^b ± 0,02	1,21 ^c ± 0,01	0,33 ^b ± 0,01	2,76 ^c ± 0,02	1,58 ^{bb} ± 0,05	0,23 ^b ± 0,01	2,21 ^{ab} ± 0,08	
		7	0,90 ^c ± 0,01	1,72 ^d ± 0,01	0,47 ^c ± 0,02	3,91 ^d ± 0,02	2,31 ^c ± 0,07	0,65 ^c ± 0,02	5,66 ^d ± 0,44	
	8,5	0	0,67 ^b ± 0,00	1,22 ^c ± 0,01	0,28 ^d ± 0,02	2,72 ^c ± 0,03	1,51 ^b ± 0,1	0,16 ^b ± 0,02	2,29 ^{ab} ± 0,01	
		3	0,78 ^b ± 0,01	1,53 ^c ± 0,00	0,35 ^b ± 0,03	3,41 ^c ± 0,03	1,65 ^{bd} ± 0,05	0,18 ^b ± 0,01	2,68 ^{bc} ± 0,12	
		7	0,89 ^c ± 0,01	1,55 ^c ± 0,01	0,6 ^c ± 0,01	3,69 ^d ± 0,02	1,76 ^d ± 0,05	0,39 ^d ± 0,01	3,05 ^c ± 0,14	
	'Kana'	-	-	0,45 ^b ± 0,00	0,53 ^b ± 0,00	0,25 ^b ± 0,01	1,31 ^b ± 0,01	1,38 ^b ± 0,03	0,14 ^b ± 0,02	2,27 ^{ab} ± 0,08
		6,5	0	0,45 ^b ± 0,01	0,54 ^b ± 0,01	0,30 ^b ± 0,01	1,38 ^b ± 0,02	1,41 ^b ± 0,02	0,12 ^b ± 0,02	2,17 ^{ab} ± 0,03
3			0,45 ^b ± 0,01	0,72 ^b ± 0,00	0,42 ^b ± 0,02	1,86 ^b ± 0,02	1,55 ^b ± 0,03	0,16 ^b ± 0,01	2,78 ^{bc} ± 0,15	
7			0,67 ^b ± 0,01	1,23 ^c ± 0,01	0,54 ^c ± 0,04	3,01 ^c ± 0,05	2,58 ^c ± 0,03	0,71 ^b ± 0,00	5,12 ^d ± 0,1	
8,5		0	0,45 ^b ± 0,02	0,7 ^d ± 0,01	0,31 ^b ± 0,02	1,70 ^d ± 0,04	1,58 ^b ± 0,06	0,12 ^b ± 0,01	2,30 ^{ab} ± 0,04	
		3	0,45 ^b ± 0,02	0,83 ^c ± 0,01	0,49 ^c ± 0,02	2,14 ^c ± 0,03	1,53 ^b ± 0,03	0,15 ^b ± 0,02	2,54 ^{bc} ± 0,01	
		7	0,45 ^c ± 0,01	0,89 ^d ± 0,01	0,64 ^d ± 0,04	2,42 ^d ± 0,04	2,17 ^d ± 0,06	0,45 ^c ± 0,04	3,21 ^c ± 0,16	

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

efekt większej, indukowanej podwyższoną temperaturą, ekstraktywności związków towarzyszących lipidom, tj. steroli, tokoferoli, karotenoidów, fosfolipidów, związków fenolowych oraz efekt tworzenia nowych związków (w wyniku degradacji termicznej składników nasion), np. kanololu – pochodnej kwasu sinapinowego czy też produktów reakcji nieenzymatycznego brunatnienia. Wszystkie te związki mają udowodnione właściwości przeciwutleniające, niektóre wykazują również działanie synergistyczne z innymi (tokoferole, fosfolipidy i związki fenolowe) [1, 10, 24, 31].

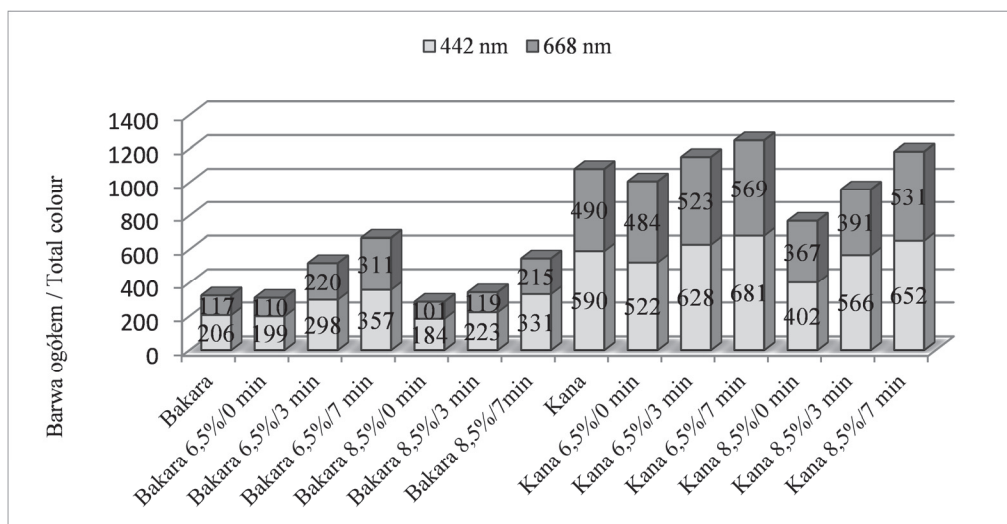
W teście Rancimat zastosowano wyższą temperaturę (130 °C) niż zwykle podawana jest w literaturze (100 ÷ 120 °C). Było to jednak spowodowane problemami analitycznymi z uchwyceniem przez urządzenie momentu przegięcia krzywej w niższej temperaturze, precyzyjnym wyznaczeniem końca czasu indukcji i z zakończeniem analizy (wyłączeniem rejestratora czasu aparatu Rancimat) (rys. 2A). Przebieg krzywych utleniania olejów niepoddanych procesowi rafinacji, zawierających liczne związki towarzyszące, jest nietypowy, odmienny niż w olejach rafinowanych, bez wyraźnego przegięcia krzywej, co utrudnia wyznaczenie okresu indukcji (rys. 2A, B).

W celu oceny wpływu obróbki mikrofalowej nasion przed tłoczeniem na cechy fizykochemiczne otrzymanych olejów oznaczono w nich podstawowe parametry jakości (tab. 3). Oleje otrzymane z nasion rzepaku odmiany 'Kana' charakteryzowały się niższym stopniem hydrolizy (0,45 ÷ 0,67 mg KOH/g) w porównaniu z olejami otrzymanymi z nasion 'Bakara' (0,67 ÷ 0,90 mg KOH/g). Najwyższy wzrost stopnia hydrolizy zaobserwowano w olejach nawilżonych do wilgotności 6,5 i 8,5 %, ogrzewanych przez 7 min. Tym niemniej wszystkie analizowane oleje spełniały wymagania pod względem liczby kwasowej w olejach tłoczonych na zimno i *virgin* określone w Codex Alimentarius (LK < 4 mg KOH/g) [5]. Ponadto oleje charakteryzowały się niskim pierwotnym stopniem utlenienia lipidów, a wartości liczby nadtlenkowej mieściły się w przedziale 0,53 ÷ 1,72 mEq O₂/kg (tab. 3), spełniając tym samym wymagania norm pod względem LOO w olejach tłoczonych na zimno i *virgin* (LOO < 15 mEq O₂/kg oleju). Liczba anizydynowa umożliwia określenie faktycznego stopnia utlenienia oleju, nie jest objęta przepisami unijnymi dla olejów tłoczonych na zimno i *virgin*, w praktyce jest bliska 0, natomiast w olejach rafinowanych wartość ta nie powinna wynosić więcej niż 8 [32].

Wraz ze zwiększeniem stopnia nawilżenia nasion i wydłużeniem czasu ogrzewania obserwowano statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) wzrost wtórnego stopnia utlenienia badanych olejów. Najwyższe, statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) wartości LA stwierdzono w olejach z nasion nawilżonych do 8,5 %, ogrzewanych przez 7 min (0,60 i 0,64, odpowiednio odmian rzepaku 'Bakara' i 'Kana'). Stwierdzona zawartość wtórnych produktów utlenienia w badanych olejach była jednak mała, nie przekraczała wartości 1,0, co świadczyło o znikomym wpływie ogrzewania mikrofalowego nasion rzepaku na stopień utlenienia oleju. Analizowane oleje charakteryzowały się niskim wskaźnikiem TOTOX, w przedziale 1,31 ÷ 3,91 (tab. 3). Mieściły się one w umownej granicy wyznaczającej dobrą jakość olejów jadalnych, określonej na poziomie wskaźnika TOTOX równego 10. Stwierdzony bardzo niski stopień hydrolizy i utlenienia świeżych olejów rzepakowych tłoczonych na zimno i *virgin*, tj. z nasion poddanych obróbce termicznej, znajduje potwierdzenie w literaturze [8, 21, 32].

Pod względem zawartości sprzężonych dienów (K_{232}) i trienów (K_{268}), wyrażonych ekstynkcją w świetle UV, badane oleje mieściły się w szerokim zakresie: dieny –

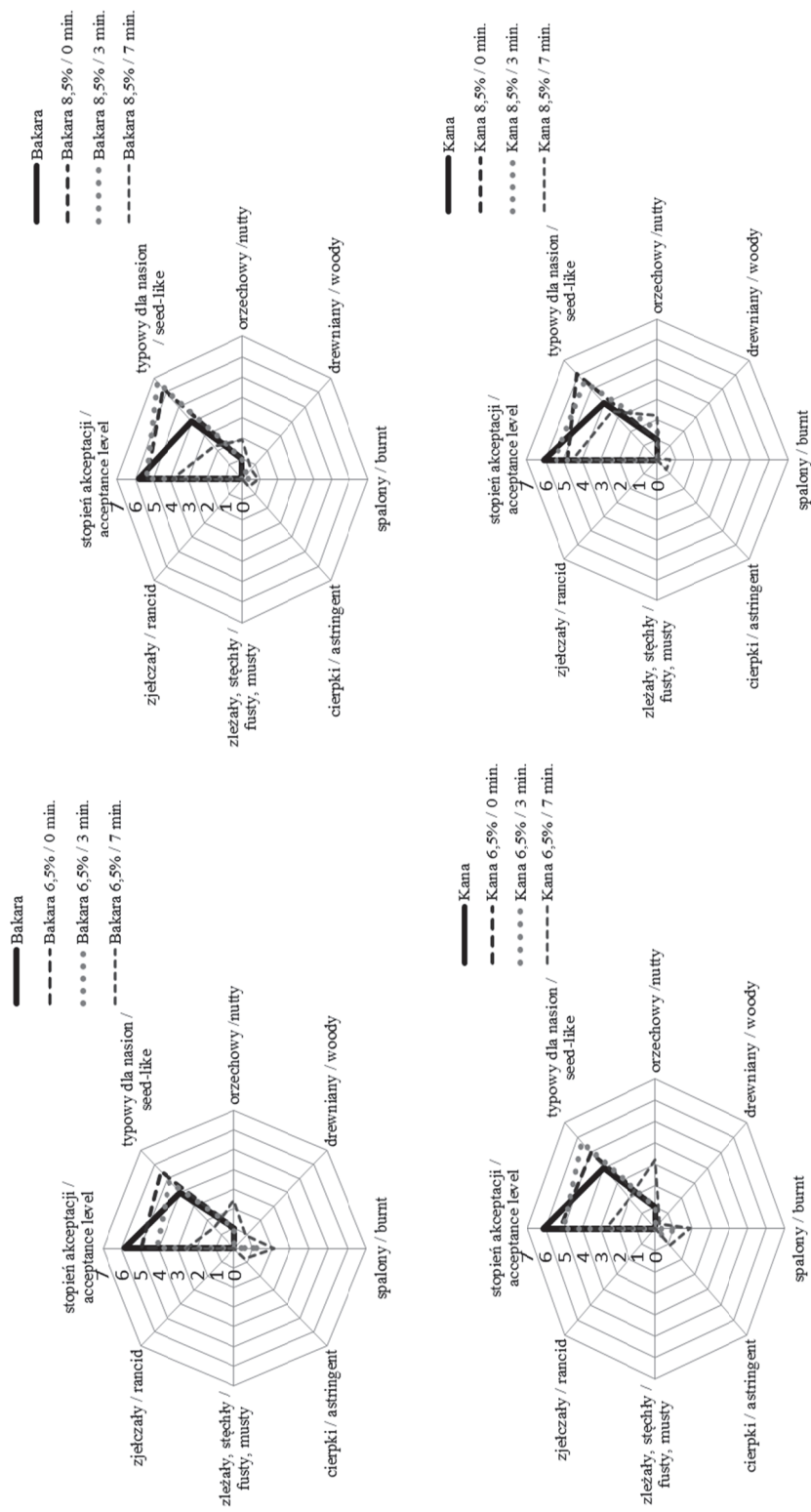
1,38 ÷ 2,58; natomiast trieny – 0,12 ÷ 0,71 (tab. 3). W europejskich przepisach dotyczących wymagań dla olejów tłoczonych na zimno nie wyznaczono wartości granicznych K_{232} oraz K_{268} . Odniesieniem może być jednak rozporządzenie Komisji UE 2568/91 [22], w którym przewiduje się w oliwie z oliwek *extra virgin* wartość ekstynkcji przy $\lambda = 232$ nm nie wyższą niż 2,50, a przy $\lambda = 268$ nm – nie wyższą niż 0,22. Ogrzewanie mikrofalowe nasion przez 7 min przyczyniło się do powstania w analizowanych olejach znacznych ilości trienów oraz wtórnych produktów utlenienia aldehydów i ketonów, przekraczających przyjętą granicę ekstynkcji $K_{268} = 0,22$, natomiast wartości K_{232} przekroczone zostały jedynie w oleju w obrębie odmiany ‘Kana’, w przypadku nasion nawilżonych do 6,5 %, ogrzewanych przez 7 min. Wariant ten charakteryzował się jednocześnie najmniejszą wydajnością oleju i najwyższą stabilnością oksydacyjną (tab. 2 i 3).



Rys. 3. Barwa olejów ($1000 \times (A_{442\text{nm}} + A_{668\text{nm}})$) w zależności od stopnia nawilżenia [%] i czasu ogrzewania nasion [min]

Fig. 3. Colour of oils ($1000 \times (A_{442\text{nm}} + A_{668\text{nm}})$) depending on moisture content [%] in rapeseeds and heating time of seeds [min]

Oleje z nasion odmiany ‘Bakara’ charakteryzowały się jaśniejszą barwą, mniejszą zawartością barwników karotenoidowych i chlorofilowych w porównaniu z olejami z nasiony ‘Kana’. Najjaśniejszymi i najbardziej klarownymi olejami z obu odmian były oleje tłoczone na zimno z nasion o wilgotności 8,5 %, nieogrzewanych przed tłoczeniem (‘Bakara’ – barwa ogółem 285, ‘Kana’ – 769) – rys. 3. Ogrzewanie mikrofalowe



Rys. 4. Wpływ parametrów obróbki wstępnej nasion rzepaku przed tłoczeniem na jakość sensoryczną wytlóconego oleju rzepakowego typu *virgin*
 Fig. 4. Effect of parameters of rapeseed pre-treatment process prior to pressing on sensory quality of *virgin* rapeseed oil pressed

nasion spowodowało istotne pociemnienie uzyskiwanego oleju i wzrost absorpcji zarówno przy 442, jak i 668 nm. Najciemniejsze były oleje z nasion o mniejszej wilgotności (6,5 %) i dłużej ogrzewanych (7 min) ('Bakara' – barwa ogółem 668, natomiast 'Kana' – 1250). Pociemnienie barwy olejów z nasion ogrzewanych przed tłoczeniem można tłumaczyć obecnością w oleju barwnych produktów reakcji Maillarda, produktów degradacji fosfolipidów i pochodnych chlorofili (feofityn), powstałych w temp. 135 ÷ 137 °C podczas obróbki termicznej nasion [2, 9].

Ogrzewanie mikrofalowe nasion przed tłoczeniem istotnie wpłynęło na cechy sensoryczne oleju (rys. 4). Oleje tłoczone na zimno charakteryzowały się największym stopniem akceptacji konsumenckiej ('Bakara' – 5,8 j.u., 'Kana' – 6,1 j.u.). W ocenie profilowej wyróżniały się najmniej intensywnym smakiem i zapachem „typowym dla rzepaku” (jedynie oleje z nasion ogrzewanych przez 7 min oceniono niżej) i „orzechowym”, niewyczuwalne były natomiast cechy sensoryczne zdefiniowane jako „drewniany” i „cierpki” (0 j.u.). Zastosowanie obróbki hydrotermicznej nasion spowodowało obniżenie stopnia akceptacji konsumenckiej olejów, w wyniku wzrostu intensywności wszystkich cech sensorycznych wybranych w ocenie profilowej, zarówno pozytywnych, jak i w wyniku pojawienia się niepożądanych, tj. „spalonego”, „drewnianego”. Najmniej akceptowane były oleje otrzymane z nasion o wilgotności 6,5 % i ogrzewanych 7 min ('Bakara' – 2,5 j.u.; 'Kana' – 2,7 j.u.). Spośród olejów z nasion ogrzewanych najwyższym stopniem akceptacji wyróżniały się oleje uzyskane z nasion o wilgotności 8,5 %, ogrzewanych przez 3 min ('Bakara' – 5,4 j.u.; 'Kana' – 5,5 j.u.).

Podsumowując, można stwierdzić, że najbardziej efektywny, pod względem stabilności oksydacyjnej oleju, wariant obróbki hydrotermicznej nasion (6,5 % wilgotności i 7 min ogrzewania mikrofalowego) charakteryzował się jednocześnie najmniejszą wydajnością tłoczenia, a uzyskany olej – najniższym stopniem pożądalności konsumenckiej i najniższą jakością. Z kolei w wariantcie najbardziej efektywnym pod względem wydajności tłoczenia nasion (8,5 % wilgotności i 3 min ogrzewania mikrofalowego), najwyższej oceniono cechy sensoryczne oleju, a czas indukcji oleju w teście Rancimat uległ niewielkiemu wydłużeniu. W związku z tym zachodzi potrzeba kontynuacji badań nad optymalizacją warunków nawilżania i ogrzewania mikrofalowego nasion rzepaku w celu uzyskania olejów o dobrych cechach sensorycznych, zadowalającej wydajności, zwiększonej wartości żywieniowej i stabilności oksydacyjnej.

Wnioski

1. Ogrzewanie mikrofalowe nasion rzepaku odmian 'Bakara' i 'Kana' przed tłoczeniem wpływa istotnie na wydajność procesu. Największy wzrost wydajności tłoczenia stwierdzono w przypadku nasion obu odmian o większej wilgotności (8,5 %), ogrzewanych krócej (3 min, temp. nasion 88 - 90 °C). Ogrzewanie nasion

- o mniejszej wilgotności (6,5 %), ale dłużej (7 min, temp. nasion 116 - 117 °C) spowodowało statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) zmniejszenie wydajności procesu.
2. Obróbka mikrofalowa nasion powoduje istotny wzrost stabilności oksydacyjnej olejów. Największe wydłużenie czasu indukcji w teście Rancimat odnotowano w przypadku olejów z nasion o mniejszej wilgotności (6,5 %), ogrzewanych dłużej (7 min), czyli w wariancie o najmniejszej wydajności i najniższej jakości.
 3. Niezależnie od odmiany i wilgotności, ogrzewanie mikrofalowe nasion przed tłoczeniem obniża jakość fizykochemiczną olejów. Zwiększają się: stopień hydrolizy, zawartość pierwotnych i wtórnych produktów utleniania, ekstynkcja właściwa przy 232 i 268 nm (zawartość dienów i trienów), pociemnienie barwy oleju oraz absorbancja przy $\lambda = 442$ i 668 nm.
 4. Ogrzewanie mikrofalowe nasion przed tłoczeniem istotnie modyfikuje cechy sensoryczne oleju. Spośród olejów z nasion ogrzewanych najwyższym stopniem akceptacji charakteryzowały się oleje uzyskane z nasion o wilgotności 8,5 %, ogrzewanych przez 3 min, najniższym natomiast – oleje otrzymane z nasion o wilgotności 6,5 % i ogrzewanych 7 min.
 5. Wykazano potrzebę optymalizacji warunków nawilżania i ogrzewania mikrofalowego w celu uzyskania olejów rzepakowych typu *virgin* o dobrych cechach sensorycznych, zadowalającej wydajności i odpowiednio wysokiej stabilności oksydacyjnej.

Literatura

- [1] Azadmard-Damirchi S., Habibi-Nodeh F., Hesari J., Nemati M., Achachlouei B.F.: Effect of pre-treatment with microwaves on oxidative stability and nutraceuticals content of oil from rapeseed. *Food Chem.*, 2010, **121**, 1211-1215.
- [2] Azadmard-Damirchi S., Alirezalu K., Fathi Achachlouei B.: Microwave pretreatment of seeds to extract high quality vegetable oil. *WASET*, 2011, **57**, 72-74.
- [3] Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I.: *Sensoryczne badania żywności. Podstawy. Metody. Zastosowania.* Wyd. II. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2014.
- [4] Brühl L., Matthäus B.: Sensory assessment of virgin rapeseed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2008, **110**, 608-610.
- [5] CODEX STAN 210 - 1999. Codex standard for named vegetable oil. Codex Alimentarius. Amendment, 2005, 2011, 2013.
- [6] Kachel-Jakubowska M.: Wpływ suszenia na jakość nasion rzepaku ozimego. *Inżynieria Rolnicza*, 2008, **1 (99)**, 127-132.
- [7] Khattab R.Y., Eskin M.N.A., Thiyam-Hollader U.: Production of canolol from canola meal phenolics via hydrolysis and microwave-induced decarboxylation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2014, **91**, 89-97.
- [8] Kraljić E., Škevin D., Pospíšil M., Obranović M., Neđeral S., Bosolt T.: Quality of rapeseed oil produced by conditioning seeds at modest temperatures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2013, **90**, 589-599.
- [9] Lamorska J., Tys J.: Physicochemical and health properties of fats. *Acta Agrophysica*, 2011, **5**, 51-55.
- [10] Matthäus B.: Oil technology. In: *Technological innovations in major world oil crops.* Ed. S. K. Gupta. Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA, 2012, pp. 23-92.

- [11] Niu Y., Jiang M., Wan C., Yang M., Hu S.: Effect of microwave treatment on sinapic acid derivatives in rapeseed and rapeseed meal. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2013, **80**, 307-313.
- [12] Oberndorfer C., Pawelzik E., Lücke W.: Prospects for the application of dielectric heating processes in the pre-treatment of oilseeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, **102**, 487-493.
- [13] PN-A-86934:1995. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Spektrofotometryczne oznaczanie barwy.
- [14] PN-EN ISO 659:2010. Nasiona oleiste. Oznaczanie zawartości oleju. Metoda odwoławcza.
- [15] PN-EN ISO 660:2005. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości.
- [16] PN-EN ISO 665:2004. Nasiona oleiste. Oznaczanie wilgotności i zawartości substancji lotnych.
- [17] PN-EN ISO 3656:2011. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie absorpcji w nadfioletnie wyrażonej jako ekstynkcyjna właściwa w świetle UV.
- [18] PN-EN ISO 3960:2012. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenukowej.
- [19] PN-EN ISO 6885:2008. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby anizydynowej.
- [20] PN-EN ISO 6886:2009. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie stabilności oksydacyjnej. Test przyspieszonego utleniania.
- [21] Prior E., Vadke V., Sosulski F.: Effect of heat treatments on canola press oils. I. Non-triglyceride components. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991, **68**, 401-406.
- [22] Rozporządzenie Komisji (UE) nr 299/2013 z dnia 26 marca 2013 roku zmieniające rozporządzenie Komisji (EWG) nr 2568/91 z dnia 11 lipca 1991 roku w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wytlóczyn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy Dz. U. L 248 z 5.9.1991, s. 1 z późn. zm.
- [23] Spielmeier A., Wagner A., Jahreis G.: Influence of thermal treatment of rapeseed on the canolol content. *Food Chem.*, 2009, **112**, 944-948.
- [24] Shrestha K., Gemechu F.G., De Meulenaer B.: A novel insight on the high oxidative stability of roasted mustard seed oil in relation to phospholipid, Maillard type reaction products, tocopherol and canolol contents. *Food Res. Int.*, 2013, **54**, 587-594.
- [25] Swetman T., Head S.: Calculation of oil extraction efficiency. *INFROM*, 1998, **9**, 11-91.
- [26] Tewari G.: Microwave and radio-frequency heating. In: *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. 1nd edition. Eds. Tewari G., Juneja V. K. Blackwell Publishing Ames, USA, 2007, pp. 91-98.
- [27] Tys J., Kachel M., Rybacki R.: Jakość surowca ocenianego na podstawie stopnia uszkodzeń nasion rzepaku. *Rośliny Oleiste*, 2006, **27**, 324-326.
- [28] Uquiche E., Jeréz M., Ortiz J.: Effect of pretreatment with microwaves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana* Mol). *Innov. Food. Sci. Emerg.*, 2008, **9**, 495-500.
- [29] Venkatesh M.S., Raghavan S.V.: An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials. *Biosystems Engineering*, 2004, **88**, 1-18.
- [30] Veldsink J.W., Muuse B.G., Meijer M.M.T., Cuperus F.P., van de Sande R.L.K.M., van Putte K.P.A.M.: Heat pretreatment of oilseeds: effect on oil quality. *Fett/Lipid*, 1999, **7**, 244-248.
- [31] Wijesundera C., Ceccato C., Fagan P., Shen Z.: Seed roasting improves the oxidative stability of canola (*B. napus*) and mustard (*B. juncea*) seed oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2008, **110**, 360-362.
- [32] Wroniak M., Ptaszek A., Ratusz K.: Ocena wpływu warunków tłoczenia w prasie ślimakowej na jakość i skład chemiczny olejów rzepakowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **1 (85)**, 92-104.
- [33] Yang M., Huang F., Liu C., Zheng C., Zhou Q., Wang H.: Influence of microwave treatment of rapeseed on minor components content and oxidative stability of oil. *Food Bioprocess Technol.*, 2013, **6**, 3206-3216.

- [34] Zhang Q.H., Dorantes-Alvárez L., Gutiérrez-López G.F., Yeom H.Y., Barbosa-Cánovas G.V., Rodríguez J.J.: An update on some key alternative food processing technologies. In: Food Science and Food Biotechnology. Eds. Gutiérrez-López G. F., Barbosa-Cánovas G. V., CRC Press LLC, USA, 2003, pp. 279-312.

EFFECT OF MICROWAVE HEAT TREATMENT OF RAPESEEDS ON OIL YIELD AND QUALITY OF PRESSED OIL

Summary

The objective of the research study was to determine the effect of thermal pre-treatment of rapeseeds with the use of microwave radiation on the oil extraction yield, physical-chemical properties, and sensory characteristics of the *virgin* oil obtained. The 'Kana' and 'Bakara' winter rape cultivars were moisturised to a moisture content levels of 6.5 and 8.5 %; next, they were treated in a microwave oven (800 W, 2450 MHz) for 3 and 7 min.; then, the oil was pressed using a Farmer 10 screw press. The oils produced were assessed in terms of: degree of hydrolysis (LA), primary (PV) and secondary oxidation state (AnV), level of dienes and trienes, oxidative stability (Rancimat test) at a temperature of 130 °C, and contents of chlorophyll and carotenoid pigments. Also, the effect of microwave thermal treatment was analyzed on the flavour and aroma of the *virgin* oils obtained (profile method); moreover, the level of consumer acceptance of oils was assessed.

It was shown that the microwave heat treatment of rapeseeds, after they were moisturized, contributed to the increase in the oil extraction yield compared to the control sample. The highest increase in the yield of pressed oil was found in oils produced from seeds with a moisture content level of 8.5 %, which were heated for a shorter time (3 min.). In the case of the seeds of 'Bakara' cultivar, the oil extraction yield was 19% higher and of the seeds of the 'Kana' cultivar: 16 % higher. Of the oils produced from the heated seeds, the above named oils were characterized by the highest level of consumer acceptance ('Bakara': 5.4 a.u., 'Kana': 5.5 a.u.). Furthermore, there were reported the decrease in the physical-chemical properties of those oils and the concurrent increase in the oxidative stability (Rancimat test) (as for 'Bakara': from 1.8 to 5.7 h; as for 'Kana': from 2.3 to 5.1 h). Heating the seeds with a lower moisture content (6.5 %) for a longer time (7 min.) most strongly contributed to the increase in the oil extraction yield, to the decrease in the level of consumer acceptance, and to the reduction in physical-chemical quality of oils.

Key words: rapeseeds, microwave thermal pre-treatment, pressing, rapeseed oil, physical-chemical properties, sensory quality ☒

KAROLINA SIUCIŃSKA, BARBARA DYKI, ALEKSANDRA MURGRABIA,
PIOTR M. PIECZYWEK, DOROTA KONOPACKA

OCENA ZMIAN STRUKTURY SUSZONEJ TKANKI WIŚNI PODDANEJ WSTĘPNIE OBRÓBCE OSMOTYCZNEJ WSPOMAGANEJ ULTRADŹWIĘKAMI

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu oddziaływania ultradźwięków na strukturę wewnętrzną owoców wiśni poddawanych obróbce osmotycznej i suszeniu. Owoce wiśni odmiany 'Nefris' odwadniano w 60-procentowym roztworze sacharozy przez 120 min (40 °C), w łaźni wodnej wyposażonej w przetwornik ultradźwiękowy (25 kHz, 0,4 W/cm²) i platformę wytrząsającą (30 rpm). Całkowity czas obróbki osmotycznej wynosił 120 min, w trakcie którego zastosowano różne warianty czasu traktowania ultradźwiękami (ang. *ultrasound* – US) i wytrząsania (ang. *shaking* – S). W pierwszej kolejności próbki traktowano US przez 0, 30, 60, 90 lub 120 min, po czym wytrząsano (S) przez odpowiednio: 120, 90, 60, 30 lub 0 min. Odwodnione owoce poddawano suszeniu konwekcyjnemu. Strukturę suszu osmo-konwekcyjnego owoców odwadnianych oraz surowca analizowano mikroskopowo. Potwierdzono, że zastosowanie ultradźwięków powoduje zmiany struktury tkanek. Dłuższy okres ekspozycji tkanki wiśni na działanie US sprzyjał zmniejszeniu się zwartości komórek bezpośrednio sąsiadujących z epidermą. Jednocześnie obserwowano zwiększanie deformacji komórek miąższu dośrodkowego i zanikanie przestrzeni międzykomórkowych. Najbardziej ujednoczoną strukturą (komórki najmniej wydłużone i komórki okrągłe) charakteryzowały się wysuszone owoce poddane obróbce osmotycznej i równocześnie poddane przez 60 min: oddziaływaniu US i wytrząsaniu (60US+60S), co wskazuje na istnienie optymalnego stanu sprzyjającego redukcji naprężenia wewnętrznego. Suszenie konwekcyjne powoduje znaczny skurcz tkanki. W owocach suszonych, które nie były poddane działaniu ultradźwięków, ale były wytrząsane przez 120 min (0US+120S), zaobserwowano występowanie wolnych przestrzeni międzykomórkowych na przemian z dużymi zagęszczeniami. Zastosowanie US do 60 min sprzyjało zwiększeniu jednorodności struktury suszonego materiału (wariant optymalny – 60US+60S). Oddziaływanie ultradźwięków powyżej 60 min wyraźnie potęgowało efekt zagęszczania struktury, w związku z czym próbki traktowane US przez 120 min (120US+0S) charakteryzowały się największym skurczem tkanki.

*Mgr inż. K. Siucińska, dr hab. D. Konopacka, Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa Owoców i Warzyw, Instytut Ogrodnictwa, ul Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, prof. dr hab. B. Dyki, mgr A. Murgrabia, Zakład Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Warzywnych, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, dr inż. P. M. Pieczywek, Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów, Instytut Agrofizyki PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin.
Kontakt: karolina.siucinska@inhort.pl*

Słowa kluczowe: tkanka roślinna, obróbka wstępna, ultradźwięki, suszenie, mikrostruktura

Wprowadzenie

Odwadnianie osmotyczne tkanki roślinnej polega na usuwaniu wody z surowca poprzez umieszczenie go w stężonym roztworze substancji osmoaktywnej na określony czas. Dzięki półprzepuszczalności ścian komórkowych tkanki roślinnej możliwe jest wywołanie dwukierunkowego przepływu masy, to znaczy możliwość równoczesnego usuwania wody oraz wnikania w jej miejsce substancji osmoaktywnej zawartej w roztworze użytym do odwadniania [12]. Zjawisko to może być wykorzystywane w inżynierii żywności, gdyż pozwala kontrolować i modyfikować skład chemiczny, a także walory smakowe żywności [19].

Owoce odwodnione nie są produktem stabilnym. Jedną z metod ich dalszego utrwalania jest suszenie, które prowadzi do usunięcia z nich wody do poziomu zapewniającego trwałość mikrobiologiczną. Zmniejszenie zawartości wody w materiale obniża jej dostępność dla mikroorganizmów, dzięki czemu produkt może być przechowywany przez długi okres bez wyraźnych objawów zepsucia [14]. Coraz większe wymagania dotyczące jakości produktu, dbałości o środowisko, aspektów efektywności/wydajności oraz oszczędności energetycznych powodują, że tradycyjne techniki suszenia i odwadniania nie są już wystarczające i generują potrzebę tworzenia nowych metod [13, 15, 24]. Jedną z nich jest wykorzystanie ultradźwięków. Są to drgania mechaniczne cząstek ośrodka wokół położenia równowagi o częstotliwości powyżej 16 kHz, rozchodzące się w ośrodku w postaci fal sprężystych [1]. Ultradźwięki o wysokiej mocy przy niższej częstotliwości, tj. od 20 do 100 kHz mają zdolność kawitacji polegającej na tworzeniu się, powiększaniu i zanikaniu pęcherzyków zawierających parę danej cieczy, gaz lub mieszaninę parowo-gazową. Zjawisko to najsilniej występuje w warstwie brzegowej, co jest szczególnie ważne w suszarnictwie, gdyż warstwy brzegowe stawiają największy opór w wymianie ciepła i masy. Wykorzystanie energii drgań akustycznych pozwala na intensyfikację wielu procesów, szczególnie tych wymagających wysokich nakładów energetycznych, do których zalicza się suszenie bez znaczącego wzrostu temperatury.

Wspomaganie ultradźwiękowe operacji odwadniania owoców i warzyw jest postrzegane jako efektywny i perspektywiczny sposób intensyfikacji procesów wymiany masy, sprzyjający skróceniu czasu zarówno niezbędnej obróbki wstępnej, jak i etapu suszenia [3, 6, 7, 8, 11, 17, 23]. Oprócz możliwych korzyści energetycznych skrócenie czasu procesu sprzyja lepszemu zachowaniu składników bioaktywnych [22]. Jest to niezmiernie istotne w przypadku owoców i warzyw kolorowych, szczególnie korzystnych dla organizmu człowieka.

Modyfikacja struktury materiałów następuje na skutek mechanicznego oddziaływania ultradźwięków na tkankę poprzez generowanie przez falę akustyczną zagęszczeń i rozrzedzeń ośrodka [9, 18]. Wielu autorów dowiodło wpływu US na mikrostrukturę różnych owoców i warzyw [3, 4, 5, 6, 16], jednak wśród opracowań brak jest danych dotyczących możliwych skutków oddziaływania ultradźwięków na tkankę owoców pestkowych o kulistym kształcie i zróżnicowanej strukturze. W przypadku wiśni przewidywane oddziaływań mechanicznych: ściana komórkowa – ultradźwięki, jest szczególnie trudne ze względu na zróżnicowanie zawartości i wytrzymałości tkanki w warstwach parenchymy i epidermy.

Celem pracy było określenie wpływu oddziaływania ultradźwięków na strukturę wewnętrzną owoców wiśni poddawanych obróbce osmotycznej i suszeniu.

Material i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły owoce wiśni odmiany 'Nefris' zebrane w optymalnym stadium dojrzałości w sadzie doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Dąbrowicach. Umyte i zamrożone owoce przechowywano w temp. $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu przeprowadzenia badań. Z wiśni w stanie zamrożonym usuwano pestki (po uprzednim doprowadzeniu owoców do temp. $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$) i poddawano je odwadnianiu osmotycznemu w 60-procentowym roztworze sacharozy, trwającemu w sumie 120 min (w temp. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) w łaźni wodnej (model IS – 50 S, producent Intersonic S.C., Olsztyn) wyposażonej w przetworniki ultradźwiękowe, zamontowane w dnie wanny (25 kHz , $0,4\text{ W/cm}^2$) i platformę wytrząsającą (30 rpm). Stosunek owoców do syropu wynosił 1 : 4. Podczas odwadniania osmotycznego zastosowano różny czas działania ultradźwięków i wytrząsania. Początkowo próbki poddawano sonikacji (US) przez 0, 30, 60, 90 i 120 min, po czym próbki wytrząsano (S) przez: 120, 90, 60, 30 i 0 min, czyli zabiegi następowały po sobie. Odwodnione owoce poddawano suszeniu konwekcyjnemu (temp. $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2,5\text{ ms}^{-1}$, 8 h), co umożliwiło uzyskanie produktu o około 20-procentowej zawartości wody. Zawartość suchej masy w materiale po etapie odwadniania osmotycznego i suszenia konwekcyjnego oznaczano metodą wagową [21]. W celu porównania stanu owoców na wszystkich etapach wytwarzania suszu, tj. surowca, owoców odwadnianych oraz suszonych konwekcyjnie, strukturę wewnętrzną tkanek analizowano na przekrojach przygotowanych metodą parafinową. Owoce zatapiano w parafinie, krojono przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości $10\text{ }\mu\text{m}$, barwione następnie safraniną z zielenia jasną. Analizę oraz dokumentację fotograficzną wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse 80i z programem NIS-elements Br do archiwizacji i pomiarów.

Ponadto surowiec i owoce odwadniane, wstępnie utrwalone przez liofilizację, zobrazowano przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego Jeol JSM-35 (anali-

zję wykonano w IMDiK im. Mossakowskiego PAN w Warszawie) [10]. Fragmenty owoców po utrwaleniu w utrwalaczu CrAF, odwadniano w alkoholu i mieszankach z acetonem. Następnie materiał suszono w punkcie krytycznym CO₂ i napyłano złotem. Analizy w SEM udokumentowano fotograficznie.

Analizę ilościową struktury tkanek wiśni z użyciem mikroskopu optycznego prowadzono na utrwalonych preparatach mikroskopowych. Z każdego typu próbki wykonywano w świetle przechodzącym, w jasnym polu widzenia 25 ÷ 45 fotografii. Z uwagi na różną liczbę obrazów uzyskiwanych z każdego wariantu doświadczalnego i sposobu obróbki materiału, do analiz statystycznych, w sposób losowy, wybrano reprezentatywną próbę 2000 obiektów geometrycznych. W wyniku znaczących zmian w strukturze tkanki wiśni oraz częściowego uszkodzenia ścian komórkowych obiekty geometryczne analizowano bez podziału na kategorie. Wszystkie wyselekcjonowane obiekty charakteryzowano za pomocą czterech parametrów geometrycznych: pola powierzchni przekroju, obwodu przekroju, wydłużenia oraz kłistości kształtu [20].

Obliczenia statystyczne wykonano z użyciem pakietu Statistica 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Istotność różnic pomiędzy parametrami geometrycznymi poszczególnych typów próbek szacowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), z testem post hoc Tukeya, na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wpływ procesu odwadniania na strukturę tkanki wiśni

Odwadnianie osmotyczne prowadzone przez 120 min wpłynęło na zwiększenie zawartości suchej masy w tkance wiśni z 17 do 27 g/100 g śm. Zarówno na etapie obróbki wstępnej, jak i po suszeniu konwekcyjnym, stwierdzono wpływ zastosowanego rodzaju obróbki na strukturę tkanki wiśni (tab. 1).

Niezależnie od sposobu wspomagania procesu odwadniania osmotycznego wszystkie rodzaje obróbki wpłynęły na zmniejszenie pól powierzchni oraz obwodów przekrojów obserwowanych obiektów w stosunku do surowca (tab. 1), co świadczy o skurczu tkanki. W najmniejszym stopniu redukcji uległy pola powierzchni obiektów, gdy tkankę poddano wyłącznie działaniu ultradźwięków przez 120 min. Podobny zakres zmian zaobserwowano również w przypadku wytrząsania próbek przez 120 min, choć różnice nie były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). Zastosowanie mieszanych sposobów obróbki próbek ultradźwiękami (US) i wytrząsaniem (S) wywoływało zmniejszenie wartości parametrów opisujących rozmiary obiektów w badanej strukturze w większym stopniu, niż w przypadku każdego z tych procesów stosowanych osobno, jednak również nie były to różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Tabela 1. Wartości średnie parametrów geometrycznych wiśni, w zależności od wariantu doświadczenia i sposobu obróbki próbek

Table 1. Mean values of geometric parameters of sour cherry depending on experiment variant and treatment method of samples

Wariant doświadczenia Type of treatment	Rodzaj obróbki wiśni Treatment method of sour cherry	Pole powierzchni Surface area		Obwód Perimeter		Wydłużenie Elongation		Koliistość Circularity	
		\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
		[μm^2]	[μm^2]	[μm]	[μm]	[j.w.]	[j.w.]	[j.w.]	[j.w.]
Obr. wst.	120US+0S	11,4·10 ⁴ a*	54,1·10 ⁴	1191 ^a	2572	0,82 ^b	0,84	0,67 ^a	0,21
Obr. wst.	90US+30S	10,7·10 ⁴ ^a	47,4·10 ⁴	1116 ^a	2221	0,70 ^a	0,66	0,69 ^a	0,20
Obr. wst.	60US+60S	9,3·10 ⁴ ^a	45,7·10 ⁴	1020 ^a	1457	0,72 ^a	0,74	0,69 ^a	0,19
Obr. wst.	30US+90S	8,8·10 ⁴ ^a	43,5·10 ⁴	1086 ^a	2229	0,75 ^a	0,72	0,68 ^a	0,21
Obr. wst.	0US+120S	10,5·10 ⁴ ^a	45,4·10 ⁴	1166 ^a	2413	0,73 ^a	0,74	0,68 ^a	0,21
Susz	120US+0S	3,6·10 ⁴ ^a	13,1·10 ⁴	729 ^{ab}	996	0,75 ^c	0,90	0,72 ^{ab}	0,19
Susz	90US+30S	3,8·10 ⁴ ^a	8,5·10 ⁴	813 ^a	1057	0,66 ^b	0,64	0,69 ^c	0,21
Susz	60US+60S	2,8·10 ⁴ ^a	6,5·10 ⁴	657 ^b	709	0,59 ^a	0,61	0,73 ^a	0,18
Susz	30US+90S	6,1·10 ⁴ ^b	39,2·10 ⁴	774 ^a	1366	0,63 ^{ab}	0,64	0,72 ^a	0,18
Susz	0US+120S	3,5·10 ⁴ ^a	9,9·10 ⁴	735 ^{ab}	827	0,65 ^{ab}	0,65	0,71 ^b	0,19
Surowiec	-	15,6·10 ⁴	66,5·10 ⁴	1311	2242	0,74	0,69	0,66	0,20

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Obr. wst. – obróbka wstępna (odwadnianie osmotyczne) / pre-treatment (osmotic dehydration); Susz /Dried material; Surowiec / Raw material.

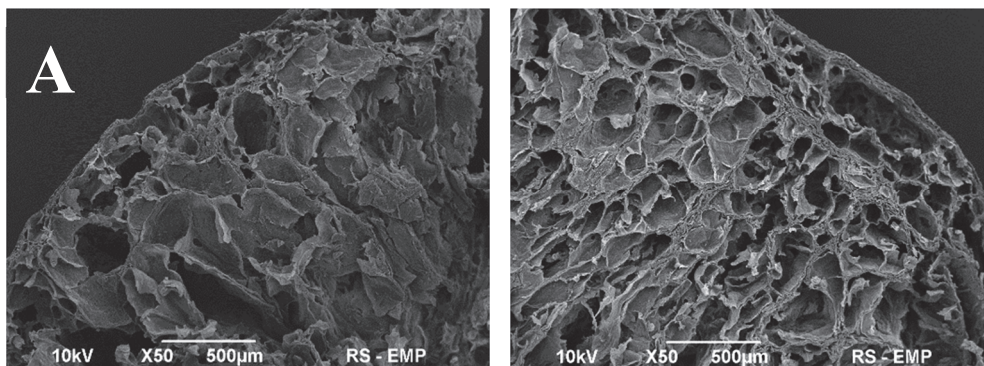
Oznaczenia próbek: / Sample code:

- 120US, 90US, 60US, 30US, 0US – oddziaływanie ultradźwiękami przez [min]: 120, 90, 60, 30, 0 / ultrasound treatment for [min]: 120, 90, 60, 30, 0;

- 0S, 30S, 60S, 90S, 120S – wytrząsanie [min]: / 0, 30, 60, 90, 120 / shaking [min]: 0, 30, 60, 90, 120

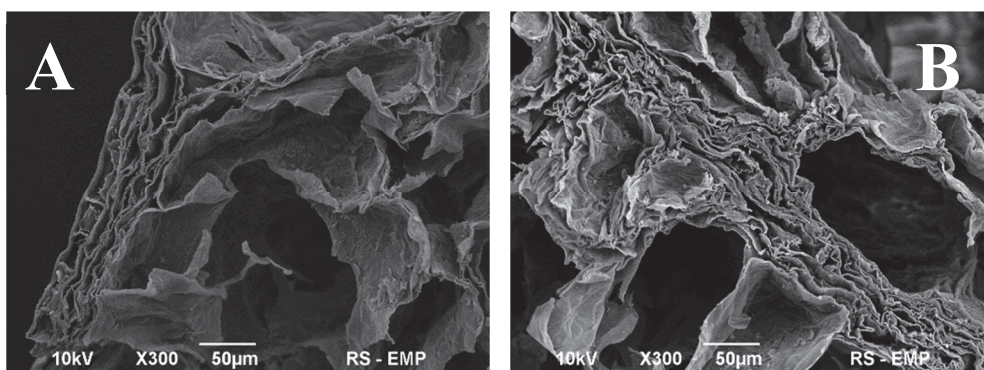
\bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation; n = 2000

*a, b, c – wartości średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą (osobno w obrębie próbek odwadnianych i osobno w obrębie suszu) nie różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values in columns and denoted by the same letter (separately among samples being dehydrated and among dried fruits) do not differ statistically significantly ($p \leq 0,05$); Wartości parametrów geometrycznych surowca przedstawiono w tabeli w celu poglądowym / Table show values of geometric parameters of raw material for demonstration purpose.



Fot. 1. Fotografie SEM owoców wiśni, mikrostruktura owoców bez obróbki wstępnej (A) oraz po 120 min odwadniania osmotycznego (B)

Fig. 1. Electron scanning microscopy images of sour cherry, (A) microstructure of fruits without pre-treatment and (B) after 120 min. of osmotic dehydration

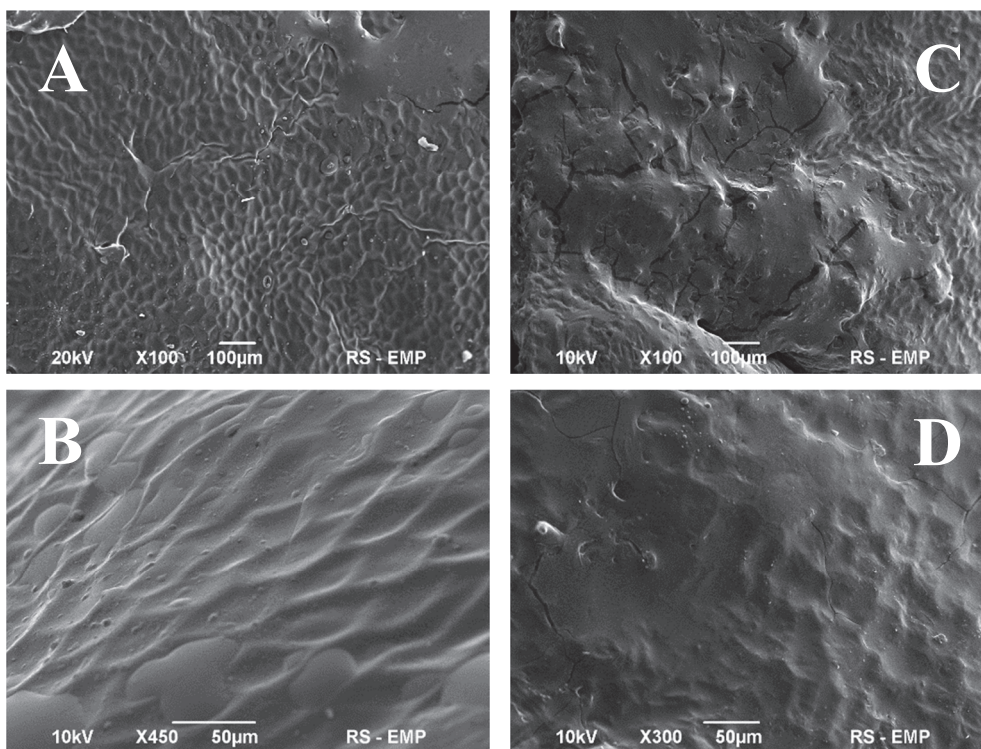


Fot. 2. Mikrostruktura owoców wiśni bez obróbki wstępnej z dobrze zachowaną epidermą i kilkoma warstwami subepidermalnych komórek mięksiszowych (A) i po odwadnianiu osmotycznym przez 120 min (B) (SEM)

Fig. 2. Microstructure of sour cherry fruits without pre-treatment with well-preserved epidermis and few layers of sub-epidermal flesh cells (A) and image (B) after osmotic dehydration for 120 min. (SEM)

Opisane wyżej zmiany struktury tkanki, wynikające z zastosowania obróbki osmotycznej tkanki, zobrazowano z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej (fot. 1 i 2). W porównaniu ze strukturą owocu wiśni bez obróbki wstępnej (fot. 1A), w owocach odwadnianych (fot. 1B) widoczne jest zagęszczenie komórek przy powierzchni skórki. Na fot. 1B i 2B zaobserwować też można zwiększenie grubości ścian komórkowych oraz zmniejszenie pola powierzchni przekroju pojedynczych komórek. Na powierzchni owoców bez obróbki wstępnej (fot. 3A) zauważalne są drobne popęknięcia z nielicznymi obszarami zasklepienymi sokiem komórkowym. Odwadnianie osmotyczne spowodowało, że spękania pogłębiły się, mocniej uwidoczniły i pojawiły się

również na pokrytych sokiem fragmentach epidermy owoców (fot. 3A i 3C). Uporządkowana struktura komórek surowca (fot. 3B) w wyniku odwadniania osmotycznego została zaburzona, a układ komórek widoczny przez skórę stał się mniej regularny (fot. 3D).

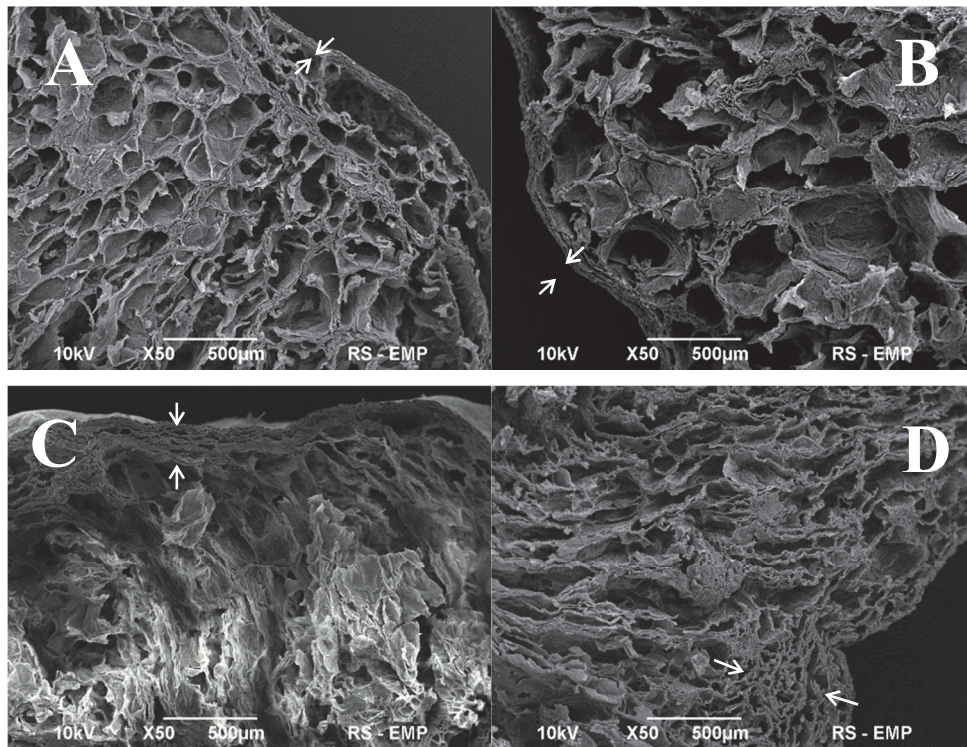


Fot. 3. Fotografie SEM powierzchni owoców wiśni (A, B) bez obróbki wstępnej oraz (C, D) owoców odwadnianych osmotycznie przez 120 min

Fig. 3. Electron scanning microscopy images of surfaces of sour cherry fruits (A, B) without pre-treatment and of fruits osmo-dehydrated for 120 min. (C, D)

Wpływ czasu oddziaływania ultradźwiękami na zmiany struktury owoców po odwadnianiu osmotycznym

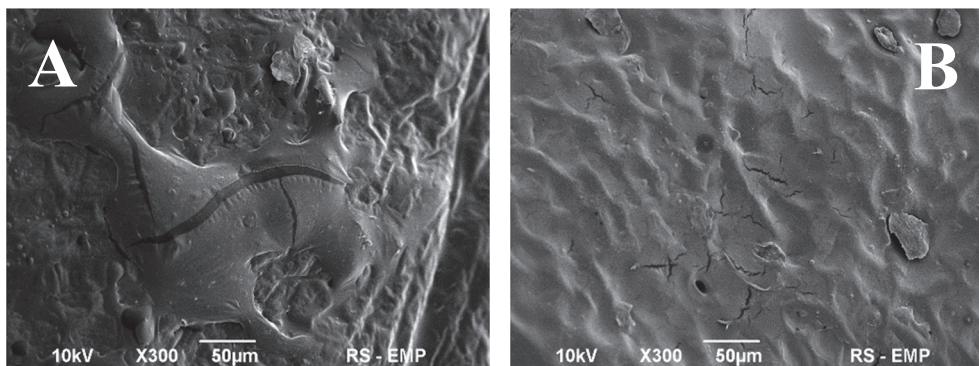
Zastosowanie ultradźwiękowego wspomaganie procesu odwadniania wiśni znacząco wpłynęło na mikrostrukturę owoców odwadnianych. Zastosowanie ultradźwięków przez 60 min ograniczyło zwartość komórek w warstwie przyściennej w porównaniu z owocami odwadnianymi bez tego wspomaganie (co zaznaczono strzałkami na fot. 4A i 4B), a kształt i wielkość komórek wskazują na mniejszą ich deformację w przypadku, gdy zjawisko dyfuzji wspomagano falami akustycznymi.



Fot. 4. Fotografie SEM miąższu wiśni odwodnionego osmotycznie. A – próbka odwadniana bez oddziaływania ultradźwiękami (US), B – odwadnianie wspomagane US przez 60 min, C – US 90 min, D – US 120 min. Strzałkami zaznaczono warstwę komórek epidermy

Fig. 4. Electron scanning microscopy images of sour cherry parenchyma after osmotic dehydration. A – sample being osmo-dehydrated without ultrasound treatment (US), B – osmotic dehydration supported by US for 60 min., C – US for 90 min., D – US for 120 min. Layers of epidermal cells were marked with arrows

O ile wraz z wydłużaniem czasu obróbki próbek ultradźwiękami w trakcie odwadniania osmotycznego zmniejszał się wyraźnie efekt zagęszczania zewnętrznych warstw komórek (co zostało zaznaczone strzałkami na fot. 4), o tyle dłuższa ekspozycja tkanki na ultradźwięki powodowała załamywanie się ścian komórkowych w strukturze miąższowej tkanki owoców. Na obrazach mikrostruktury (fot. 4C i 4D) widoczne są wyraźne pofałdowania będące wynikiem osłabienia i zapadania się ścian komórkowych. Spostrzeżenia te znalazły odzwierciedlenie w pracach innych autorów, w których materiałem doświadczalnym były owoce: kiwi [16], melona [5] i ananasa [4]. Prawdopodobne niewielkie zmiany wielkości i kształtu komórek epidermy i kilku warstw podepidermalnego miąższu ograniczały intensywność spękań na powierzchni owoców w porównaniu z owocami odwadnianymi bez wspomaganie ultradźwiękami (fot. 5A i 5B).



Fot. 5. Mikromorfologia powierzchni owoców wiśni odwodnionych osmotycznie (SEM). A – próbka odwadniająca bez oddziaływania ultradźwiękami (US); widoczne długie spękania wypukłych fragmentów pokrytych sokiem komórkowym. B – odwadnianie wspomaganie US przez 120 min.; widoczna lekko pofalowana epiderma i drobne mikrospeknięcia

Fig. 5. Micro-morphology of surfaces of sour cherry fruits after osmotic dehydration (SEM). A – sample being osmo-dehydrated without ultrasound treatment (US); visible long cracks of convex fragments covered with cell sap. B – osmotic dehydration supported by US for 120 min.; visible corrugation of epidermis and fine cracks

Wpływ stosowania ultradźwięków na strukturę tkanki utrwalonej w sposób konwekcyjny

Różnice w strukturze tkanki wywołane stosowaniem ultradźwięków, zaobserwowane bezpośrednio po obróbce osmotycznej, zostały utrwalone w strukturze suszu konwekcyjnego i uwidoczniły się bezpośrednio na obrazach mikroskopowych (fot. 6), jak i w wynikach parametrów opisujących rozmiary zobrazowanych struktur (tab. 1). Suszenie konwekcyjne wzmocniło efekt obróbki wstępnej obserwowanej w różnym czasie stosowania ultradźwięków, jednak dominujący był skurcz suszarniczy. W przypadku pola powierzchni zaobserwowano nawet kilkakrotne zmniejszenie wartości tego parametru w owocach suszonych w stosunku do surowca. O ile redukcja pola powierzchni przekroju po obróbce wstępnej była największa w wariacie 30US+90S, o tyle po suszeniu konwekcyjnym dalsze zmniejszanie pola powierzchni było najmniejsze spośród zastosowanych sposobów obróbki wstępnej. I pod względem tego parametru susz 30US+90S różnił się od pozostałych statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$). Zmniejszanie średnich wartości parametrów opisujących rozmiary komórek oraz przestrzeni międzykomórkowych można tłumaczyć z jednej strony skurczem struktury (fot. 6 i 7), a z drugiej – rozluźnieniem struktury ścian komórkowych oraz pojawieniem się dużej liczby pęknięć i mikroporów. Jednocześnie zaobserwowano mniejsze wartości odchyłeń standardowych w przypadku pól powierzchni, zarówno po obróbce wstępnej, jak i po suszeniu konwekcyjnym oraz obwodów obiektów po suszeniu konwekcyjnym próbek 60US po odwadnianiu, w stosunku do surowca (tab. 1). Świadczy to o mniej-

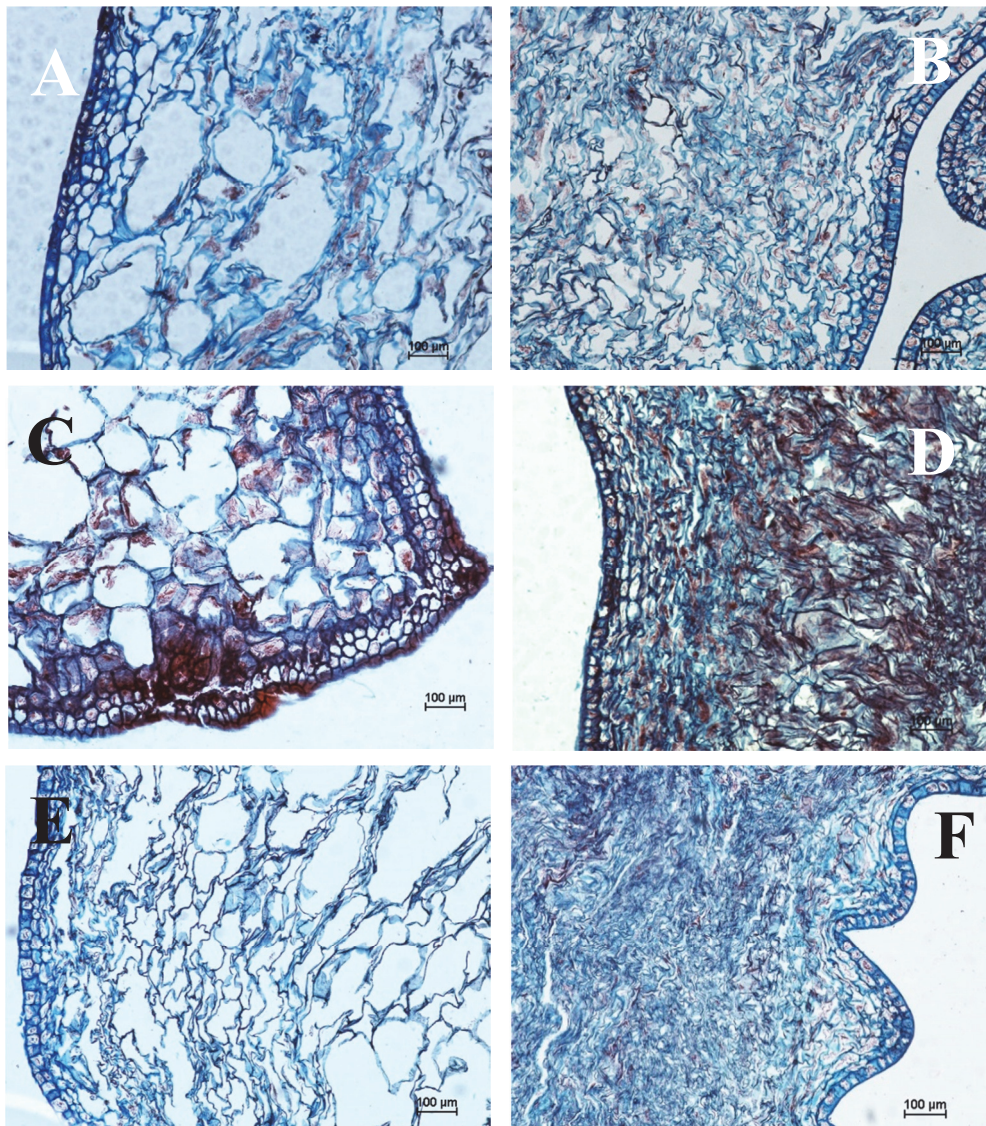
szym zróżnicowaniu struktury tkanki pod względem rozmiarów widocznych obiektów, a tym samym większym jej ujednorodnieniem po zastosowaniu suszenia.

Dane zamieszczone w tab. 1. pozostają w zgodzie z obserwacjami widocznymi bezpośrednio na obrazach z mikroskopu elektronowego SEM. Na fot. 4. najbardziej ujednoczoną strukturą pod względem pola powierzchni i obwodu, zarówno po odwadnianiu (fot. 4B), jak i po suszeniu (fot. 6D), charakteryzowały się owoce traktowane przez 60 min ultradźwiękami, co znajduje potwierdzenie w danych z tab. 1. i pozwala wnioskować o istnieniu optymalnego stanu sprzyjającego redukcji naprężenia wewnętrznego towarzyszącego procesom dyfuzyjnym.

W przypadku parametrów opisujących kształty obiektów na obrazach mikroskopowych wpływ oddziaływania ultradźwięków oraz wytrząsania mechanicznego na etapie obróbki wstępnej nie miały jednoznacznego charakteru. Generalną tendencją była redukcja wydłużenia obiektów oraz zaokrąglenie ich kształtów (wzrost wartości współczynnika kolistości), jednak na etapie obróbki wstępnej zmiany nie były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$), z wyjątkiem wydłużenia próbek wariantu 120 US. Różnice pomiędzy zastosowanymi wariantami obróbki uwidoczniły się po suszeniu konwekcyjnym. Podobnie, jak w przypadku pól powierzchni oraz obwodów, największy, statystycznie istotny ($p \leq 0,05$), wzrost zaokrąglenia oraz redukcję wydłużenia kształtów obiektów zaobserwowano w próbce 60US+60S.

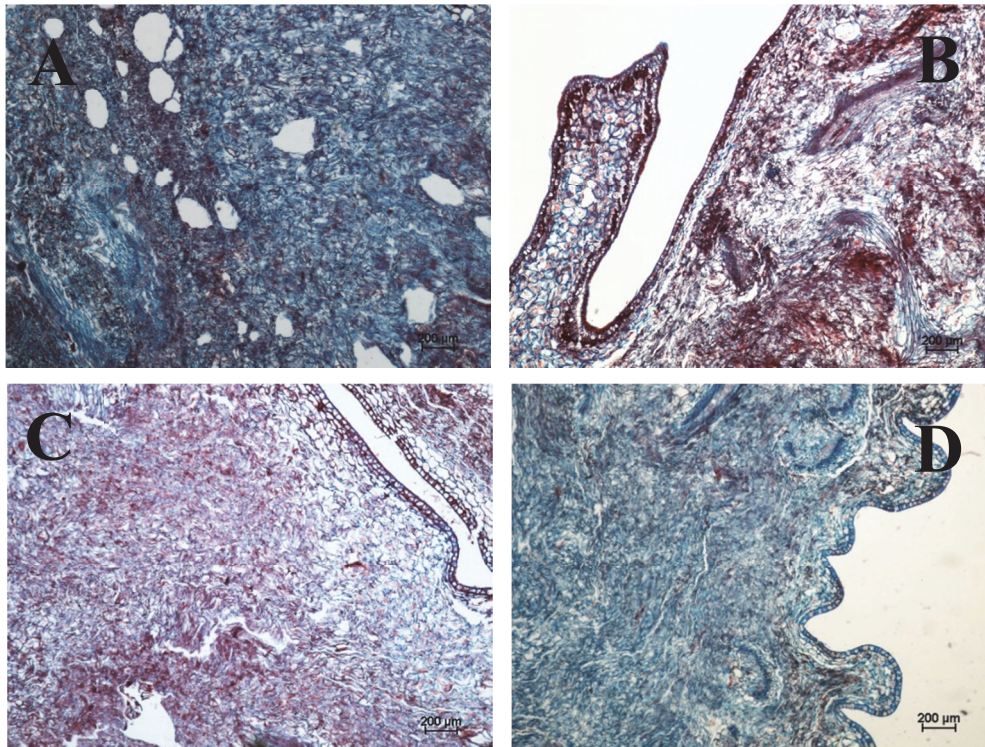
Niezależnie od czasu stosowania ultradźwięków w trakcie suszenia konwekcyjnego, kształt komórek w części miększowej owoców ulegał podobnym zmianom destrukcyjnym poprzez pofałdowanie ścian komórkowych. Zbliżone wyniki otrzymali Nowacka i wsp. [17] oraz Deng i Zhao [2] – dłuższe traktowanie próbek jabłka ultradźwiękami skutkowało większą destrukcją struktury suszu. Zastosowanie US w procesie suszenia skórki pomarańczowej również wywołało podobne rezultaty [9, 18]. Stopień deformacji komórek stanowił o ich zagęszczeniu, a tym samym o zwartości konsystencji miększu (fot. 6). W zależności od czasu traktowania odwadnianej tkanki ultradźwiękami zaobserwowano wyraźne różnice w homogenności struktury wysuszonych owoców (fot. 7). W obrazie mikroskopowym miąższu wiśni, które nie były poddane działaniu ultradźwięków, zaobserwowano występowanie wolnych przestrzeni międzykomórkowych na różnej głębokości tkanki, na przemian z zagęszczeniami (fot. 7A).

Zastosowanie wspomagania ultradźwiękowego sprzyjało zwiększeniu jednorodności struktury miąższu i przy obróbce przez 60 min obserwowane wyrównanie struktury, podobnie jak na etapie bezpośrednio po odwadnianiu (fot. 4B), było największe (fot. 7B). Komórki były najbardziej okrągłe i najmniej wydłużone spośród wszystkich suszy (tab. 1). Przedłużanie czasu działania US wyraźnie potęgowało efekt zagęszczania struktury, tak że susze z owoców traktowanych falami akustycznymi przez cały okres odwadniania charakteryzowały się największym skurczem tkanki (fot. 7D). W tej kombinacji komórki były najbardziej wydłużone (tab. 1).



Fot. 6. Przekroje owoców wiśni z warstwą komórek epidermy o dobrze zachowanym kształcie i miększu o zróżnicowanej strukturze. Obrazy z mikroskopu świetlnego tkanki odwodnionej osmotycznie (A, C, E) oraz tkanki poddanej po odwadnianiu suszeniu konwekcyjnemu (B, D, F). A i B – próbki bez traktowania ultradźwiękami (US), C, D – próbki traktowane US przez 60 min, E, F – próbki traktowane US przez 120 min

Fig. 6. Cross-sections of sour cherry fruits with layer of well-preserved shape of epidermal cells and diversified parenchyma. Light microscopy images of osmo-dehydrated tissue (A, C, E) and tissue subjected to convective drying (B, D, F) after dehydration. A, B – samples without ultrasound (US) treatment, C, D – samples treated with US for 60 min., E, F – samples treated with US for 120 min



Fot. 7. Przekroje owoców wiśni suszonych konwekcyjnie o nieregularnej, pofalowanej powierzchni komórek epidermy i o zwartej strukturze mięszku. Obrazy z mikroskopu świetlnego. A – próbka bez traktowania ultradźwiękami (US), B – próbka traktowana US przez 60 min, pojedyncze niewielkie perforacje, C – US przez 90 min, D – US przez 120 min. A – wyraźnie widoczne perforacje tkanki zanikające po stosowaniu wspomaganie US, B – sporadyczne, C, D – brak perforacji

Fig. 7. Cross-sections of convectively dried sour cherry fruits with irregular corrugated surface of epidermis cells and highly compacted parenchyma structure. Light microscopy images. A – sample without ultrasound (US) treatment, B – sample treated with US for 60 min., C – US for 90 min., D – US for 120 min. A – clearly visible perforations of tissue that disappeared after US-assisted treatment was applied, B – sporadic, C, D – no perforation

Dłuższy okres ekspozycji owoców wiśni na działanie US sprzyjał dezorganizacji struktur komórkowych w subepidermalnej strefie mięszku. Wiśnie zawierają niewiele pektyn, co może powodować skłonność do deformowania się tkanki mięszkowej, która ma duże przestrzenie międzykomórkowe. Skórka owocu, stanowiąca barierę ochronną ma zwartą strukturę komórkową i dlatego ma większą wytrzymałość niż tkanka mięszkowa. W związku z tym lepiej znosiła interakcje z falą akustyczną. Uzyskane wyniki wskazują, że tkanka wiśni absorbowała ultradźwięki i ich zastosowanie mogłoby ograniczać skurcz warstw powierzchniowych suszu, jednak operacja taka wymagałaby starannej optymalizacji.

Wnioski

1. Zastosowanie ultradźwięków jako czynnika modyfikującego proces odwadniania osmotycznego wiśni istotnie wpłynęło na strukturę tkanki, a obserwowany zakres zmian zależał od czasu ekspozycji tkanki na fale akustyczne.
2. W porównaniu z owocami odwadnianymi osmotycznie bez wspomaganie ultradźwiękowego, wraz z wydłużaniem czasu obróbki tkanki falami akustycznymi zmniejszała się zwartość komórek bezpośrednio sąsiadujących z epidermą. Jednocześnie obserwowano zwiększanie się deformacji komórek miękkiszu dośrodkowego i zanikanie przestrzeni międzykomórkowych.
3. Bezpośrednio po procesie odwadniania najbardziej ujednoczoną strukturą charakteryzowały się owoce poddawane działaniu ultradźwięków przez 60 min, co dowodzi istnienia optymalnego stanu sprzyjającego redukcji naprężenia wewnętrznego towarzyszącego procesom dyfuzyjnym.
4. We wszystkich analizowanych rodzajach próbek suszenie konwekcyjne spowodowało znaczny skurcz odwodnionej tkanki, jednak w zależności od czasu wcześniejszego traktowania ultradźwiękami zaobserwowano istotne różnice w homogenności struktury uzyskanego suszu.
5. Największą jednorodnością charakteryzował się susz uzyskany z tkanki traktowanej ultradźwiękami przez 60 min. W suszu otrzymanym z próbek odwadnianych bez wspomaganie ultradźwiękami stwierdzono występowanie wolnych przestrzeni na różnej głębokości tkanki na przemian z dużymi zagęszczeniami, zaś w próbkach poddawanych działaniu ultradźwięków przez 90 i 120 min, podobnie jak w próbkach bezpośrednio po odwadnianiu, obserwowano zwiększanie się skurczu tkanki i zanik przestrzeni międzykomórkowych.

Praca badawcza współfinansowana ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu pt. „Wykorzystanie ultradźwięków do wspomaganie procesów suszenia materiałów biologicznych szczególnie wrażliwych na termiczne warunki suszenia” (PBS1/A8/13/2012).

Literatura

- [1] Banaszak J., Kowalski S.J.: Metody akustyczne w badaniach inżynierskich. Wyd. Politechniki Poznańskiej, Poznań 2011.
- [2] Deng Y., Zhao Y.: Effect of pulsed vacuum and ultrasound osmopretreatments on glass transition temperature, texture, microstructure and calcium penetration of dried apples (Fuji). LWT – Food Sci. Technol., 2008, **41**, 1575-1585
- [3] Fernandes F.A.N., Rodrigues S.: Ultrasound as pre-treatment for drying of fruits: Dehydration of banana. J. Food Eng., 2007, **82**, 261-267.
- [4] Fernandes F.A.N., Gallão M.I., Rodrigues S.: Effect of osmosis and ultrasound on pineapple cell tissue structure during dehydration. J. Food Eng., 2009, **90**, 186-190.

- [5] Fernandes F.A.N., Gallão M.I., Rodrigues S.: Effect of osmotic dehydration and ultrasound pre-treatment on cell structure: Melon dehydration. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2008, **41**, 604-610.
- [6] Fernandes F.A.N., Linhares F.E. Jr., Rodrigues S.: Ultrasound as pre-treatment for drying of pineapple. *Ultrasonic Sonochemistry*, 2008, **15**, 1049-1054.
- [7] Fernandes F.A.N., Rodrigues S.: Application of ultrasound and ultrasound-assisted osmotic dehydration in drying of fruits. *Drying Technology*, 2008, **26**, 1509-1516.
- [8] Garcia-Noguera J., Oliveira F.I.P., Gallão M.I., Weller C.L., Rodrigues S., Fernandes F.A.N.: Ultrasound-assisted osmotic dehydration of strawberries: Effect of pretreatment time and ultrasonic frequency. *Drying Technology*, 2010, **28**, 294-303.
- [9] Garcia-Perez J.V., Ortuño C., Puig A., Carcel J.A., Perez-Munuera I.: Enhancement of water transport and microstructural changes by high-intensity ultrasound application on orange peel drying. *Food Bioprocess Technol.*, 2012, **5**, 2256-2265.
- [10] Hayat M.A.: Principles and techniques of scanning electron microscopy. Vol. 5. Van Nostrand Reinhold Co., New York 1976.
- [11] Jambak A.R., Mason T.J., Paniwnyk L., Lelas V.: Accelerated drying of button mushrooms, Brussels sprouts and cauliflower by applying power ultrasound and its rehydration properties. *J. Food Eng.*, 2007, **81**, 88-97.
- [12] Janowicz M., Średzińska K.: Wybrane właściwości suszonych konwekcyjnie jabłek wstępnie odwadnianych osmotycznie w warunkach zmiennego ciśnienia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **1(62)**, 86-98.
- [13] Kudra T., Mujumdar A.S.: Advanced drying technologies, Taylor and Francis Group. Boca Raton, FL USA, 2009.
- [14] Lewicki P.P.: Design of hot air drying for better foods. *Trends Food Sci. & Technol.*, 2006, **17**, 153-163.
- [15] Marzec A., Kowalska H., Ołdak B.: Wpływ techniki suszenia wiśni na właściwości teksturalne suszu oceniane metodą akustyczną i mechaniczną. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **4(89)**, 210-221.
- [16] Nowacka M., Tylewicz U., Laghi L., Dalla Rosa M., Witrowa-Rajchert D.: Effect of ultrasound treatment on the water state in kiwifruit during osmotic dehydration. *Food Chem.*, 2014, **144**, 18-25.
- [17] Nowacka M., Wiktor A., Śledź M., Jurek N., Witrowa-Rajchert D.: Drying of ultrasound pretreated apple and its selected physical properties. *J. Food Eng.*, 2012, **3(113)**, 427-433.
- [18] Ortuño C., Pérez-Munuera I., Puig A., Riera E., Garcia-Perez J.V.: Influence of power ultrasound application on mass transport and microstructure of orange peel during hot air drying. *Physics Procedia*, 2010, **3**, 153-159.
- [19] Piasecka E., Uczciwek M., Klewicki R.: Odwadnianie osmotyczne owoców w roztworach zawierających fruktoolisacharydy. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **2(63)**, 138-153.
- [20] Pieczywek P.M., Zdunek A.: Automatic classification of cells and intercellular spaces of apple tissue. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2012, **81**, 2-78.
- [21] PN-90/A-75101/03. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości suchej masy metodą wagową.
- [22] Rawson A., Tiwari B.K., Tuohy M.G., O'Donnell C.P., Brunton N.: Effect of ultrasound and blanching pretreatments on polyacetylene and carotenoid content of hot air and freeze dried carrot discs. *Ultrasonic Sonochemistry*, 2011, **18**, 1172-1179.
- [23] Rodrigues S., Fernandes F.A.N.: Use of ultrasound as pretreatment for dehydration of melons. *Drying Technology*, 2007, **10(25)**, 1791-1796.
- [24] Szparaga A., Kopeć A., Czerwińska E.: Wpływ odwadniania osmotycznego i zamrażalniczego przechowywania na stan mikrobiologiczny śliwek rozmrażanych w komorze próżniowo-parowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, **1(92)**, 137-147.

**ASSESSMENT OF CHANGES IN STRUCTURE OF DRIED TISSUE OF SOUR CHERRY
PRETREATED USING ULTRASOUND-ASSISTED OSMOTIC DEHYDRATION****S u m m a r y**

The objective of the research study was to determine the effect of ultrasounds on the microstructure of osmo-treated and dried sour cherry fruits. The 'Nefris' sour cherry fruit variety was osmotically dehydrated using a 60 % sucrose solution for 120 min. (40 °C) in an ultrasonic bath equipped with a transducer (25 kHz, 0.4 W/cm²) and a shaking platform (30 rpm). The total time of osmotic dehydration was 120 min; during that time period, diverse time variants of ultrasound (US) treatment and shaking (S) were applied. First, the samples were treated by ultrasounds (US) for 0, 30, 60, 90, and 120 min.; next, they were shaken for 120, 90, 60, 30, or 0 min., respectively. The dehydrated fruits were convectively dried. The structure of osmo-convectively dried samples of dehydrated fruits and raw material was microscopically analyzed. It was confirmed that the application of ultrasounds caused changes in the structure of tissues. A longer time of exposing sour cherry tissue to ultrasounds resulted in a decrease in the density of cells directly adjacent to the epidermis. Concurrently, it was found that the deformation of parenchyma cells increased and the intercellular spaces faded away. By the most homogenous structure (the most elongated and circular cells) were characterized the dried fruits that were osmo-treated and, simultaneously, ultrasound-treated and shaken for 60 min. (60US+60S); thus the presence of optimal state was proved that supported the reduction in internal tension. The convective drying causes the tissue to considerably contract. In the dried fruits, which were not treated by ultrasounds, but only shaken for 120 min. (0US+120S), alternating free intercellular and highly compact spaces were found. The application of ultrasounds for max 60 min. caused the homogeneity of structure of the material being dried to increase (optimal variant: 6US+60S).

Key words: plant tissue, pre-treatment, ultrasounds, drying, microstructure ☒

MACIEJ BILEK, KINGA STAWARCZYK, ŁUKASZ ŁUCZAJ, EWA CIEŚLIK

ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH SKŁADNIKÓW MINERALNYCH I ANIONÓW NIEORGANICZNYCH W SOKACH DRZEWNYCH Z TERENU PODKARPACIA

Streszczenie

Analizowano soki drzewne ośmiu gatunków drzew z Podkarpacia: brzozy zwisłej (brodawkowatej) – *Betula pendula* Ehrh., brzozy omszonej – *Betula pubescens* Ehrh., grabu pospolitego – *Carpinus betulus* L., klonu zwyczajnego – *Acer platanoides* L., klonu jawora – *Acer pseudoplatanus* L., klonu polnego – *Acer campestre* L., klonu jesionolistnego – *Acer negundo* L. i klonu srebrzystego – *Acer saccharinum* L. Określono zawartość anionów nieorganicznych: chlorków, azotanów(V), siarczanów(VI) oraz fosforanów(V), a także składników mineralnych: miedzi, cynku, wapnia, magnezu, sodu i potasu. Największą średnią zawartość chlorków ($32,68 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) i siarczanów ($21,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) oznaczono w sokach grabowych, a magnezu ($18,96 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) i wapnia ($30,52 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) w sokach z klonu polnego. W sokach z klonu jesionolistnego stwierdzono największą średnią zawartość fosforanów ($114,53 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), miedzi ($1,45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) i azotanów ($25,99 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), a w soku z brzozy zwisłej – cynku ($1,85 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) i sodu ($0,59 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Soki z klonu zwyczajnego odznaczały się z kolei największą średnią zawartością potasu ($82,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Otrzymane wyniki zestawiono z obowiązującymi w Polsce normami żywieniowymi. Wskazują one, że soki drzewne mogą być wartościowym źródłem składników mineralnych, szczególnie miedzi i cynku, w mniejszym stopniu wapnia, magnezu i fosforu. Jednocześnie stwierdzono znikome zagrożenie ze strony składników potencjalnie niekorzystnych dla ludzkiego zdrowia, tzn. anionów nieorganicznych: azotanów(V) i siarczanów(VI) oraz sodu.

Słowa kluczowe: soki drzewne, aniony nieorganiczne, składniki mineralne, normy żywieniowe

Dr M. Bilek, Katedra Inżynierii Produkcji Rolno-Spożywczej, Wydz. Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów, mgr K. Stawarczyk, dr hab. Ł. Łuczaj, Pozawydziałowy Zamiejscowy Instytut Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych, Uniwersytet Rzeszowski, Werynia 502, 36-100 Kolbuszowa, prof. dr hab. inż. E. Cieślik, Katedra Technologii Gastronomicznej i Konsumpcji, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków. Kontakt: mbilek@univ.rzeszow.pl

Wprowadzenie

Soki pochodzące z takich drzew, jak klon (*Acer* spp.) i brzoza (*Betula* spp.) są zbierane na półkuli północnej wczesną wiosną, ze względu na walory zdrowotne i żywieniowe [13, 23, 24, 25]. Rzadziej soki pobierane są z grabów, drzew owocowych, orzechów, lip, a także z winorośli [23].

Głównymi składnikami soków drzewnych, poza wodą stanowiącą zwykle ponad 95 % ich masy, są cukry. Sok klonowy, najłodszy ze wszystkich badanych do tej pory soków drzewnych, stanowi surowiec do produkcji syropu, z którego słynie Ameryka Północna [5, 12]. Na obszarze Europy i Azji sok ten przeważnie spożywa się jako napój surowy lub po sfermentowaniu [23]. Surowy sok klonowy ma duże walory zdrowotne i stosowany jest tradycyjnie m.in. do łagodzenia dolegliwości żołądkowych i w nadciśnieniu tętniczym [23, 24]. Świeży sok klonowy zawiera przede wszystkim sacharozę, której stężenie w sokach pobranych na terenie Podkarpacia w roku 2013 wynosiło od 2,74 % (klon polny) do 4,01 % (klon srebrzysty) [13]. W soku klonowym stwierdzono także kwasy organiczne, aminokwasy, związki fenolowe, witaminy oraz składniki mineralne [5, 12, 24]. Do głównych składników mineralnych, zawartych w soku klonowym, należą wapń i potas. W świeżym soku *Acer saccharinum* znajduje się $25 \div 50 \text{ mg l}^{-1}$ potasu i $20 \div 30 \text{ mg l}^{-1}$ wapnia. Do pozostałych związków mineralnych, występujących w sokach drzew z rodzaju klon, należą: magnez, sód, cynk, żelazo i miedź [12, 24]. Składniki te oznaczono w ilościach $0,01 \div 5,5 \text{ mg l}^{-1}$ [8, 12, 24].

Sok, pozyskiwany z drzew należących do rodzaju brzoza, nazywany w Polsce „oskołą”, ceniony jest w Europie i Azji, a zwłaszcza w krajach wschodniej Europy – na Ukrainie, Białorusi i w Rosji. Spożywany jest zarówno w postaci świeżej, jak i po przefermentowaniu do niskoalkoholowego, orzeźwiającego napoju [5, 12, 23, 24]. Sok z brzozy stosowany jest w medycynie ludowej do leczenia wielu chorób [12, 23, 24]. Zalecany jest także w wiosennych „kuracjach oczyszczających” oraz jako środek poprawiający kondycję skóry [23, 24, 25]. W przeciwieństwie do soków z klonu, zawierających sacharozę, soki brzozowe zawierają głównie glukozę (ok. 1 %) i fruktozę (ponad 1 %) [11, 12, 13, 24]. W skład soku brzozowego wchodzi ponadto aminokwasy, witaminy i kwasy organiczne [7, 10, 11, 12, 24]. W soku tym obecne są także składniki mineralne, głównie: potas ($115 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), wapń ($56,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), magnez ($22,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), sód ($14,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), cynk, mangan, żelazo, miedź i chrom. Potas, wapń, magnez, mangan i cynk występują w świeżym soku brzozowym w największych ilościach [7, 24].

Najrzadziej pozyskuje się sok z grabu. Istnieją jedynie lokalne doniesienia o stosowaniu go jako napoju [23]. Ocena zawartości cukrów w soku grabowym z terenu Podkarpacia wykazała obecność fruktozy (0,38 %) i glukozy (0,49 %), ze śladowymi ilościami sacharozy [13]. Brak jest natomiast danych dotyczących zawartości składni-

ków mineralnych w świeżych sokach grabowych, jak również wyników zawartości anionów nieorganicznych w świeżych sokach drzewnych.

Celem pracy było określenie zawartości składników mineralnych i wybranych anionów nieorganicznych w sokach drzewnych, pochodzących z obszaru południowo-wschodniej Polski. Oszacowano, w jakim stopniu badane soki drzewne mogą pokrywać zapotrzebowanie człowieka na wybrane składniki mineralne. Oznaczenie zawartości anionów nieorganicznych pozwoliło także ocenić potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumenta.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły soki z brzozy zwistej (brodawkowatej) – *Betula pendula* Ehrh., brzozy omszonej – *Betula pubescens* Ehrh., grabu pospolitego – *Carpinus betulus* L., klonu zwyczajnego – *Acer platanoides* L., jawora – *Acer pseudoplatanus* L., klonu polnego – *Acer campestre* L., klonu jesionolistnego – *Acer negundo* L. i klonu srebrzystego – *Acer saccharinum* L.

Soki pobierano z grup drzew rosnących w południowo-wschodniej Polsce, liczących od 2 do 5 osobników. Na Płaskowyżu Kolbuszowskim soki pobierano z drzew rosnących w parku na terenie miejscowości Werynia, zaś z terenu Pogórza Karpackiego – z drzew rosnących w Pietruszej Woli, Rzepniku i Krośnie. Próbkę pobierano pomiędzy 9 a 14 kwietnia 2013 r., w godzinach 10 - 12. Osobniki w obrębie jednego gatunku dobierano tak, by charakteryzowały się zbliżoną pierśnicą na wysokości 130 centymetrów. W celu pobrania próbek na każdym z drzew od strony południowej wykonywano małe nacięcie w kształcie litery V. W miejscu nacięcia wbijano rurkę o długości 12 cm i średnicy 2 cm. Pod każdą z nich umieszczano sterylną probówkę wirówkową o pojemności 50 ml, którą zamykano natychmiast po zebraniu soku. Proces poboru soku trwał 5 ÷ 20 min. Następnie próbki zamrażano i transportowano do laboratorium w przewoźnej zamrażarce. Przed badaniami laboratoryjnymi próbki rozmrażano w łaźni wodnej, w temp. 60 °C.

Oznaczanie zawartości składników mineralnych wykonywano przy użyciu spektrofotometru absorpcji atomowej z atomizacją w płomieniu (F-AAS), przy użyciu aparatu Hitachi Z-2000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) według wcześniej opublikowanej metodyki [3], a do określenia zawartości anionów nieorganicznych zastosowano chromatograf jonowy Dionex ICS 1000, postępując według opracowanej wcześniej procedury analitycznej [2]. Zawartość fosforanów (V) oznaczano spektrofotometrycznie metodą wanado-molibdenową [17]. Każdą analizę powtarzano trzykrotnie.

Wyniki i dyskusja

W sokach drzewnych oznaczono siedem z dziewięciu pierwiastków, definiowanych przez polskie normy żywieniowe [9] jako składniki mineralne, czyli: fosfor, fluor, żelazo, wapń, magnez, miedź i cynk (tab. 1 i 2). W próbkach nie stwierdzono obecności fluoru i żelaza.

Średnia zawartość miedzi w badanych sokach wynosiła od $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w soku z brzozy zwisłej z Werynii do $1,45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w soku z klonu jesionolistnego z Pietruszej Woli (tab. 1 i 2). Pod względem zawartości miedzi produktami spożywczymi najbardziej zbliżonymi do soków drzewnych są owoce egzotyczne ($0,01 \div 2,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), produkty mleczne (ok. $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) [4], napary herbaciane (do $0,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) [22], piwo ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) [18], różne gatunki win (do $0,364 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) [3].

Soki drzewne mogą stanowić bogate źródło cynku. Najwięcej było go w soku z brzozy, odpowiednio: $1,29 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (brzoza omszona z Krosna) i $1,85 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (brzoza zwisła z Pietruszej Woli) – tab. 1 i 2. Zawartości zbliżone do soków drzewnych zostały stwierdzone w świeżych owocach ($0,2 \div 6,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), sokach owocowych, napojach bezalkoholowych ($0,1 \div 2,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) [4, 15] oraz napojach alkoholowych: w piwie $0,13 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [18], w winie do $0,36 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [3]. Podobną zawartość oznaczono w naparach herbacianych – poniżej $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [22].

Soki drzewne mogą być także źródłem wapnia i magnezu. Największą zawartość wapnia i magnezu stwierdzono w próbkach soku klonu polnego pobranych na terenie Rzepnika. Średnia zawartość wapnia wynosiła $30,52 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, a magnezu – $18,96 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (tab. 1 i 2). W sokach drzewnych było mniej magnezu niż w butelkowanym piwie ($132 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [18]), mleku ($120 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [4]), czerwonym winie ($122 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) i w białym winie ($66 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [3]). Jednak w soku jabłkowym ($40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ magnezu) ilości te są już zbliżone do soków drzewnych [4]. Najbliższe sokom drzewnym są nisko zmineralizowane wody mineralne, zawierające średnio $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ magnezu, natomiast wody średnio zmineralizowane zawierają już ponad $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [20]. Podobna tendencja dotyczy wapnia. Soki drzewne zawierają ilości porównywalne np. z nektarami i musami owocowymi [16], z piwem [18], z białym i czerwonym winem, [3, 4] oraz napojami typu *cola*, w których jest ok. $30 \div 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Zawartość wapnia w sokach drzewnych jest również porównywalna z nisko zmineralizowanymi wodami mineralnymi, które zawierają średnio $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [20].

Soki drzewne mogą być także źródłem fosforu, występującego w postaci łatwo przyswajalnych anionów – fosforanów(V). Średnia zawartość fosforu wynosiła od około $4,07 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w soku z grabu (z Rzepnika) do $37,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ – z klonu jesionolistnego (z Pietruszej Woli) – tab. 1 i 2.

Tabela 1. Zawartość anionów nieorganicznych i składników mineralnych w sokach drzewnych [mg·l⁻¹]
Table 1. Content of inorganic anions and minerals in tree saps [mg·l⁻¹]

Gatunek Species	Liczba drzew, z których pobrano próbki Number of trees sampled	Miejsce poboru Place of sampling	Zawartość anionów nieorganicznych i składników mineralnych w soku drzewnym Content of inorganic anions and minerals in tree sap									
			Cl ⁻	SO ₄ ³⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	Mg ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺
Klon zwyczajny Norway maple	5	P	3,03 ± 0,88	3,2 ± 1,59	1,34 ± 1,84	51,35 ± 58,25	5,76 ± 2,28	0,36 ± 0,27	0,17 ± 0,05	18,39 ± 17	81,59 ± 69,09	0,34 ± 0,14
			7,09 ± 2,28	3,71 ± 2,26	1,86 ± 4,16	66,54 ± 26,24	9,2 ± 2,32	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,06	27,08 ± 11,53	82,15 ± 30,65	0,25 ± 0,09
Klon polny Field maple	5	R	4,34 ± 0,45	3,8 ± 2,59	4,79 ± 10,71	19,8 ± 11,07	18,96 ± 5,27	0,43 ± 0,57	0,32 ± 0,12	30,52 ± 10,74	61,98 ± 15,7	0,22 ± 0,06
			17,01 ± 8,36	17,35 ± 11,48	0,53 ± 1,18	12,49 ± 6,67	8,34 ± 3,07	0,34 ± 0,46	0,11 ± 0,05	14,3 ± 7,64	25,21 ± 23,75	0,25 ± 0,06
Grab pospolity Common hornbeam	5	W	32,68 ± 11,09	21,8 ± 9,38	n.d.	20,8 ± 9,26	15,06 ± 5,84	0,78 ± 0,54	0,1 ± 0,05	18,62 ± 8,8	24,5 ± 3,74	0,46 ± 0,27
			3,21 ± 1,25	3,54 ± 1,39	n.d.	42,01 ± 13,96	14,36 ± 2,04	0,39 ± 0,25	1,85 ± 0,32	17,28 ± 9,6	23,76 ± 8,63	0,56 ± 0,16
Brzoza zwisła Silver birch	5	W	2,84 ± 1,42	2,16 ± 2,24	0,49 ± 1,09	58,01 ± 62,24	4,42 ± 2,9	0,15 ± 0,09	0,88 ± 0,5	5,52 ± 3,14	10,56 ± 5,1	0,59 ± 0,72
			5,39 ± 1,28	6,17 ± 5,57	0,59 ± 1,18	38,63 ± 34,41	13,82 ± 5,55	0,48 ± 0,42	1,29 ± 0,17	15,12 ± 4,74	18,08 ± 18,85	0,55 ± 0,62
Klon srebrzysty Silver maple	4	P	7,06 ± 2,15	2,64 ± 2,19	0,85 ± 1,7	37,3 ± 16,06	2,0 ± 0,73	0,74 ± 1,13	0,11 ± 0,04	2,93 ± 1,0	21,02 ± 9,77	0,14 ± 0,02
			8,04 ± 3,66	3,33 ± 0,81	5,39 ± 3,1	88,76 ± 41,55	8,7 ± 4,34	0,17 ± 0,05	0,18 ± 0,07	28,4 ± 20,84	55,67 ± 40,12	0,43 ± 0,15
Klon jawor Sycamore	5	R	8,87 ± 3,01	2,46 ± 0,76	13,29 ± 2,16	114,53 ± 59,12	8,95 ± 6,58	1,45 ± 1,67	n.d.	16,06 ± 9,77	58,13 ± 35,83	0,21 ± 0,2
			6,46 ± 4,25	6,19 ± 4,76	25,99 ± 38,88	82,17 ± 27,33	8,3 ± 3,94	0,16 ± 0,08	n.d.	15,15 ± 6,65	54,22 ± 51,01	0,21 ± 0,07

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W – Werynia / Werynia village, P – Pietrusza Wola / Pietrusza Wola village, R – Rzepnik / Rzepnik village, K – Krosno / Krosno city, n.d. – nie wykryto / not detected;
W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations.

Tabela 2. Realizacja norm żywieniowych na składniki mineralne i elektrolity przez litrowe porcje badanych soków drzewnych

Table 2. Implementation of nutrition standards realized by one liter of tree sap

Pierwiastek Element	Wskazania norm żywieniowych na składnik mineralny lub elektrolit dla osoby dorosłej w wieku 31 ÷ 50 lat [mg/dzień] Recommended nutrition standards ref. to mineral or electrolyte for adult aged 31 ÷ 50 years [mg per day]		Największa średnia zawartość w badanym soku drzewnym The highest average content in tree sap analyzed [mg·l ⁻¹]	Realizacja normy w porcji soku drzewnego o obj. 1 litra Fulfilment of nutrition standards by tree sap portion of one litre [%]	
	Kobiety Women	Mężczyźni Men		Kobiety Women	Mężczyźni Men
Miedź Copper	0,9*		Klon jesionolistny / Boxelder 1,45	161,1	
Cynk Zinc	8*	11*	Brzoza zwisła / Silver birch 1,85	23,1	16,8
Wapń Calcium	1000*		Klon polny / Field maple 30,52	3	
Magnez Magnesium	320*	420*	Klon polny / Field maple 18,96	5,9	4,5
Fosfor Phosphorus	700*		Klon jesionolistny / Boxelder 37,7	5,4	
Potas Potassium	4700**		Klon zwyczajny / Norway maple 82,15	1,7	
Sód Sodium	1500**		Brzoza zwisła / Silver birch 0,59	0,04	
Chlor Chlorine	2300**		Grab pospolity Common hornbeam 32,68	1,4	

Objaśnienia: / Explanatory notes:

*) RDA – zalecane spożycie dzienne/ Recommended Dietary Allowances;

**) AI – wystarczające spożycie/ Adequate Intake.

Oceniono zawartość pierwiastków klasyfikowanych w diecie człowieka jako elektrolity sodu i potasu. We wszystkich próbkach soków drzewnych sód stanowił poniżej 1 mg·l⁻¹, co należy uznać za korzystne ze względu na negatywny wpływ nadmiernych ilości tego pierwiastka na organizm ludzki [6]. Natomiast zawartość potasu wynosiła od 10,56 mg·l⁻¹ w soku z brzozy zwisłej (z Werynii), do 82,15 mg·l⁻¹ – w soku z klonu zwyczajnego z tego samego miejsca (tab. 1 i 2). W porównaniu z sokami drzewnymi inne produkty płynne zawierają potas, w przeliczeniu na 1 litr: piwo – 309 mg [18], zaś wody butelkowane od 0,05 mg (woda źródłana) do 268 mg (woda mineralna) [14, 20].

Zawartość innych, poza fosforanami(V), anionów w sokach drzewnych nie stwarza perspektyw uzyskania korzyści żywieniowych. Średnia zawartość chlorków w badanych próbkach wynosiła od 2,84 mg·l⁻¹ w soku z brzozy zwisłej (z Werynii) do 32,68 mg·l⁻¹ w soku z grabu (również z Werynii) – tab. 1 i 2. Soki drzewne stanowią zatem znikome źródło chlorków, porównywalne z nisko zmineralizowanymi wodami mineralnymi, zawierającymi od 0,1 do 50 mg·l⁻¹ badanego anionu [20].

Nadmierna zawartość siarczanów(VI) w produktach spożywczych może być szkodliwa dla organizmu ze względu na efekt drażnienia przewodu pokarmowego. W żadnym z soków nie stwierdzono jednak przekroczenia normowanej dla wody pitnej, największej dopuszczalnej zawartości siarczanów, wynoszącej 250 mg·l⁻¹ [19]. Średnia zawartość siarczanów wynosiła od 2,16 mg·l⁻¹ w soku z brzozy zwisłej (z Werynii), do 21,8 mg·l⁻¹ w soku z grabu, z tej samej lokalizacji (tab. 1). Dla porównania – w polskich wodach mineralnych średnia zawartość siarczanów wynosi około 48 mg·l⁻¹ [20].

W aspekcie toksykologicznym należy rozpatrywać także zawartość azotanów(V) w sokach drzewnych (tab. 1). Uwagę zwraca duży rozrzut wyników zawartości tego anionu w sokach pochodzących z grupy kilku drzew. W obrębie pięciu osobników jawora zaobserwowano zawartość jonów azotanowych(V) w zakresie od 2,14 do 10,63 mg·l⁻¹. W przypadku klonu jesionolistnego, w próbkach z dwóch sąsiadujących drzew azotany(V) stanowiły 42,81 i 87,1 mg·l⁻¹ soku. Warto także podkreślić, że azotany(V) oznaczono w soku jednego lub dwóch osobników spośród, liczącej pięć sztuk, grupy drzew. W grupie pięciu osobników klonu polnego, w soku drzewnym czterech z nich nie stwierdzono występowania azotanów(V), zaś w przypadku jednego – zawartość wynosiła 23,96 mg·l⁻¹. Różnice mogły być spowodowane warunkami siedliskowymi i glebowymi w obrębie danego stanowiska. W porównaniu z wymaganiami dotyczącymi jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [19], według których dopuszczalny poziom azotanów(V) to 50 mg·l⁻¹, wymieniona wyżej ilość 87 mg·l⁻¹ wskazuje, że soki drzewne w wyjątkowych przypadkach mogą być potencjalnie szkodliwe dla zdrowia konsumenta. Jednak określone przez EFSA (*European Food Safety Authority* – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności) i JECFA (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* – Wspólny Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności) dopuszczalne dzienne pobranie (ADI, *Acceptable Daily Intake*) azotanów(V) może wynosić 3,7 mg·kg⁻¹ masy ciała. Przekroczenie ADI byłoby możliwe przy spożyciu trzech litrów soku o największej oznaczonej zawartości azotanów(V) [21]. Pobierając soki drzewne w celach konsumpcyjnych, należałoby zwracać uwagę na otoczenie rośliny. Dotyczy to intensywnego nawożenia, stosowania środków ochrony roślin i ewentualnego występowania w sąsiedztwie drzew np. wysypiska odpadów.

Wnioski

1. Soki drzewne mogą stanowić w diecie człowieka cenne źródło wybranych składników mineralnych, szczególnie miedzi i cynku, a w mniejszym stopniu: magnezu, wapnia i fosforu.
2. Badane soki drzewne nie zawierały dużych ilości składników potencjalnie niekorzystnych dla człowieka, tzn. azotanów(V), siarczanów(VI) i sodu.
3. Stwierdzono duże zróżnicowanie zawartości składników mineralnych w sokach drzewnych, nie tylko w obrębie jednego gatunku, ale nawet na tym samym stanowisku. Dlatego badania dotyczące wpływu różnych czynników (sposób pobierania soku, cechy drzewa, skład gleby) na skład soków drzewnych powinny być kontynuowane.

Autorzy składają podziękowania pracownikom Wydziałowego Laboratorium Analiz Zdrowotności Środowiska i Materiałów Pochodzenia Rolniczego Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego – magistrowi Marcinowi Pieniżkowi za wykonanie analiz przy użyciu spektrofotometru absorpcji atomowej oraz dr Agnieszce Ozimek za wykonanie analiz przy użyciu spektrofotometru UV-Vis.

Literatura

- [1] Beveridge T., Bruce K., Kok R.: Carbohydrate and mineral composition of gray birch syrup. Canadian Inst. Food Sci. Technol. J., 1978, **1** (11), 28-30.
- [2] Bilek M., Natłok N., Kaniuczak J., Gorzelany J.: Sugar and inorganic anions content in mineral and spring water-based beverages. Roczn. Państw. Zakł. Hig., 2014, **3** (65), 193-197
- [3] Bilek M., Stawarczyk M., Stępień A., Pieniżek M.: Analiza wybranych parametrów jakościowych i zdrowotnych win wytrawnych. Bromat. Chem. Toksykol., 2013, **4** (46), 440-448.
- [4] Ekmekcioglu C.: Intestinal bioavailability of minerals and trace elements from milk and beverages in humans. Nahrung, 2000, **6** (44), 390-397.
- [5] Essiamah S.: Spring sap of trees. Ber. Deut. Bot. Ges., 1980, **93**, 257-267.
- [6] Gertig H., Przysławski J.: Bromatologia. Zarys nauki o żywności. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2007, ss. 273-343.
- [7] Harju L., Hulten S.G.: Birch sap as a tool for biogeochemical prospecting. J. Geochem. Explor., 1990, **3** (37), 351-365.
- [8] Hyun-Shik M., Kwon S.-D., Park S.-B., Goo J.-W.: Sap collection and major components of Acer mono in Mt. Jiri. Korean J. Ecol., 2004, **5** (27), 263-267.
- [9] Jarosz M. (Red): Normy żywienia dla populacji polskiej. Nowelizacja. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2012, ss. 123-142 i 143-154.
- [10] Jeong S.J., Lee Ch.H., Kim H.Y., Lee S.H., Hwang I.G., Shin C.S., Lee J., Jeong H.S.: Quality characteristics of the white birch sap with varying collection periods. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 2012, **1** (41), 143-148.
- [11] Kallio H., Ahtonen S., Raulo J., Linko R.R.: Identification of the sugars and acids in birch sap. J. Food Sci., 1985, **1** (50), 266-269.
- [12] Kūka M., Čakste I., Geršebeka E.: Determination of bioactive compounds and mineral substances in latvian birch and maple saps. Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B Nat. Exact Appl. Sci., 2013 **4-5** (67), 437-441.

- [13] Łuczaj Ł., Bilek M., Stawarczyk K.: Sugar content in the sap of birches, hornbeams and maples in southeastern Poland. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2014, **4** (9), 410-416.
- [14] Marcussen H., Holm P.E., Hansen H.Ch.: Composition, flavor, chemical food safety, and consumer preferences of bottled water. *Compr. Rev. Food Sci.*, 2013, **12**, 333-356.
- [15] Martínez-Ballesta M.C., Dominguez-Perles R., Moreno D.A., Muries B., Alcaraz-López C., Bastías E., García-Viguera C., Carvajal M.: Minerals in plant food: effect of agricultural practices and role in human health. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 2010, **2** (30), 295-309.
- [16] Marzec A., Marzec Z., Kidała J., Zaręba S.: Zawartość wapnia i fosforu w niektórych produktach przeznaczonych do żywienia niemowląt i małych dzieci. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009, **3** (XLII), 793-797.
- [17] Ostrowska A., Gawliński S., Szczubiałka Z.: *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin*. Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa 1991.
- [18] Rajkowska M., Holak M., Protasowicki M.: Makro- i mikroelementy w wybranych asortymentach piwa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **2** (63), 112-118.
- [19] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 20 kwietnia 2010 r zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożyci przez ludzi. *Dz. U.* 2010 r. Nr 72, poz. 466. Zał. nr 1.
- [20] Salomon A., Regulska-Iłow B.: Polskie butelkowane wody mineralne i lecznicze – charakterystyka i zastosowanie. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2013, **1** (XLVI), 53-65.
- [21] Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. Nitrate in vegetables. Adopted on 10 April 2008. pp. 2. [online]. Dostęp w Internecie [12.07.2013]: <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/689.pdf>.
- [22] Street R., Száková J., Drábek O., Mládková L.: The status of micronutrients (Cu, Fe, Mn, Zn) in tea and tea infusions in selected samples imported to the Czech Republic. *Czech J. Food Sci.*, 2006, **2** (24), 62-71.
- [23] Svanberg I., Šoukand R., Łuczaj Ł., Kalle R., Zyryanova O., Dénes A., Papp N., Nedelcheva A., Šeřkauskaitė D., Kołodziejska-Degórska I., Kolosova V.: Uses of tree saps in northern and eastern parts of Europe. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 2012, **4** (81), 343-357.
- [24] Viřkelis P., Rubinskienė M.: Beržų sulos cheminų sudėtis. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialno sodininkystės ir daržininkystės instituto Ir Lietuvos žemės ūkio universiteto Mokslo Darbai. *Sodininkystė ir Daržininkystė* 2011, **3-4** (30), 75-81.
- [25] Zyryanova O.A., Terazawa M., Koike T., Zyranov V.I.: White birch trees as resource species of Russia: their distribution, ecophysiological features, multiple utilizations. *Eurasian J. For. Res.*, 2010 **1** (13), 25-40.

CONTENT OF SELECTED MINERALS AND INORGANIC ANIONS IN TREE SAPS FROM PODKARPACIE REGION

S u m m a r y

There were analyzed tree saps of eight tree species: silver birch - *Betula pendula*, downy birch - *Betula pubescens*, common hornbeam - *Carpinus betulus*, Norway maple - *Acer platanoides*, sycamore maple - *Acer pseudoplatanus*, field maple - *Acer campestre*, boxelder maple - *Acer negundo*, and silver maple - *Acer saccharinum*). The contents of the following inorganic anions were determined: chlorides, nitrates (V), sulphates (VI), and phosphates (V) as well as of the following minerals: copper, zinc, calcium, magnesium, sodium, and potassium. The highest average content of chlorides ($32.68 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) and sulphates ($21.8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) was determined in common hornbeam saps, whereas of magnesium ($18.96 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) and calcium ($30.52 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) in field maple saps. The highest average content of phosphates ($114.53 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), copper ($1.45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), and nitrates ($25.99 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) was detected in boxelder maple saps. The highest average contents of zinc ($1.85 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) and sodium ($0.59 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) were found in the silver birch saps. The Norway maple tree saps, in turn, were characterized by the highest average content of potassium ($82.15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

The results obtained were compared with the nutrition standards in force in Poland. They indicate that tree saps could be a valuable source of minerals, especially of copper and zinc, and to a lesser degree, of calcium, magnesium, and phosphorus. At the same time, it was reported that the ingredients showing a potentially adverse impact on human health, i.e. inorganic anions: nitrates(V), sulphates(VI), and sodium, present a negligible risk.

Key words: tree saps, inorganic anions, minerals, nutrition standards ✕

DOROTA BONARSKA-KUJAWA, SYLWIA CYBORAN, JAN OSZMIAŃSKI,
HALINA KLESZCZYŃSKA

AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA EKSTRAKTÓW POLIFENOLOWYCH Z OWOCÓW CZERWONEJ PORZECZKI I ŻURAWINY W ODNIESIENIU DO BŁONY ERYTROCYTÓW

Streszczenie

Celem podjętych badań było określenie aktywności przeciwutleniającej wodnych ekstraktów z czerwonej porzeczki i żurawiny w odniesieniu do błony erytrocytów oraz mechanizmu odpowiedzialnego za tę aktywność. Oznaczono skład polifenolowy ekstraktów z zastosowaniem metody chromatografii cieczowej z detektorem diodowym i masowym (UPLC-DAD-MS). Spektrofotometrycznie określono współczynnik podziału związków zawartych w ekstraktach pomiędzy fazę organiczną i wodną. Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów wobec błony erytrocytów zbadano metodą fluorymetryczną na podstawie stopnia gaszenia fluorescencji sondy DPH-PA, indukując utlenianie błon erytrocytów związkiem AAPH. Fluorymetrycznie określono również lokalizację w błonie erytrocytów związków polifenolowych zawartych w ekstraktach.

Stwierdzono, że owoce czerwonej porzeczki i żurawiny są bogate w związki polifenolowe, szczególnie w antocyjany i procyanidyny. Wykazano, po zastosowaniu sond fluorescencyjnych, że polifenole zawarte w ekstraktach nie przenikają do części hydrofobowej błony, na co wskazuje brak zmian w anizotropii fluorescencji. Łączą się natomiast z regionem główek polarnych na powierzchni błony, zmieniając ich upakowanie, na co wskazuje zmniejszenie uogólnionej polaryzacji. Dowiedziono, że związki polifenolowe zawarte w ekstraktach skutecznie chronią błonę erytrocytów przed szkodliwym działaniem wolnych rodników indukowanych związkiem AAPH w środowisku wodnym. Ponadto wykazano, że aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z czerwonej porzeczki ($IC_{50} = 4,59 \mu\text{g/ml}$) jest zbliżona do aktywności standardowego przeciwutleniacza, jakim jest Trolox ($IC_{50} = 3,9 \mu\text{g/ml}$), oraz że jest ona wyższa od aktywności ekstraktu żurawiny ($IC_{50} = 12,02 \mu\text{g/ml}$).

Słowa kluczowe: ekstrakty polifenolowe, owoce czerwonej porzeczki i żurawiny, błona erytrocytów, płynność błony, aktywność przeciwutleniająca ekstraktów

Dr inż. D. Bonarska-Kujawa, dr inż. S. Cyboran, prof. dr hab. H. Kleszczyńska, Katedra Fizyki i Biofizyki, Wydz. Przyrodniczo-Technologiczny, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, prof. dr hab. inż. J. Oszmiański, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. J. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław. Kontakt: dorota.bonarska-kujawa@up.wroc.pl

Wprowadzenie

Owoce żurawiny (*Vaccinium macrocarpon*) i czerwonej porzeczki (*Ribes rubrum* L.) są znane z walorów smakowych i właściwości prozdrowotnych. Spożywanie tych owoców może przyczynić się do łagodzenia przebiegu chorób układu nerwowego, pokarmowego, krwionośnego, a także wspomagać terapię nowotworów. Właściwości prozdrowotne tych owoców są związane przede wszystkim z ich właściwościami przeciwutleniającymi i przeciwzapalnymi związków wchodzących w skład ekstraktów. Owoce żurawiny są stosowane jako środek wspomagający leczenie w bakteryjnych infekcjach układu moczowego [12, 28], a owoce czerwonej porzeczki wykazują właściwości przeciwutleniające [15, 20]. Wymienione owoce, są bogatym źródłem wielu składników odżywczych [26], w tym związków polifenolowych.

Uważa się, że właściwości przeciwutleniające polifenoli są głównie odpowiedzialne za prozdrowotny wpływ ekstraktów roślinnych na organizm człowieka, zatem mają one zastosowanie w profilaktyce i leczeniu wielu chorób wywołanych stresem oksydacyjnym [23]. Na podstawie skutków oddziaływania tych substancji z błoną biologiczną, która jest pierwszym miejscem kontaktu różnych czynników fizykochemicznych z organizmami [1, 2, 11], będzie można określić prawdopodobny molekularny mechanizmu odpowiedzialny za te skutki. Ten mechanizm nie został dotąd w pełni wyjaśniony.

Celem badań było określenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z żurawiny i czerwonej porzeczki w odniesieniu do błony erytrocytów, traktowanej jako przykład i model błony biologicznej.

Material i metody badań

Acetonitryl, kwas mrówkowy, metanol i induktor utleniania 2,2'-diazobis(2-amidinopropan) dichlorowodoru (AAPH) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich[®]. Standardowe polifenole: kwercetyno-3-*O*-glukozyd, kwercetyno-3-*O*-galaktozyd, kwercetyno-3-*O*-ksylozyd, (-) epikatechinę, (+) katechinę, procyanidynę B2, viteksin, cyanidyno-3-*O*-galaktozyd, mirecetynę i kwercetynę zakupiono w firmie Extrasynthese[®]. Sondy fluorescencyjne 6-dodekanoil-2-dimetylaminoftalen (Laurdan), 1,6-difenyl-1,3,5-heksatrien (DPH) i kwas propionowy (3-(p-(6-fenyl)-1,3,5-heksatrienyl) (DPH-PA) zakupiono w firmie Molecular Probes[®].

Błony erytrocytów (cienie) uzyskano ze świeżej heparynowanej krwi świni, według metody Dodge'a i wsp. [10], stężenie białka w próbkach wynoszące 100 µg/ml określano metodą opisaną przez Bradforda [8].

Owoce żurawiny zbierano w Ogrodzie Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, a owoce czerwonej porzeczki – w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Zybiszowie. Materiał badawczy stanowiły liofilizaty wymienionych

owoców. Stosowano procedurę ekstrakcji polifenoli wg Gąsiorowskiego i wsp. [13]. Polifenole izolowano z owoców poprzez ekstrakcję wodą zawierającą 200 ppm SO₂, a stosunek rozpuszczalnika do owoców wynosił 3 : 1. Związki polifenolowe uzyskiwano z użyciem kolumny Purolite AP 400 (*PuroliteInt. Ltd UK*). Zawartość polifenoli w preparatach oznaczano za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC-DAD-MS). Identyfikację polifenoli prowadzono według Oszmiańskiego i wsp. [19] oraz Teleszko i wsp. [25]. Przy identyfikacji związków bazowano na wcześniej opublikowanych analizach ekstraktów z żurawiny [17, 22, 27] i czerwonej porzeczki [14]. Nie identyfikowano natomiast pozostałych składników ekstraktów.

Współczynnik podziału pomiędzy oktanol i bufor fosforanowy wyznaczano w celu oznaczenia hydrofilowości ekstraktów [18]. Przy użyciu spektrofotometru Cary 300 (Varian) w zakresie 200 ÷ 380 nm (UV) rejestrowano widma roztworów badanych związków w fazie organicznej, reprezentowanej przez oktanol przed inkubacją ekstraktów z roztworem fosforanowym i po niej. Maksimum absorbancji (A_0) i widma roztworów odpowiadały stężeniu badanych substancji w fazie organicznej, natomiast A_x – stężeniu badanych substancji, jakie pozostały w tej fazie, po 30 min inkubacji z buforem fosforanowym (A_x) [4]. Współczynnik podziału P obliczano z równania podanego przez Nenadisa i wsp. [18]:

$$P = \frac{A_x}{A_0 - A_x}$$

W celu ustalenia lokalizacji składników ekstraktów w błonie erytrocytów prowadzono badania określające wpływ tych związków na właściwości fizyczne hydrofilowego i hydrofobowego obszaru błony przy użyciu metody fluorymetrycznej. Zastosowano sondy fluorescencyjne DPH i Laurdan, które lokują się na różnych głębokościach błony. Sonda DPH emituje fluorescencję z obszaru łańcuchów węglowodorowych lipidów, natomiast chromofor sondy Laurdan jest zlokalizowany w obszarze glicerolu lipidów błonowych. Na podstawie zmian anizotropii fluorescencji sondy DPH i uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan, określono wpływ użytych ekstraktów na płynność hydrofobowego obszaru błony i uporządkowanie główek polarnych lipidów. Zmiany tych parametrów fizycznych świadczą o obecności użytych związków w badanych obszarach błon.

Próba kontrolna zawierała zawiesinę błon erytrocytów (0,1 mg/ml) i sondy fluorescencyjnej (10 μM), a do 3 ml próbek badanych dodawano odpowiednie ilości ekstraktów tak, aby ich stężenia wynosiły od 0,005 do 0,05 mg/ml. Intensywność fluorescencji była mierzona w temp. 37 °C dla dwóch sond Laurdan i DPH. Pomiar intensywności fluorescencji wykonywano przy użyciu fluorymetru CARY Eclipse, (Varian). Na podstawie zmierzonych wartości intensywności fluorescencji obliczano

wartości anizotropii fluorescencji sondy DPH i uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan według równań Lakowicza [16].

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów oznaczano metodą fluorymetryczną, według Bonarskiej-Kujawy i wsp. [6]. Wykorzystano w niej zależność intensywności fluorescencji sondy DPH-PA od stężenia wolnych rodników obecnych w roztworze. Do próbek z zawiesiną błon erytrocytów i sondy oraz odpowiednią ilością badanych ekstraktów dodawano związek AAPH, którego homolityczny rozpad prowadzi do powstania wolnych rodników. Za miarę stopnia utlenienia lipidów przyjęto względną intensywność fluorescencji (F/F_0), czyli stosunek fluorescencji badanej próbki utleniającej induktorem AAPH do początkowej fluorescencji tej próbki. Na podstawie otrzymanych wyników określono kinetyki utleniania lipidów błonowych w obecności ekstraktów użytych w 5 różnych stężeniach. Względne zmniejszenie intensywności fluorescencji (F/F_0 , gdzie F_0 – fluorescencja początkowa, F – fluorescencja po 30 min utleniania) przyjęto jako miarę stopnia utlenienia błon.

Statystyczną analizę wyników wykonano w programie Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa). Zastosowano analizę wariancji przy użyciu jednostronnego testu Dunnetta ($p = 0,05$), a wyniki pomiarów przedstawiono w postaci wartości średnich i odchyłeń standardowych. Każdy eksperyment wykonano w 5 powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

W ekstrakcie z czerwonej porzeczki zidentyfikowano 12 związków polifenolowych, w tym kwasy fenolowe, glikozydy kwercetyny oraz antocyjany, w szczególności cyjanidyny (tab. 1). Antocyjany były największą grupą związków fenolowych zawartych w ekstrakcie z czerwonej porzeczki i stanowiły 85 % jego frakcji polifenolowej. Wśród zidentyfikowanych antocyjanin najwięcej było cyjanidyno-3-*O*-kwylozylrutynozydu (ok. 65 %). Pozostałe związki polifenolowe, jak kwasy hydroksycynamonowe i pochodne flawonoli, stanowiły ok. 15 % frakcji polifenolowej tego ekstraktu.

W ekstrakcie z owoców żurawiny zidentyfikowano 22 związki polifenolowe w tym flawanole, flawonole, antocyjany oraz kwasy fenolowe (tab. 1). Procyjanidyny polimerowe stanowiły największą grupę związków fenolowych w owocach żurawiny i wynosiły 89,5 % s.m. zidentyfikowanej frakcji polifenolowej ekstraktu (tab. 1).

Współczynniki podziału ekstraktów pomiędzy oktanol i bufor fosforanowy wyrażono jako $\log P$. Ze wzrostem ujemnych wartości $\log P$ zwiększa się hydrofilowy charakter związków zawartych w ekstraktach. Dodatnie wartości parametru $\log P$ świadczą o hydrofobowym charakterze związków. Uzyskane wartości współczynnika podziału wskazują na hydrofilowy charakter polifenolowych składników ekstraktów z czerwonej porzeczki i żurawiny, przy czym bardziej hydrofilowe były składniki ekstraktu z czerwonej porzeczki (tab. 2).

Tabela 1. Zawartość i charakterystyka związków fenolowych w ekstraktach z owoców żurawiny i czerwonej porzeczki

Table 1. Content and profile of phenolic compounds in extracts from cranberry and red currant fruits

Ekstrakty Extracts	Żurawina Cranberry [mg/g]	Czerwona porzeczka Red currant [mg/g]	Rt [min]	λ_{\max} [nm]	[MS-]
Kwas neochlorogenowy Neochlorogenic acid	1,00	4,3	2,36	320	353
Dimer procyanidyny typu B B-type PA-dimer	4,18		2,66	280	577
Heksozyd kwasu kawowego / Caffeoyl-hexose		6,2	2,72	320	341
(+) katechina / (+)- catechin	6,82		3,16	280	289
Heksozyd kwasu kawowego Caffeoyl-hexose		2,1	3,40	320	341
Kwas chlorogenowy / Chlorogenic acid	2,10		3,53	320	353
Kwas kawowy / Caffeic acid	1,76		3,73	320	179
Procyanidyna B2 / Procyanidin B2	3,62		3,93	280	577
p-Kumaryloheksozyd / p-Coumaroyl-hexose		2,3	4,05	312	324
Trimer procyanidyny typu B B-type PA-trimer	1,20		4,48	280	865
(-) epikatechina / (-)-epicatechin	6,33		4,71	280	289
Cyjanidyno-heksozo-pentozyd (cyjanidyno-3-O-sambubiozyd) Cyanidin hexose-pentoside (cyanidin 3-O-sambubioside)		13,6	4,82	514	581
Cyjanidyno-3-O-galaktozyd Cyanidin-3-O-galactoside	5,36		4,83	515	449
Cyjanidyno (heksoza + pentoza)- deoksyheksozyd (cyjanidyno 3-O-(2G-ksylorutynozyd)) Cyanidin (hexose + pentose)-deoxyhexoside (cyanidin 3-O-(2G-xylosylrutinoside))		133,3	4,95	514	727
Cyjanidyno heksozo-deoksyheksozyd (cyjanidyno-3-O-rutynozyd) Cyanidinhexose-deoxyhexoside (cyanidin 3-O-rutinoside)		24,6	5,15	516	595
Cyjanidyno-3-O-arabinozyd Cyanidin-3-O-arabinoside	0,16		5,16	515	419
Kwercetyno-heksozo-deoksyheksozo- deoksyheksozyd / Quercetinhexose- deoxyhexose-deoxyhexoside		5,2	6,20	355	757
Procyanidyna C1 Procyanidin C1	2,82		5,20	280	865

Miryctyno-3- <i>O</i> -galaktozyd Myricetin-3- <i>O</i> -galactoside	0,26		5,83	355	479
Peonidyno-3- <i>O</i> -galaktozyd Peonidin-3- <i>O</i> -galactoside	0,29		6,06	515	463
Malwidyno-3- <i>O</i> -arabinozyd Malvidin-3- <i>O</i> -arabinoside	0,05		6,43	520	463
Kwercetyno-heksozo-deoksyheksozyd Quercetin-hexose-deoxyhexose		2,8	6,60	355	611
Miryctyno-3- <i>O</i> -arabinozyd Myricetin-3- <i>O</i> -arabinoside	0,15		6,75	355	449
Kwercetyno-3- <i>O</i> -galaktozyd Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside	0,08		7,12	355	463
Dimer procyanidyny typu B B-type PA-dimer	0,5		7,21	280	577
Kwercetyno-3- <i>O</i> -rutynozyd Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside		5,7	7,22	355	611
Kwercetyno-3- <i>O</i> -glukozyd Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	0,12		7,38	350	463
Kwercetyno-3- <i>O</i> -ksylozyd Quercetin-3- <i>O</i> -xyloside	0,16		7,95	350	433
Kwercetyno-3- <i>O</i> -glukozyd Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside		3,2	8,00	355	465
Kwas dikawowo-chinowy Di-caffeoyl quinic acid	0,22		8,26	320	515
Miryctyna / Myricetin	0,16		8,64	360	317
Kwercetyna / Quercetin	0,76		11,09	345	301
Polimery procyanidyny / Procyanidin polymers	285,61				
W sumie / Total	323,71	203,3			

Objaśnienie: / Explanatory notes:

Identyfikacja związków na podstawie: długości fali przy maksimum absorpcji (λ_{\max}), czasu retencji (Rt) i jonów ujemnych.(MS-) / Identification of compounds on the basis of: wavelength at maximum absorption (λ_{\max}), retention time (Rt), and negative ions (MS-)

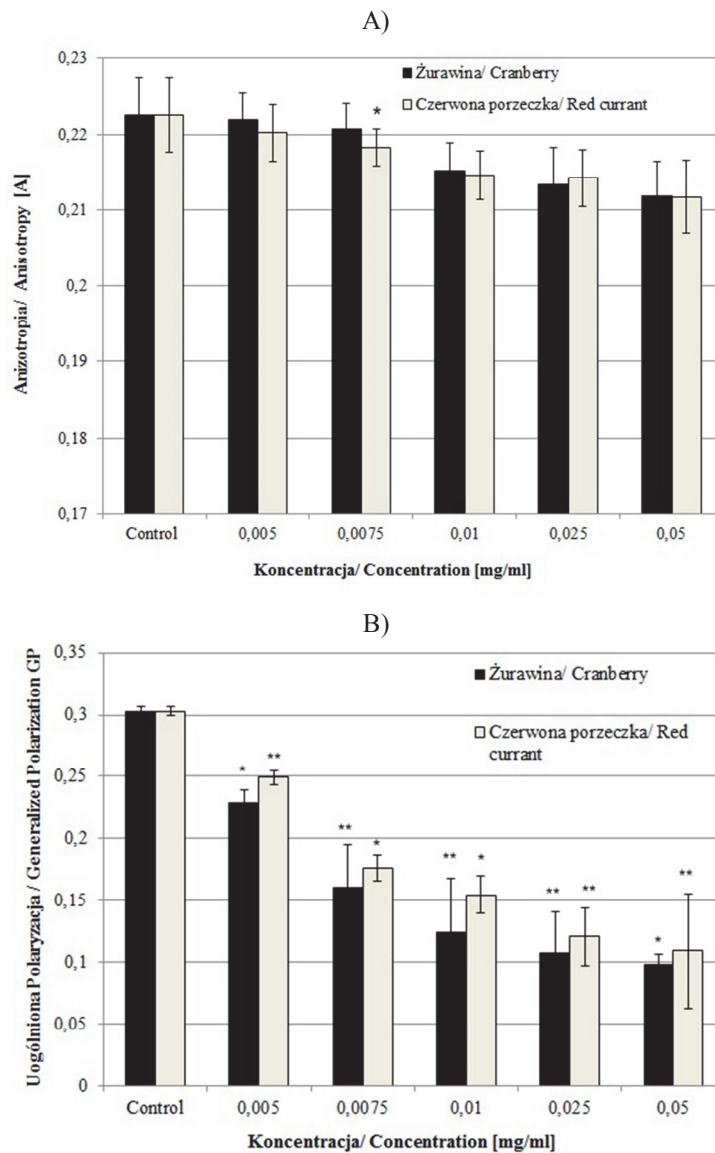
Tabela 2. Wartości współczynnika podziału oktanol / bufor fosforanowy ekstraktów z czerwonej porzeczki i żurawiny oraz standardowego przeciwutleniacza – Troloxu[®]

Table 2. Values of octanol-phosphate buffer partition coefficient for cranberry and red currant extracts and standard antioxidant: Trolox[®]

Ekstrakt / Extract	log P (\bar{x})	s / SD
Żurawina / Cranberry	-0,611	0,048
Czerwona porzeczka / Red currant	-0,831	0,035
Trolox [®]	-0,805	0,044

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation; n = 5



Objaśnienia: / Explanatory notes:

n = 5; * – różnice statystycznie istotne na poziomie p = 0,01 / statistically significant differences at p = 0.01;

** – różnice statystycznie istotne na poziomie p = 0,05/ statistically significant differences at p = 0.05.

Rys. 1. Wartość anizotropii (A) sondy DPH i uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan (B) dla błon erytrocytów modyfikowanych ekstraktami z owoców żurawiny i czerwonej porzeczki o różnych stężeniach w temp. 37 °C

Fig. 1. Values of (A) anisotropy of DPH probe and generalized polarization (GP) of Laurdan probe (B) for erythrocytes membranes modified using cranberry and red currant fruit extracts at different concentration rates, at 37 °C

Płynność błon w obszarze hydrofobowym, tj. na poziomie łańcuchów lipidów błonowych określono na podstawie anizotropii fluorescencji (A) sondy DPH, która lokuje się w tym obszarze błon. Nie wykazano istotnych zmian płynności błony erytrocytów pod wpływem badanych ekstraktów, co dowodzi, że związki obecne w ekstraktach pozostają na powierzchni błony, nie wnikając głęboko do obszaru hydrofobowego (rys.1A).

Zmiany zachodzące w części hydrofilowej błon pod wpływem badanych ekstraktów określone zostały na podstawie wartości uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan, rejestrującej zmiany parametru uporządkowania główek polarnych lipidów w błonie. Wyniki tych badań wskazują, że związki zawarte w ekstraktach zmieniły parametr uporządkowania lipidów, co przemawia za ich lokalizacją w tej części błon (rys. 1B). W obecności obydwu badanych ekstraktów nastąpiło wyraźne zmniejszenie uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan, który zależało od stężenia ekstraktów w roztworze.

Uzyskane wyniki badań z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych pozwalają sądzić, że obecne w ekstraktach polifenole koncentrują się głównie w obszarze hydrofilowym błon erytrocytów, natomiast nie wnikają do obszaru hydrofobowego dwuwarstwy lipidowej błony. Podobne spostrzeżenia w przypadku innych ekstraktów roślinnych, przy użyciu takich samych technik badawczych, przedstawiono w pracach [3, 24].

Tabela 3. Wartości stężeń IC_{50} ekstraktu z czerwonej porzeczki i żurawiny, określone metodą fluorymetryczną

Table 3. Values of IC_{50} concentration rates of cranberry and red currant extracts as determined using fluorescence method

Ekstrakt / Extract	Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
Żurawina / Cranberry	$12,02 \pm 2,17$
Czerwona porzeczka / Red currant	$4,59 \pm 0,42$
Trolox®	$3,90 \pm 0,30$

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie \pm odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 5

Stopień ochrony błon przed utlenieniem przez związki polifenolowe zawarte w ekstraktach określono fluorymetrycznie na podstawie stopnia gaszenia fluorescencji sondy DPH-PA przez wolne rodniki powstałe w wyniku rozpadu związku AAPH. Na podstawie uzyskanych kinetyk utleniania przy różnych stężeniach badanych ekstraktów wyznaczono wartości stężenia IC_{50} odpowiedzialnego za 50-procentową inhibicję stopnia utlenienia lipidów błonowych. Wykazano dobre właściwości przeciwutleniają-

ce użytych ekstraktów wobec lipidów błonowych, które porównano z aktywnością standardowego przeciwutleniacza, jakim jest Trolox[®]. Aktywność ekstraktu z czerwonej porzeczki była porównywalna z aktywnością Troloxu[®], zaś aktywność ekstraktu z żurawiny była mniejsza (tab. 3).

Wyniki aktywności przeciwutleniającej ekstraktów można powiązać z hydrofilowością ich ekstraktów. Hydrofilowość ekstraktu z żurawiny okazała się mniejsza, wykazywał on również mniejszą aktywność przeciwutleniającą. Jak wiadomo, hydrofilowość ekstraktów jest uwarunkowana ich składem polifenolowym. Antocyjany, w tym glikozydy cyjanidyny, które są głównymi składnikami polifenolowymi ekstraktu z czerwonej porzeczki, jak wykazano wcześniej [5], charakteryzują się dużą aktywnością przeciwutleniającą wobec błon erytrocytów oraz mają hydrofilowy charakter. Cyjanidyny dominują również w ekstrakcie z owoców aronii, czarnej porzeczki i jagody kamczackiej. Ekstrakty te chronią błony erytrocytów utleniane związkami AAPH w podobnym stopniu, jak ekstrakt z czerwonej porzeczki [4, 9]. Za aktywność przeciwutleniającą składników ekstraktu z żurawiny prawdopodobnie odpowiadają głównie zawarte w nim procyjanidyny, które ze względu na swoje duże rozmiary osłaniają grupy hydroksylowe innych związków zawartych w ekstrakcie, przez co ograniczają ich aktywność przeciwutleniającą. Potwierdziły to uzyskane wyniki – aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z żurawiny była niższa od ekstraktu z czerwonej porzeczki, który zawiera mniej związków polifenolowych (ok. 40 %). Ponadto uważa się [7, 26], że za aktywność przeciwutleniającą ekstraktu z żurawiny odpowiadają przede wszystkim antocyjany, a następnie flawanole i flawonole. Mniejsza zawartość antocyjanów w ekstrakcie z żurawiny może wyjaśniać jego mniejszą aktywność przeciwutleniającą wobec błon erytrocytów niż ekstraktu z czerwonej porzeczki.

Wnioski

1. Stwierdzono, że ekstrakty z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny są bogatym źródłem związków polifenolowych, w szczególności antocyjanów i procyjanidyn.
2. Związki polifenolowe zawarte w tych ekstraktach nie były obecne w hydrofobowym wnętrzu błony erytrocytów, ponieważ praktycznie nie zmieniały płynności błony w tym obszarze. Indukowały natomiast zmiany w części hydrofilowej błon erytrocytów, lokując się prawdopodobnie na ich powierzchni.
3. Ekstrakt z czerwonej porzeczki charakteryzował się wysoką aktywnością przeciwutleniającą, porównywalną z aktywnością Troloxu[®], dzięki dużej zawartości antocyjanów. Niższą aktywność przeciwutleniającą wykazywał ekstrakt z żurawiny, co prawdopodobnie było związane z obecnością w jego składzie procyjanidyn o dużym stężeniu.
4. Ochrona błony przed utlenianiem przez wolne rodniki obecne w roztworze była związana z obecnością na powierzchni błony związków polifenolowych zawartych

w ekstraktach. Taka lokalizacja polifenoli sprawia, że stanowią one barierę chroniącą błony biologiczne przed destrukcyjnym działaniem wolnych rodników.

Praca została sfinansowana ze środków statutowych Katedry Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Literatura

- [1] Arbos K.A., Claro M.L., Borges L., Santos C.A.M., Weffort-Santos A.M.: Human erythrocyte as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutr. Res.*, 2008, **28**, 457-463.
- [2] Arora A., Byren T.M., Nair M.G., Strasburg G.M.: Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **1** (373), 102-109.
- [3] Bonarska-Kujawa D., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H.: Biological activity of blackcurrant extracts (*Ribesnigrum* L.) in relation to erythrocyte membranes. *BioMed Res. Inter.*, 2014, Article ID 783059, DOI: 10.1155/2014/783059.
- [4] Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H.: Biophysical mechanism of the protective effect of the polyphenols extracts from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.) against lipid peroxidation of erythrocyte and lipid membranes. *J. Membrane Biol.*, 2014, **247**, 611-625.
- [5] Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Kleszczyńska H.: Interaction of selected antocyanins with erythrocytes membrane and liposomes membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2012, **17**, 289-308.
- [6] Bonarska-Kujawa D., Sarapuk J., Bielecki K., Oszmiański J., Kleszczyńska H.: Antioxidant properties of extracts from apple, chokeberry and strawberry. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2012, **4** (62), 229-234.
- [7] Borges G., Degeneve A., Mullen W., Crozier A.: Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants and cranberries. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3901-3909.
- [8] Bradford M.: Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [9] Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H.: Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Res. Int.*, 2014, DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.037.
- [10] Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of erythrocytes. *Arch. Biochem.*, 1963, **100**, 119-130.
- [11] Duchnowicz P., Bors M., Podsędek A., Koter-Michalak M., Broncel M.: Effect of polyphenols extracts from *Brassica* vegetables on erythrocyte membranes (*in vitro* study). *Environ. Toxic. Pharmacol.*, 2012, **34**, 783-790.
- [12] Duthie S.J., Jenkinson A.M.E., Crozier A., Mullen W., Pirie L., Kyle J., Yap L. S., Christenm P., Duthie G.G.: The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relation to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur. J. Nutr.*, 2006, **45**, 113-122.
- [13] Gąsiorowski K., Szyba K., Brokos B., Kozaczyńska B., Jankowiak W.M., Oszmiański J.: Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Lett.*, 1997, **119**, 37-46.
- [14] Goiffon J.P., Mouly P.P., Gaydou E.M.: Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 1999, **382**, 39-50.
- [15] Konic-Ristic A., Savikin K., Zdunic G., Jankovic T., Juranic Z., Menkovic N., Stankovic I.: Biological activity and chemical composition of different berry juice. *Food Chem.*, 2011, **125**, 1412-1417.

- [16] Lakowicz J.R.: Fluorescence anisotropy. In: Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rdedn. Springer, New York 2006, pp. 353-382.
- [17] Maatta-Rihinein K.R., Kamal-Eldin A., Mattila P.H., Gonzales-Paramas A.M., Torronen A.R.: Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. J. Agric. Food Chem., 2004, **52**, 4477-4486.
- [18] Nenadis N., Boyle S., Bakalbassis E.G., Tsimidou M.: An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids and related monophenols. J. Am. Oil Chem. Soc., 2003, **5** (80), 451-458.
- [19] Oszmiański J., Wojdyło A., Gorzelny J., Kapusta I.: Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS. J. Agric. Food Chem., 2011, **59**, 12830-12835.
- [20] Pantelidis G.E., Vasilakakis M., Manganaris G.A., Diamantidis G.: Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currant, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chem., 2007, **102**, 777-783.
- [21] Parasassi T., Krasnowska E.K., Bagatolli L., Gratton E.: Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. J. Fluorescence 1998, **4** (8), 365-373.
- [22] Prior R.L., Lazarus S.A., Cao G., Muccitelli H., Hammerstone J.F.: Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 2001, **49**, 1270-1276.
- [23] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci., 1997, **2** (4), 152-159.
- [24] Suwalsky M., Oyarce K., Avello M., Villena F., Sotomayor C.P.: Human erythrocytes and molecular models of cell membranes are affected in vitro by *Balbisia peduncularis* (Amancay) extracts. Chem.-Biol. Interact., 2009, **179**, 413-418.
- [25] Teleszko M., Wojdyło A., Oszmiański J.: Zawartość kwasu elagowego i spolimeryzowanych proantocyjanidyn w pseudoowocach wybranych gatunków róż. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2012, **5** (84), 37-46.
- [26] Teleszko M.: Żurawina wielkoowocowa – możliwości wykorzystania do produkcji biożywności. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2011, **6** (79), 132-141.
- [27] Flvendenskaya I.O., Rosen R.T., Guido J.E., Russell D.J., Mills K.A., Vorsa N.: Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. J. Agric. Food Chem., 2004, **52**, 188-195.
- [28] Wojnicz D., Sych Z., Walkowski S., Gabrielska J., Włoch A., Kucharska A., Sokół-Łętowska A., Hendrich A.B.: Study on the influence of cranberry extract Żuravit S.O.S[®] on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. Phytomed., 2012, **19**, 506-514.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM RED CURRENT AND CRANBERRY FRUITS WITH REGARD TO ERYTHROCYTES MEMBRANE

Summary

The objective of the research study was to determine the antioxidant activity of aqueous solutions of extracts from red current and cranberry with regard to the erythrocytes membrane, and the mechanism responsible for that activity. The polyphenolic composition of the extracts was determined using an ultra-performance liquid chromatography method with diode array detection and mass analysis (UPLC-DAD-MS). Spectrophotometrically was determined a partition coefficient for compounds contained in extracts between the organic and aqueous phases. The antioxidant activity of extracts towards the erythrocytes

membrane was analyzed using a fluorescence method on the basis of a quenching degree of DPH-PA probe fluorescence, whereas the oxidation of the erythrocytes membranes was induced by an AAPH compound. The fluorescence spectroscopy was also used to determine the location of phenolic compounds, contained in the extracts, in the erythrocyte membrane.

It was found that the red currant and cranberry fruits were rich in polyphenols, in particular in anthocyanins and procyanidins. With the use of fluorescence probes, it was proved that polyphenolic compounds contained in the extracts did not penetrate into the hydrophobic region of the membrane; the absence of any changes in the fluorescence anisotropy confirmed it. However, they bound to the region of polar heads on the membrane surface and changed their packing as evidenced by the decrease in the generalized polarization. It was proved that the polyphenols in the extracts efficiently protected the erythrocytes membrane against harmful activity of free radicals induced by the AAPH compound in the aqueous environment. Furthermore, it was proved that the antioxidant activity of red currant extract ($IC_{50} = 4.59 \mu\text{g/ml}$) was comparable to that of a standard antioxidant, i.e. of Trolox[®] ($IC_{50} = 3.9 \mu\text{g/ml}$) and that it was better than the activity of cranberry extracts ($IC_{50} = 12.02 \mu\text{g/ml}$).

Key words: polyphenolic extracts, red currant and cranberry fruits, erythrocyte membrane, fluidity of membrane, antioxidant activity of extracts ☒

ZUZANNA MAŁYSZEK, AGNIESZKA MAKOWSKA, JĘDRZEJ SMENTEK,
PIOTR KUBIAK, JOANNA LE THANH-BLICHARZ,
GRAŻYNA LEWANDOWICZ

OCENA CZYNNIKÓW DECYDUJĄCYCH O PRAWIDŁOWOŚCI POMIARU WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNYCH SKROBI MODYFIKOWANYCH

Streszczenie

Celem pracy było określenie, w jakim stopniu warunki przebiegu procesu kleikowania skrobi modyfikowanych determinują wyniki pomiarów reologicznych. Ponadto poddano weryfikacji tezę, że wiskograf RVA może być używany do wyznaczania absolutnych wartości lepkości kleików skrobiowych.

Sześć handlowych skrobi modyfikowanych chemicznie: bieloną, utlenioną, acetylowaną, fosforan diskrobiowy, acetylowany fosforan diskrobiowy oraz acetylowany adypinian diskrobiowy poddawano kleikowaniu w wiskografach RVA i Brabendera, rejestrując wartości temperatury i lepkości. Bezpośrednio po pomiarze przebiegu kleikowania, kleik skrobiowy umieszczano w cylindrze pomiarowym reometru Haake i oznaczano lepkość w trybie CR w zakresie szybkości ścinania 5 - 600 s⁻¹.

Stwierdzono, że przebieg procesu kleikowania skrobi modyfikowanych zależy przede wszystkim od profilu zmian temperatury w toku analizy. Na uzyskane wyniki wpływa również (τ w mniejszym stopniu) geometria układu pomiarowego. Właściwości reologiczne kleików badane za pomocą aparatu o zdefiniowanej szybkości ścinania (reometr Haake) zależą od sposobu przygotowania kleiku, przy czym szczególnie istotna jest szybkość kleikowania. Zbyt krótki czas przyrządzania roztworu skrobiowego, jaki ma miejsce przy zastosowaniu klasycznego, krótkiego cyklu kleikowania w aparacie RVA, przyczynia się do niepełnego rozpuszczenia tego polimeru. W konsekwencji obserwuje się zniżenie wartości lepkości oraz zwiększenie rozrzutu wyników pomiarów. Wpływ czasu kleikowania na uzyskane wyniki jest najsilniejszy w przypadku skrobi sieciowanych. Pomiary za pomocą wiskografu RVA nie odbywają się w zdefiniowanej szybkości ścinania i nie powinny być podawane w jednostkach absolutnych (mPa·s), a jedynie w jednostkach umownych RVA (Rapid Visco Analyser Unit).

Słowa kluczowe: skrobia modyfikowana, kleikowanie, lepkość, wiskograf, reometr

Mgr Z. Małysek, dr inż. J. Le Thanh-Blicharz, Oddział Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych w Poznaniu, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, ul. Starołęcka 40, 61-361 Poznań, dr inż. A. Makowska, Zakład Technologii Zbóż, mgr inż. J. Smentek, mgr inż. P. Kubiak, prof. dr hab. G. Lewandowicz, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań. Kontakt: zchemz@gmail.com

Wprowadzenie

Analiza przebiegu kleikowania za pomocą wiskografów jest źródłem cennych informacji w ocenie przydatności skrobi modyfikowanych do konkretnych zastosowań technologicznych, dlatego wiskografy są powszechnie stosowane w laboratoriach przemysłowych. Do wyznaczania przebiegu kleikowania próbowano stosować inne aparaty, takie jak wiskozymetr rotacyjny Rheotest [1, 9] czy też reometr Haake [16]. Stosowanie wiskozymetrów rotacyjnych do takich badań wiąże się z ryzykiem błędu spowodowanego osiadaniem granulek skrobi w początkowej fazie oznaczenia, przebiegającej w temperaturach niższych od temperatury kleikowania. W europejskim standardzie badania przebiegu kleikowania stosowano wiskograf Brabendera, podczas gdy na kontynencie amerykańskim używano aparatu Rapid Visco Analyser (RVA). W Polsce wiskografy RVA zaczynają się upowszechniać, głównie z uwagi na to, że umożliwiają przeprowadzenie analizy na mniejszej próbce [2]. Ponadto użycie aparatu RVA umożliwia bardziej elastyczne programowanie jej przebiegu. Wskutek tego badanie przebiegu kleikowania za pomocą RVA może trwać tylko 15 min, a w wiskografie Brabendera – aż 110 min. Użycie RVA wydaje się korzystne również ze względu na możliwość zarejestrowania wyników nie tylko w postaci jednostek umownych (RVA unit RVU), tak jak to ma miejsce w przypadku aparatu Brabendera (Brabender Unit BU), ale również w postaci jednostek fizycznych – cP czyli mPa·s [15]. Należy podkreślić, że w ostatnich latach firma Brabender wprowadziła na rynek Micro Visco-Amylo-Graph, aparat o podobnej charakterystyce jak wiskograf RVA, dotąd jednak posiadają go tylko nieliczne laboratoria [3]. Rekomendację dotyczącą możliwości zarejestrowania wyniku w jednostkach fizycznych producent wiskografu RVA wywodzi z pracy Lai i wsp. [4], w której oszacowano – na podstawie badań roztworów gumy guar oraz metylocelulozy – średnią szybkość ścinania w naczyniu pomiarowym aparatu Rapid Visco Analyser. Jak podają autorzy, wynosi ona 20,1 rps (*revolution per second*), co budzi wątpliwości, ponieważ w obrotach na minutę podaje się prędkość obrotową będącą parametrem aparatu, a nie szybkość ścinania, odnoszącą się do samego pomiaru i wymiarowaną jako $[s^{-1}]$. Autorzy niniejszej pracy [5] wykazali, że porównywanie wartości lepkości kleików skrobiowych zmierzonych za pomocą różnych aparatów wymaga precyzyjnego określenia szybkości ścinania [5]. W przypadku wyników otrzymanych za pomocą wiskozymetrów (np. Brookfielda), które pozwalają na zadanie wyłącznie określonej szybkości obrotowej, jest to niemożliwe. Ponadto, z uwagi na możliwość przeprowadzenia badania według różnych standardów powstaje pytanie, czy rejestrowane wyniki zależą od użytego aparatu oraz od czasu trwania analizy. Kontynuując powyższy wątek, w niniejszej pracy podjęto reologiczne badania porównawcze z zastosowaniem różnych aparatów oraz różnych standardów pomiarowych.

Celem pracy było określenie, w jakim stopniu warunki przebiegu procesu kleikowania skrobi modyfikowanych determinują wyniki pomiarów reologicznych. Ponadto poddano weryfikacji tezę, że wiskograf RVA może być używany do wyznaczania absolutnych wartości lepkości kleików skrobiowych.

Material i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły handlowe skrobie modyfikowane: skrobia bielona (INS 1403), skrobia utleniona (INS 1404), fosforan diskrobiowy (INS 1412), acetylowany fosforan diskrobiowy (INS 1414), skrobia acetylowana (INS 1420) i acetylowany adypinian diskrobiowy (INS 1422) wyprodukowane przez Wielkopolskie Przedsiębiorstwo Przemysłu Ziemniaczanego w Luboniu. Stopień podstawienia grupami karboksylowymi oznaczano metodą alkacymetryczną, zgodnie z normą PN-EN ISO 11214 [8]. Zawartość fosforu oznaczano za pomocą dwóch spektrometrów firmy Varian: emisyjnego (ICP-OES) i masowego (ICP-MS) z indukcyjnie sprzężoną plazmą. Próbkę do analizy zawartości fosforu mineralizowano kwasowo w piecu mikrofalowym MARS 5 firmy CEM.

Badanie przebiegu kleikowania prowadzono za pomocą dwóch wiskografów: Brabendera (firmy Brabender® GmbH & Co. KG, Niemcy) oraz Rapid Visco Analyser (RVA) typu TecMaster (Perten Instruments, Hägersten, Szwecja). Analizy prowadzono w 3,3-procentowych (m/m) zawiesinach skrobiowych, jedynie skrobię bieloną i utlenioną badano w stężeniach: odpowiednio 4 i 7 % (m/m). W przypadku każdego z wiskografów zastosowano dwa różne tryby pomiarowe. Przy użyciu aparatu Brabendera zastosowano puszkę pomiarową – 700 Nm oraz następujące warunki pomiarów:

- Tryb B1 – temperatura początkowa 25 °C, ogrzewanie z szybkością 1,5 °C/min, termostatowanie 20 min, chłodzenie z szybkością 1,5 °C/min, temperatura końcowa 25 °C;
- Tryb B2 – temperatura początkowa 25 °C, ogrzewanie z szybkością 1,5 °C/min, chłodzenie z szybkością 1,5 °C/min, temperatura końcowa 25 °C.

W przypadku wiskografu RVA zastosowano następujące warunki pomiarów:

- Tryb RVA1 – temperatura początkowa 25 °C, ogrzewanie z szybkością 1,5 °C/min, termostatowanie 20 min, chłodzenie z szybkością 1,5 °C/min, temperatura końcowa 25 °C;
- Tryb RVA2 – temperatura początkowa 25 °C, ogrzewanie z szybkością 11,0 °C/min, termostatowanie 2,5 min, chłodzenie z szybkością 11,0 °C/min, temperatura końcowa 25 °C.

Oznaczano: temperaturę początku kleikowania, temperaturę w pikcie lepkości, czas termostatowania potrzebny do osiągnięcia pikcie lepkości, lepkość w pikcie, lepkość na starcie procesu termostatowania, lepkość na końcu procesu termostatowania, lepkość

końcową, zmniejszenie lepkości w czasie kleikowania (ang. *breakdown*), wzrost lepkości podczas chłodzenia (ang. *setback*).

Kleiki powstałe podczas badania przebiegu kleikowania w aparacie Brabendera przenoszono bezpośrednio po pomiarze do reometru Roto Visco 1 (firmy Haake, Niemcy), a kleiki powstałe w wiskografie RVA przenoszono bezpośrednio po pomiarze do reometru RheoStres1 (firmy Haake, Niemcy). W obydwu reometrach wyznaczano krzywe płynięcia w temp. 22 °C przy użyciu reometru z zastosowaniem rotora Z20 DIN Ti w ciągu 120 s z kontrolowaną szybkością ścinania w zakresie 5 - 600 s⁻¹. Rejestracji wyników oraz obliczeń dokonywano przy użyciu programu RheoWin 3.40. Otrzymane krzywe opisano modelem matematycznym Ostwalda de Waele'a:

$$\tau = K * \dot{\gamma}^n$$

gdzie:

$\dot{\gamma}$ - szybkość ścinania [1/s],

τ - naprężenie ścinające [Pa],

K - współczynnik konsystencji [Pa·sⁿ],

n - wielkość wskazująca na zbieżność z przepływem newtonowskim.

Prawidłowość wskazań wartości lepkości przez użyte przyrządy pomiarowe zweryfikowano przez pomiary lepkości wzorców o lepkości 120, 990 oraz 4800 mPa·s. Wszystkie zastosowane w badaniach aparaty podawały wyniki pomiaru w granicach dopuszczalnego błędu.

Wyniki poddano analizie wariancji (ANOVA). Istotność różnic między wartościami średnimi zweryfikowano testem Tukeya ($p = 0,05$). Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (lepkość kleików przy szybkości ścinania 600 s⁻¹ uzyskanych w różnych urządzeniach i różnych profilach temperatury) oraz jednoczynnikową analizę wariancji (szybkość ścinania, dla której reometrem Haake zarejestrowano lepkość podaną przez wiskograf RVA, w zależności od profilu temperaturowego pomiaru w RVA). Obliczenia wykonano w programie GraphPadInStat 3.

Wyniki i dyskusja

Badane skrobie należą do najpowszechniejszych na polskim rynku skrobi modyfikowanych chemicznie. Otrzymano je w wyniku reakcji utleniania i estryfikacji. Ich podstawową charakterystykę przedstawiono w tab.1.

Zawartość grup modyfikujących w badanych skrobiach była dość mała, nie tylko spełniająca rekomendacje JECFA [8], ale również świadcząca o niezwykle subtelnej zmianie w pierwszorzędowej strukturze makrocząsteczek skrobiowych. W przypadku skrobi INS 1403 utlenieniu uległa tylko jedna grupa hydroksylowa na tysiąc pierścieni anhydroglukozy, a w INS 1404 – cztery grupy. Jeszcze niższe stopnie podstawienia stwierdzono w przypadku skrobi usieciowanych, w których jedna grupa tworząca wią-

zanie sieciujące (fosforanowa lub adypinowa) przypadła na dziesięć tysięcy pierścieni anhydroglukozy. Nieznacznie wyższe stopnie podstawienia zaobserwowano jedynie w przypadku skrobi modyfikowanych metodą acetylacji. Skrobie sieciowane i acetylowane (INS 1414 i INS 1422) zawierały trzy grupy acetylowe na sto pierścieni anhydroglukozy, natomiast skrobia acetylowana – sześć.

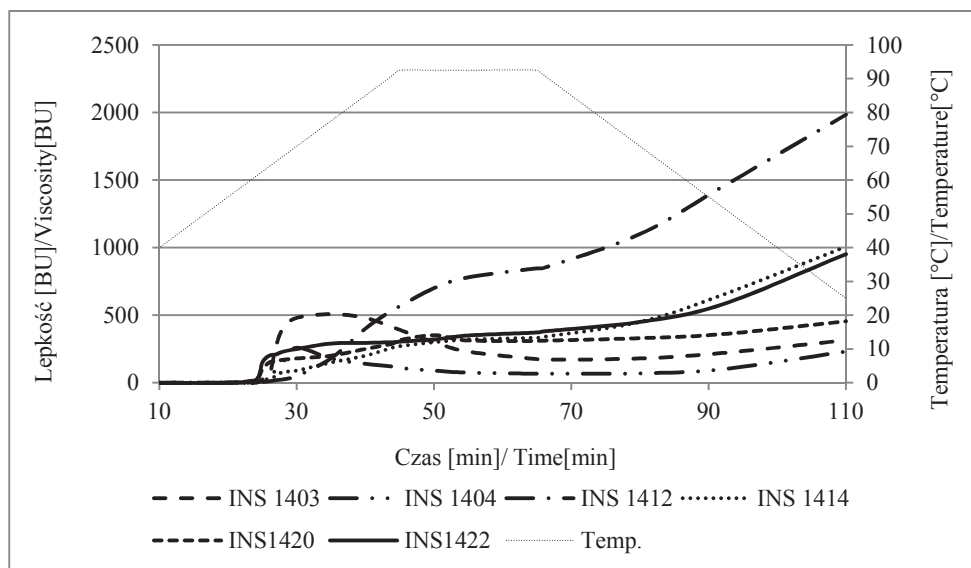
Tabela 1. Zawartość grup modyfikujących w badanych skrobiach modyfikowanych
Table 1. Content of modifying groups in modified starches analyzed

Skrobia modyfikowana Modified starch	Zawartość grup acetylowych Content of acetylated groups [%]	Zawartość grup karboksylowych Content of carboxyl groups [%]	Zawartość fosforu Phosphorus content [%]	Zawartość grup adypinowych Content of adypinian groups [%]
INS 1403	-	0,039 ± 0,003	0,0569 ± 0,0001	-
INS 1404	-	0,110 ± 0,020	0,0569 ± 0,0001	-
INS 1412	-	-	0,0575 ± 0,0004	-
INS 1414	0,73 ± 0.10	-	0,0575 ± 0,0004	-
INS 1420	1,29 ± 0.20	-	0,0569 ± 0,0001	-
INS 1422	0,99 ± 0.20	-	0,0569 ± 0,0001	0,013 ± 0,002

Objaśnienia: /Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe; n=3 / Table shows mean values and standard deviations.

Tak minimalne zmiany strukturalne spowodowały istotne zmiany właściwości reologicznych. Były one tak silne, że wiązały się z koniecznością modyfikacji warunków pomiaru w przypadku skrobi modyfikowanych chloranem(I) sodu. W badaniu przebiegu kleikowania w Polsce oraz w Europie standardowo stosuje się pomiar z użyciem wiskografu Brabendera, przy czym skrobi ziemniaczanej używa się w stężeniu 3,3 % (m/m). Takie stężenie zastosowano w niniejszej pracy do badania skrobi zmodyfikowanych w drodze estryfikacji. W przypadku pochodnych otrzymanych w wyniku modyfikacji chloranem(I) sodu przyjęto stężenia 4 i 7 % (m/m) odpowiednio: skrobi modyfikowanej INS 1403 i INS 1404. Było to konieczne, ponieważ obróbka chloranem sodu(I) powoduje nie tylko utlenienie makrocząsteczki skrobiowej, ale również istotne zmniejszenie lepkości wywołane towarzyszącym tej modyfikacji obniżeniem masy cząsteczkowej skrobi [6].



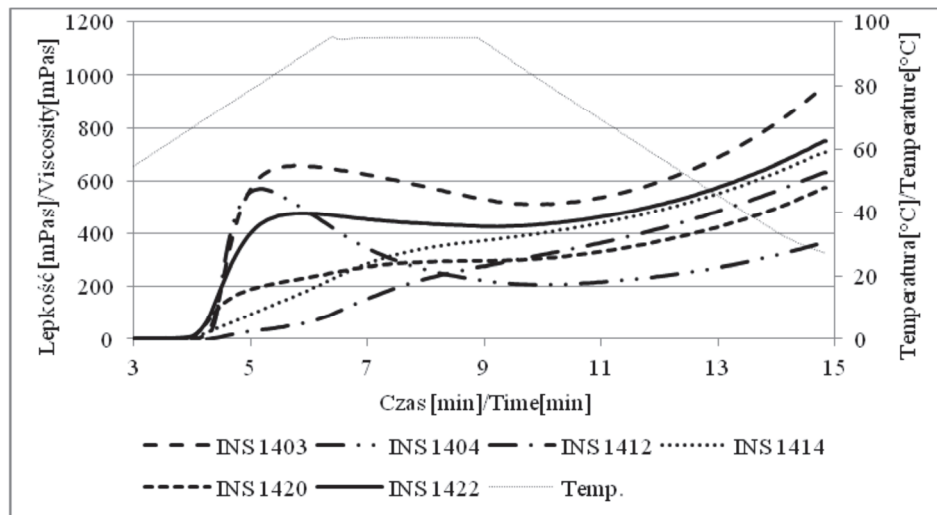
Rys. 1. Przebieg kleikowania skrobi modyfikowanych w aparacie Brabendera. Klasyczny tryb zmian temperatury (tryb B1)

Fig. 1. Pasting process of modified starches performed in Brabender viscosograph. Classic profile of temperature changes (B1 mode)

Na rys. 1. przedstawiono przebieg kleikowania skrobi modyfikowanych chemicznie, zbadany w klasycznym cyklu, stosowanym najczęściej w Polsce i w Europie do badania skrobi ziemniaczanej. Skrobie zmodyfikowane chemicznie charakteryzowały się zróżnicowanym przebiegiem kleikowania. Najbardziej wyróżniającą się krzywą jest linia przebiegu kleikowania fosforanu diskrobiowego INS 1412. Próbkę tą charakteryzowała się znacząco podwyższoną temperaturą kleikowania i najwyższą wartością lepkości końcowej. Dwie pozostałe skrobie sieciowane, poddane dodatkowo estryfikacji bezwodnikiem octowym, czyli acetylowany fosforan diskrobiowy INS 1414 i acetylowany adypinian diskrobiowy INS 1422, wykazywały niższą niż INS 1412, ale wyższą niż pozostałe skrobie lepkość końcową. Drugą istotną obserwacją jest występowanie na krzywych kleikowania skrobi utlenionych piku lepkości. Występował on w przypadku skrobi INS 1403 w temp. 75 °C, a skrobi INS1404 – w temp. 70 °C. Obniżenie temperatury kleikowania skrobi wskutek utleniania bądź acetylacji oraz jej wzrost wskutek sieciowania są zjawiskami znanymi i opisanymi w literaturze [7].

Zupełnie inne zależności zaobserwowano w przypadku pomiarów wykonanych za pomocą wiskografu RVA (rys. 2). Najwyższą wartość lepkości końcowej w tym trybie (RVA2) pomiarowym wykazywała skrobia bielona INS 1403, następnie kolejno: acetylowany adypinian diskrobiowy INS 1422, acetylowany fosforan diskrobiowy INS

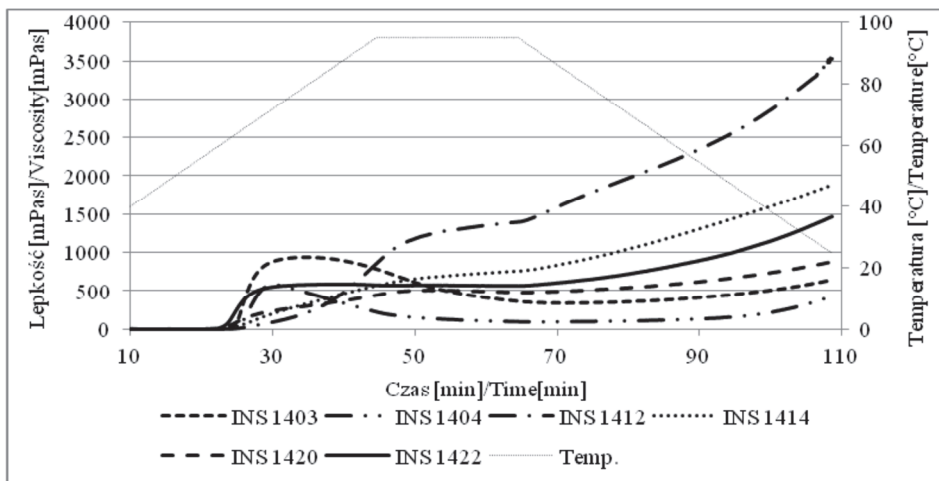
1414 i jako czwarty z kolei – fosforan diskrobiowy INS 1412. Najmniejszą lepkość końcową wykazała skrobia utleniona INS 1404.



Rys. 2. Przebieg kleikowania skrobi modyfikowanych w aparacie Rapid Visco Analyser. Klasyczny tryb zmian temperatury (tryb RVA2)

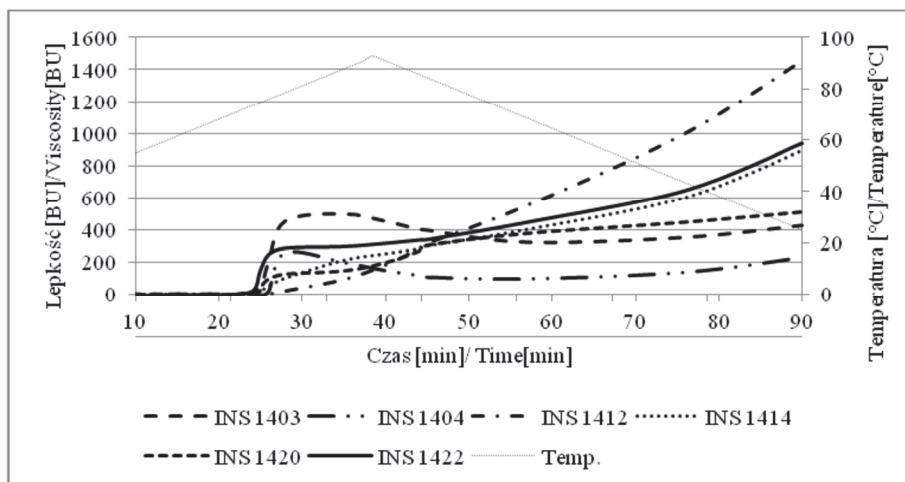
Fig. 2. Pasting process of modified starches performed in Rapid Visco Analyser viscograph. Classic profile of temperature changes (RVA2 mode)

Tak odmienny, od rezultatów badań w wiskografie Brabendera, wynik uzyskany w wiskografie RVA skłania do pytania o przyczynę tych różnic. Czy są one spowodowane różną geometrią układu pomiarowego, czy też znacznie krótszym czasem pomiaru. Wiskograf RVA umożliwia praktycznie dowolne profilowanie zmian temperatury, stąd przeprowadzono pomiary w identycznym trybie jak w przypadku wiskografu Brabendera (rys. 3). Wyniki wskazują na podstawową, ale nie jedyną przyczynę różnic w wynikach pomiarów, czyli na różny czas pomiaru. Szybkie zmiany temperatury w klasycznym, krótkim cyklu RVA nie pozwoliły na pełne skleikowanie skrobi. Wydłużenie czasu analizy powodowało, że charakter zmian lepkości w obydwu aparatach różnił się w znacznie mniejszym stopniu. Podobnie jak w przypadku klasycznego oznaczenia za pomocą aparatu Brabendera (rys. 1), największą lepkość końcową wykazywała skrobia INS 1412, jednak przewaga nad kolejną skrobią INS 1414 nie była już tak duża. Lepkość pozostałych skrobi modyfikowanych malała również w tym samym szeregu, kolejno: INS 1422 > INS 1420 > INS 1403 > INS 1404.



Rys. 3. Przebieg kleikowania skrobi modyfikowanych w aparacie Rapid Visco Analyser. Tryb zmian temperatury odpowiadający klasycznemu profilowi Brabendera (tryb RVA1)

Fig. 3. Pasting process of modified starches performed in Rapid Visco Analyser viscograph. Profile of temperature changes corresponding to classic Brabender profile (RVA1 mode)



Rys. 4. Przebieg kleikowania skrobi modyfikowanych w aparacie Brabendera. Pomiar bez termostatowania w temperaturze 92,5 °C (tryb B2)

Fig. 4. Pasting process of modified starches performed in Brabender viscograph. Measurements without thermostating at 92.5 °C (B2 mode)

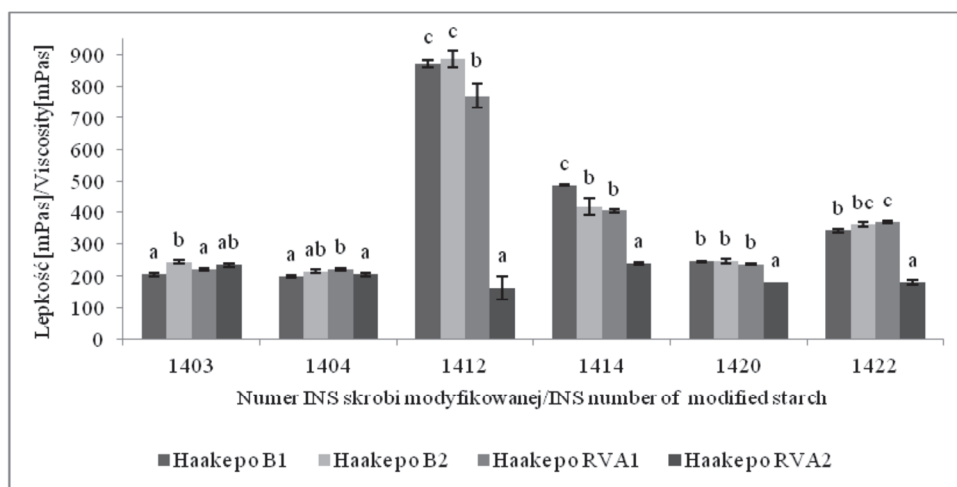
Aparat Brabendera nie pozwala na tak elastyczne profilowanie zmian temperatury jak wiskograf RVA. Niekiedy jednak stosuje się skrócenie analizy lub też manipuluje się długością czasu termostatowania. W celu wyjaśnienia, w jaki sposób na uzyskane

rezultaty wpływa termostatowanie kleiku w temp. 92,5 °C, przeprowadzono dodatkowe badania za pomocą aparatu Brabendera, eliminując ten etap z pomiaru.

Charakter krzywych przedstawionych na rys. 4. przypomina wyniki uzyskane w aparacie Brabendera w klasycznym trybie pomiaru. Jedyną różnicą było zarejestrowanie wyższej lepkości końcowej acetylowanego adypinianu diskrobiowego INS 1422 niż acetylowanego fosforanu diskrobiowego INS 1414, inaczej niż to było w pomiarze w trybie klasycznym (z termostatowaniem).

Podsumowując powyżej uzyskane wyniki można stwierdzić, że niepełne skleikowanie skrobi relatywnie łatwo ulegających rozpuszczeniu, tj. utlenionych i acetylowanych, powodowało wzrost ich lepkości końcowej. Trudno ulegające rozpuszczeniu fosforany diskrobiowe przy zastosowaniu dłuższego procesu kleikowania zwiększały swoją lepkość po ochłodzeniu.

W celu określenia, na ile różne warunki procesu kleikowania wpływają na lepkość roztworu skrobiowego, przeprowadzono analizę lepkości kleików powstałych po badaniach przebiegu kleikowania w różnych warunkach za pomocą reometru Haake. Wyniki przedstawiono na rys. 5. oraz w tab. 2. i 3.



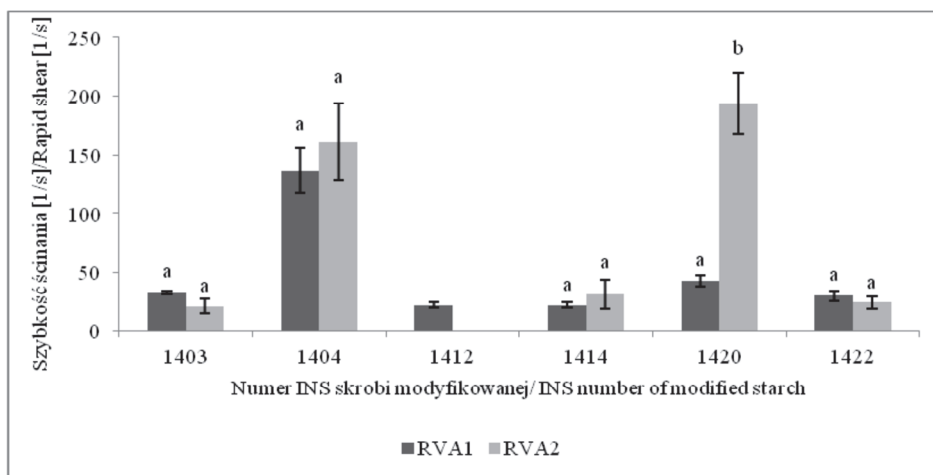
Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – wartości średnie (przedstawione w postaci słupków) oznaczone różnymi literami w obrębie INS różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values (in the form of bars) denoted by different letters differ statistically significantly ($p \leq 0.05$).

Rys. 5. Lepkość kleików skrobiowych mierzona w aparacie Rapid Visco Analyser, w różnych warunkach przy szybkości ścinania 600 s^{-1}

Fig. 5. Viscosity of starch pastes measured using Rapid Visco Analyser viscosgraph under various conditions, at shear rate of 600 s^{-1}

Jak wynika z danych przedstawionych na rys. 5., w wyniku procesu kleikowania w różnych warunkach w aparacie Brabendera (Haake po B1 i Haake po B2) uzyskano kleiki o lepkości różniącej się w niewielkim stopniu lub wręcz nie różniące się w sposób statystycznie istotny ($p \leq 0,05$). Większe zróżnicowanie wykazywały wartości lepkości powstałych podczas kleikowania w wiskografie RVA (Haake po RVA1 i Haake po RVA2). Szczególnie spektakularną różnicę zaobserwowano w przypadku fosforanu diskrobiowego INS 1412 kleikowanego w klasycznym, krótkim cyklu RVA1. Charakteryzował się on wartością lepkości najmniejszą ze wszystkich zarejestrowanych, a przecież skrobia ta jest produkowana i stosowana jako środek zagęszczająco-stabilizujący o szczególnie dużej lepkości. We wszystkich pozostałych pomiarach przeprowadzonych w innych warunkach uzyskano znacznie wyższe wartości lepkości. Świadczy to o tym, że krótki czas kleikowania w trybie RVA1 nie pozwala na dostateczne rozpuszczenie tej skrobi, której zmodyfikowana struktura powstała poprzez usieciowanie makrocząsteczek skrobiowych. Tak krótki czas kleikowania nie odpowiada praktyce technologicznej, co dowodzi, że w wyniku skróconego czasu kleikowania otrzymuje się wyniki nieprzydatne do oceny funkcjonalności skrobi sieciowanych w kształtowaniu tekstury produktów spożywczych. Kolejną obserwacją, jaką można uczynić w toku analizy danych z rys. 5., jest większy rozrzut wyników pomiarów lepkości przy zastosowaniu skróconego czasu kleikowania, nawet przy zachowaniu podobnych średnich wartości lepkości.



Objaśnienia jak pod rys. 5. / Explanatory notes as in Fig. 5.

Rys. 6. Szybkość ścinania kleików mierzona w aparacie Haake, a utworzonych w wiskografie Rapid Visco Analyser

Fig. 6. Shear rate of pastes measured using Haake rheometer; pastes are formed in Rapid Visco Analyser viscograph.

Wyniki analiz wykonanych za pomocą wiskografu RVA można przedstawić, podobnie jak w przypadku wiskografu Brabendera, w postaci jednostek umownych, odpowiednio RVU (Rapid Visco Unit) i BU (Brabender Unit). W przypadku aparatu RVA możliwe jest również przeliczenie RVU na $\text{mPa}\cdot\text{s}$. Przeprowadzone pomiary lepkości wzorców potwierdziły zasadność takiego postępowania. Problem pojawia się jednak w momencie porównywania wyników pomiarów lepkości wykonanych za pomocą wiskografu RVA z innymi aparatami, do czego konieczne jest zdefiniowanie wartości szybkości ścinania. Zgodnie z deklaracją producenta, szybkość ścinania w naczyniu pomiarowym aparatu RVA wynosi 20,1 obr./s (w oryginale 20.1 rps (*revolution per second*)). Wartość ta w istocie nie definiuje szybkości ścinania, a jedynie szybkość obrotową. Wyniki przedstawione na rys. 5. istotnie różnią się od końcowych wartości lepkości zmierzonych podczas badania przebiegu kleikowania w wiskografie RVA. Przyczyną tych zakłóceń może być niewłaściwie dobrana (zbyt wysoka) wartość szybkości ścinania, za pomocą której uzyskano wyniki przedstawione na rys. 5. W celu weryfikacji powyższej tezy odczytano, przy jakiej szybkości ścinania w reometrze Haake zarejestrowano wartość lepkości odpowiadającą lepkości końcowej zmierzonej w wiskografie RVA, a wyniki przedstawiono na rys. 6. Zaobserwowano bardzo duże zróżnicowanie wartości szybkości ścinania. Dla części skrobi mieściły się one w zakresie poniżej 50 s^{-1} , jednak w przypadku skrobi utlenionej oraz acetylowanej zaobserwowano znacznie wyższe wartości.

Otrzymane w reometrze Haake krzywe płynięcia opisano za pomocą równania Ostwalda de Waele'a. Dopasowanie tego równania reologicznego do uzyskanych danych doświadczalnych jest bardzo dobre (tab. 2). Podobnie doskonałe dopasowanie (do krzywych płynięcia) zaobserwowano w przypadku badania właściwości reologicznych skrobi kukurydzianej woskowej [13]. Tym niemniej jednoznaczna interpretacja sensu fizycznego współczynników K i n równania reologicznego, w odniesieniu do właściwości skrobi, jest trudna. Przede wszystkim w większości przypadków wartości współczynników konsystencji skrobi skleikowanych w różnych warunkach różnią się między sobą. Jedynie w przypadku skrobi zawierających grupy acetylowe na odpowiednio wysokim poziomie, czyli INS 1420 oraz INS 1422 stwierdzono wartości współczynników konsystencji nieróżniące się pomiędzy sobą w sposób statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) – tab. 2. Szczególnie duże zróżnicowanie współczynników konsystencji (od 0,84 do 16,9) zaobserwowano w przypadku fosforanu diskrobiowego INS 1412 oraz skrobi modyfikowanej chloranem(I) sodu INS 1403 (od 2,54 do 16,9). Podobne wątpliwości opisano w pracy dotyczącej ketchupów [14], co sugeruje, że na wartość współczynników równań reologicznych wpływają również inne czynniki, na które nie zwraca się uwagi w praktyce technologicznej.

Tabela. 2. Parametry równania Ostwalda de Waele'a

Table. 2. Parameters of Ostwald deWaele's model

Skrobia Starch	Współczynnik równania Coefficient equation	Tryb kleikowania / Pasting Mode			
		B1	B2	RVA 1	RVA 2
INS 1403	K [Pa·s ⁿ]	2,54 ^a ± 0,04	3,66 ^b ± 0,28	2,62 ^a ± 0,27	16,9 ^c ± 2,1
	n [-]	0,607 ^c ± 0,008	0,578 ^b ± 0,015	0,591 ^{bc} ± 0,011	0,390 ^a ± 0,017
	R ²	0,9975	0,9958	0,9980	0,9898
INS 1404	K [Pa·s ⁿ]	4,22 ^a ± 0,01	2,52 ^b ± 0,01	7,99 ^c ± 0,42	5,83 ^a ± 0,99
	n [-]	0,542 ^c ± 0,01	0,616 ^d ± 0,009	0,434 ^a ± 0,007	0,541 ^b ± 0,022
	R ²	0,9975	0,9980	0,9991	0,9988
INS 1412	K [Pa·s ⁿ]	16,9 ^c ± 2,1	12,16 ^c ± 4,5	1,98 ^b ± 0,10	0,84 ^a ± 0,31
	n [-]	0,551 ^a ± 0,024	0,542 ^a ± 0,074	0,777 ^b ± 0,008	0,745 ^b ± 0,084
	R ²	0,9931	0,9737	0,9930	0,9787
INS 1414	K [Pa·s ⁿ]	7,39 ^c ± 0,06	6,27 ^{bc} ± 0,93	4,43 ^b ± 1,65	1,24 ^a ± 0,23
	n [-]	0,589 ^a ± 0,026	0,576 ^a ± 0,0087	0,614 ^a ± 0,028	0,748 ^b ± 0,028
	R ²	0,9993	0,9968	0,9966	0,9992
INS 1420	K [Pa·s ⁿ]	3,90 ^a ± 0,46	5,22 ^a ± 0,25	5,57 ^a ± 1,67	6,81 ^a ± 0,61
	n [-]	0,566 ^b ± 0,016	0,528 ^{ab} ± 0,001	0,486 ^a ± 0,006	0,435 ^a ± 0,015
	R ²	0,9966	0,9946	0,9995	0,9983
INS 1422	K [Pa·s ⁿ]	4,62 ^a ± 0,07	6,35 ^a ± 0,04	5,96 ^a ± 2,22	3,33 ^a ± 0,15
	n [-]	0,583 ^a ± 0,002	0,556 ^a ± 0,020	0,557 ^a ± 0,036	0,551 ^a ± 0,007
	R ²	0,9973	0,9962	0,9991	0,9990

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations;

a, b, c – różne litery w indeksach górnych oznaczają, że wartości średnie w wierszach różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$ / different letters in superscripts indicate that the mean results in lines differ statistically significantly ($p \leq 0.05$).

W ocenie funkcjonalności kleików skrobiowych duże znaczenie przypisuje się wartości energii tiksotropii. Zjawisko to uzależnione jest od czasu i szybkości ścinania, a także od zjawisk mechanicznych, którym podlega materiał. Uważa się, że tiksotropia jest zjawiskiem niekorzystnym, świadczącym o niestabilności struktury [10]. Aby temu przeciwdziałać, stosuje się różnego rodzaju modyfikacje skrobi – fizyczne, chemiczne, biochemiczne oraz ich kombinacje, a także próbuje się ustabilizować żele skrobiowe poprzez dodatki do nich nieskrobiowych hydrokoloidów polisacharydowych [11, 12]. Najniższą energią tiksotropii charakteryzowała się skrobia utleniona (INS 1404) (tab. 3). Jednak uwagę zwraca przede wszystkim duże zróżnicowanie otrzymanych wyników. Może się ono wydawać zaskakujące wobec niewielkich zmian wartości lepkości

zarejestrowanej przy szybkości ścinania 600 s^{-1} (rys. 5). Szczególnie duże różnice pod względem wartości tiksotropii w kolejnych pomiarach zarejestrowano w odniesieniu do fosforanu diskrobiowego INS 1412, skleikowanego w wiskografie RVA. Zróżnicowanie to było tak duże, że kleiki w poszczególnych pomiarach wykazywały właściwości tiksotropowe lub antytiksotropowe. Zjawisko antytiksotropii kleików skrobi modyfikowanej jest relatywnie rzadko opisywane, jednak było obserwowane np. w układach dwuskładnikowych skrobia-guma ksantanowa [12]. Znacznie większy rozrzut wartości tiksotropii zaobserwowano w przypadku skrobi kleikowanych w wiskografie RVA niż Brabendera. Biorąc pod uwagę, że tiksotropia jest miarą niestabilności struktury kleików, można wnioskować, że proces kleikowania w wiskografie RVA skutkuje wytworzeniem kleiku o mniejszej stabilności. Podobnie skrócenie czasu kleikowania nie sprzyja stabilności wytworzonego kleiku. Wartość tiksotropii ma odniesienie nie tylko do sposobu przygotowania kleiku, ale również do rodzaju modyfikacji skrobi. Najwyższymi wartościami tiksotropii charakteryzował się fosforan diskrobiowy (INS 1412), czyli skrobia modyfikowana wyłącznie w procesie sieciowania. Dodatkowy proces acetylowania niezbędny do otrzymania acetylowanego fosforanu diskrobiowego (INS1414) spowodował zwiększenie stabilności, jednak do znacznie niższego poziomu niż w przypadku drugiej ze skrobi podwójnie modyfikowanych, czyli acetylowanego adypnianu diskrobiowego (INS 1422). Większa stabilność reologiczna INS 1422 jest związana prawdopodobnie z wprowadzeniem dość długiego (przynajmniej w porównaniu z rozmiarami sieciującej grupy fosforanowej), czterowęglowego łańcucha węglowodorowego oddzielającego grupy karboksylowe adypnianu. Taka struktura pierwszorzędowa tej skrobi sieciowanej nie unieruchamia wzajemnie makrocząsteczek polisacharydu i nie usztywnia struktury kleiku oraz zapobiega tendencji do żelowania.

W przypadku skrobi acetylowanej INS 1420, inaczej niż we wszystkich pozostałych próbkach, stwierdzono, że wartości energii tiksotropii kleików przygotowanych w różnych warunkach nie różniły się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) pomiędzy sobą (tab. 3). Jest to zgodne z obserwacją poczynioną w przypadku współczynnika konsystencji (tab. 2) i potwierdza, że obecność grup acetylowych zmniejsza wpływ warunków przygotowania kleiku na wyniki pomiarów reologicznych. Może to być związane z obecnością relatywnie hydrofobowych grup acetylowanych w makrocząsteczce skrobiowej, utrudniających asocjację molekuł tego polisacharydu w roztworze [6].

Pomimo zaobserwowanej wyżej korelacji wartości energii tiksotropii ze strukturą pierwszorzędową preparatów skrobiowych, stwierdzono znaczne zróżnicowanie analizowanych wartości energii tiksotropii i współczynników równania Ostwalda de Waele'a poszczególnych skrobi modyfikowanych spowodowanych różnymi warunkami pomiarowymi. Należy zatem sądzić, że zarówno na wartość energii tiksotropii, jak i współczynników równania Ostwalda de Waele'a wpływają jeszcze inne dodatkowe czynniki, nieuwzględnione w schemacie opisanego eksperymentu. Sugeruje to celo-

wość dalszych badań reologicznych skrobi oraz wskazuje, że ze względu na praktykę technologiczną najbardziej przydatne są badania przebiegu kleikowania oraz pomiar lepkości przy stałej, założonej szybkości ścinania. Dla prawidłowości tych ostatnich niezbędne jest stosowanie standardowych warunków pomiaru.

Tabela 3. Tikсотropia kleików powstałych w różnych warunkach

Table 3. Thixotropy of pastes formed under different conditions

Skrobia Starch	Energia tiksotropii / Thixotropic energy [Pas·s ⁻¹]			
	B1	B2	RVA 1	RVA 2
INS 1403	2563 ^a ± 388	4779 ^b ± 347	2126 ^a ± 480	15490 ^c ± 509
INS 1404	871 ^a ± 234	3236 ^b ± 158	5174 ^c ± 570	4351 ^d ± 658
INS 1412	31835 ^c ± 2863	27015 ^c ± 1351	-7544 ^b ± 566	-20225 ^a ± 7856
INS 1414	10395 ^c ± 1305	3251 ^{bc} ± 32	-379 ^b ± 3173	-8020 ^a ± 825
INS 1420	3949 ^a ± 197	2853 ^a ± 238	2623 ^a ± 1736	5505 ^a ± 798
INS 1422	1663 ^a ± 228	5246 ^b ± 173	6479 ^b ± 1394	2063 ^a ± 572

Oznaczenia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

Wnioski

1. Wyniki badań reologicznych skrobi modyfikowanych są bardzo silnie uzależnione od zastosowanych warunków analizy. Dotyczy to zarówno badania przebiegu kleikowania, jak i pomiarów właściwości reologicznych za pomocą reometrów.
2. W odniesieniu do badania przebiegu kleikowania wykazano, że kształt krzywej przebiegu procesu kleikowania skrobi modyfikowanych zależy przede wszystkim od profilu zmian temperatury. Na uzyskane wyniki wpływa również (jednak w mniejszym stopniu) geometria układu pomiarowego.
3. W odniesieniu do badania właściwości reologicznych wykonanych za pomocą reometru wykazano, że uzyskane wyniki zależą od sposobu przygotowania kleiku, przy czym szczególnie istotna jest szybkość kleikowania:
 - zbyt krótki czas przyrządzania roztworu skrobiowego, jaki ma miejsce przy zastosowaniu klasycznego, krótkiego, cyklu kleikowania w aparacie RVA, przyczynia się do niepełnego rozpuszczenia tego polimeru. W konsekwencji obserwuje się zaniżenie wartości lepkości oraz zwiększenie rozrzutu wyników pomiarów. Wpływ czasu kleikowania skrobi zmodyfikowanych z zastosowaniem różnych reakcji chemicznych na uzyskane wyniki jest różny:
 - najsilniej zakłócone jest badanie fosforanu diskrobiowego INS 1412, czyli skrobi modyfikowanej wyłącznie w procesie sieciowania,
 - duże zmiany występują również w rezultatach analiz skrobi podwójnie modyfikowanych – usieciowanych i acetylowanych INS 1414 oraz INS 1422, jak również skrobi acetylowanej INS 1420,

- praktycznie nie ma znaczenia w badaniu skrobi modyfikowanych chlora-
nem(I) sodu (INS 1403 i INS 1404);
 - wyznaczone parametry równania reologicznego Ostwalda de Waele'a wykazują
bardzo dobre dopasowanie statystyczne do otrzymanych w wyniku pomiarów
krzywych płynięcia kleików skrobi modyfikowanych. Policzone wartości
współczynników równania nie wykazują jednak dużej przydatności do opisu
właściwości użytkowych skrobi modyfikowanych;
 - policzone wartości tiksotropii wykazują bardzo duże zróżnicowanie w kolejnych
pomiarach. Szczególnie duży rozrzut tych wartości występuje w przypadku klei-
ków powstałych w wiskografii RVA, zwłaszcza w klasycznym krótkim cyklu
kleikowania.
4. Przeprowadzone badania pozwoliły na negatywną weryfikację tezy o możliwości
oznaczenia bezwzględnych wartości lepkości za pomocą wiskografu RVA:
- wartości lepkości końcowej uzyskane z pomiaru wiskografem RVA w puli wy-
ników pomiarów reometrem Haake występują przy różnych szybkościach ścina-
nia. Zatem, wbrew deklaracji firmy Perten Instruments, producenta wiskografu
RVA, pomiary za pomocą tego aparatu nie odbywają się w zdefiniowanej szyb-
kości ścinania i nie powinny być podawane w jednostkach absolutnych (mPa·s),
a jedynie w jednostkach umownych RVA (Rapid Visco Analyser Unit).

Literatura

- [1] Fortuna T., Gałkowska D., Juszcak L.: Comparison of rheological properties of selected preparations of modified starches. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2004, **3** (1), 21-32.
- [2] Gałkowska D., Długosz M., Juszcak L.: Effect of high methoxyl pectin and sucrose on pasting, rheological, and textural properties of modified starch systems. *Starch/Stärke* 2013, **65**, 499-508.
- [3] Krysińska P., Gałkowska D., Fortuna T.: Charakterystyka układów skrobi modyfikowanych uzyskanych z kukurydzy woskowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **5** (60), 9-23.
- [4] Lai L.S., Tung J., Lin P.S.: Solution properties of hsian-tso (Mesonaprocumbens Hemsl) leaf gum. *Food Hydrocoll.*, 2000, **14**, 287-294.
- [5] Le Thanh-Blicharz J., Lubiewski Z., Voelkel E., Lewandowicz G.: Ocena właściwości reologicznych handlowych skrobi naturalnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **3** (76), 53-65.
- [6] Lewandowicz G., Walkowski A., Gawęcki J.: Fosforany skrobiowe – ich charakterystyka, funkcje technologiczne i rola żywieniowa. *Przem. Spoż.*, 1999, 3 (53), 34-36, 40.
- [7] Le Thanh J., Błaszczak W., Lewandowicz G.: Digestibility vs. structure of food grade modified starches, *EJPAU*, 2007. 10(3), #10. Available Online: <http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue3/art-10.html>
- [8] PN-EN ISO 11214:2001: Skrobia zmodyfikowana. Oznaczanie grup karboksylowych w skrobiach utlenionych.
- [9] Pietrzyk S., Fortuna T., Sowa M.: Wpływ katalizatorów na efektywność procesu utleniania skrobi i jej właściwości fizykochemiczne. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2** (47), 69-81.
- [10] Sikora M., Adamczyk G., Krystyan M.: Tiksotropia miarą niestabilności ciekłych produktów żywnościowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **1** (74), 5-14.

- [11] Sikora M., Kowalski S., Tomasik P., Sady M.: Rheological and sensory properties of dessert sauces thickened by starch-xanthan gum combinations. *J. Food Eng.*, 2007, **79**, 1144-1151.
- [12] Sikora M., Kowalski S., Tomasik P.: Binary hydrocolloids from starches and xanthan gum. *Food Hydrocoll.*, 2008, **22**, 943-952.
- [13] Sitkiewicz I., Denech S.: Właściwości reologiczne oraz retrogradacja wybranych skrobi modyfikowanych kukurydzy woskowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **1**, (46) Supl., 143-151.
- [14] Śmigielska H., Lewandowicz J., Le Thanh-Blicharz J.: Wpływ skrobi odpornej typu RS4 na barwę i właściwości reologiczne ketchupu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **2** (87) 137-149.
- [15] *The RVA handbook*. Ed. G.B. Crosbiei A.S. Ross. Eds. AACC International, St. Paul, Minnesota, USA, 2007.
- [16] Tur W.: Analiza przebiegu procesu kleikowania skrobi przy pomocy wiskografu Brabendera i reometru Haake'a. Praca magisterska. Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu 2004.


ASSESSMENT OF FACTORS DETERMINING ACCURACY IN MEASURING RHEOLOGICAL PROPERTIES OF MODIFIED STARCHES

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess to what extent the processing conditions of modified starches pasting process determined the rheological measurements. Moreover, a conjecture was verified that RVA, a Rapide Visco Analyzer, could be used to determine absolute viscosity values of starch pastes.

Six commercially available and chemically modified starches: bleached, oxidized, acetylated, di-starch phosphate, acetylated di-starch phosphate, and acetylated di-starch adipate were pasted in the RVA and Brabender viscographs, and the values of temperature and viscosity were recorded. Immediately after measuring the pasting process parameters, the starch paste was placed in a measuring cylinder of Haake rheometer and the viscosity was measured pursuant to a CR mode at shear rate values ranging from 5 to 600 s⁻¹.

It was found that the process of pasting modified starch depended, primarily, on the profile of temperature changes during the analysis. Additionally, the geometry of measuring system impacts the results ([τ] to a lesser extent). The rheological properties examined with the use of a device with a defined shear rate (Haake rheometer) depend on the method of preparing the paste, and the gelatinization rate is, here, particularly important. Where a classic, short pasting cycle, like the one in the RVA instrument, is applied, the time duration of preparing a starch solution is too short it contributes to incomplete dissolution of that polymer. Consequently, the viscosity values measured are reported to be underestimated and the variation among the measurements taken to increase. In the case of cross-linked starches, the effect of pasting time on the results obtained is the highest. The measurements taken using the RVA viscograph are not performed under a defined shear rate and they should not be expressed in absolute units (mPa·s) but in conventional RPA units only (Rapide Visco Analyser Units).

Key words: modified starch, pasting, viscosity, viscograph, rheometer 

ANNA PEKSA, ELŻBIETA RYTEL, AGNIESZKA TAJNER-CZOPEK,
AGNIESZKA KITA, HONORATA DANILCENKO, ELVYRA JARENIE,
ADAM FIGIEL, KRZYSZTOF LECH, JOANNA MIEDZIANKA,
WIOLETTA DROŹDŹ

WPLYW SUROWCA I PARAMETRÓW PROCESU NA CECHY SENSORYCZNE I FIZYCZNE EKSTRUDOWANYCH PRZEKĄSEK

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu zastąpienia części kaszki kukurydzianej w produkcji ekstrudowanych chrupek mąką uzyskaną z niekonwencjonalnych surowców, jak nasiona amarantusa (MA), bulwy topinamburu (MT) i miąższ z dyni (MD) oraz określenie wpływu temperatury ekstruzji na jakość sensoryczną i cechy fizyczne otrzymanych przekąsek. Dodatek badanych mąk lub ich mieszanin do kaszki kukurydzianej wynosił 10 ÷ 20 %, a ekstruzję prowadzono w zakresach temperatur [°C]: 140/150/160 oraz 150/160/170. Dodatek 10 ÷ 15 % MA lub MT i ich mieszanin wpłynął korzystnie na teksturę chrupek, zwiększając ich kruchość i delikatność. Wpłynął także na strukturę chrupek, zwiększając jednolitość porowatości, co potwierdzono w ocenie sensorycznej. Wraz ze zwiększaniem dodatku surowców uzupełniających gęstość chrupek zwiększała się, jednak w mniejszym stopniu, gdy ekstruzja prowadzona była w temp. 160 °C – z 0,078 do 0,240 g·cm⁻³. Wprowadzenie surowców uzupełniających do chrupek kukurydzianych spowodowało rozjaśnienie barwy produktów ($L^* < 74$), szczególnie ekstrudowanych w niższej temperaturze. Dodatek mąki z dyni zwiększył udział barwy czerwonej w gotowych wyrobach, w sposób wyraźny po ekstruzji w temp. 160 °C ($a^* > 8$). Spośród chrupek z dodatkami, najkorzystniejszymi cechami fizycznymi i sensorycznymi charakteryzowały się wyroby z 10-procentowym dodatkiem mąki z amarantusa lub topinamburu, ekstrudowane w temp. 160 °C (akceptacja sensoryczna powyżej 70 %).

Słowa kluczowe: chrupki kukurydziane, amarantus, topinambur, dynia, jakość

*Prof. dr hab. A. Pęksa, dr hab. inż. E. Rytel, dr hab. inż. A. Tajner-Czopek, prof. dr hab. A. Kita, dr inż. J. Miedzianka, dr inż. W. Drożdż, Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa, Wydz. Nauk o Żywności, dr hab. inż. A. Figiel, prof. UP, dr inż. K. Lech, Instytut Inżynierii Rolniczej, Wydz. Przyrodniczo-Technologiczny, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, prof. dr hab. H. Danilcenko, doc. dr hab. E. Jarenie, Agriculture and Food Science Institute, Agronomy Faculty, Aleksandras Stulginskis University, Studentu 11, LT-53361 Akademija Kaunor, Lithuania.
Kontakt: anna.peksa@up.wroc.pl*

Wprowadzenie

Produkty przekąskowe stanowią znaczącą część codziennej diety ludzi w różnym wieku, szczególnie dzieci. Dlatego też mogą wpływać na stan ich odżywienia. Około 1/3 spożywanych przekąsek to produkty ekstrudowane, produkowane na bazie przetworów zbożowych, najczęściej kaszki kukurydzianej lub ryżowej [4, 18]. Są lubiane przez konsumentów ze względu na charakterystyczne cechy sensoryczne i fizyczne, w tym kruchą teksturę. Rosnące wymagania w stosunku do wartości odżywczej wymuszają zwiększenie w tych produktach zawartości białka oraz innych składników odżywczych i funkcjonalnych [4, 5, 10, 18]. Technologia ekstruzji umożliwia łączenie różnych surowców, przy czym istotnym składnikiem, decydującym o wytworzeniu typowej porowatej struktury prawidłowo wyekspandowanej przekąski o małej gęstości oraz delikatnej, chrupkiej teksturze jest skrobia. Warunki ekstruzji, w tym temperatura, wilgotność ekstrudowanej masy oraz użyte surowce, powinny zapewnić odpowiednią ilość skleikowanej skrobi. Wprowadzenie surowców zawierających znaczne ilości błonnika, cukru czy tłuszczu może zaburzyć proces jej kleikowania, a tym samym pogorszyć cechy fizykochemiczne wytworzonych chrupek [16, 21].

Do surowców niekonwencjonalnych, znacznie różniących się składem chemicznym, proponowanych przez różnych autorów [6, 7, 9, 12, 15, 22, 23] do wzbogacania artykułów spożywczych należą: amarantus, topinambur i dynia. Nasiona amarantusa odznaczają się dużą zawartością (12 ÷ 18 %) wartościowego pod względem odżywczym białka o małym udziale frakcji tworzących gluten, tłuszczu (w ilości 5 ÷ 9 %), zawierającego substancje wykazujące silne właściwości antyoksydacyjne, jak skwalen, tokoferole czy tokotrienole, składników mineralnych, a szczególnie żelaza [15, 22, 23]. Bulwy topinamburu zawierają znaczne ilości rozpuszczalnych frakcji błonnika, głównie inuliny i jej pochodnych (fruktooligosacharydów) oraz cukrów redukujących i sacharozy [7, 11]. Mąka z topinamburu charakteryzuje się małą wilgotnością, zawiera kilkakrotnie mniej białka niż mąka z amarantusa oraz nieznaczną ilość tłuszczu. Jest źródłem błonnika, witamin i składników mineralnych. Miąższ z dyni jest natomiast źródłem pektyn, cukrów, soli mineralnych, α - i β -karotenu, luteiny, witaminy C i związków fenolowych [6, 17].

Celem pracy było określenie wpływu zastąpienia części kaszki kukurydzianej w produkcji ekstrudowanych chrupek mąką uzyskaną z niekonwencjonalnych surowców, jak nasiona amarantusa, bulwy topinamburu i miąższ z dyni oraz określenie wpływu temperatury ekstruzji na jakość sensoryczną i cechy fizyczne otrzymanych przekąsek.

Material i metody badań

Surowcem podstawowym w doświadczeniu była kaszka kukurydziana firmy Kupiec, zakupiona w handlu detalicznym, o deklarowanej granulacji w zakresie 750 ÷ 1200 µm, zawierająca 73,5 % skrobi (dane producenta). Użyto także mąk otrzymanych w warunkach laboratoryjnych z takich surowców, jak amarantus (*Amaranthus cruentus*) odmiany ‘Geltoniukiai’, topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) odmiany ‘Sauliai’ oraz dynia (*Cucurbita maxima* L.) odmiany ‘Karovita’, pochodzących z uprawy organicznej prowadzonej przez Agriculture and Food Sciences Institute w Aleksandras Stulginskis University na Litwie w 2012 r.

W surowcach oznaczano zawartość: azotu ogółem [1] i przeliczano na białko (stosując mnożnik 6,25), popiołu [2], cukrów redukujących i ogółem [13], tłuszczu po hydrolizie, metodą Soxhleta z użyciem aparatu firmy Büchi [2], suchej masy – metodą suszenia do stałej masy w temp. 105 °C oraz węglowodanów na podstawie obliczeń z różnicy zawartości suchej substancji i sumy oznaczonych składników. Analizy wykonano w 4 równoległych powtórzeniach.

Oczyszczone i umyte bulwy topinamburu, bezpośrednio po zbiorze, krojono w plastry (1,0 ÷ 1,5 mm) i suszono 24 h w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza w temp. 55 °C. Owoce dyni bezpośrednio po zbiorze myto, obierano, usuwano nasiona, a miąższ krojono w plastry o grubości 2 ÷ 3 mm i suszono w takich samych warunkach. Próbkę mielono w młynku Retach GM 200 (Niemcy), umieszczano w szczelnie zamykanych pojemnikach i przetrzymywano w temp. 20 ± 2 °C do czasu przeprowadzenia badań. Nasiona amarantusa suszono w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza w temp. 45 °C przez 48 h. Wysuszony produkt mielono, przesiewano przez nylonowe sito o wielkości oczek 200 µm i pakowano do pojemników.

Tabela 1. Warunki doświadczenia i proporcje użytych składników

Table 1. Conditions of experiment and proportions of components used

Surowiec Raw material*	Udział dodatku Percent content of additive			Temperatura ekstruzji (na głowicy) Extrusion temperature (head zone)	
	[%]			[°C]	
KK/MA	10	-	-	160	170
KK/MT	10	15	20	160	170
KK/MD	10	-	-	160	170
KK/MA/MD	5/10	-	-	160	170
KK/MA/MT	5/10	5/15	-	160	170
KK	-	-	-	160	170

Objaśnienia: / Explanatory notes:

KK – kaszka kukurydziana / corn grits; MA – mąka z amarantusa / amaranths flour; MT – mąka z topinamburu / Jerusalem artichoke flour; MD – mąka z miąższu dyni / flour made from pumpkin flesh

Do wytworzenia ekstrudowanych chrupek kukurydzianych przygotowano mieszanki (tab. 1) kaszki kukurydzianej (KK) z dodatkiem mąki z amarantusa (MA), topinamburu (MT) i miąższu z dyni (MD) w ilościach umożliwiających ekspansję produktu w trakcie procesu ekstruzji.

Wilgotność mieszanek doprowadzano do ok. 12 % poprzez rozpylenie obliczonej ilości wody, mieszanie i rozcieranie prób. Przetarte przez sito mieszanki pakowano do worków polietylenowych i kondycjonowano w temp. 20 ± 2 °C przez 24 h. Chrupki otrzymywano w wyniku ekstruzji przygotowanych mieszanek w ekstruderze laboratoryjnym firmy Brabender typu 20DN. Zastosowano 2 warianty rozkładu temperatur. W wariacie pierwszym proces przebiegał w zakresie temperatur [°C]:140/150/160 (odpowiednio: strefa 1/strefa 2/głowica), a w wariacie drugim – w zakresie [°C]: 150/160/170. Temperaturę głowicy określano w pracy jako temperaturę ekstruzji. W doświadczeniu używano dyszy o średnicy 4 mm oraz ślimaka o stopniu sprężania 2 : 1. Ekstrudaty o długości ok. 30 cm pozostawiano na 12 h w temp. 20 ± 2 °C celem wystudzenia.

Chrupki poddawano analizom cech fizycznych i sensorycznych. Określano całkowitą objętość V_s chrupek o długości 20 mm, które następnie ważono i mielono celem zniszczenia ich porowatej struktury. Objętość materiału bez porów V_t oznaczano za pomocą piknometru gazowego HumiPyc-M2 (InstruQuest Inc., USA), wykonując po 6 pomiarów każdej próby. Obliczano gęstość objętościową (1) i masową (2), a na podstawie ich wartości oraz masy próbek obliczano porowatość chrupek (3).

$$(1) \rho_s = m/V_s, \quad (2) \rho_t = m/V_t, \quad (3) \varepsilon = \frac{(\rho_t - \rho_s)}{\rho_t} \cdot 100\%.$$

Teksturę chrupek określano za pomocą maszyny wytrzymałościowej typu Instron 5544, mierząc minimalną siłę (N) niezbędną do ich przecięcia. Wykonano 15 pomiarów z każdej próby. Oznaczano barwę zmielonych chrupek za pomocą spektrofotometru Konica-Minolta CM-5, odczytując parametry skali barw Huntera L^* , a^* i b^* [7], stosując przesłonę o średnicy $\varnothing = 30$ mm oraz illuminant D65. Źródłem światła była ksenonowa lampa błyskowa, a pomiary wykonano w odbiciu z zastosowaniem światła rozproszonego przy kącie pomiaru 8° w trybie SCI (składowa lustrzana włączona). Każdą próbę analizowano w 5 powtórzeniach. Przeprowadzano ocenę jakości hedonicznej chrupek z wykorzystaniem skali graficznej w zakresie od 0 do 100 % pożądalności cechy [3]. Badano ogólną jakość wyrobów biorąc pod uwagę wyróżniki: wygląd/strukturę, barwę, konsystencję, smak i zapach. Analizę przeprowadzał zespół 6 odpowiednio przeszkolonych ekspertów. Oceniano zakodowane próbki podane w jednakowych pojemnikach.

Wyniki badań poddano jednoczynnikowej analizie wariancji. Weryfikację prowadzono na poziomie istotności $p = 0,05$. Grupy jednorodne oraz zakresy odchyłeń standardowych określano za pomocą testu porównań wielokrotnych Duncana. Istotność

różnic pomiędzy średnimi obliczano na podstawie kryterium najmniejszej istotnej różnicy (NIR) [20]. Obliczenia wykonano w programie Statistica 10.0.

Wyniki i dyskusja

Kaszka kukurydziana (KK), jako podstawowy surowiec, charakteryzowała się składem chemicznym pozwalającym na prawidłową ekspansję chrupek w procesie ekstruzji, w tym zawartością skrobi na poziomie 73,5 %, białka – 9,17 %, niewielką ilością tłuszczu – 1,61 % i składników mineralnych w postaci popiołu – 0,37 % oraz cukrów redukujących – 0,49 % (tab. 2). Mąki użyte jako zamiennik KK wykazywały znaczne zróżnicowanie pod względem składu chemicznego. Mąka z amarantusa (MA) zawierała najwięcej białka (12,2 %), przewyższając 3-krotnie jego zawartość w mące z topinamburu (MT) i o ok. 40 % – ilość tego składnika w mące z miąższu dyni (MD) (8,12 %). Oprócz MA, w której było 7 % tłuszczu, pozostałe dodatki zawierały go niewiele, a szczególnie mało tłuszczu zawierała MT (0,25 %). Większe ilości popiołu oznaczono w MD oraz MT, odpowiednio: 7,77 i 4,38 %. MA zawierała ogółem 66,1 % węglowodanów, MT – 83,8 % tych związków, w tym 52 % cukrów ogółem. Mąka MD charakteryzowała się znaczną zawartością cukrów redukujących (35,5 %) i ogółem (38,0 %) – podstawowych węglowodanów w tym surowcu [6].

Tabela 2. Podstawowy skład chemiczny użytych surowców
Table 2. Basic chemical composition of raw materials used

Symbol próby Sample sign	Wilgotność Moisture [%]	Białko Protein [%]	Tłuszcz Fat [%]	Zw. miner. jako popiół Ash [%]	Cukry redukujące Reducing sugars [%]	Cukry ogółem Total sugars [%]	Węglowodany ogółem Total carbohydrates [%]
KK	13,6 ^d ± 0,24	9,17 ^c ± 0,09	1,61 ^b ± 0,11	0,37 ^a ± 0,02	0,49 ^b ± 0,04	2,16 ^b ± 0,02	75,2 ^b ± 0,23
MA	11,8 ^c ± 0,15	12,2 ^d ± 0,11	7,0 ^c ± 0,01	2,90 ^b ± 0,09	0,20 ^a ± 0,01	1,0 ^a ± 0,03	66,1 ^a ± 0,30
MT	7,02 ^a ± 0,10	4,53 ^a ± 0,04	0,25 ^a ± 0,02	4,38 ^c ± 0,06	1,90 ^c ± 0,05	52,0 ^d ± 0,41	83,8 ^c ± 0,41
MD	9,35 ^b ± 0,09	8,12 ^b ± 0,05	1,63 ^b ± 0,04	7,77 ^d ± 0,08	35,50 ^d ± 0,15	38,0 ^c ± 0,32	73,1 ^b ± 0,04

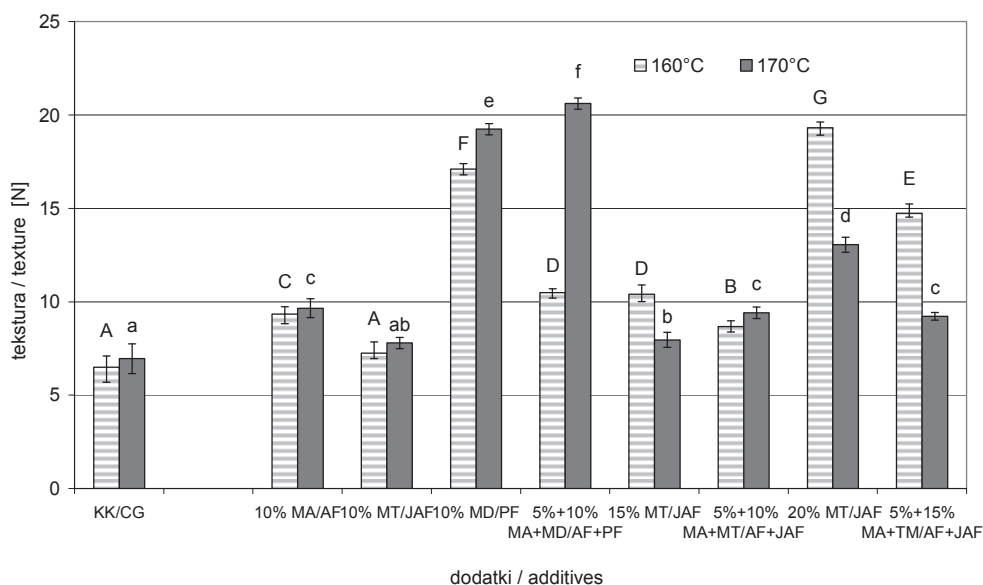
Objaśnienia: / Explanatory notes:

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

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; a - d – wartości średnie w kolumnach (dla każdego parametru) oznaczone tymi samymi literami wskazują na grupy homogeniczne na poziomie istotności $p = 0,05$ / mean values in columns (for every parameter) and denoted by the same letters indicate homogenous groups at the level of significance $p = 0.05$

Niezależnie od temperatury ekstruzji, jedynie 10-procentowy dodatek MT nie powodował zmiany tekstury chrupek (rys. 1). Chrupki te wykazywały podobną twar-

dość, a tym samym i podobną wielkość siły niezbędnej do ich przecięcia ($7,2 \div 7,8$ N) jak produkt bez dodatku ($6,5 \div 6,9$ N), a wprowadzenie $15 \div 20$ % tej mąki do KK było korzystniejsze, gdy ekstruzja przebiegała w temp. 170 °C. Spośród wyrobów z MD korzystniejszą teksturą charakteryzowały się chrupki wytworzone z dodatkiem mieszanki 5 % A + 10 % D, gdy temperatura ekstruzji wynosiła 160 °C ($10,5$ N). Również Dehghan-Shoar i wsp. [10] stwierdzili, że optymalną temperaturą ekstruzji chrupiek kukurydzianych jest 160 °C.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

a - f, A - G – te same litery nad słupkami o tej samej barwie oznaczają grupy homogeniczne na poziomie istotności $p = 0,05$ / the same letters on blocks of the same colour mean homogenous groups at the level of significance $p = 0.05$.

Pozostałe objaśnienia jak pod tab. 1. / Other explanatory notes as in Tab. 1.

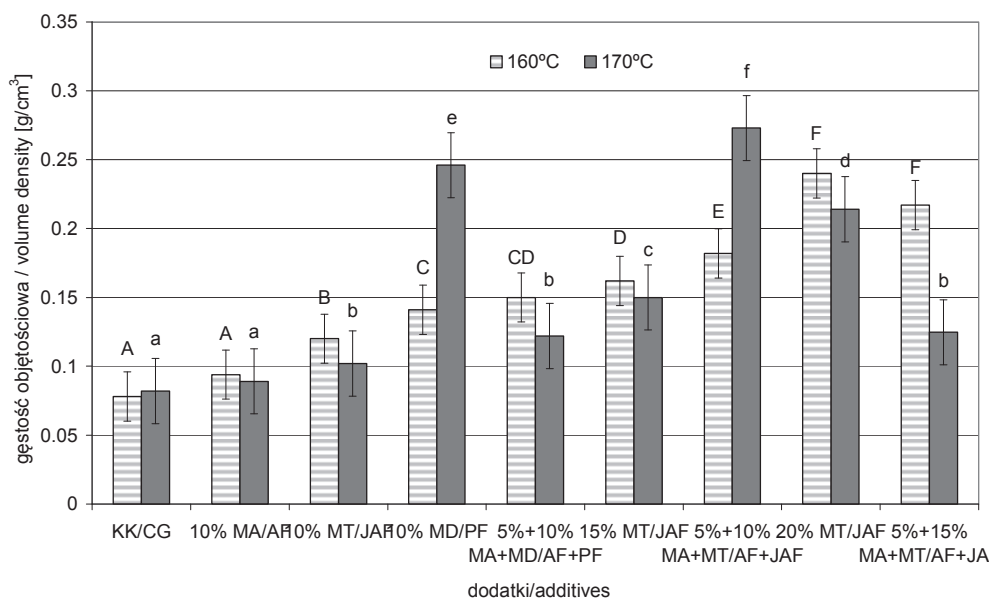
Rys. 1. Wpływ dodatku surowców uzupełniających i temperatury ekstruzji na teksturę chrupiek kukurydzianych

Fig. 1. Effect of supplementary raw material added and extrusion temperature on texture of corn snacks

Tekstura wyrobów ekstrudowanych jest wynikiem reakcji restrukturyzacji i retrogradacji uprzednio skleikowanej i stopionej skrobi oraz jej interakcji z obecnymi w cieście białkami i tłuszczami. Wprowadzenie do ciasta większych ilości surowców bogatych w białko, tłuszcz lub błonnik może zwiększyć twardość chrupiek i wymaga zwiększenia energii mechanicznej procesu, a w efekcie również temperatury [4, 16, 21]. Udział $10 \div 20$ % badanych mąk w recepturze chrupiek wpływał na zwiększenie zawartości białka o $1,2 \div 2,4$ %, tłuszczu – $0,7 \div 1,4$ % (amarantus) oraz cukrów pro-

stych – 5 ÷ 10 % (topinambur, dynia). Według niektórych autorów [4, 14, 16, 19, 21] niewielkie ilości tłuszczu (do 5 %), cukrów (do 7,5 %) i białka (do 5 %) oraz błonnika, zależnie od jego pochodzenia (do 15 %), zapewniają prawidłowy przebieg procesu ekstruzji kaszki kukurydzianej i wpływają na poprawę tekstury wyrobów gotowych.

Gęstość badanych chrupek zależała od dodatku surowców uzupełniających i wysokości temperatury ekstruzji (rys. 2). Wyroby o korzystnej, małej gęstości, podobnej do próby kontrolnej, otrzymano z 10-procentowym dodatkiem MA i MT niezależnie od temperatury ekstruzji ($0,094 \div 0,089$ i $0,120 \div 0,102 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$). Jednocześnie wyroby o mniejszej gęstości z dodatkiem MD uzyskano albo obniżając temperaturę ekstruzji, albo stosując MD w mieszance z 5 % MA ($0,141$ i $0,150 \div 0,122 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$). Zwiększenie udziału dodatków do 20 % wymagało podniesienia temperatury ekstruzji celem zmniejszenia gęstości wyrobów. Gęstość badanych chrupek była mniejsza niż chrupek kukurydzianych z fasolką, pastą pomidorową czy z oliwkami, otrzymanych przez innych autorów [4, 10, 18, 19].

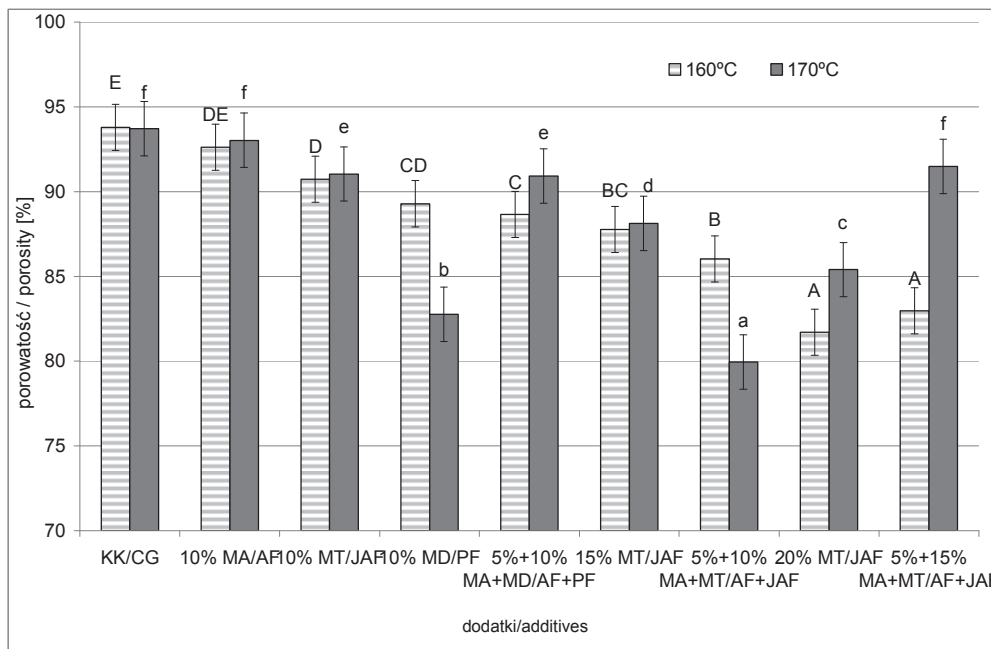


Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Gęstość chrupek kukurydzianych z dodatkiem surowców uzupełniających, ekstrudowanych w dwóch temperaturach

Fig. 2. Density of corn snacks with added supplementary raw materials and extruded at two temperatures

Cechy fizyczne ekstrudowanych przekąsek, jak: gęstość, porowatość, ekspansja i struktura zależą od rodzaju i ilości skleikowanej skrobi oraz od ilości i rodzaju wprowadzonych do ekstrudowanego surowca skrobiowego (np. kaszki kukurydzianej) surowców uzupełniających i warunków ekstruzji. Stosowanie innych biopolimerów może zmienić temperaturę kleikowania skrobi i jej ekspansję, a powstałe mieszanki będą wymagały zmiany temperatury ekstruzji. Zwiększenie stopnia skleikowania skrobi przyczynia się do zwiększenia ekspansji i porowatości chrupiek, zmniejszenia ich gęstości oraz uzyskania delikatnej struktury o cienkich ścianach porów. Niewielkie ilości cukru, białka, szczególnie w postaci denaturowanej, oraz błonnika wpływają korzystnie na te cechy chrupiek lub nie powodują znaczących zmian [4, 14, 16, 21].



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

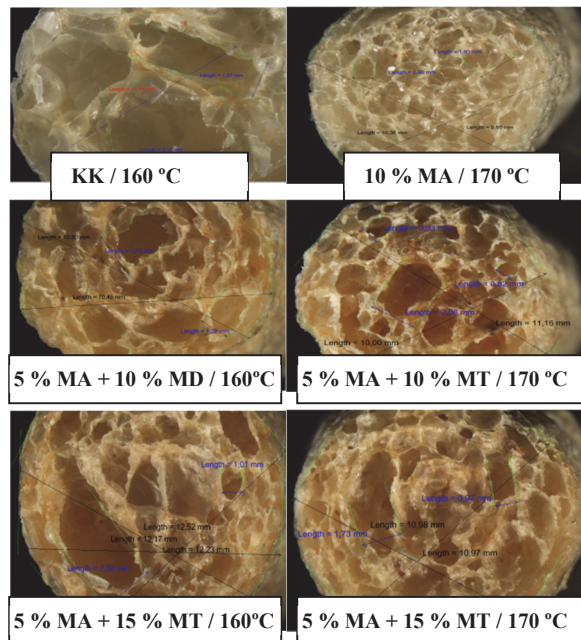
Rys. 3. Porowatość chrupiek kukurydzianych z dodatkiem surowców uzupełniających, ekstrudowanych w dwóch temperaturach.

Fig. 3. Porosity of corn snacks with added supplementary raw materials and extruded at two temperatures

Większość uzyskanych w trakcie badań ekstrudowanych przekąsek wykazywało znaczną porowatość, przewyższającą lub zbliżoną do 90 % (rys. 3). Zdecydowanie mniejszą porowatość miały chrupki ekstrudowane w temp. 170 °C, z 10-procentowym dodatkiem MD oraz z 15-procentowym udziałem mieszanki zawierającej 10 % MT

i 5 % MA (82,76 i 79,95 %). Większy udział MT w chrupkach wpływał na zwiększenie ich porowatości, ale po ekstruzji w temp. 170 °C (85,40 i 91,49 %). Inni autorzy wykazali, że można uzyskać chrupki kukurydziane z brokułami o porowatości 80 ÷ 90 %, gdy ekstruduje się je w temp. 170 °C [4] lub w 160 °C, kiedy dodatkiem są przetwory pomidorowe [10].

Wygląd i struktura chrupiek zależały przede wszystkim od rodzaju i ilości dodatku uzupełniającego. Najbardziej delikatną strukturę i jednolitą porowatość, wynikającą z mniejszej grubości ścian oddzielających pory produktu, wykazywały chrupki z 10 % MA ekstrudowane w 170 °C (fot. 1). Produkty z 15- i 20-procentowym dodatkiem mieszanek zawierających 5 % MA oraz 10 lub 15 % MT, ekstrudowane w 170 °C były dość jednolite, o dużej porowatości, ale o wyraźnie grubszych ścianach komórek.



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

Fot. 1. Zdjęcia chrupiek kukurydzianych z dodatkiem surowców uzupełniających, ekstrudowanych w dwóch temperaturach

Phot. 1. Photos of corn snacks with added supplementary raw materials and extruded in two temperatures

Chrupki z dodatkiem MT i MD były nieznacznie ciemniejsze (tab. 3) niż pozostałe próbki, a szczególnie otrzymane z 10-procentowym dodatkiem MD wprowadzanej indywidualnie lub w mieszance z MA, ekstrudowane w 160 °C ($L = 71,01$ i $70,64$), a także wyroby z dodatkiem MT ekstrudowane w 170 °C ($L = 71,70$). Dodatek MA rozjaśniał barwę chrupiek ($L = 72,89 \div 75,27$).

Udział parametru składowego czerwonego w barwie badanych chrupek zależał zarówno od dodatku, jak i od temperatury ekstruzji, przy czym wyroby o wyraźnie większym udziale tego odcienia stwierdzono w chrupkach z dodatkiem MD, szczególnie ekstrudowanych w niższej temperaturze ($a = 8,47 \div 8,52$). Ponadto odcień czerwony zaobserwowano w barwie produktów z 15- i 20-procentowym dodatkiem MT stosowanej indywidualnie lub w mieszance z 5 % MA ($a = 5,90 \div 7,39$). Barwa badanych chrupek charakteryzowała się znacznym udziałem tonacji żółtej ($b = 27,68 \div 38,62$), szczególnie próby kontrolnej ekstrudowanej w 170 °C oraz chrupek z 10-procentowym dodatkiem MA ekstrudowanych w 160 °C. Według niektórych autorów [10] podwyższenie temperatury z 140 do 180 °C zmniejsza wartości parametrów a i b w skali Huntera, co może być wynikiem większej degradacji zawartych w surowcach barwników.

Tabela 3. Barwa chrupek kukurydzianych z dodatkiem surowców uzupełniających, ekstrudowanych w dwóch temperaturach

Table 3. Colour of corn snacks with added supplementary raw materials and extruded at two temperatures

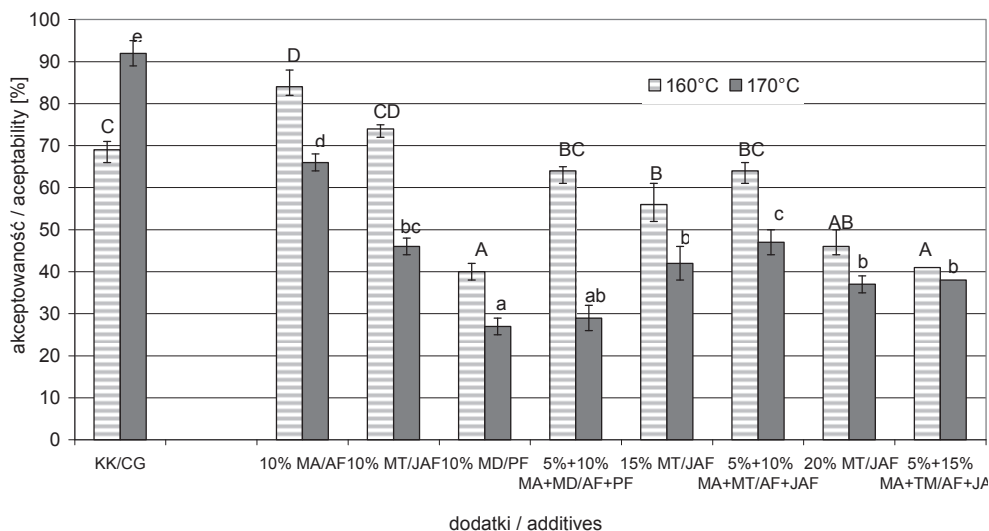
Dodatek Additive	Skala barw Huntera / Hunter's colour scale					
	Jasność Brightness [L]		Udział barwy czerwonej Percent share of red colour [a]		Udział barwy żółtej Percent share of yellow colour [b]	
	Temperatura ekstruzji (na głowicy) / Extrusion temperature (head zone)					
	160 °C	170 °C	160 °C	170 °C	160 °C	170 °C
Kontrola /Control KK	75,62 ^c	75,50 ^c	3,48 ^a	6,94 ^b	30,72 ^a	38,62 ^d
10 % MA	75,27 ^c	73,87 ^b	6,63 ^c	6,25 ^a	39,89 ^d	30,25 ^b
10 % MT	75,70 ^c	71,70 ^a	6,12 ^c	6,97 ^b	33,13 ^b	29,97 ^b
10 % MD	71,01 ^a	74,64 ^c	8,47 ^e	7,03 ^b	33,21 ^b	32,79 ^e
5 % MA + 10 % MD	70,64 ^a	74,76 ^c	8,52 ^e	6,69 ^{ab}	33,01 ^b	32,12 ^{bc}
15 % MT	72,53 ^b	73,65 ^b	7,39 ^d	7,08 ^b	34,33 ^c	31,10 ^b
5 % MA + 10 % MT	73,48 ^b	73,67 ^b	6,89 ^c	6,40 ^a	34,36 ^c	27,68 ^a
20 % MT	71,89 ^a	72,92 ^b	7,30 ^{cd}	6,37 ^a	33,17 ^b	30,15 ^b
5 % MA + 15 % MT	75,16 ^c	72,89 ^b	5,90 ^b	6,70 ^{ab}	32,20 ^b	30,00 ^b

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

a - d, A - E – wartości średnie w kolumnach (dla każdego parametru) oznaczone tymi samymi literami wskazują na grupy homogeniczne ($p = 0,05$) / mean values in columns (for every parameter) and denoted by the same letters indicate homogenous groups ($p = 0.05$).

Chrupki kukurydziane wzbogacone dodatkiem badanych mąk były lepiej akceptowane sensorycznie, gdy ekstruzja prowadzona była w temp. 160 °C ($84 \div 40$ % akceptacji) (rys. 4), natomiast akceptacja próby kontrolnej była wyższa (92 %) po zasto-

sowaniu temp. 170 °C w procesie ekstruzji. Najbardziej akceptowane były chrupki z 10-procentowym dodatkiem MA i MT oraz stosunkowo dobrze (> 60 %) – wyroby z 10-procentowym dodatkiem MD lub MT, wprowadzone w mieszance z 5 % MA.



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

Rys. 4. Wpływ dodatku surowców uzupełniających i temperatury ekstruzji na akceptację sensoryczną chrupiek kukurydzianych

Fig. 4. Effect of added supplementary raw materials and extrusion temperature on sensory acceptability of corn snacks

Wnioski

1. Dodatek MA i MT, jak i ich mieszanin oraz MD w mieszaninie z 5 % MA, w ilości 10 ÷ 15 %, wpływał korzystnie na kruchość i delikatność wyrobów, szczególnie ekstrudowanych w temp. 160 °C.
2. Wyroby z dodatkiem 10 ÷ 15 % MA, MT oraz MD w mieszaninie z 5 % MA odznaczały się dużą porowatością i małą gęstością, niezależnie od temperatury ekstruzji. Zwiększenie udziału dodatków do 20 % (MT lub MT 15% + 5% MA) wymagało podwyższenia temperatury ekstruzji, celem uzyskania korzystnych cech chrupiek.
3. Wprowadzenie dodatków zwiększyło jasność chrupiek, szczególnie gdy ekstruzję prowadzono w niższej temperaturze. Ponadto, dodatek mąki z dyni zwiększył udział barwy czerwonej.

4. Największą akceptację sensoryczną uzyskały produkty ekstrudowane w temp. 160 °C, z 10-procentowym dodatkiem MA lub MT oraz z 15-procentowym dodatkiem mieszanin, w których 10 % stanowiła MD lub MT.
5. Spośród wyrobów z dodatkiem surowców uzupełniających najkorzystniejszymi cechami fizykochemicznymi charakteryzowały się chrupki z 10-procentowym udziałem MA oraz MT, niezależnie od temperatury ekstruzji.

Praca współfinansowana przez MNiSW w ramach projektu badawczego E! 6855 ECORAW (E! 6855/45/NCBiR/2012) „Higher functionality food products from organic vegetable raw materials”.

Literatura

- [1] AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Analytical Communities, 16th edition, 1995, Washington, DC.
- [2] AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Analytical Communities, 18th edition 2005, Gaithersburg, MD.
- [3] Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I. Sensoryczne badania żywności. Podstawy – Metody - Zastosowania. Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków 2014, s. 375.
- [4] Bisharat G.I., Oikonomopoulou V.P., Panagiotou N.M., Krokida M.K., Maroulis Z.B.: Effect of extrusion conditions on the structural properties of corn extrudates enriched with dehydrated vegetables. *Food Res. Int.*, 2013, **53**, 1-14.
- [5] Chávez-Jáuregui R.N., Cardoso-Santiago R.A., Pinto e Silva M.E.M., Arêas J.A.G.: Acceptability of snacks produced by the extrusion of amaranth and blends of chickpea and bovine lung. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2003, **7 (38)**, 795-798.
- [6] Zhou C-L., Liu W., Zhao J., Yuan C., Song Y., Chen D., Ni Y-Y., Li Q-H.: The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physical-chemical characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) during refrigerated storage. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2014, **21**, 24-34.
- [7] Cieślak E., Kopeć A., Praznik W.: Healthy properties of Jerusalem artichoke flour (*Helianthus tuberosus* L.). *EJPAU*, 2005, **2 (8)**, # 37.
- [8] Clydesdale F.M.: Instrumental techniques for colour measurement of foods. Symposium: Colour Measurement of Foods. *Food Technol.*, 1976, **10**, 52-59.
- [9] Czubaszek A.: Wpływ dodatku śruty z szarłat na wartość wypiekową handlowej mąki pszennej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2002, **3 (32)**, 101-111.
- [10] Dehghan-Shoar Z., Hardacre A.K., Brennan C.S.: The physico-chemical characteristics of extruded snacks enriched with tomato lycopene. *Food Chem.*, 2010, **123**, 1117-1122.
- [11] Florkiewicz A., Cieślak E., Filipiak-Florkiewicz A.: Wpływ odmiany i terminu zbioru na skład chemiczny bulw topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.). *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **3 (52)**, 71-81.
- [12] Gedrovica I., Karklina D.: Sensory evaluation of meatballs with Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *World Academy of Science, Eng. Technol.*, 2013, **7**, 499-501.
- [13] Jarosz K., Muszkat T., Skibniewski S., Suchodolski J., Urbański M.: Kontrola produkcji w przemyśle spirytusowym. WPLiS, Warszawa 1955, s. 320.

- [14] Jin Z., Hsieh F., Huff H.E.: Effects of soy fiber, salt, sugar and screw speed on physical properties and microstructure of corn meal extrudate. *J. Cereal Sci.*, 1995, **22**, 185-194.
- [15] Marciniak-Łukasiak K., Skrzypach M.: Koncentrat chleba bezglutenowego z dodatkiem mąki z szarłat. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **4 (59)**, 131-140.
- [16] Mezreb K., Goullieux A., Ralainirina R., Queneudec M.: Effect sucrose on textural properties of corn and wheat extrudates. *Carbohydr. Polym.*, 2006, **64**, 1-8.
- [17] Oloyede F.M., Agbaje G.O., Obuotor E.M., Obisesan I.O.: Nutritional and antioxidant profiles of pumpkin (*Cucurbita pepo* Linn.) immature and mature fruits as influenced by NPK fertilizer. *Food Chem.* 2012, **135**, 460-463
- [18] Pastor-Cavada E., Drago S.R., González R.J., Juan R., Pastor J.E., Alaiz M., Vioque J.: Effects of the addition of wild legumes (*Lathyrus annuus* and *Lathyrus clymenum*) on the physical and nutritional properties of extruded products based on whole corn and brown rice. *Food Chem.* 2011, **128**, 961-967.
- [19] Silva E.M.M., Ascheri J.L.R., Carvalho C.W.P., Takeiti C.Y., Berrios J.J.: Physical characteristics of extrudates from corn and dehulled carioca bean flour blend. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2014, **58**, 620-626.
- [20] Stanisław A.: Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem Statistica Pl na przykładach z medycyny. T. 1. Statystyki podstawowe. Wyd. StatSoft Polska, Kraków 2006.
- [21] Suknark K., Philips R.D., Chinnan M.S.: Physical properties of directly expanded extrudates formulated from partially defatted peanut flour and different types of starch. *Can. J. Food Sci. Technol. J.*, 1998, **8 (30)**, 575-583.
- [22] Szwejkowska B., Bielski S.: Wartość prozdrowotna nasion szarłat (*Amaranthus cruentus* L.). *Postępy Fitoterapii*, 2012, **4**, 240-243.
- [23] Wolska P., Ceglińska A., Grabarczyk E. *vel* Grabarczyk: Wpływ dodatku mąki i płatków z szarłat na jakość chleba pszennego. *Acta Agrophysica*, 2011, **1 (17)**, 219-228.

EFFECT OF RAW MATERIAL AND PROCESSING PARAMETERS ON SENSORY AND PHYSICAL FEATURES OF EXTRUDED SNACKS

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the effect of substituting a portion of corn grits being produced for flour made from unconventional raw materials such as amaranth seeds (AF), Jerusalem artichoke tubers (JAF), and pumpkin flesh (PF), and to study the effect of extrusion temperature on the sensory quality and physical features of the snacks produced. The amount of flours or their mixtures added to corn grits was 10 – 20 %, and the process of extrusion was carried out at temperatures ranging as follows [°C]: 140/150/160C, and 150/160/170. The addition of 10 ÷ 15 % of AF and JAF as well as of their mixtures had a positive effect on the texture of crisps and caused the fragility and refinement of them to increase. Also, it impacted the structure of crisps and increased their uniformity and porosity; the sensory analysis confirmed this report. Along with the increasing amount of raw materials added, the density of crisps increased; however, when the extrusion process was carried out at a temperature of 160 °C, the extent of the increase in the density was lower: from 0.078 do 0.240 g·cm⁻³. Incorporating the supplementary raw materials into the corn-based snacks caused the colour of the products to become brighter (L < 74), particularly, the colour of products extruded at a lower temperature. The addition of pumpkin flour increased the percent share of red colour in ready-made products, and this increase was clearly visible after the extrusion performed at a temperature of 160 °C (a > 8). Among the crisps with the additives,

the samples characterized by the best physical and sensory properties were those with 10 % of amaranth or Jerusalem artichoke flours added and extruded at a temperature of 160 °C (sensory acceptability level was more than 70 %).

Key words: corn snacks, amaranths, Jerusalem artichoke, pumpkin, quality ☒

AGATA GÓRSKA, EWA OSTROWSKA-LIGĘZA, KAROLINA SZULC,
MAGDALENA WIRKOWSKA-WOJDYŁA, JOANNA BRYŚ

WPLYW DODATKU UKŁADU LAKTOZA – MALTODEKSTRYNA NA WŁAŚCIWOŚCI TERMICZNE I FUNKCJONALNE KOMPLEKSÓW β-LAKTOGLOBULINY Z PALMITYNIANEM RETINYLU

Streszczenie

W pracy wykorzystano właściwości β-laktoglobuliny do wiązania palmitynianu retinyłu. Otrzymane produkty wzbogacono w układ laktoza/maltodekstryna i po zastosowaniu suszenia rozpyłowego lub sublimacyjnego uzyskano w postaci proszków. Określono właściwości sorpcyjne oraz termiczne analizowanych próbek, istotne ze względu na przewidywanie stabilności i zmian jakości podczas przechowywania suszonej żywności. Obecność cukrów w składzie surowcowym kompleksów wpłynęła istotnie na zmniejszenie równowagowej zawartości wody w produktach oraz na przebieg kinetyki adsorpcji pary wodnej. Charakterystyczne zmniejszenie ilości adsorbowanej wody było wynikiem zmian zachodzących w laktozie podczas procesu sorpcji pary wodnej, jej przemiany ze stanu amorficznego w krystaliczny. Stwierdzono istotny wpływ składu surowcowego produktów na wartość temperatury przejścia fazowego. W przypadku produktów zawierających układ laktoza/maltodekstryna zaobserwowano dwa wyraźnie oddzielone przejścia fazowe, związane z obecnością w składzie surowcowym laktozy oraz maltodekstryny. Badania potwierdziły, że wzbogacenie produktu w składnik o dużej masie cząsteczkowej, np. w maltodekstrynę, skutkuje podwyższeniem temperatury przejścia fazowego.

Słowa kluczowe: β-laktoglobulina, palmitynian retinyłu, właściwości sorpcyjne, właściwości termiczne

Wprowadzenie

Wzbogacanie żywności w witaminę A, ze względu na jej rozpuszczalność w tłuszczach, odbywa się zazwyczaj z zastosowaniem nośników będących pochodnymi tłuszczów. Rosnąca świadomość żywieniowa i zdrowotna konsumentów powoduje, że

*Dr A. Górka, dr hab. E. Ostrowska-Ligęza, dr inż. M. Wirkowska-Wojdyła, dr inż. J. Bryś, Katedra Chemii, dr inż. K. Szulc, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa
Kontakt: agata_gorska@sggw.pl*

coraz częściej sięgają oni po produkty z obniżoną zawartością tłuszczu lub beztłuszczowe, czego konsekwencją mogą być niedobory witaminy A w diecie. Fizjologiczna rola witaminy A jest związana z jej udziałem w procesie widzenia, wzrostu oraz metabolizmu. Brak witaminy A wywołuje niedowidzenie zmierzchowe (tzw. kurzą ślepotę) i opóźnia procesy podziału komórek [2]. Witaminę A stanowi ok. 50 związków podobnych budową i funkcją do tzw. all-trans-retinolu. W pożywieniu pochodzenia zwierzęcego podstawową formą, w jakiej występuje witamina A, jest ester – palmitynian retinylu, który w jelicie cienkim ulega hydrolizie enzymatycznej do alkoholu – retinolu. Niedobór witaminy A w diecie można ograniczać przez zastosowanie innych niż tłuszczowe nośników palmitynianu retinylu. Wśród takich substancji na szczególną uwagę zasługuje β -laktoglobulina – główne białko frakcji serwatkowej mleka krowiego. Charakterystyczna budowa pozwala na zakwalifikowanie β -laktoglobuliny do rodziny lipokalin [16]. Wykazuje ona zdolność wiązania hydrofobowych związków, tj. retinolu, kwasów tłuszczowych, cholesterolu itp. [9-11, 23]. Umożliwia to wykorzystanie jej do transportu palmitynianu retinylu w układach pozbawionych tłuszczu lub z obniżoną zawartością tłuszczu.

Ze względu na transport, przechowywanie i dozowanie, szczególnie korzystne jest uzyskiwanie nowych produktów w formie sypkiej. Należy jednak pamiętać, że zastosowany proces suszenia oraz parametry procesu mogą wpływać na zawartość witaminy w produkcie końcowym. W przypadku połączeń β -laktoglobuliny z witaminą A podwyższona temperatura może powodować denaturację białka i jednocześnie rozpad powstałego kompleksu. Cukry, tj. laktoza i trehaloza wpływają korzystnie na stabilność białka podczas suszenia [4, 5, 21]. Cukry te w stanie amorficznym wytworzonym w czasie suszenia charakteryzują się właściwościami szklistotwórczymi [18]. Stan szklisty o bardzo wysokiej lepkości znacznie ogranicza ruchliwość cząstek i możliwość występowania zmian konformacyjnych [22], wpływając korzystnie na stabilność białek. Oprócz dwucukrów, do najczęściej stosowanych substancji szklistotwórczych należy maltodekstryna. Związki tej grupy znalazły szczególne miejsce w przetwórstwie żywności. Są stosowane m.in. jako neutralne wypełniacze, stabilizatory emulsji, materiały tworzące powłoki, zwiększające lepkość cieczy. Dodatek wysokocząsteczkowych substancji nośnikowych sprzyja zwiększeniu wydajności procesu suszenia, zapobiegając zbrylaniu oraz oblepianiu ścian suszarki, występującym w przypadku stosowania cukrów prostych.

W celu osiągnięcia wysokiej jakości końcowej i stabilności produktu w czasie magazynowania, istotne jest poznanie właściwości sorpcyjnych produktów w warunkach eksperymentalnych, podobnych do warunków naturalnych [20]. Znajomość tych cech jest niezbędna do określania poziomu trwałości, krytycznej wilgotności i aktywności wody, szczególnie produktów o jakości ulegającej obniżeniu pod wpływem wilgotności [15]. Znajomość izoterm i kinetyki sorpcji jest niezbędna do ustalenia optymal-

nych warunków przechowywania żywności suszonej oraz doboru odpowiednich opakowań [8, 25]. Istotny wpływ na stabilność i jakość produktów uzyskanych w postaci proszków ma temperatura przejścia fazowego opisywana przez temperaturę początkową (T_g onset), środkową (T_g midpoint) oraz końcową (T_g endpoint). Produkt spożywczy charakteryzuje się najwyższą stabilnością w temperaturze przemiany szklistej (T_g) i niższej.

Celem pracy było uzyskanie połączeń pomiędzy β -laktoglobuliną a palmitynianem retinyłu wzbogaconych w układ laktoza – maltodekstryna w postaci proszków przy zastosowaniu suszenia rozpyłowego lub sublimacyjnego oraz określenie właściwości sorpcyjnych i termicznych uzyskanych produktów.

Material i metody badań

Uzyskanie połączeń pomiędzy β -laktoglobuliną a palmitynianem retinyłu oraz ich analogów wzbogaconych w laktozę i maltodekstrynę w formie roztworów

β -laktoglobulinę otrzymano od firmy Davisco Foods International (Le Sueur, Minnesota). Analiza chromatograficzna (HPLC) wykazała brak witaminy A w próbce białka. Palmitynian retinyłu, bufor fosforanowy oraz etanol pochodziły z firmy Sigma – Aldrich (Niemcy).

Rozpuszczano 8 g β -laktoglobuliny ($4,3 \times 10^{-4}$ mola; $M = 18400 \text{ g/mol}$) w 400 ml 0,1 M roztworu buforu fosforanowego o pH wynoszącym 6,8 i mieszano do momentu uzyskania klarownego roztworu. Do tak przygotowanego roztworu β -laktoglobuliny dodawano 0,46 g ($8,6 \times 10^{-4}$ mola) palmitynianu retinyłu (rozpuszczonego uprzednio w minimalnej objętości absolutnego etanolu), tak, aby stosunek molarowy β -laktoglobuliny do liganda wynosił 1 : 2. Roztwory mieszano w temp. 40 °C przez 2 h z użyciem mieszadła magnetycznego. Następnie dodawano układ laktoza/maltodekstryna w trzech stosunkach wagowych: 9 : 1; 8 : 2 i 7 : 3.

Przeprowadzenie uzyskanych roztworów w postaci proszku metodą suszenia rozpyłowego lub sublimacyjnego

Każdorazowo do suszenia rozpyłowego przygotowywano 400 ml roztworu. Roztwory poddawano homogenizacji w homogenizatorze Ultra Turrax T 25 basic IKA Labortechnik (Niemcy) przez 90 s przy 11000 rpm, a następnie suszono rozpyłowo. Suszenie otrzymanych roztworów prowadzono w suszarce rozpyłowej firmy Anhydro (Dania), przy prędkości dysku rozpyłowego wynoszącej 39000 obr./min (średnica dysku 63,42 mm) i przy strumieniu podawania surowca – 51,4 cm³/min. Suszenie odbywało się współprądowo, a temperatura powietrza wlotowego wynosiła 120 °C.

Przed procesem liofilizacji badany roztwór zamrażano w zamrażarce komorowej w ciągu 24 h w temp. -70 °C. Następnie materiał poddawano liofilizacji w liofilizatorze ALPHA1-4 LDC-1m firmy Christ, z kontaktowym ogrzewaniem surowca. Proces

przewodzony był przy stałych parametrach: ciśnienie – 63 Pa, ciśnienie bezpieczeństwa – 103 Pa, czas – 24 h. Temperatura półek grzejnych liofilizatora wynosiła 30 °C. Temperaturę w czasie suszenia kontrolowano przy użyciu termopary.

Wyznaczanie właściwości sorpcyjnych

Właściwości sorpcyjne oznaczano metodą statyczno-eksykatorową. Izotermy adsorpcji pary wodnej wyznaczano przy dziesięciu poziomach aktywności wody (a_w) od 0,0 do 0,92. Jako czynniki higrostatyczne zastosowano nasycone roztwory soli w temperaturze 25 °C. Użyto nasyconych roztworów soli: CaCl_2 , LiCl , CH_3COOK , MgCl_2 , K_2CO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NaNO_2 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, zapewniających aktywność wody wynoszącą odpowiednio: 0; 0,11; 0,23; 0,33; 0,44; 0,53; 0,65; 0,75; 0,81 i 0,92. Próbkę do pomiaru stanowił proszek o masie około 1 g. Próbki przetrzymywano przez 3 miesiące, a następnie ponownie ważono wykorzystując wagę Mettler AE 240. W ekzykatorach o aktywności wody środowiska powyżej 0,75 umieszczany był tymol zapobiegający pleśnieniu próbek. Pomiaru przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Kinetykę adsorpcji pary wodnej oznaczano z wykorzystaniem stanowiska zapewniającego ciągły pomiar zmian masy próbek. Do badań używano wagi Mettler AE 240 przystosowanej do pracy ciągłej w warunkach stałej temperatury i wilgotności względnej powietrza. Kinetykę adsorpcji pary wodnej prowadzono przy trzech poziomach aktywności wody środowiska: 0,33, 0,65 i 0,92, w temp. 25 °C przez 24 h. Jako czynniki higrostatyczne zastosowano nasycone roztwory soli: MgCl_2 , NaNO_2 i $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Próbkę do badań kinetycznych stanowił proszek o masie około 1 g. Po umieszczeniu próbki w higroście, zmianę jej masy rejestrowano za pomocą programu komputerowego POMIAR. Pomiaru przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Wyznaczanie właściwości termicznych

Właściwości termiczne badano przy użyciu skaningowego kalorymetru różnicowego – DSC, Q200, TA Instruments przy użyciu metody MDSC (modulowana skaningowa kalorymetria różnicowa). Próbki o masie 10 ÷ 13 mg umieszczano w naczynkach aluminiowych niehermetycznie zamkniętych i ogrzewano od 10 do 170 °C z szybkością 2 °C/min, przy amplitudzie temperatur ± 1 °C i okresie modulacji 60 s. Otrzymano krzywe całkowitego, odwracalnego i nieodwracalnego przepływu ciepła w zależności od temperatury. Z uzyskanych krzywych odczytano temperaturę początkową (T_g onset), środkową (T_g midpoint) i końcową (T_g endpoint) temperatury przemiany szklistej. Pomiaru przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń otrzymano proszki kompleksów β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu wzbogacone w układ laktoza/maltodekstryna. Skład produktów oraz metodę suszenia przedstawiono w tab. 1.

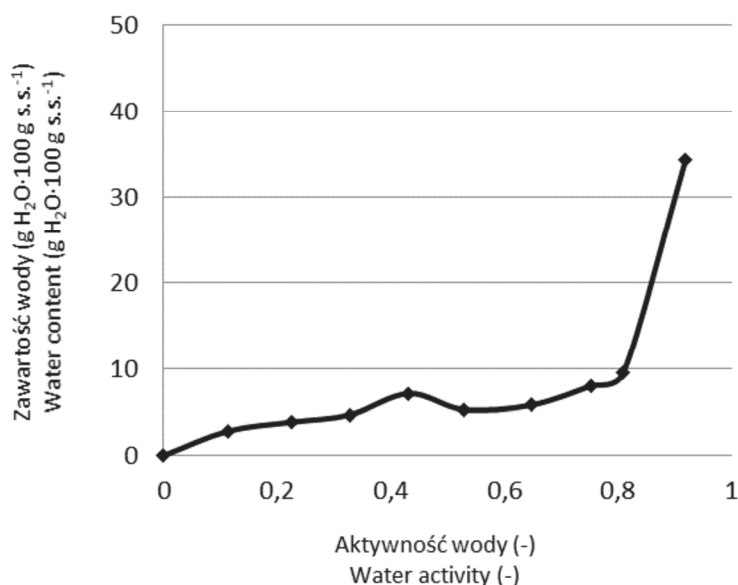
Tabela 1. Skład surowcowy i metoda suszenia kompleksów β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu
Table 1. Composition and drying method of β -lactoglobulin and retinyl palmitate complexes

Próbka Sample	Skład surowcowy Composition	Metoda suszenia Drying method
A1	β -laktoglobulina, palmitynian retinyłu, laktoza : maltodekstryna w stosunku masowym 9 : 1	suszenie rozpyłowe
A2	β -laktoglobulina, palmitynian retinyłu, laktoza : maltodekstryna w stosunku masowym 8 : 2	suszenie rozpyłowe
A3	β -laktoglobulina, palmitynian retinyłu, laktoza : maltodekstryna w stosunku masowym 7 : 3	suszenie rozpyłowe
A4	β -laktoglobulina, palmitynian retinyłu, laktoza : maltodekstryna w stosunku masowym 9 : 1	suszenie sublimacyjne
A5	β -laktoglobulina, palmitynian retinyłu, laktoza : maltodekstryna w stosunku masowym 8 : 2	suszenie sublimacyjne
A6	β -laktoglobulina, palmitynian retinyłu, laktoza : maltodekstryna w stosunku masowym 7 : 3	suszenie sublimacyjne

Zawartość wody w produkcie decyduje o stopniu zmian chemicznych, fizycznych i mikrobiologicznych, wpływając na stabilność przechowalniczą suszonej żywności [1]. Wrażliwość produktów suszonych na wilgoć i ich zdolność chłonięcia wody mogą być określone na podstawie kształtu izotermy sorpcji, czyli zależności graficznej pomiędzy aktywnością wody i równowagową zawartością wody w produkcie [6]. Znajomość izoterm sorpcji wody przez produkt spożywczy jest pomocna podczas projektowania, modelowania i optymalizacji procesów: suszenia, chłodzenia, kondycjonowania, składowania. Ułatwia również przewidywanie stabilności i zmian jakości podczas pakowania i przechowywania suszonej żywności [14]. Uzyskane w pracy wyniki równowagowych zawartości wody w produkcie przedstawiono w postaci izoterm sorpcji pary wodnej (rys. 1). Ze względu na to, że dla wszystkich analizowanych próbek (A1 - A6) przebieg izoterm sorpcji był analogiczny, na rys. 1. przedstawiono przykładową krzywą, wyznaczoną dla produktu A1. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że izoterm sorpcji pary wodnej badanych kompleksów β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu oraz dodatkiem węglowodanów cechują się kształtem charakterystycznym dla produktów bogatych w cukry proste. Nie obserwowano przegięcia krzywych w zakresie niskich aktywności wody, na-

tomiast w zakresie aktywności wody ok. 0,8 - 0,9 zawartość wody w produkcie znacząco wzrastała wraz ze wzrostem aktywności wody środowiska. Izotermy tego rodzaju należą do III grupy według klasyfikacji Brunauera i wsp. [3], typowej dla produktów bogatych w cukry proste.

Dodatek układu laktoza/maltodekstryna wpłynął na znaczne zmniejszenie równowagowej zawartości wody w produktach. Próbki zawierające β -laktoglobulinę i palmitynian retinyłu charakteryzowały się największymi równowagowymi zawartościami wody, podczas gdy ich analogi wzbogacone w cukry cechowała najmniejsza równowagowa zawartość wody. W środowisku o aktywności wody 0,33 największą równowagową zawartość wody (9,36 g/100 g s.m) zaobserwowano w próbkach β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu, najmniejszą – w próbkach β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu i z laktozą/maltodekstryną (7 : 3) (7,11 g/100 g s.m.). W środowisku o aktywności wody 0,65 dodatek cukrów spowodował istotne zmniejszenie równowagowej zawartości wody, z 20,94 g/100 g s.m. w próbce β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu do 5,78 g/100 g s.m. w produkcie β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu i z laktozą/maltodekstryną (7 : 3).



Rys. 1. Przykładowa izoterma adsorpcji kompleksu β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu z dodatkiem układu laktoza – maltodekstryna w stosunku wagowym 9 : 1, otrzymanego w postaci proszku metodą suszenia rozpyłowego (A1)

Fig. 1. Adsorption isotherm of β -lactoglobulin - retinyl palmitate complex with lactose/maltodextrin addition in 9 : 1 weight ratio, obtained in the form of powder by spray drying (A1)

Analogiczne zależności stwierdzono w środowisku o aktywności wody 0,92. Jest to zgodne z wynikami badań opisywanymi w literaturze. Mieszaniny zawierające znaczne ilości białek charakteryzują się zwiększoną zdolnością chłonięcia wody w porównaniu z próbkami bogatymi w węglowodany [17].

W przypadku analizowanych próbek zaobserwowano znaczne zmniejszenie ilości zaadsorbowanej wody w środowisku o aktywności wody ok. 0,5 (rys. 1). Charakterystyczne zmniejszenie ilości zaadsorbowanej wody obserwowane na krzywej było wynikiem zmian zachodzących w laktozie podczas procesu sorpcji pary wodnej. Nastąpiło zwiększenie ruchliwości cząsteczek cukru, co umożliwiło jego przejście z metastabilnego stanu bezpostaciowego w stan krystaliczny. Poziom zaadsorbowanej wody był wystarczający na zainicjowanie przemiany laktozy ze stanu amorficznego w krystaliczny, której towarzyszyło wydzielanie nadmiaru zaadsorbowanej wody przez powstające struktury krystaliczne [13, 19].

Kinetyka adsorpcji pary wodnej umożliwia określenie zależności przyrostu zawartości wody w żywności w proszku od czasu trwania procesu. Kształt krzywej kinetyki adsorpcji zależy od składu żywności w proszku oraz parametrów pomiaru (temperatury i wilgotności względnej środowiska) [7]. Kinetykę adsorpcji pary wodnej przez badane próbki określono w środowiskach o aktywności wody: 0,33, 0,65 i 0,92.

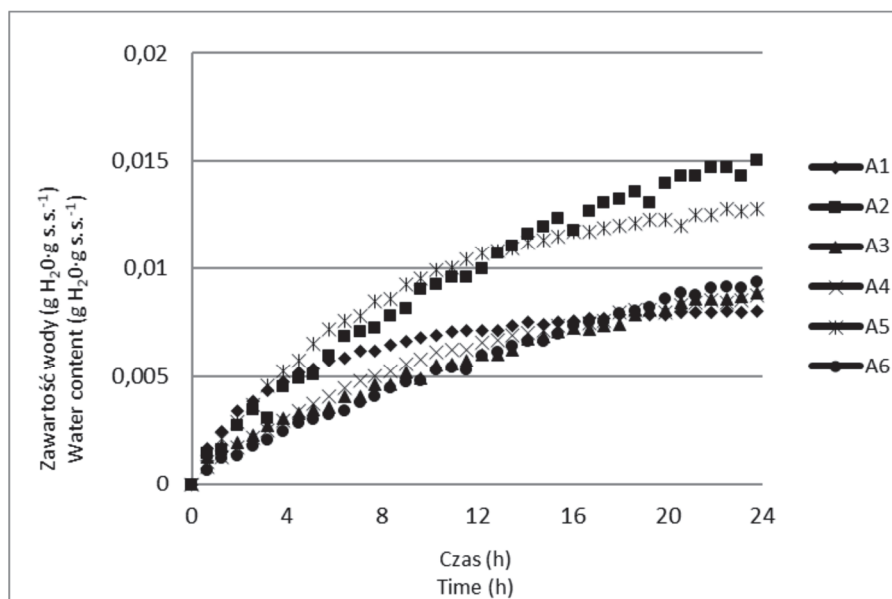
Krzywą kinetyczną uzyskaną w środowisku o aktywności wody 0,33 połączeń β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu wzbogaconych w układ laktoza/maltodekstryna przedstawiono na rys. 2. W przypadku próbek wzbogaconych w cukry obserwowano ciągły wzrost zawartości wody w ciągu 24 h przechowywania. Adsorpcja pary wodnej przebiegała najintensywniej w początkowej fazie procesu – do 5 h, a następnie zbliżała się do wartości równowagowych. W przypadku badanych próbek stan równowagi wilgotnościowej nie został osiągnięty, o czym świadczy wzrost zawartości wody w końcowych godzinach procesu. Stwierdzono zmniejszoną intensywność procesu adsorpcji pary wodnej przez próbki z dodatkiem cukrów w porównaniu z próbkami, w składzie których nie było laktozy/maltodekstryny. Uzyskany rezultat jest zgodny z wynikami kompleksów β -laktoglobuliny z cholekalcyferolem [12].

Krzywe kinetyki adsorpcji pary w środowisku o aktywności wody 0,65 próbek β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyłu wzbogaconych w układ laktoza/maltodekstryna przedstawiono na rys. 3. Obecność cukrów w składzie surowcowym kompleksów istotnie wpłynęła na przebieg kinetyki adsorpcji pary wodnej. Charakterystyczne obniżenie ilości adsorbowanej wody obserwowane na krzywych było wynikiem zmian zachodzących w laktozie podczas procesu sorpcji pary wodnej. Nastąpiło zwiększenie ruchliwości cząsteczek cukru, co umożliwiło jego przejście z metastabilnego stanu bezpostaciowego w stan krystaliczny. Poziom zaadsorbowanej wody był wystarczający na zainicjowanie przemiany amorficznej laktozy do stanu krystaliczne-

go, której towarzyszyło wydzielanie nadmiaru zaadsorbowanej wody przez powstające struktury krystaliczne.

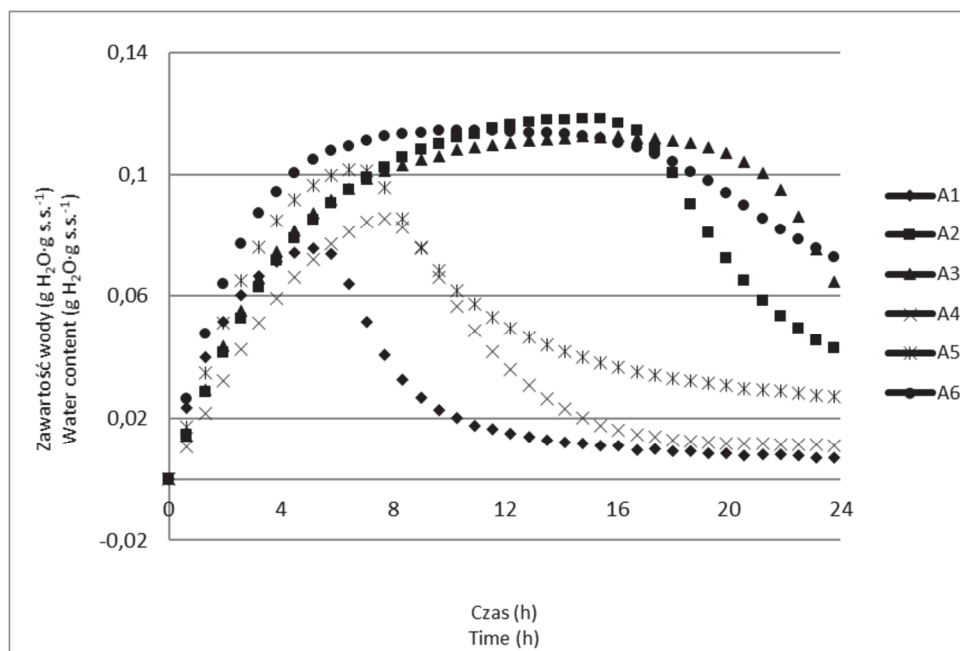
W środowisku o aktywności wody 0,92 (rys. 4) zdolność chłonięcia wody przez próbki była znacznie większa niż w środowiskach o aktywności wody 0,33 oraz 0,65. Końcowa zawartość wody po 24 h procesu wynosiła przykładowo 0,53 g wody/g s.m. w próbce β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyli; 0,16 g wody/g s.m. w produkcie, w składzie których obecne były cukry. W przypadku produktów wzbogaconych w układ laktoza/maltodekstryna zauważono szczególnie wyraźny efekt zmniejszenia zdolności chłonięcia wody. W środowisku o aktywności wody 0,92 nie stwierdzono zmian zachodzących w strukturze cukrów, tj. krystalizacji.

Należy podkreślić, że produkty w postaci proszku, otrzymane metodą suszenia rozpyłowego lub sublimacyjnego, przy małej zawartości wody zawierają cukry w stanie amorficznym. Charakteryzują się one wówczas znaczną higroskopijnością i jeżeli zostaną poddane działaniu wilgoci z otoczenia, może dojść do ich zbrylenia, co prowadzi do obniżenia jakości, zmniejszenia rozpuszczalności i utraty sypkości produktu.



Rys. 2. Kinetyka adsorpcji pary wodnej kompleksów β -laktoglobuliny z palmitynianem retinyli z dodatkiem układu laktoza/maltodekstryna w różnych stosunkach wagowych, suszonych rozpyłowo (A1, A2, A3) oraz sublimacyjnie (A4, A5, A6); ($a_w = 0,33$)

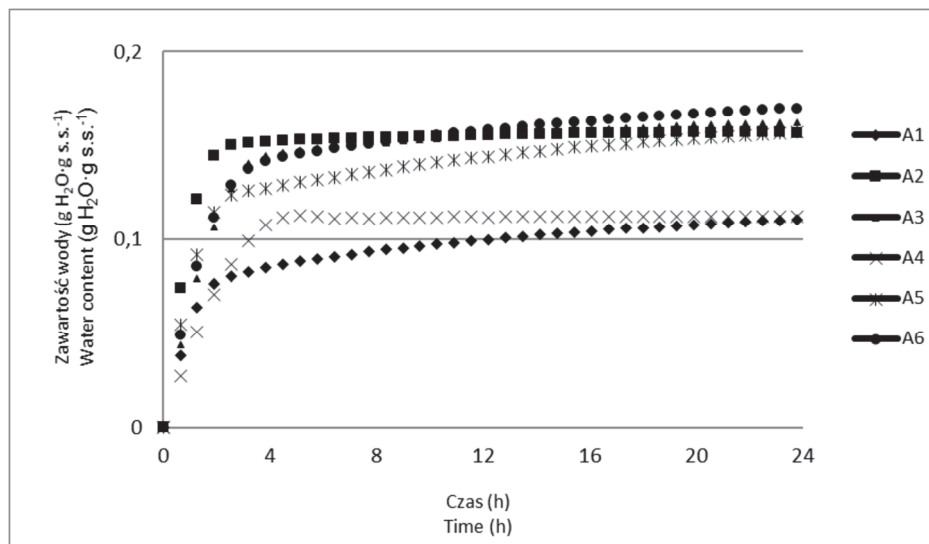
Fig. 2. Adsorption kinetics of β -lactoglobulin - retinyl palmitate complexes with lactose/maltodextrin addition in different weight ratio, obtained by spray drying (A1, A2, A3) and freeze drying (A4, A5, A6); ($a_w = 0.33$)



Rys. 3. Kinetyka adsorpcji pary wodnej kompleksów β -laktoglobuliny z palmitynianem retinylu z dodatkiem układu laktoza/maltodekstryna w różnych stosunkach wagowych, suszonych rozpyłowo (A1, A2, A3) oraz sublimacyjnie (A4, A5, A6); ($a_w = 0,65$)

Fig. 3. Adsorption kinetics of β -lactoglobulin - retinyl palmitate complexes with lactose/maltodextrin addition in different weight ratio, obtained by spray drying (A1, A2, A3) and freeze drying (A4, A5, A6); ($a_w = 0.65$)

Temperatura przemiany szklistej (T_g) jest jedną z najważniejszych wielkości opisujących bezpostaciowe ciało stałe, a jej wartość określa optymalne warunki, które zapewniają stabilność produktu [22]. Powszechnie wykorzystywaną termoanalityczną techniką pozwalającą wyznaczyć T_g jest DSC (różnicowa kalorymetria skaningowa). Stwierdzono istotny wpływ składu surowcowego produktów na wartość temperatury przejścia fazowego (T_g). W przypadku produktów zawierających układ laktoza : maltodekstryna wystąpiły dwa oddzielone przejścia fazowe (T_g^1 , T_g^2), związane z obecnością w składzie surowcowym laktozy oraz maltodekstryny, które ulegają tego typu przemianie (tab. 2).



Rys. 4. Kinetyka adsorpcji pary wodnej kompleksów β -laktoglobuliny z palmitynianem retinylu z dodatkiem układu laktoza/maltodekstryna w różnych stosunkach wagowych, suszonych rozpyłowo (A1, A2, A3) oraz sublimacyjnie (A4, A5, A6); ($a_w = 0,92$)

Fig. 4. Adsorption kinetics of β -lactoglobulin - retinyl palmitate complexes with lactose/maltodextrin addition in different weight ratio, obtained by spray drying (A1, A2, A3) and freeze drying (A4, A5, A6); ($a_w = 0,92$)

Tabela 2. Temperatura przejść fazowych (temperatura początkowa, temperatura środkowa, temperatura końcowa) kompleksów β -laktoglobuliny z palmitynianem retinylu z dodatkiem układu laktoza/maltodekstryna w różnych stosunkach wagowych, suszonych rozpyłowo (A1, A2, A3) oraz sublimacyjnie (A4, A5, A6) [°C]

Table 2. Glass transition temperatures (Tg onset, Tg midpoint, Tg endpoint) of β -lactoglobulin - retinyl palmitate complexes with lactose/maltodextrin addition in different weight ratio, obtained by spray drying (A1, A2, A3) and freeze drying (A4, A5, A6) [°C]

Próbka Sample	Temperatura początkowa ¹ T _g ¹ onset	Temperatura środkowa ¹ T _g ¹ midpoint	Temperatura końcowa ¹ T _g ¹ endpoint	Temperatura początkowa ² T _g ² onset	Temperatura środkowa ² T _g ² midpoint	Temperatura końcowa ² T _g ² endpoint
A1	44,1 ± 0,2	47,3 ± 0,2	51,4 ± 0,2	116,5 ± 0,2	123,4 ± 0,2	125,8 ± 0,4
A2	49,8 ± 0,4	51,7 ± 0,6	54,8 ± 0,4	118,9 ± 0,4	125,5 ± 0,1	128,1 ± 0,5
A3	52,8 ± 0,5	56,5 ± 0,4	60,6 ± 0,7	124,1 ± 0,5	127,9 ± 0,3	131,3 ± 0,3
A4	51,9 ± 0,5	59,1 ± 0,3	69,3 ± 0,5	111,2 ± 0,1	118,3 ± 0,3	122,2 ± 0,3
A5	54,2 ± 0,4	62,7 ± 0,2	74,3 ± 0,6	114,4 ± 0,5	120,4 ± 0,4	124,2 ± 0,1
A6	56,8 ± 0,2	66,2 ± 0,6	77,0 ± 0,5	118,4 ± 0,2	123,2 ± 0,2	127,1 ± 0,7

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviation; n = 3

Wraz ze zwiększającym się udziałem maltodekstryny w produktach obserwowano wyższe wartości temperatury przejścia szklistego. Próbki A3 oraz A6, w których stosunek wagowy laktozy do maltodekstryny wynosił 7 : 3 charakteryzowały się wyższymi wartościami temperatury T_g^1 oraz T_g^2 niż produkty A1 i A4 oraz A2 i A5 – o mniejszym udziale maltodekstryny w składzie produktów. Przykładowo, w przypadku produktu A1 (stosunek wagowy laktoza/maltodekstryna 9 : 1) wartość T_g midpoint pierwszej przemiany szklistej wynosiła 47,32 °C, drugiej – 123,42 °C, natomiast w odniesieniu do produktu A3 – odpowiednio: 56,48 i 127,87 °C. Wraz ze zwiększaniem udziału maltodekstryny w kompleksach wartość temperatury przejść szklistych wzrastała. Badania potwierdziły, że wzbogacanie produktu w składnik o dużej masie cząsteczkowej, np. w maltodekstrynę, skutkuje podwyższeniem T_g [24]. Stwierdzono znacznie niższą wartość T_g^2 w przypadku próbek suszonych liofilizacyjnie w porównaniu z ich analogami suszonymi rozpyłowo. Znacznie niższe były natomiast wartości T_g^1 próbek w postaci proszku, otrzymanych metodą suszenia rozpyłowego. Przemiana szklista istotnie wpływała na jakość produktów w formie proszku, otrzymanych w wyniku suszenia sublimacyjnego lub rozpyłowego.

Wnioski

1. Wykazano wpływ składu produktów na ich właściwości sorpcyjne i termiczne. Równowagowa zawartość wody w badanych proszkach była uzależniona od składu produktów i aktywności wody środowiska. Dodatek układu laktoza/maltodekstryna wpłynął na znaczne obniżenie równowagowej zawartości wody w produktach.
2. Obecność laktozy w składzie surowcowym kompleksów wpłynęła istotnie na przebieg kinetyki adsorpcji pary wodnej. W środowisku o aktywności wody 0,65 nastąpiła przemiana laktozy ze stanu amorficznego w krystaliczny.
3. Wartości temperatury przejścia fazowego uzależnione były od składu surowcowego produktów. Próbki zawierające układ laktoza/maltodekstryna cechowały się obecnością dwóch wyraźnie oddzielonych przejść fazowych.
4. Wzbogacenie produktu w maltodekstrynę przyczyniło się do podwyższenia temperatury przejścia szklistego.

Badania były finansowane ze środków budżetowych na naukę w latach 2010 - 2012 jako projekt badawczy nr N N312 068639.

Literatura

- [1] Al-Muhtaseb A.H., McMinn W.A.M., Magee T.R.A.: Water sorption isotherms of starch powders. Part 1. Mathematical description of experimental data. *J. Food Eng.*, 2004, **3** (61), 297-307.
- [2] Anderson J.J.B., Toverud S.U.: Diet and vitamin A and D: A review with an emphasis on human function. *J. Nutr. Biochem.*, 1994, **5**, 58-65.

- [3] Brunauer S., Deming L. S., Deming W. E., Teller E.: On the theory of van der Waals adsorption of gases. *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 1723-1732.
- [4] Cardona S., Schebor C., Buera M.P., Karel M., Chirife J.: The thermal stability of invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state of trehalose. *J. Food Sci.*, 1997, **62**, 105-112.
- [5] De Wit J.N.: Structure and functional behavior of whey proteins. *Neth Milk Dairy J.*, 1981, **35**, 47-64.
- [6] Domian E., Lenart A.: Effect of the agglomeration on adsorption properties of milk powders. *Proc. of the 10th Int. Drying Symp.*, Kraków, Poland, 1996, vol. B, 763.
- [7] Domian E., Lenart A.: Adsorpcja pary wodnej przez żywność w proszku. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2000, **4 (25)**, 27-35.
- [8] Foster K.D., Bronlund J.E., Paterson A.H.J.: The prediction of moisture sorption isotherms for dairy powders. *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 411-418.
- [9] Górska A., Szulc K., Ostrowska-Ligęza E., Wirkowska M.: Wykorzystanie właściwości β -laktoglobuliny do wiązania cholekalcyferolu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **19 (2)**, 99-106.
- [10] Górska A., Szulc K., Ostrowska-Ligęza E., Wirkowska M.: A differential scanning calorimetric study of β -lactoglobulin and vitamin D₃ complexes. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2012, **1 (110)**, 473-477.
- [11] Górska A., Szulc K., Ostrowska-Ligęza E., Wirkowska M., Bryś J.: Próba zastosowania β -laktoglobuliny jako nośnika palmitynianu retinylu w układach beztluszczowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **20 (3)**, 164-173.
- [12] Górska A., Szulc K., Ostrowska-Ligęza E., Wirkowska M., Bryś J.: The influence of trehalose-maltodextrin and lactose-maltodextrin matrices on thermal and sorption properties of spray-dried β -lactoglobulin-vitamin D₃ complexes. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2013, **1 (112)**, 429-436.
- [13] Hunter N.E., Frampton C.S., Craig D.Q.M., Belton P.S.: The use of dynamic vapour sorption methods for the characterisation of water uptake in amorphous trehalose. *Carbohydr. Res.*, 2010, **345**, 1938-1944.
- [14] Iciek J., Tamborski Z.: Izotermy sorpcji wilgoci przez cukier. *Gazeta Cukrownicza*, 2006, **8**, 234-236.
- [15] Katz E.E., Labuza T.P.: Effect of water activity on sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. *J. Food Sci.*, 1982, **46**, 403-409.
- [16] Kontopidis G., Holt C., Sawyer L.: Invited review: β -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 785-796.
- [17] Kowalska H., Domian E., Janowicz M., Lenart A.: Właściwości sorpcyjne wybranych mieszanin proszków spożywczych o składzie białkowo-węglowodanowym. *Inżynieria Rolnicza*, 2005, **11 (71)**, 259-265.
- [18] Mazzobre M.F., Buera M.P., Chirife J.: Protective role of trehalose on thermal stability of lactase in relation to its glass and crystal forming properties and effect of delaying crystallization. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1997, **30**, 324-329.
- [19] Miao S., Roos Y.H.J.: Crystalization kinetics and X-ray diffraction of crystal formed in amorphous lactose, trehalose, and lactose/trehalose mixtures. *Food Sci.*, 2005, **70**, 350-358.
- [20] Moraga G., Martinez-Navarrete N., Chiralt A.: Water sorption isotherms and glass transition in strawberries: Influence of pre-treatment. *J. Food Eng.*, 2004, **62**, 315-321.
- [21] Murray B.S., Liang H.J.: Evidence for conformational stabilization of β -lactoglobulin when dried with trehalose. *Langmuir*, 2000, **16**, 6061-6063.
- [22] Pałacha Z., Sitkiewicz I.: Temperatura przemiany szklistej – parametr stabilności żywności. *Przem. Spoż.*, 2008, **9 (62)**, 32-37.

- [23] Perez Dolores M., Calvo M.: Interaction of β -Lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review. *J. Dairy Sci.*, 1995, **78**, 978-988.
- [24] Sonthipermpon W., Suwonsichon T., Wittaya-Areekul S., Wuttijumnong P.: Effect of maltodextrin on glass transition temperature and water activity of production banana flake. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 2006, **40**, 708-715.
- [25] Sukumar D., Hemavathy J., Bhat K.K.: Moisture sorption studies on onion powder. *Food Chem.*, 2002, **78**, 479-482.

THE INFLUENCE OF LACTOSE/MALTODEXTRIN SYSTEM ADDITION ON THERMAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF BETA-LACTOGLOBULIN AND RETINYL PALMITATE COMPLEXES

S u m m a r y

In the research, the properties of β -lactoglobulin to bind retinyl palmitate were used. To the obtained complexes, lactose/maltodextrin systems were incorporated. The final products were obtained in the form of powders by spray- and freeze drying. For analysed samples sorption and functional properties, essential for predicting the stability and changes occurring during the storage of dried food, were determined. The presence of sugars in the products has significantly influenced the equilibrium moisture content and the kinetics of water sorption. The loss of adsorbed water observed on the shape of curve was the result of changes occurring in lactose during water sorption process, its transition from amorphous to crystalline state. The significant influence of complexes composition on glass transition temperatures was observed. In the case of products with lactose:maltodextrin system addition two distinct glass transitions were present, which were the result of lactose and maltodextrin transitions. The researches have shown that the incorporation of high mass components, for example maltodextrin to the product results in glass transition temperature increasing.

Key words: β -lactoglobulin, retinyl palmitate, sorption properties, thermal properties ☒

AGNIESZKA I. BARUK, SEBASTIAN BIAŁOSKURSKI

WYBRANE DETERMINANTY WIZERUNKU PRODUKTU SPOŻYWCZEGO

Streszczenie

Przeprowadzone badania miały na celu: identyfikację czynników wpływających na wizerunek produktu spożywczego, hierarchiczne uporządkowanie zidentyfikowanych determinant wizerunku oraz dokonanie ich analizy. Artykuł ma charakter teoretyczno-empiryczny. W części teoretycznej zastosowano metodę analizy poznawczo-krytycznej z zakresu marketingu i zarządzania marketingowego. Natomiast w części empirycznej wykorzystano metodę badania ankietowego do zebrania danych pierwotnych oraz metody analizy statystycznej (w tym analizy czynnikowej) do opracowania danych pierwotnych i przeprowadzenia wnioskowania. Stwierdzono, że cena produktu spożywczego nie wpływa istotnie na jego wizerunek. Relatywnie większą rolę wizerunkową odgrywają działania promocyjne, chociaż w ich przypadku również nie stwierdzono występowania silnej zależności statystycznej w odniesieniu do wizerunku. Pierwsze, najważniejsze miejsce w strukturze hierarchicznej determinant wizerunku zajął czynnik marki, natomiast czynnik cenowy zajął ostatnią lokatę. Znajomość zakresu tych czynników oraz ich układu hierarchicznego umożliwia skuteczne i efektywne zarządzanie wizerunkiem przez oferentów produktów spożywczych, co z kolei stanowi o wartości aplikacyjnej badań.

Słowa kluczowe: produkt spożywczy, cena, promocja, wizerunek

Wprowadzenie

Każdy produkt charakteryzuje się określoną zdolnością do spełniania oczekiwań konsumentów [19], czyli podmiotów indywidualnych, kupujących produkty w celu zaspokojenia własnych potrzeb lub potrzeb członków gospodarstwa domowego. Zdolność ta jest wypadkową cech, w jakie produkt został wyposażony przez producenta. Decydują one o jego jakości technologicznej. Podejmując decyzje zakupowe, nabywcy kierują się przede wszystkim własną subiektywną oceną tych cech i znaczeniem, jakie sami im przypisują obecnie oraz jakie będą mieć one dla nich w przyszłości [8]. Kieru-

*Dr hab. A. I. Baruk, prof. UP, dr S. Białoskurski, Katedra Zarządzania i Marketingu, Wydz. Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin.
Kontakt: agnieszka.baruk@poczta.onet.pl*

ją się zatem indywidualnie postrzeganą jakością, której elementem jest subiektywnie postrzegana jakość technologiczna [15] i przypisują jej niekiedy odmienne znaczenie, jeśli chodzi o możliwość osiągnięcia oczekiwanych korzyści z nabycia danego produktu.

Oferenci podejmują zróżnicowane działania marketingowe, chcąc w ten sposób wpłynąć na ocenę produktów przez nabywców, a tym samym kształtują marketingową jakość wyrobów i usług jako dwóch podstawowych kategorii produktów. Działania marketingowe umożliwiają skuteczniejsze wyróżnienie się na tle pozostałych uczestników rynku w porównaniu z działaniami pozamarketingowymi, których efektem jest np. uzyskanie produktu spożywczego o określonych cechach sensorycznych. Te ostatnie są stosunkowo łatwe do powielania przez innych oferentów, w odróżnieniu od marketingowych atrybutów produktu, które mogą spełniać funkcję jego charakterystycznych i wyłącznych wyróżników, przyczyniając się do kreowania wartości dodanej z punktu widzenia nabywców [10]. O unikatowości przesądza przede wszystkim ich niematerialny charakter, co czyni je trudnymi lub wręcz niemożliwymi do powielania przez innych oferentów. Do marketingowych niematerialnych atrybutów produktu należy jego marka. Jest ona jednym z elementów opakowania. Nabywca ma z nią styczność wcześniej niż z cechami produktu wynikającymi z jego jakości technologicznej. Tym samym marka dominuje w budowaniu tzw. efektu pierwszego wrażenia dotyczącego danego produktu. Może być on wzmocniony lub osłabiony przez takie czynniki, jak:

- pozaproduktowe działania marketingowe oferenta [4, 16, 17]:
 - ustalenie ceny na określonym poziomie (w przypadku nabywców należących do grupy innowatorów cena ma relatywnie mniejsze znaczenie niż dla innych grup odbiorców [20]), stosowanie rabatów w ramach jej różnicowania itd.,
 - promowanie produktu, jego marki i wytwórcy,
 - kształtowanie określonych warunków dostępności produktu w ramach polityki dystrybucji (przykładowo, produkty o zasięgu globalnym sygnowane markami globalnymi oceniane są przez nabywców jako mające lepszy wizerunek [26], chociaż z pewnością nie dotyczy to etnocentrystów);
- informacje znane nabywcy, pochodzące ze źródeł niezwiązanych z oferentem:
 - informacje na temat pochodzenia produktu i jego wytwórcy, przy czym ważny jest zarówno kraj, jak i region pochodzenia,
 - informacje na temat opinii o produkcie osób cieszących się zaufaniem nabywcy (członków rodziny, znajomych itd.);
- własne doświadczenia nabywcy związane z danym produktem lub jego wytwórcą.

Wymienione czynniki wpływają na efekt pierwszego wrażenia, ale jednocześnie oddziałują na sposób postrzegania danego produktu, którego skutkiem jest jego określony wizerunek, jako element niematerialny należący do kluczowych wyróżników każdego oferenta. Jego znaczenie jest szczególnie istotne w przypadku oferentów dzia-

łających w branżach charakteryzujących się intensywnym konkutowaniem, do których należy branża spożywcza. Znaczenie wizerunku jest istotne z powodu jego specyfiki. Trudno jest bowiem zbudować i utrzymać pozytywny wizerunek, znacznie łatwiej o jego degradację lub utratę, gdyż podmiotami postrzegającymi w określony sposób produkt są nabywcy cechujący się indywidualną wrażliwością na bodźce (w tym marketingowe) oraz indywidualnym stopniem odczuwania określonych potrzeb i oczekiwań [18, 19].

Wizerunek, będący jedną z kluczowych kategorii marketingowych i skutkiem świadomych i nieświadomych działań podejmowanych przez oferenta, nadal nie jest jednoznacznie definiowany w literaturze przedmiotu. Można wskazać trzy główne nurty jego definiowania. Część autorów określa wizerunek jako obraz konkretnego podmiotu lub przedmiotu postrzegania, ukształtowany w świadomości danej osoby na podstawie czynników wewnętrznych (związanych z tą osobą, np. cech osobowościowych, wcześniejszych doświadczeń) oraz zewnętrznych (tkwiących w otoczeniu tej osoby, np. bodźców kierowanych przez oferenta do odbiorców) [3, 12]. W tej grupie definicji uwypuklono efekt (czyli obraz) osiągnięty dzięki występowaniu zbioru określonych bodźców (czyli czynników wewnętrznych i zewnętrznych). Dlatego tę grupę można określić mianem definicji przyczynowo-skutkowych.

Inni autorzy, definiując wizerunek, skupili się przede wszystkim na sposobie postrzegania określonego obiektu (podmiotu lub przedmiotu), utożsamiając z nim wizerunek [9, 24]. Tę grupę można określić jako definicje emocjonalno-procesowe, zbudowane na dwóch filarach, jakimi są emocjonalny stosunek do danego obiektu oraz proces jego postrzegania.

Wizerunek definiowany jest również jako wewnętrzna, zbiorowa świadomość, na podstawie której podejmowane są korporacyjne wysiłki (skuteczne lub nieskuteczne), aby zaprezentować się innym [2]. W takim ujęciu eksponowane są dwa zbiory aspektów: mentalne (świadomość) oraz celowościowe (zaplanowany charakter działań oraz dążenie do najlepszego pokazania się innym podmiotom).

Elementem wspólnym wszystkich trzech grup definicji jest składnik znaczeniowy wizerunku odwołujący się do przeszłości, co decyduje o trudnościach związanych z jego ewentualną poprawą. Nie da się bowiem zmienić wcześniejszych niewłaściwych działań, można jedynie unikać analogicznych błędów czy niedociągnięć w przyszłości. Budowanie wizerunku jest zatem skomplikowanym i jednocześnie długotrwałym procesem.

W branży spożywczej większe znaczenie przypisywane jest przez oferentów do cech sensorycznych produktów [por. 23], natomiast aspekty wizerunkowe traktowane są drugoplanowo. Dowodem na ich niedoceniaenie jest chociażby stosowanie nieetycznych praktyk [4], które bezpośrednio negatywnie wpływają na postrzeganie produktów żywnościowych. Tego typu praktyki stosowane są mimo udowodnionej pozytywnej

zależności między postrzeganą jakością produktu (niezależnie od jego typu) a satysfakcją nabywcy z jego zakupu [7]. Odczuwanie satysfakcji przez konsumenta przynosi także oferentowi wiele korzyści, m.in. w postaci zwiększenia lojalności nabywców, poprawy reputacji, zmniejszenia wrażliwości cenowej nabywców, poprawy ich kompetencji rynkowych [27]. Nieetyczne postępowanie wpływa ujemnie na wizerunek produktu, którego dotyczą te działania, jak i na stosującego je oferenta, nie pozwalając zbudować zaangażowania nabywców [21], a tym samym stworzyć społeczności rynkowych partnerów wiedzy [6], powiązanych z oferentem relacjami o charakterze emocjonalnym. Dlatego niezwykle istotne jest zidentyfikowanie i poddanie analizie czynników wpływających na wizerunek produktów spożywczych. Ich znajomość jest niezbędna do skutecznego i efektywnego kształtowania przez oferentów sposobu postrzegania przez nabywców wspomnianych wyrobów, tym bardziej, że wizerunek (podobnie, jak inne wartości niematerialne [11]) staje się coraz ważniejszym czynnikiem wyboru w decyzyjnym procesie zakupowym nabywców, charakteryzujących się coraz większym poziomem świadomości rynkowej [28].

Celem pracy było:

- zidentyfikowanie czynników wpływających na wizerunek produktu spożywczego,
- hierarchiczne uporządkowanie zidentyfikowanych determinant wizerunku oraz dokonanie ich analizy.

Hipotezy badawcze i model koncepcyjny

Wybór produktów spożywczych wynikał z ich specyfiki. Są to towary najczęściej kupowane i bezpośrednio wpływające na zdrowie konsumentów. Z powodu dostępności na rynku ofert o podobnej jakości technologicznej oferenci szukają czynników pozwalających przynajmniej na subiektywne wyróżnienie swoich produktów. Należy do nich bez wątplenia wizerunek.

Sformułowano 2 hipotezy badawcze, odzwierciedlające zależności między wybranymi czynnikami marketingowymi a wizerunkiem produktu spożywczego w postaci modelu przedstawionego na rys. 1.

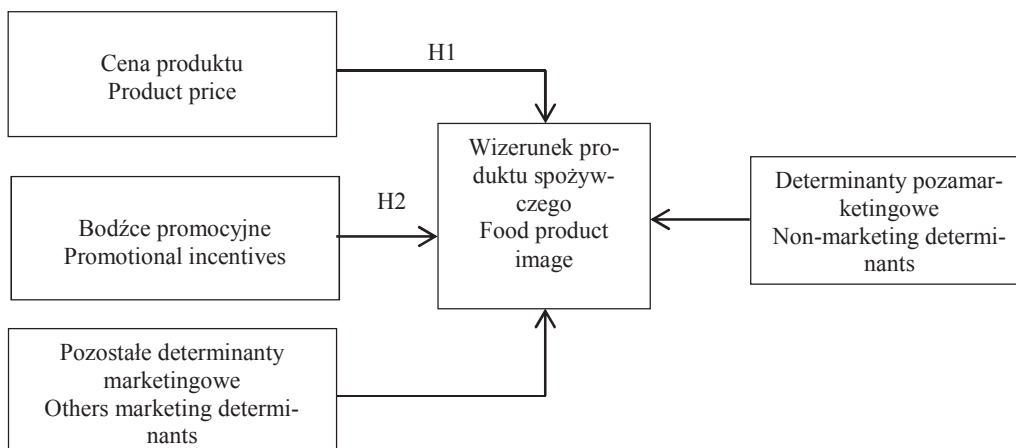
Do najważniejszych, wymienianych w literaturze, czynników decydujących o postrzeganiu produktu (niezależnie od jego typu) i ocenie jego wartości dokonywanej przez nabywców należy cena [14, 22]. W pracy dążono zatem do zidentyfikowania zależności między ceną produktu a jego wizerunkiem w przypadku produktów spożywczych. Podjęto więc próbę zweryfikowania hipotezy w brzmieniu:

- H1 – cena produktu spożywczego silnie wpływa na jego wizerunek.

Dotychczasowe badania dotyczące bodźców marketingowych skupiały się głównie na ich roli w przyciąganiu uwagi nabywców (np. opakowanie produktu [29]), czy roli w podejmowaniu decyzji zakupowych (np. promocyjne obniżki cen [17]). W pracy podjęto się przeanalizowania wpływu bodźców promocyjnych na wizerunek produktu

spożywczego. W związku z tym sformułowano i poddano weryfikacji hipotezę brzmiącą:

- H2 – bodźce promocyjne stosowane przez oferentów silnie wpływają na wizerunek produktu spożywczego.



Rys. 1. Model determinant wizerunku produktu spożywczego.

Fig. 1. Model of determinants of food product image.

Źródło: opracowanie własne / Source: Author's own study.

Metody badań

W celu zweryfikowania hipotez badawczych przeprowadzono badania empiryczne. W badaniach pilotażowych, a następnie właściwych, stosowano metodę ankietową. Badania pilotażowe służyły wyodrębnieniu potencjalnych determinant wizerunku produktu spożywczego, które poddano dalszym analizom. Kwestionariusz ankiety zawierał pytania zamknięte i półotwarte, skierowane do nabywców produktów spożywczych.

Właściwe badania ankietowe zostały przeprowadzone w 2013 roku w formie bezpośredniego kontaktu ankietera z respondentami, co umożliwiło uzyskanie wysokiej zwrotności wypełnionych kwestionariuszy. Zakres podmiotowy badań obejmował respondentów reprezentujących pełnoletnich nabywców finalnych i konsumentów produktów spożywczych z terenu Polski. Dobór konkretnych osób do próby badawczej miał charakter nielosowy, natomiast operatem populacji były dane Banku Danych Lokalnych Głównego Urzędu Statystycznego [13]. Wybór nabywców finalnych i konsumentów produktów spożywczych wynikał w głównej mierze z ich rosnącego znaczenia w działalności rynkowej oferentów [5]. Obie wymienione grupy podmiotów spełniają bowiem zarówno rolę ostatecznych weryfikatorów marketingowej oferty, jak i jej potencjalnych współtwórców.

W trakcie badań właściwych uzyskano łącznie 910 kompletnie wypełnionych kwestionariuszy, które poddano analizie porównawczej oraz analizie czynnikowej, z zakresu analizy statystycznej przy użyciu pakietu Statistica 8.0.

Analiza czynnikowa umożliwiła pogłębioną analizę zebranych danych pierwotnych. Jest ona wykorzystywana do redukcji liczby zmiennych stanowiących dane pierwotne, uzyskane z badań ankietowych, oraz do wykrywania struktur w związkach między tymi zmiennymi, czyli do ich klasyfikacji. Przeprowadzenie tej analizy umożliwiło zredukowanie podzbioru zmiennych wejściowych i zastąpienie go jedną nową zmienną. Pierwszym etapem tworzenia modelu czynnikowego było zbudowanie macierzy korelacji pomiędzy zmiennymi pierwotnymi i jej wstępna analiza, od wyników której uzależniony był dalszy sposób postępowania dotyczący wykorzystywania algorytmów identyfikujących ukryte czynniki. W przypadku, gdy współczynniki korelacji pomiędzy zmiennymi okazały się niskie ($r < 0,3$), należało zaniechać dalszego postępowania. Natomiast, jeśli macierz korelacji zmiennych pierwotnych była odpowiednia do zastosowania analizy czynnikowej, należało określić sposób identyfikacji czynników, czyli dokonać wyboru modelu czynnikowego. Do wyodrębnienia i określenia liczby czynników wspólnych (tzw. składowych głównych) zastosowano technikę kryterium Kaisera [25], polegającą na pozostawieniu tylko tych czynników, które mają wartości własne (po standaryzacji) większe od 1. Każdy taki czynnik wyjaśnia pewien poziom zmienności ogólnej rozpatrywanego układu, określony procentem wariancji, który można interpretować jako miarę wyjaśnienia problemu. Na tym etapie tworzona jest macierz wyodrębnionych korelacji, nazywanych ładunkami czynnikowymi. Wyrażają one stopień nasycenia zmiennej danym czynnikiem i stanowią dla nieskorelowanych czynników współczynniki korelacji danej zmiennej pierwotnej z poszczególnymi czynnikami. Im większy był współczynnik korelacji zmiennej z czynnikiem, tym bardziej istotna była ta zmienna dla danego czynnika. W dalszej kolejności uzyskane ładunki czynnikowe poddano technice rotacji. Rotację czynników wykonano metodą znormalizowanej varimax, która poprzez maksymalizację wariancji zapewnia przejrzystość i ułatwia interpretację wyników potrzebnych do wyjaśnienia danego czynnika [25].

W końcowym etapie analizy odniesiono wartość ładunków do czynników i poszczególnych zmiennych, interpretując odpowiednio wyniki analizy. W tym celu wyodrębniono zmienne o najwyższych ładunkach czynnikowych względem danych czynników (przyjęto w zaokrągleniu $> 0,7$) i poprzez analizę nazw zmiennych znaleziono ich wspólne odniesienie do danego, głębszego wymiaru.

Wśród ankietowanych przeważały kobiety (62,4 %). Największy odsetek respondentów (27,8 %) stanowiły osoby w wieku 26 - 35 lat, natomiast najmniejsza część badanych (2,2 %) miała ponad 65 lat. Prawie co czwarta osoba (23,5 %) miała 46 - 55 lat. Ankietowani w wieku 18 - 25 i 36 - 45 lat stanowili odpowiednio: 19,5 i 19,3 %).

Natomiast przedział wiekowy 56 - 65 reprezentowało 7,7 % osób. Zatem większość badanych należała do przedziału wiekowego 26 - 55 lat (łącznie 70,8 %). Największą część ankietowanych (41,8 %) legitymowała się wykształceniem wyższym. Więcej niż co trzeci badany (34,4 %) miał wykształcenie średnie. Na zbliżonym poziomie kształtował się odsetek osób z wykształceniem zawodowym i licencjackim (odpowiednio: 12,1 i 9,8 %). Najmniejsza część ankietowanych miała wykształcenie gimnazjalne (0,3 %), a podstawowe – 1,6 % osób. Odsetek kobiet i mężczyzn w podobnych grupach wykształcenia był ten sam.

Wyniki badań i dyskusja

W wyniku badań wyodrębniono czynniki, które miały wpływ na postrzeganie produktu spożywczego. Uwzględniając charakter analizowanych elementów, czynnikom tym nadano symboliczne nazwy odzwierciedlające ich specyfikę i określono ich hierarchię (tab. 1).

Tabela 1. Hierarchia czynników ze względu na ich wartości własne ustalone na podstawie kryterium Kaisera

Table 1. Hierarchy of factors based on their own values established according to Kaiser criterion

Symboliczna nazwa czynnika Symbolic name of factor	Wartości własne Own values	Całkowita wariancja Total variance [%]	Relatywne znaczenie wizerunkotwórcze Relative significance in shaping image
Markowy (Cm1) / Brand (Cm1)	5,975	25,98	Kluczowe / Key
Produktowy (Cp2) / Product (Cp2)	2,170	9,43	Średnie / Medium
Promocyjny (Cp3) / Promotion (Cp3)	1,718	7,47	
Handlowy (Ch4) / Retail (Ch4)	1,586	6,90	
Etnocentryczny (Ce5) Ethnocentric (Ce5)	1,213	5,27	
Cenowy (Cc6) / Price (Cc6)	1,138	4,95	Małe / Small

Źródło: opracowanie własne / Source: Author's own study.

Wytypowano 6 głównych składowych, mających największy wpływ na wizerunek produktu spożywczego, które można powiązać z odpowiednimi zmiennymi. Pierwsza wartość własna (5,975) wyjaśnia 25,98 % zmienności, natomiast ostatnia wartość własna (1,138) wyjaśnia już tylko 4,95 % zmienności. Uzyskane wyniki procentowej całkowitej wariancji poszczególnych cech świadczą o tym, jak ważne są dla respondentów. Najwyższa względna wartość całkowitej wariancji (25,98 %) świadczy o największej wadze elementów wchodzących w skład pierwszego czynnika (markowego), natomiast najniższa – (4,95 %) dowodzi najmniejszej wagi elementów należących do ostatniego wyodrębnionego czynnika (cenowego).

Z przeprowadzonej analizy czynnikowej wynika, że dla pierwszego czynnika uzyskano dodatnie ładunki czynnikowe o wartości równej 0,7 lub większe od niej w odniesieniu do cech określonych jako marka produktu (0,787) i marka producenta (0,800). Można zatem stwierdzić, że czynnik markowy reprezentowany przez markę określonego produktu oraz markę producenta decydował w największym stopniu o wizerunku produktu spożywczego (tab. 2). Drugie miejsce, w zakresie wizerunkowym, zajął czynnik produktowy reprezentowany przez takie cechy produktu, jak: jego skład (0,738), wartość prozdrowotna (0,760) oraz wartość odżywcza (0,777). Kolejne 4 wyodrębnione czynniki w mniejszym stopniu determinowały postrzeganie produktu spożywczego. Trzecią pozycję ze względu na znaczenie wizerunkowe zajął czynnik promocyjny, zawierający takie bodźce promocyjne, jak konkursy (0,706) i obniżki cen (0,743). Jeszcze mniejsze znaczenie miał czynnik handlowy, wyodrębniony na podstawie takich zmiennych, jak kompetencje pracowników placówek handlowych (0,743) oraz poziom obsługi (0,766). Elementy determinujące wizerunek produktu o charakterze etnocentrycznym (kraj pochodzenia (0,794) oraz region kraju pochodzenia określonego produktu spożywczego (0,798)) miały relatywnie jeszcze mniejsze znaczenie wizerunkowe. W najmniejszym zaś stopniu na wizerunek produktu spożywczego wpływał czynnik cenowy.

W przypadku czynnika markowego relatywnie większe znaczenie miała marka producenta (0,800) niż marka produktu (0,787), chociaż różnica była nieznaczna. Dążąc do wykreowania i utrwalenia pozytywnego wizerunku produktu spożywczego oferenci powinni zatem skupić się na działaniach związanych zarówno ze swoją marką (był to jedyny element, w przypadku którego wartość ładunku czynnikowego wyniosła co najmniej 0,8), jak i z marką produktu. Natomiast działania promocyjne z zakresu tzw. promocji sprzedaży okazały się znacznie słabszymi determinantami wizerunku produktu spożywczego. Można jednak stwierdzić, że większą rolę wizerunkotwórczą odgrywały działania polegające na stosowaniu promocyjnych obniżek cen (0,743), czyli działania relatywnie prostsze do przeprowadzenia przez oferentów niż działania wymagające zaangażowania nabywców w postaci konkursów (0,706). Czynnik cenowy (cena standardowa) był najmniej istotny w kontekście wizerunkowym. Wartość całkowitej wariancji w jego przypadku była ponad pięciokrotnie mniejsza niż czynnika markowego.

Podkreślić należy, że w przeprowadzonej analizie czynnikowej nie występowały ujemne ładunki czynnikowe o wartości równej -0,7 lub mniejszej. Występowanie elementów o ujemnych wartościach ładunków czynnikowych oznaczałoby wpływ takich cech na pogorszenie wizerunku produktu.

Tabela 2. Wyniki analizy czynnikowej elementów determinujących wizerunek produktu spożywczego

Table 2. Results of factor analysis of elements determining image of food product

Potencjalne determinanty wizerunku Potential determinants of image	Cm1	Cp2	Cp3	Ch4	Ce5	Cc6
Cena / Price	-0,066	-0,064	0,348	0,051	0,066	0,781
Jakość / Quality	0,193	0,421	-0,161	0,011	0,023	0,581
Wizerunek producenta / Producer's image	0,615	0,079	-0,116	0,252	0,134	0,266
Wizerunek handlowca / Retailer's image	0,381	0,001	-0,023	0,563	0,202	0,259
Cechy sensoryczne produktu Sensory features of product	0,328	0,379	-0,050	0,122	-0,274	0,056
Marka produktu / Brand of product	0,787	0,079	0,191	0,018	0,048	-0,060
Marka producenta / Brand of producer	0,800	0,105	0,129	0,077	0,130	0,030
Opakowanie / Packaging	0,567	0,041	0,347	0,060	0,170	-0,069
Dodatkowe oznakowanie produktu Additional marking of product	0,290	0,296	0,152	0,155	0,530	-0,049
Kraj pochodzenia produktu Country of origin of product	0,101	0,236	-0,010	0,076	0,794	0,144
Region kraju pochodzenia produktu Region in country of origin of product	0,050	0,153	-0,013	0,269	0,798	0,052
Etykieta / Label	0,411	0,133	0,142	0,201	0,557	-0,099
Renoma miejsca nabywania produktu Prestige of place where product is purchased	0,389	-0,022	0,074	0,526	0,279	0,099
Kompetencje personelu placówki handlowej Competency of staff employed in retail facility	0,093	0,146	-0,056	0,743	0,192	0,064
Skład produktu Composition of product	0,018	0,738	0,024	0,055	0,289	0,096
Brak zmian jakości produktu w długim okresie czasu No changes in product quality over long period of time	0,187	0,649	0,058	0,115	0,059	-0,052
Wartość odżywcza produktu Nutritive value of product	-0,051	0,777	0,164	0,113	0,187	0,071
Wartość prozdrowotna produktu Health value of product	0,059	0,760	0,079	0,122	0,167	0,021
Usługi dodatkowe w punkcie sprzedaży Additional services in retail facility	0,072	0,119	0,372	0,662	0,117	-0,085
Poziom obsługi / Level of service	-0,040	0,268	0,205	0,766	0,008	-0,064
Bodźce marketingowe typu obniżki ceny Marketing incentives such as price reductions	0,052	0,163	0,743	0,232	-0,105	0,221
Bodźce marketingowe typu konkursy Marketing incentives such as competitions	0,188	-0,110	0,706	0,255	0,114	0,129
Opinia rodziny lub znajomych Opinion of family or acquaintances	0,180	0,203	0,542	-0,096	0,081	-0,094

Źródło: opracowanie własne / Source: Author's own study.

Podsumowując, można stwierdzić, że dla respondentów głównym czynnikiem decydującym o wizerunku produktu spożywczego była marka (zwłaszcza producenta), czyli jeden z marketingowych atrybutów produktu. Mniejsze znaczenie wizerunkowe miały cechy produktu decydujące o jego jakości technologicznej.

Wnioski

1. W przypadku produktu spożywczego cena zajęła ostatnie miejsce w hierarchii determinant jego wizerunku.
2. Działania promocyjne bardziej wpływały na wizerunek produktu spożywczego, ale nie była to silna zależność.
3. Zdecydowanie najsilniejsza zależność występowała między wizerunkiem i czynnikiem markowym, który należy do czynników o charakterze marketingowym. Relatywnie mniejsze znaczenie miał czynnik produktowy, obejmujący wartość odżywczą i prozdrowotną produktu oraz jego skład, czyli czynnik o charakterze pozamarketingowym. Jednak okazał się on ważniejszy w kontekście wizerunkowym niż pozamarkowe czynniki marketingowe, co stanowi ważną praktyczną wskazówkę dla oferentów, że w świadomym kształtowaniu wizerunku produktu spożywczego istotną rolę odgrywają także technolodzy. Korzystna więc będzie ich współpraca ze specjalistami ds. marketingu, gdyż jedynie wówczas działania wizerunkowe będą skuteczne.
4. W badaniach nie uwzględniono identyfikowania determinant wizerunku produktu specyficznych dla jednorodnych segmentów nabywców, np. dla osób w określonym wieku, co pozwoliłoby oferentom różnicować działania wizerunkowe i maksymalizować ich skuteczność i efektywność. Problematyka taka będzie przedmiotem przyszłych badań.

Literatura

- [1] Ahmed Z.U., Johanson J.P., Yang X., Chen K.F., Han S.T., Boon L.C.: Does country of origin matter for low-involvement products? *Int. Market. Rev.*, 2004, **21**, 102-120.
- [2] Balmer J.M.T.: Corporative identity and the advent of corporate marketing. *J. Mark. Man.*, 1998, **14**, 963.
- [3] Balmer J.M.T., Greyser S.A.: Managing the multiple identities of the corporation. *Calif. Manage. Rev.*, 2002, **44 (3)**, 72-86.
- [4] Baruk A.: *Petitioner or Partner. Multifaceted Insight into the Market Role of a Contemporary Purchaser on the Consumer Goods Market.* Lambert Academic Publishing, Saarbrücken 2014.
- [5] Białoskurski S.: *Marketing lateralny w procesie kształtowania wizerunku produktów spożywczych.* Praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź 2013.
- [6] Chen T.F.: An Integrated process – based customer knowledge management model. *J. Know. Man. Practice*, 2011, **12 (4)**, 43.
- [7] Choi E.J., Kim S.-H.: The study of the impact of perceived quality and value of social enterprises on customer satisfaction and re-purchase intention. *Int. J. Smart Home*, 2013, **7 (1)**, 239-252.

- [8] Chowdhury M.H.K., Rabiul I.: Critical factor in consumer perceptions: a cognitive approach. *J. Bus. Res.*, 2003, **5**, 1-18.
- [9] Dowling G.R.: Corporate reputations: should you compete on yours? *Calif. Man. Rev.*, 2004, **46 (3)**, 19-36.
- [10] Doyle P.: *Value – Based Marketing: Marketing Strategies for Corporate Growth and Shareholder Value*. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, 2008.
- [11] Freestone O., McGoldrick P.: Motivations of the ethical consumer. *J. Bus. Ethics*, 2008, **79 (4)**, 445-467.
- [12] Gotsi M., Wilson A.M.: Corporate reputation: seeking a definition. *Corporate Communications: An Int. J.*, 2001, **6 (1)**, 24-30.
- [13] GUS. Bank danych lokalnych. Dostęp w Internecie [14.02.2014.]: http://www.stat.gov.pl/bdl/app/strona.html?p_name=indeks
- [14] Hansen T.: Perspectives on consumer decision making: An integrated approach. *J. Cons. Beh.*, 2005, **4 (6)**, 420-437.
- [15] Hassan A.: The value proposition concept in marketing: how customers perceive the value delivered by firms – a study of customer perspectives on supermarkets in Southampton in the United Kingdom. *Int. J. Mark. Studies*, 2012, **4 (3)**, 68-87.
- [16] Ismail Z., Masood S., Tawab Z.M.: Factors affecting consumer preference of international brands over local brands. 2nd Int. Conf. on Social Sci. and Humanity. IPEDR, IACSIT Press, Singapore 2012.
- [17] Jakpar S., Goh Sze Na A., Johari A., Than Myint K.: Examining the product quality attributes that influences customer satisfaction most when the price was discounted: a case study in Kuching Sarawak. *Int. J. Bus. Social Sci.*, 2012, **3 (23)**, 221-236.
- [18] Jiang T., Tuzhilin A.: Segmenting customers from population to individuals: does 1-to-1 keep your customers forever? *IEEE Transactions On Knowledge And Data Engineering*, 2006, **18 (10)**. Dostęp w Internecie [14.02.2014.]: <http://pages.stern.nyu.edu/~atuzhili/pdf/TKDE-0377-0905-2.pdf>
- [19] Kotler Ph, Keller K.L.: *Marketing Management*. Prentice Hall, New Jersey 2012.
- [20] Kowalczyk I., Gutkowska K., Sajdakowska M., Żakowska-Biemans S., Kozłowska A., Olewnik-Mikołajewska A.: Innowacyjny konsument żywności pochodzenia zwierzęcego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **5 (90)**, 177-194.
- [21] Michaelidou N., Dibb S.: Product involvement: An application in clothing. *J. Cons. Beh.*, 2006, **5**, 442-453.
- [22] Monroe K.B.: *Pricing Making Profitable Decisions (3rd ed.)*. McGraw-Hill Publishing, New York 2003.
- [23] Niewczas M.: Kryteria wyboru żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **6 (91)**, 204-219.
- [24] Schiffman L.G., Kanuk L.L., Hansen H.: *Consumer Behaviour: A European Outlook*. Prentice Hall, Essex 2008.
- [25] Sokołowski A., Sagan A.: Przykłady stosowania analizy danych w marketingu i badaniu opinii publicznej. Dostęp w Internecie [14.02.2014.]: <http://www.statsoft.pl/czytelnia/marketing/adwmarketingu.html#wymiarowosci>.
- [26] Steenkamp J.-B., Batra R., Alden D.L.: How perceived brand globalness creates brand value? *J. Int. Bus. Stud.*, 2003, **34**, 53-65.
- [27] Swanson S. R., Kelley S. W.: Service recovery attributions and word-of-mouth intentions. *Eur. J. Mark.*, 2001, **35 (1-2)**, 194-211.
- [28] Szmigin I., Carrigan M., McEachern M.: The conscious consumer: Taking a flexible approach to ethical behaviour. *Int. J. Cons. Studies*, 2009, **33 (2)**, 224-231.

- [29] Underwood R.L., Klein N.M., Burke R.B.: Packaging communication: attentional effects of product imagery. *J. Prod. Brand Man.*, 2001, **10** (7), 1-19.

SELECTED DETERMINANTS OF FOOD PRODUCT IMAGE

S u m m a r y

The research study performed had two objectives: to identify the factors impacting the image of a food product and to hierarchically order and analyze the image determinants identified. The character of the paper is theoretical and empirical. In the theoretical part, a method was used of cognitive-critical analysis from the realm of marketing and marketing management. In the empirical part, the following research methods were applied: questionnaire survey method to collect primary data and statistical analysis (including factor analysis) to analyze those primary data and to draw conclusions. It was found that the price of food product did not strongly affect its image. Promotional activities played a relatively greater image-related role, although, in their case, no strong statistical dependence was observed in relation to image, either. The brand factor had the first and most important position in the hierarchical structure of determinants of image, whereas the price factor had the last place. Knowing the scope of those factors and their hierarchical arrangement, the offerer can efficiently and effectively manage the image of food products, and this, in turn, determines the value of research applicability.

Key words: food product, price, promotion, image ☒

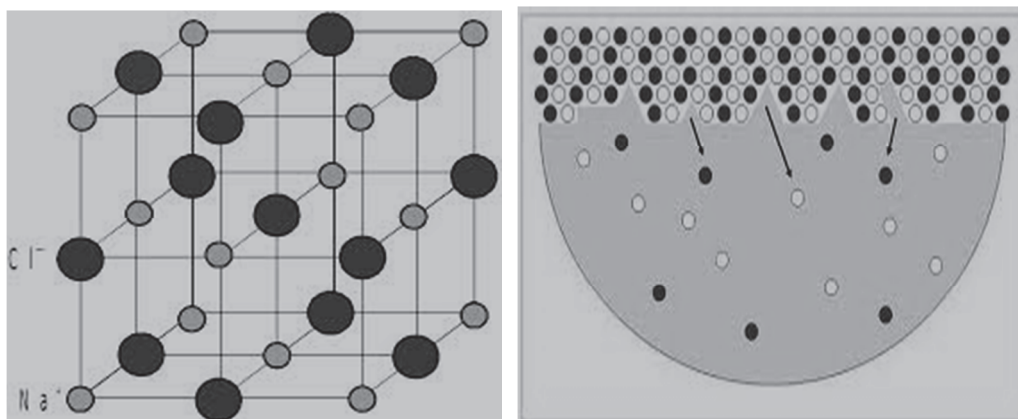
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA

INTERAKCJE SKŁADNIKÓW ŻYWNOŚCI

Prezentujemy 27. część cyklu nt.: „Interakcje składników żywności”. Druk materiałów z tego cyklu rozpoczęliśmy w *Żywności* nr 1 (74), 2011.

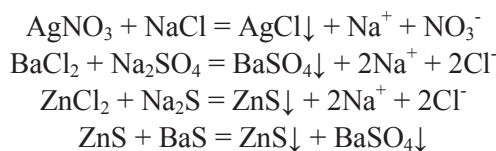
Efektem ataku cząsteczek wody na powierzchnię kryształu soli jest wyrwanie jonów z jego powierzchni, które powoli dyfundują w głąb cieczy. Jest to proces energetyczny, gdyż woda musi pobrać energię, aby aniony i kationy mogły pokonać siły przyciągania, które łączą je w kryształ (energia sieci). Energia ta zostaje oddana przez układ, gdy jony i cząsteczki rozpuszczalnika wiążą się ze sobą (energii hydratacji, solwatacji) – rys. 1. Rozpuszczanie kryształu następuje, gdy energia hydratacji (solwatacji) jest większa niż energia sieci. Jony obecne w roztworze poruszają się po torze zygzakowatym, podobnie jak cząsteczki gazu. Proces dysocjacji związku jonowego ma charakter spontaniczny, tzn. że jony poruszające się w roztworze mogą łączyć się w pary, które ponownie ulegają rozdzielaniu. Teraz przejdźmy do procesu odwrotnego, polegającego na powolnym usuwaniu wody z roztworu przez odparowanie (dehydratację). Odparowanie roztworu powoduje wzrost częstości zderzeń pomiędzy jonami i cząsteczkami wody aż do chwili, kiedy przy pewnym stężeniu kryształ soli umieszczony w roztworze uzyska więcej jonów niż ich straci i w ten sposób powiększy swe rozmiary. Efektem tego jest dynamiczna równowaga pomiędzy ilością jonów opuszczających kryształ soli i ilością wędrujących do niego. Taki roztwór nazywa się nasyconym. Jeżeli ilość substancji rozpuszczonej stykającej się z roztworem zmniejsza się, to taki roztwór nazywa się nienasyconym, natomiast roztwór, w którym ta ilość wzrasta nosi nazwę przesyconego. Warto jeszcze wspomnieć o efekcie wspólnego lub inertnego (biernego) jonu. Gdy do roztworu soli dodany zostanie roztwór zawierający wspólny z nią jon, to rozpuszczalność soli maleje, co potwierdza reguła Le Chateliera, mówiąca, że położenie równowagi układu zdolnego do reakcji chemicznej zmienia się w taki sposób, aby usunąć ten jon z roztworu. Natomiast, gdy do roztworu soli dodany

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. Modele struktury kryształu NaCl oraz procesu jego rozpuszczania w wodzie

zostanie roztwór zawierający jon inerty, rozpuszczalność soli wzrasta. Spowodowane to jest energetycznie korzystnymi oddziaływaniami elektrostatycznymi między jonami inertynymi i jonami soli, które stabilizują jony w roztworze i sprzyjają dalszej dysocjacji soli. Teoretycznie trudno jest przewidzieć rozpuszczalność soli. Ze względu na interaktywność jonów oraz rozpuszczalność powstających soli, z technologicznego i żywieniowego punktu widzenia warto zapamiętać pewne empiryczne zasady. Wszystkie węglany i fosforany są praktycznie nierozpuszczalne z wyjątkiem węglanów i fosforanów metali alkalicznych (poza litem) oraz amonu. Kwaśne węglany (wodorowęglany) i diwodorofosforany (z jonem H_2PO_4^-) są jednak rozpuszczalne. Niektóre siarczany są praktycznie nierozpuszczalne, szczególnie siarczany baru, strontu i ołowiu. Dość trudno rozpuszcza się też siarczan wapnia. Większość wodorotlenków jest nierozpuszczalna, z wyjątkiem wodorotlenków metali alkalicznych oraz baru, strontu i wapnia. Tlenki i siarczki są praktycznie nierozpuszczalne w wodzie, z wyjątkiem tlenków i siarczków metali alkalicznych i metali ziem alkalicznych, które reagują z wodą i rozpuszczają się, tworząc wodorotlenki i wodorosiarczki. Chlorki, bromki i jodki są prawie wszystkie łatwo rozpuszczalne, z wyjątkiem chlorków, bromków i jodków srebra, miedzi, rtęci i ołowiu (rozpuszczalne we wrzącej wodzie). Potwierdzeniem interaktywności soli w wodnym roztworze mogą być reakcje:



Przed zadaniem pytania zapoznajmy się z rozpuszczalnością wybranych soli (tab. 1).

Tabela 1. Rozpuszczalność wybranych substancji w wodzie

Substancja rozpuszczana		Rozpuszczalność substancji w g/100 g H ₂ O w temp. 20 °C
wzór	nazwa	
AgNO ₃	Azotan srebra	210,0
BaCl ₂	Chlorek baru	44,7
Ba(NO ₃) ₂	Azotan baru	8,88
BaSO ₄	Siarczan baru	0,26
CaCl ₂	Chlorek wapnia	563,0
CaSO ₄	Siarczan wapnia	0,26
NaCl	Chlorek sodu	35,9
Na ₂ SO ₄	Siarczan sodu	57,1
ZnCl ₂	Chlorek cynku	176,7

Tabela 2. Ujemne logarytmy iloczynów rozpuszczalności wybranych soli, pK_{S0}

Sól nieorganiczna		pK _{S0}
wzór	nazwa	
AgCl	chlorek srebra	9,75
ZnS	siarczek cynku	24,4

A teraz spróbujmy rozwiązać następujący problem. W wodzie rozpuszczono następujące sole w stężeniu 1 mol/dm³: AgNO₃, BaCl₂, NaCl, NaSO₄ i ZnCl₂.

Następnie przelano je do jednej zlewki. Pytanie: ile pozostanie jonów w roztworze wodnym, a ile przejdzie do osadu? Nie podajemy odpowiedzi, ale w zamian sugerujemy stwierdzenie, że bezwzględna ilość jonów w żywności i w suplementach nie jest równoznaczna z ilością ich bioaktywnych form w organizmie człowieka. ☒

GRAŻYNA MORKIS

PROBLEMATYKA ŻYWNOŚCIOWA W USTAWODAWSTWIE POLSKIM I UNIJNYM

Publikujemy kolejny przegląd aktów prawnych, które ukazały się w Dzienniku Ustaw RP oraz Dzienniku Urzędowym UE. Poniższe zestawienie zawiera akty prawne dotyczące szeroko omawianej problematyki żywnościowej wg stanu na dzień 31 maja 2015 r.

Polskie akty prawne

1. Ustawa z dn. 20 lutego 2015 r. o zmianie ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. 2015 r., poz. 470).
W ustawie z dn. 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. z 2014 r. poz. 1539 oraz z 2015 r. poz. 266) wprowadzono posiadaczom zwierząt m.in. nakaz zgłaszania powiatowemu lekarzowi weterynarii miejsc, w których przebywają zwierzęta z gatunków wrażliwych na daną chorobę zakaźną.
Główny Lekarz Weterynarii zobowiązany został do opracowania programu bioasekuracji mającego na celu zapobieganie szerzeniu się chorób zakaźnych zwierząt podlegających obowiązkowi zwalczania, biorąc pod uwagę sytuację epizootyczną w odniesieniu do danej choroby zakaźnej zwierząt.
2. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 6 marca 2015 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie wprowadzenia "Krajowego programu zwalczania niektórych serotypów *Salmonella* w stadach hodowlanych gatunku kura (*Gallus gallus*)" na lata 2014 - 2016 (Dz. U. 2015 r., poz. 468).
W rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 stycznia 2014 r. w sprawie wprowadzenia "Krajowego programu zwalczania niektórych serotypów *Salmonella* w stadach hodowlanych gatunku kura (*Gallus gallus*)" na lata 2014 - 2016 (Dz. U. poz. 233) nowe brzmienie otrzymał załącznik do niniejszego rozporządzenia.

3. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 23 marca 2015 r. w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej niektórych napojów (Dz. U. 2015 r., poz. 474).

Rozporządzenie określa szczegółowe wymagania dotyczące stosowania do napojów zawierających dwutlenek węgla, znajdujących się pod ciśnieniem powyżej 1 bara i w temperaturze 20 °C, szklanych butelek i zamknięć typowych dla wina musującego. Do napojów można stosować szklane butelki i zamknięcia określone w art. 69 ust. 1 lit. a i b rozporządzenia Komisji (WE) nr 607/2009 z dnia 14 lipca 2009 r. ustanawiającego niektóre szczegółowe przepisy wykonawcze do rozporządzenia Rady (WE) nr 479/2008 w odniesieniu do chronionych nazw pochodzenia i oznaczeń geograficznych, określeń tradycyjnych, etykietowania i prezentacji niektórych produktów sektora wina (Dz. Urz. UE L 193 z 24.07.2009, str. 60, z późn. zm.), jeżeli nie wprowadzają konsumentów w błąd co do prawdziwego charakteru danego napoju, w szczególności przez jego oznakowanie i prezentację, a także pozwalają na odróżnienie napoju niebędącego wyrobem winiarskim od wyrobów winiarskich, o których mowa w art. 3 ustawy z dnia 12 maja 2011 r. o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina (Dz. U. z 2014 r. poz. 1104).

Traci moc rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 12 kwietnia 2011 r. w sprawie szczegółowych wymagań jakości handlowej w zakresie opakowań niektórych wyrobów winiarskich (Dz. U. Nr 87, poz. 489).

4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 24 września 2007 r. w sprawie wykazu przejść granicznych właściwych dla przeprowadzania granicznej kontroli sanitarnej (Dz. U. 2015 r., poz. 546).

Ustalono nowy wykaz przejść granicznych, przez które środki spożywcze oraz materiały lub wyroby przeznaczone do kontaktu z żywnością, podlegające granicznej kontroli sanitarnej, mogą być wprowadzane na terytorium Unii Europejskiej.

5. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 8 kwietnia 2015 r. w sprawie wykazu przejść granicznych, na których jest dokonywana kontrola jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych sprowadzanych z zagranicy (Dz. U. 2015 r., poz. 592).

Ustalono nowy wykaz przejść granicznych, na których jest dokonywana kontrola jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych sprowadzanych z zagranicy.

Traci moc rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie wykazu przejść granicznych, na których jest dokonywana kontrola jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych sprowadzanych z zagranicy (Dz. U. Nr 122, poz. 1276).

6. Ustawa z dn. 10 grudnia 2003 r. o kontroli weterynaryjnej w handlu (tekst jednolity) (Dz. U. 2015 r. poz. 519).
Został ogłoszony jednolity tekst ustawy z dn. 10 grudnia 2003 r. o kontroli weterynaryjnej w handlu. Ustawa powyższa określa zasady przeprowadzania kontroli weterynaryjnej w handlu zwierzętami i produktami wymienionymi w przepisach wskazanych w załącznikach oraz kontroli dokumentów zootechnicznych w handlu zwierzętami. Przepisów ustawy nie stosuje się do kontroli weterynaryjnej zwierząt domowych towarzyszących osobom fizycznym odpowiedzialnym za te zwierzęta, które są wprowadzane na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej z innych państw członkowskich w celach niehandlowych.
7. Ustawa z dn. 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych (tekst jednolity) (Dz. U. 2015 r., poz. 678).
Został ogłoszony jednolity tekst ustawy z dn. 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych. Ustawa reguluje sprawy jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych oraz organizację i zasady działania Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych.
8. Ustawa z dn. 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (tekst jednolity) (Dz. U. 2015 r., poz. 594).
Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Ustawa określa wymagania i procedury niezbędne dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności i żywienia zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiającego ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołującego Europejski Urząd do Spraw Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiającego procedury w sprawie bezpieczeństwa żywności (Dz. Urz. WE L 31 z 01.02.2002, str. 1; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t. 6, str. 463).
9. Oświadczenie rządowe z dn. 16 marca 2015 r. w sprawie mocy obowiązującej Umowy o międzynarodowych przewozach szybko psujących się artykułów żywnościowych i o specjalnych środkach transportu przeznaczonych do tych przewozów (ATP), przyjętej w Genewie dnia 1 września 1970 r. (Dz. U. 2015 r., poz. 668).
Polska złożyła Sekretarzowi Generalnemu Organizacji Narodów Zjednoczonych dokument przystąpienia Polski do umowy o międzynarodowych przewozach szybko psujących się artykułów żywnościowych i o specjalnych środkach transportu przeznaczonych do tych przewozów (ATP), przyjętej w Genewie dnia 1 września 1970 r. i dnia 5 maja 1983 r.

Unijne akty prawne

1. Rozporządzenie Komisji (UE) 2015/537 z dn. 31 marca 2015 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 w odniesieniu do stosowania łaków glinowych koszenili, kwasu karminowego, karminu (E 120) w środkach spożywczych specjalnego przeznaczenia medycznego (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. Urz. UE L, 2015 r. nr 88, s. 1).
Zmiana dotyczy maksymalnego poziomu glinu stosowanego w dietetycznych środkach spożywczych specjalnego przeznaczenia medycznego (kategoria żywności 13.2).
2. Rozporządzenie Komisji (UE) 2015/538 z dnia 31 marca 2015 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 w odniesieniu do stosowania kwasu benzooesowego – benzoesanów (E 210 - 213) w gotowanych krewetkach w solance (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. Urz. UE L, 2015 r. nr 88, s. 4).
Zostało dopuszczone stosowanie kwasu benzooesowego – benzoesanów (E 210 - 213), jako dodatku tylko do gotowanych krewetek.
3. Decyzja Wykonawcza Komisji (UE) 2015/545z dnia 31 marca 2015 r. zezwalająca na wprowadzenie do obrotu oleju z mikroalg Schizochytrium sp. (ATCC PTA-9695) jako nowego składnika żywności zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady (notyfikowana jako dokument nr C(2015) 2082) (Dz. Urz. UE L, 2015 r. nr 90, s. 7).
Zezwolono na wprowadzenie do obrotu w Unii oleju z mikroalg *Schizochytrium sp. (ATCC PTA-9695)* jako nowego składnika żywności. Olej z mikroalg *Schizochytrium sp. (ATCC PTA-9695)* dopuszczony do obrotu niniejszą decyzją ma być oznaczany na etykiecie zawierających go środków spożywczych jako „olej z mikroalg *Schizochytrium sp. (ATCC PTA-9695)*”.
4. Decyzja Wykonawcza Komisji (UE) 2015/546 z dn. 31 marca 2015 r. zezwalająca na rozszerzenie zastosowania oleju z mikroalg Schizochytrium sp. bogatego w DHA i EPA jako nowego składnika żywności zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady (notyfikowana jako dokument nr C(2015) 2083) (Dz. Urz. UE L, 2015 r. nr 90, s. 11).
Zezwolono na wprowadzenie do obrotu w Unii oleju z mikroalg *Schizochytrium sp. bogatego w DHA i EPA* jako nowego składnika żywności do zastosowań określonych i przy maksymalnych poziomach ustanowionych w załączniku II, nie naruszając przepisów dyrektywy 2002/46/WE. Olej z mikroalg *Schizochytrium sp. bogaty w DHA i EPA* dopuszczony do obrotu niniejszą decyzją ma być oznaczany na etykiecie zawierających go środków spożywczych jako „olej z mikroalg *Schizochytrium sp. bogaty w DHA i EPA*”.

5. Rozporządzenie Komisji (UE) 2015/647 z dn. 24 kwietnia 2015 r. w sprawie zmiany i sprostowania załączników II i III do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 w odniesieniu do stosowania określonych dodatków do żywności (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. Urz. UE L, 2015 r. nr 107, s. 1).

Wprowadzono zmiany dotyczące stosowania dodatków do żywności. Zakres tych zmian został zawarty w załącznikach do niniejszego rozporządzenia. ☒

NOWE KSIĄŻKI

Kompetencje konsumentów

Dąbrowska A., Byłok F., Janoś-Kresło M., Kiełczewski D., Ozimek I.

Wydawnictwo: PWE, Warszawa 2015, ISBN 978-83-208-2189-5, stron 200, cena 46,67 zł

Zamówienia: www.pwe.com.pl

Książka składa się z 6 rozdziałów, w których omówiono współczesne wyzwania cywilizacyjne z punktu widzenia konsumenta, kompetencje oraz ich znaczenie w kształtowaniu zachowań i postaw konsumentów, zrównoważoną konsumpcję oraz postawy konsumentów wobec niej, innowacyjne zachowania w kontekście kompetencji konsumentów (w tym cechy innowacyjnych konsumentów, wybór innowacyjnych produktów przez konsumentów, wzory konsumpcji), zagadnienia dotyczące ochrony praw konsumentów. Książka polecana jest dla osób, które interesują się zachowaniami konsumentów, organizacjami i instytucjami działającymi w tym zakresie oraz studentów uczelni ekonomicznych.

Dietary Supplements in Health Promotion

[Suplementy diety w promowaniu zdrowego trybu życia]

Wallace T. C.

Wydawnictwo CRC Press, 2015, ISBN 9781482210347, stron 405, cena 54,39 £

Zamówienia: www.crcpress.com

Rynek suplementów diety rozwija się bardzo szybko. Już połowa populacji stosuje suplementy diety w celu zachowania dobrego stanu zdrowia. W książce scharakteryzowano zagadnienia takie jak: bezpieczeństwo i skuteczność stosowania suplementów diety, porady dotyczące prawidłowego stosowania suplementów diety, dokonano charakterystyki głównych suplementów diety. Każdy rozdział zakończony jest podsumowaniem oraz radami ekspertów i naukowców zajmujących się żywieniem człowieka. Zawarto również wyniki badań dotyczące efektów stosowania suplementów diety. Książka stanowi odpowiedź na liczne wątpliwości oraz pojawiające się sprzeczne informacje na temat stosowania suplementów diety i prezentuje treści w sposób jasny

i zrozumiały. Jest polecana dla osób zajmujących się żywnością, żywieniem człowieka oraz studentów kierunków związanych z żywnością.

Health Benefits of Fermented Foods and Beverages

[Zalety dla zdrowia ze spożywania żywności i napojów fermentowanych]

Tamang J. P. (red.)

Wydawnictwo: CRC Press, 2015, ISBN 9781466588097, stron 638, cena 91,80 £

Zamówienia: www.crcpress.com

W publikacji opisano pozytywny wpływ na zdrowie żywności i napojów fermentowanych. Wśród pozytywnych efektów ich działania można wskazać zapobieganie chorobom: układu krążenia, wątroby, układu trawiennego, nowotworom, nadciśnieniu, osteoporozie, alergii. Pozytywny wpływ spożywania żywności i napojów fermentowanych na zdrowie człowieka wynika z różnorodności mikroorganizmów obecnych w tych produktach, takich jak: grzyby, bakterie oraz drożdże. W książce zawarto również wyniki badań klinicznych. Książka polecana jest dla zainteresowanych osób oraz dla studentów kształcących się na kierunkach związanych z żywnością i żywieniem człowieka.

Food Safety, Market Organization, Trade and Development

[Bezpieczeństwo żywności, organizacje rynkowe, handel i rozwój]

Hammoudi A., Grazia C., Surry Y., Traversac J.-B. (red.)

Wydawnictwo: Springer, 2015, ISBN 978-3-319-15226-4, stron 254, cena 106,99 €

Autorzy podjęli zagadnienie skutków ekonomicznych standardów bezpieczeństwa żywności na międzynarodowy handel. Skupiono uwagę na regulacjach z zakresu bezpieczeństwa żywności w wymiarze międzynarodowym oraz prywatnych standardach bezpieczeństwa żywności. Analizowano łańcuchy dostaw żywności oraz strategie wszystkich operatorów na rynku żywności. Scharakteryzowano standardy zapewnienia bezpieczeństwa żywności, zachowania konsumentów w zakresie bezpieczeństwa żywności i rolę standardów bezpieczeństwa żywności w handlu międzynarodowym. W książce zawarto pomysły, sugestie i rekomendacje dotyczące możliwości godzenia interesów ekonomicznych i zdrowia konsumentów, co stanowi główny obszar zainteresowania naukowców, jak i praktyków z tej dziedziny.

Opracowała: Magdalena Niewczas

TWÓRCY POLSKIEJ NAUKI O ŻYWNOSCI

POLSCY UCZENI PO II WOJNIE ŚWIATOWEJ PROF. DR HAB. HENRYK GAŚIOROWSKI (1922 - 2010)



Prof. dr hab. Henryk Gąsiorowski urodził się 12 grudnia 1922 roku w Łowinku, obecnie woj. kujawsko-pomorskie, gdzie spędził dzieciństwo i lata młodości. W Liceum Ogólnokształcącym im. Józefa Piłsudskiego w Bydgoszczy uzyskał tzw. małą maturę. Gdy rozpoczęła się II wojna światowa, jako 17-letni ochotnik wstąpił do polskiego wojska i w batalionie przysposobienia wojskowego uczestniczył między innymi w obronie Warszawy. Po kapitulacji trafił wraz z innymi żołnierzami do obozu jenieckiego pod Grudziądem, gdzie przebywał do końca 1939 roku. Po zwolnieniu z obozu początkowo pracował jako robotnik rolny na Pomorzu, a po wysiedleniu do Generalnej

Guberni, od 1941 roku jako robotnik leśny, a następnie robotnik w hucie Stalowa Wola. W roku 1944 wstąpił do Drugiej Armii Wojska Polskiego i brał udział w walkach o Nysę.

Po zakończeniu wojny, jeszcze przez rok pozostał w wojsku w formacji służby pogranicza. W tym czasie skończył szkołę średnią w Jeleniej Górze. W 1946 roku zdał maturę i podjął studia na Wydziale Rolniczo-Leśnym Uniwersytetu Poznańskiego. Specjalizację i pracę dyplomową, której tematem była charakterystyka przemian biochemicznych i technologicznych mąki przechowywanej w zróżnicowanych warunkach, wykonał pod kierunkiem prof. Józefa Janickiego i dra Stanisława Jankowskiego. Pracę dyplomową obronił na ocenę celującą. Od profesora Janickiego otrzymał propozycję podjęcia pracy na Uczelni i przez rok pracował jako asystent w Katedrze Technologii Rolnej. Trudne warunki mieszkaniowe i funkcjonujący w tamtym okresie nakaz pracy sprawiły, że w 1951 roku podjął pracę jako technolog, a następnie kierownik laboratorium analitycznego w Zespole Młynów w Lesznie. Pracował tam przez ponad dwa lata.

Stąd został oddelegowany do pracy w delegaturze Najwyższej Izby Kontroli, w zespole do spraw przemysłu spożywczego, gdzie pracował do końca 1956 roku.

W 1957 roku powrócił do Poznania, do swojej uczelni i pracy naukowej, kontynuując badania pod kierunkiem prof. Stanisława Jankowskiego. Zainteresowania naukowe prof. Gąsiorowskiego były bardzo szerokie, od kryteriów i metod oceny ziarna zbóż i przetworów zbożowych, poprzez technologię młynarstwa i piekarstwa aż do zagadnień reologii i biochemii. Pracę doktorską pt. „Wpływ temperatury przechowywania pieczywa na jego przydatność konsumpcyjną i zmiany niektórych jego składników” obronił w 1962 roku. Po doktoracie przebywał na stażach naukowych w ośrodku naukowym z branży zbożowej w Detmold, a także przez dłuższy czas przebywał w Moskiewskim Technologicznym Instytucie Przemysłu Spożywczego, gdzie pracował pod kierunkiem prof. Kretowicza (późniejszego doktora h.c. Akademii Rolniczej w Poznaniu), prof. Auermana oraz prof. Kazakowa. Po powrocie do kraju przygotował pracę habilitacyjną „Wpływ niektórych czynników fizycznych i chemicznych na reologiczne własności ciasta pszennego”, która w 1966 roku była przedmiotem kolokwium habilitacyjnego w SGGW w Warszawie. Henryk Gąsiorowski aktywnie pracował naukowo, a efektem jego osiągnięć było nadanie mu w 1976 roku tytułu profesora nadzwyczajnego, a w 1984 roku – profesora zwyczajnego.

Prof. dr hab. Henryk Gąsiorowski jest autorem lub współautorem ponad 300 publikacji, drukowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, ale i adresowanych do kadry inżyniersko-technicznej przemysłu spożywczego. Niektóre z publikacji ukazały się w językach: angielskim, niemieckim, włoski i francuskim. O bliskości działalności badawczej profesora z praktyką przemysłową świadczą liczne wdrożenia w zakładach zbożowo-młynarskich, piekarskich i makaronowych. Niektóre z produktów i technologie ich wytwarzania stosowane są do chwili obecnej.

Obok pracy naukowej prof. Henryk Gąsiorowski prowadził szeroką działalność organizacyjną. W roku 1955, wspólnie z prof. Stanisławem Jankowskim, utworzyli zakład doświadczalny popularnie nazywany piekarnią doświadczalną, gdzie powstawały nowe sortymenty pieczywa oraz testowano różne metody produkcji pieczywa. Wielu poznaniaków do tej pory wspomina z sentymentem pieczywo wytwarzane w tamtym zakładzie.

W latach 1968 - 1970 prof. Gąsiorowskiemu zostaje powierzona funkcja prodziekana do spraw dydaktycznych Wydziału, a w 1970 r. zostaje wybrany dziekanem Wydziału. Funkcję dziekana piastuje jeszcze raz w latach 1981 - 1984.

Z chwilą powstania Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego prof. Gąsiorowski zostaje wicedyrektorem Instytutu ds. dydaktycznych. Funkcję tę pełni przez dwie kadencje aż do 1978 roku. W latach 1981 - 1984 zostaje także kierownikiem Zakładu Technologii Zbóż.

Przejście prof. dr hab. Henryka Gąsiorowskiego w 1993 roku na emeryturę nie spowodowało zaprzestania Jego aktywności naukowej. Swój czas, wiedzę i energię poświęcił napisaniu monografii „Żyto – chemia i technologia”, „Owies – chemia i technologia”, „Jęczmień - chemia i technologia” oraz wydanej w 2004 roku „Pszenica - chemia i technologia”. O książkach tych prof. Stanisław Jankowski napisał między innymi: „*Monografie trzech zbóż pod redakcją prof. H. Gąsiorowskiego stanowią dzieło, moim zdaniem, nieprzeciętnej wartości naukowej zarówno pod względem bogactwa źródłowego, jak i zakresu oraz formy jego wykorzystania w opracowaniu*”, oraz „*Monografie pod redakcją prof. Gąsiorowskiego powinny zainteresować jak największą liczbę czytelników, zarówno z grona producentów zbóż, jak i technologów, a także konsumentów oraz żywieniowców-dietetyków, no i internistów*”.

Nie można też nie wspomnieć o pracy dydaktycznej Profesora. Pod Jego opieką zostało wykonanych ponad 200 prac dyplomowych inżynierskich i magisterskich. Niektórzy z jego dyplomantów pełnili i pełnią ważne funkcje zawodowe bądź prowadzą własne przedsiębiorstwa, a doktoranci pracują naukowo.

Działalność naukowa, dydaktyczna i organizacyjna Profesora, lecz przede wszystkim postawa społeczna i życzliwość wobec innych zostały wielokrotnie docenione licznymi medalami: za udział w walce wyzwoleniczej, Krzyżem Kawalerskim i Krzyżem Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski za działalność naukową, społeczną i dydaktyczną, nagrodami Ministra Nauki, Szkolnictwa Wyższego i Techniki I i III stopnia za osiągnięcia naukowe.

Profesor Henryk Gąsiorowski zmarł w Poznaniu 2010 roku. Został pochowany na Cmentarzu Parafialnym przy ul. Lutyckiej w Alei Profesorów.

Wiktor Obuchowski

Przygotowano na podstawie biogramu opublikowanego w wydawnictwie jubileuszowym "50 lat Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu 1962 -2012" pod red. Tomasza Jankowskiego, Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2012.

XX KRAJOWA KONFERENCJA MŁODEJ KADRY NAUKOWEJ
I
IV SESJA MIĘDZYNARODOWA
„ŻYWNOŚĆ – JAKOŚĆ I PERSPEKTYWY”
14 - 15 MAJA 2015, RZESZÓW

W dniach 14 - 15 maja 2015 r. odbyło się spotkanie młodych naukowców w ramach cyklicznej Konferencji Młodej Kadry Naukowej. Jubileuszowe, dwudzieste krajowe, a czwarte międzynarodowe spotkanie nt. „Żywność – jakość i perspektywy” gościł Oddział Podkarpacki PTTŻ na Wydziale Biologiczno-Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego, kierowany przez dr hab. Małgorzatę Dżugan, prof. UR. Młodym członkom Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, z prezesem – prof. dr hab. Edwardem Pospiechem, towarzyszyli młodzi członkowie Sekcji Chemii Żywności Polskiego Towarzystwa Chemicznego, pod opieką prof. dr hab. Henryka Zielińskiego. Konferencję objęli patronatem: Marszałek Województwa Podkarpackiego – Władysław Ortyl oraz J.M. Rektor Uniwersytetu Rzeszowskiego – prof. dr hab. Aleksander Bobko.

Spotkania od lat gromadzą doktorantów i młodych pracowników nauki z większości polskich jednostek naukowych, a od czterech lat służą również wymianie wiedzy i doświadczeń w aspekcie międzynarodowym. Tematycznie Sesja Młodej Kadry Naukowej skupia się wokół szerokiego pojęcia żywności i żywienia. Podczas tegorocznej sesji omówiono takie zagadnienia, jak: jakość i bezpieczeństwo zdrowotne żywności, technologia nowoczesnych produktów spożywczych, biotechnologia w produkcji żywności, żywienie człowieka we współczesnym świecie czy chemia żywności i metody analizy w aspekcie funkcjonalnych i prozdrowotnych właściwości, które dobrze łączyły zakres zainteresowań badawczych uczestników zrzeszonych w obu Towarzystwach – PTTŻ i PTChem.

W obradach, podzielonych na cztery sesje referatowe oraz sesję plakatową, wzięło udział 95 uczestników, w tym 7 osób z ośrodków zagranicznych z Ukrainy i Słowacji. Młodzi naukowcy reprezentowali uczelnie: Uniwersytet Rzeszowski, Uniwersytet

Przyrodniczy w Poznaniu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, Szkołę Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Politechnikę Poznańską, Akademię im. J. Długosza w Częstochowie, Slovak University of Agriculture in Nitra oraz *Institute of Cell Biology* National Academy of Sciences of Ukraine in Lviv.

Sesja Młodej Kadry Naukowej, zgodnie z wieloletnią tradycją, stwarza możliwość poznania i integracji środowiska młodych naukowców będąc jednocześnie dogodną płaszczyzną do wymiany poglądów i otwartej dyskusji na temat prowadzonych badań, a przede wszystkim do przedstawienia własnych wyników badań szerszym gronie.

Nad poziomem merytorycznym obrad czuwał Komitet Naukowy, w skład którego weszli m.in. prezesi Towarzystw sprawujących pieczę nad Sesją, członkowie poszczególnych Oddziałów PTTŻ oraz zasłużeni przyjaciele i sympatycy Młodej Kadry Naukowej. Wygłoszono 4 referaty plenarne, 18 prezentacji ustnych w języku polskim i 8 w języku angielskim oraz zaprezentowano 84 plakaty. Z uwagi na międzynarodowy charakter sesji, językiem konferencyjnym był język angielski. Tradycyjnie już prelegentów nagrodzono za najlepsze referaty i plakaty.

W polskojęzycznej sesji referatowej nagrodzono następujące osoby:

1. Paulina Nowicka z UP we Wrocławiu,
2. Anna Rzepkowska z SGGW w Warszawie,
3. Anna Grygier z UP w Poznaniu.

Nagrodę specjalną, w postaci możliwości opublikowania artykułu w czasopiśmie *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, otrzymał Bartosza Fotschki z IRZiBŻ PAN w Olsztynie.

W anglojęzycznej sesji referatowej nagrodzeni zostali:

1. Alina Pacesz z UP w Poznaniu,
2. Małgorzata Przygodzka z PAN w Olsztynie,
3. Oleksii Lyzak z Ukrainy.

Nagrodę specjalną, którą stanowi możliwość opublikowania artykułu w czasopiśmie *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, otrzymał Artur Wiktor z SGGW w Warszawie.

W sesji plakatowej nagrody otrzymali:

1. Marek Halenar ze Słowacji,
2. Maciej Kluz z Uniwersytetu Rzeszowskiego,
3. Arleta Mieszkowska z SGGW w Warszawie.

Nagrodę specjalną, w postaci publikacji w czasopiśmie *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* otrzymał Marcin Bajcar z Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Wzorem poprzednich lat uczestnicy mieli możliwość wytypowania spośród wystąpień jednej prezentacji oraz jednego plakatu, czyli tzw. nagrody publiczności. Nagrodę za najlepszy referat otrzymał Artur Wiktor z SGGW w Warszawie, zaś za najlepszy plakat – Arleta Mieszkowska (SGGW w Warszawie).

W przerwie obrad odbyło się spotkanie członków Sekcji Młodej Kadry PTTŻ, dotyczące przyszłości młodych w PTTŻ, które poprowadził prezes PTTŻ – prof. dr hab. Edward Pospiech. Na kolejną kadencję wybrano nową przewodniczącą, Monikę Przeor z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, która przez ostatni rok była p.o. przewodniczącej Sekcji Młodej Kadry PTTŻ.

Spotkanie młodych zakończył krótki wyjazd w Bieszczady, który stał się doskonałym miejscem rozmów i wymiany doświadczeń. Kolejne spotkanie Młodej Kadry Naukowej odbędzie się w maju 2016 roku, na które serdecznie zapraszamy.

Monika Przeor i Maciej Kluz

TECHNOLOG ŻYWNOŚCI

INFORMATOR POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI

Rok 25 Nr 3

czerwiec 2015

DZIAŁALNOŚĆ TOWARZYSTWA

Zarząd Główny

Wiceprezes PTTŻ prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska, jako przedstawicielka Towarzystwa i delegat, uczestniczyła w Walnym Zebraniu Federacji Gospodarki Żywnościowej RP, które odbyło się w dniu 9.06. br. w Warszawie. Na tym zebraniu przedstawiła działalność PTTŻ i zaprosiła do współpracy, co spotkało się z dużym zainteresowaniem delegatów.

PTTŻ znajduje się w gronie założycieli FGŻ RP. Federacja stanowi związek branżowych organizacji pozarządowych i innych osób prawnych działających w Polsce na rzecz gospodarki żywnościowej, posiada osobowość prawną. Po sześciu latach wspólnej działalności w Radzie Gospodarki Żywnościowej przy Ministrze Rolnictwa i Rozwoju Wsi (przedstawicielem PTTŻ był prof. Tadeusz Sikora), pomyślne jej efekty i rozwój aktywności społecznej w służbie sektora rolno-spożywczego skłoniły znaczną grupę jej członków do suwerennej inicjatywy powołania międzybranżowej organizacji zrzeszającej producentów rolnych i przetwórców przemysłu spożywczego.

W dniach 25 - 26 czerwca 2015 r. na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie odbyła się XLII Sesja Komitetu Nauk o Żywności PAN pt. „ŻYWNOŚĆ – ZDROWIE - PRZYSZŁOŚĆ. Współorganizatorem był Oddział Lubelski PTTŻ.

WAŻNIEJSZE MIĘDZYKRAJOWE I KRAJOWE KONFERENCJE NAUKOWE W 2015 r.

Lipiec

6 - 10 POZNAŃ = IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej nt. „Chemia analityczna to ciągle wyzwania”

Organizatorzy: Wydział Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Kontakt: pkca@amu.edu.pl

Wrzesień

- 8 - 12 RIO DE JANEIRO - BRAZIL = 9th International Conference on Predictive Modelling in Food.
Organizatorzy: The 9th International Conference on Predictive Modelling in Foods is organised by Elsevier in association with International Committee of Predictive Modelling in Food.
- 20 - 22 SOPOT – GDAŃSK = Międzynarodowa Konferencja Naukowa nt. „Jakość i jej zastosowania”.
Organizatorzy: Politechnika Gdańska i Uniwersytet Gdański.
Informacje: www.qualitygdansk.eu
Kontakt: qualitygdansk@zie.pg.gda.pl
- 24 - 25 RZESZÓW = Konferencja Naukowa „Jakość i marketing produktów spożywczych w kształtowaniu konkurencyjności firm i regionów”.
Organizatorzy: Centrum Marketingu Produktów Spożywczych Uniwersytetu Rzeszowskiego i Katedra Opakowalnictwa Towarów Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie.
Informacje: e-mail: marketingiJakosc@interia.pl
Kontakt: Tel.: +48 12 293 51 67; +48 12 293

Październik

- 15 - 16 ŁÓDŹ = Międzynarodowa Konferencja nt. „Związki biologicznie aktywne w żywności”
Organizatorzy: Oddział Łódzki PTTŻ, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej.
Informacje: www.bacif.p.lodz.pl
Kontakt: bacif@info.p.lodz.pl

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY POLSKIEGO TOWARZYSTWA
TECHNOLOGÓW ŻYWNOSTCI

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 3 (100)/2015 Biuletynu podano według stanu informacji do 15 czerwca 2015 r. Materiały do Nr 4 (101)/2015 prosimy nadsyłać do 1 sierpnia 2015 r. na adres Redakcji Czasopisma.

KOMUNIKAT

Informujemy P.T. Autorów, że *Informacje dla Autorów oraz wymagania redakcyjne* publikujemy na stronie <http://www.ptz.org/zyw/index.html>

**Adresy Zarządu Głównego, Oddziałów i Sekcji
Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności**

PREZES / ODDZIAŁ	ADRES
Prof. dr hab. Edward Pospiech Prezes PTTŻ	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: 61 848 72 60; e-mail: pospiech@up.poznan.pl
Dr hab. Dorota Piasecka-Kwiatkowska Sekretarz PTTŻ	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ e-mail: dorotapk@up.poznan.pl
Prof. dr hab. Maria Śmiechowska Oddział Gdański	AM, ul. Morska 81-87, 81-225 GDYNIA Tel.: 58 690 15 62; e-mail: smiemari@am.gdynia.pl
Dr hab. inż. Joanna Stadnik Oddział Lubelski	UP, ul. Skromna 8, 20-704 LUBLIN Tel.: 81 462 33 41; e-mail: joanna.stadnik@up.lublin.pl
Dr hab. Joanna Leszczyńska Oddział Łódzki	PL, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 ŁÓDŹ e-mail: joanna.leszczynska@p.lodz.pl
Dr hab. inż. Lesław Juszcak, prof. UR Oddział Małopolski	UR, ul. Balicka 122, 30-149 KRAKÓW Tel. 12 662 47 78; e-mail: rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl
Dr inż. Janusz Pomianowski Oddział Olsztyński	UWM, Pl. Cieszyński 1, 10-957 OLSZTYN Tel.: 89 523 36 17; e-mail: Pomian@uwm.edu.pl
Dr hab. Małgorzata Dżugan, prof. URzesz Oddział Podkarpacki	UR w Rzeszowie, ul. M. Ćwiklińskiej 2, 35-601 RZESZÓW Tel. 17 872 17 22; e-mail: mdzugan@univ.rzeszow.pl
Dr inż. Arkadiusz Żych Oddział Szczeciński	ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 3, 71-550 SZCZECIN Tel.: 91 449 66 00 wew. 6583; e-mail: arkadiusz.zych@zut.edu.pl
Dr inż. Dorota Nowak Oddział Warszawski	SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA Tel.: 22 593 75 62; e-mail: dorota_nowak@sggw.pl
Dr hab. Dorota Piasecka-Kwiatkowska Oddział Wielkopolski	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ e-mail: dorotapk@up.poznan.pl
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Kita Oddział Wrocławski	UP, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: 71 320 50 38; e-mail: agnieszka.kita@wnoz.up.wroc.pl
SEKCJE	
Dr Karol Krajewski Ekonomiczna	Politechnika Koszalińska, ul. Kwiatkowskiego 6e, 75-343 KOSZALIN Tel.: 609 807 618; e-mail: janjasiencyk@poczta.onet.pl
Dr inż. Arkadiusz Żych Technologii Mięsa	ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 3, 71-550 SZCZECIN Tel.: 91 449 66 00 wew. 6583; e-mail: arkadiusz.zych@zut.edu.pl
Dr hab. Magdalena Rudzińska Chemii i Technologii Tłuszczów	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: 61 848 72 76; e-mail: magdar@up.poznan.pl
Prof. dr hab. Antoni Golachowski Technologii Węglowodanów	UP, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: 71 320 77 68; e-mail: antoni.golachowski@up.wroc.pl
Dr hab. inż. Piotr Gębczyński, prof. nadzw. Technologii Owoców i Warzyw	UR, ul. Balicka 122, 30-149 KRAKÓW e-mail: rrgebczy@cyf-kr.edu.pl
Mgr inż. Monika Przeor Młodej Kadry Naukowej	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ e-mail: m.przeor@au.poznan.pl