



ŻYWNOŚĆ

Nauka Technologia Jakość

FOOD

Science Technology Quality

Nr 6 (103)

Kraków 2015

Rok 22

ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość

Organ naukowy PTTŻ – dwumiesięcznik

Nr 6 (103)

Kraków 2015

Rok 21

SPIS TREŚCI

Od Redakcji.....	5
MACIEJ TACZANOWSKI: Definicje legalne prawa żywnościowego – przyczyny tworzenia i formy.....	7
NATALIA SKIEPKO, IWONA CHWASTOWSKA-SIWIECKA, JACEK KONDRATOWICZ: Właściwości likopenu i jego wykorzystanie do produkcji żywności funkcjonalnej.....	20
JOANNA KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, ANNA STOCHMAL: Klowamid i jego pochodne jako bioaktywne roślinne związki fenolowe.....	33
RADOSŁAW DEMBZYŃSKI, WOJCIECH BIAŁAS, ANNA OLEJNIK, PRZEMYSŁAW KOWALCZEWSKI, AGNIESZKA DROZDZYŃSKA, TOMASZ JANKOWSKI: Separacja antocyjanów z owoców aronii, czarnego bzu, czarnej porzeczki i korzenia czarnej marchwi za pomocą chromatografii preparatywnej.....	41
MACIEJ BILEK, KINGA STAWARCZYK, AGNIESZKA SIEMBIDA, MACIEJ STRZEMSKI, MARCIN OLSZEWSKI, EWA CIEŚLIK: Zawartość cukrów w sokach drzewnych z terenu Podkarpacia.....	53
HANNA M. BARANOWSKA, MAREK SIKORA, MAGDALENA KRYSZYJAN, PIOTR TOMASIK, ANNA DOBOSZ, EDYTA M. KUTYŁA-KUPIDURA: Zastosowanie metody NMR do analizy wiązania wody w kleikach skrobiowych.....	64
ADAM P. KUCZYŃSKI, BOHDAN ACHREMOWICZ, CZESŁAW PUCHALSKI: Porównanie lepkości pozornej kleików otrzymanych z błyskawicznych płatków zbożowych.....	75
ANNA SZOSLAND-FAŁTYN, BEATA BARTODZIEJSKA, JOANNA KRÓLASIK, BEATA PAZIAK-DOMAŃSKA: Zastosowanie przyjaznych dla środowiska technik dezynfekcji do inaktywacji <i>Campylobacter</i> sp. w mięsie drobiowym.....	87
BOŻENA STODOLAK, ANNA STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, AGNIESZKA WIKIERA: Wpływ dodatku wyciągów lnianych na potencjał antyoksydacyjny tempe z nasion lędźwianu.....	96
ZYGMUNT LITWIŃCZUK, ALICJA MATWIJCZUK, ANETA BRODZIAK: Wartość energetyczna, właściwości fizyczne i przydatność technologiczna mleka krów rasy polskiej czerwonej, białogrzbiętej i simentalskiej utrzymywanych w systemie niskonakładowym.....	106
GENOWEFA BONCZAR, KRZYSZTOF MACIEJOWSKI, JACEK DOMAGAŁA, DOROTA NAJGEBAUER-LEJKO, MAREK SADY, MARIA WALCZYCKA, MONIKA WSZOŁEK: Wpływ probiotycznych kultur starterowych na zawartość cholesterolu w mlecznych napojach fermentowanych.....	118
WALDEMAR GUSTAW, JUSTYNA KOZIOŁ, ADAM WAŚKO, KATARZYNA SKRZYPCZAK, MONIKA MICHALAK-MAJEWSKA, MACIEJ NASTAJ: Właściwości fizykochemiczne i przeżywalność <i>Lactobacillus casei</i> w mlecznych napojach fermentowanych otrzymanych z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka.....	129
ANNA MITUNIEWICZ-MAŁEK, MAŁGORZATA ZIARNO, IZABELA DMYTRÓW: Zastosowanie zamrażalniczo utrwalonego mleka koziego do wyrobu potencjalnie probiotycznego napoju fermentowanego.....	140
MONIKA GARBOWSKA, ILONA STEFAŃSKA, MARLENA MŁYNEK: Aktywność peptydaz wybranych szczepów <i>Lactobacillus</i> poddanych obróbce termicznej.....	150
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Interakcje składników żywności.....	165
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	169
MAGDALENA NIEWCZAS: Nowe książki.....	171
Twórcy polskiej nauki o żywności.....	173
ILONA KOŁODZIEJSKA: Jubileusz 85-lecia urodzin Profesora Zdzisława Edmunda Sikorskiego.....	176
Technolog Żywności.....	178
Spis treści czasopisma „Żywność” Nr 98–103.....	183
Wykaz nazwisk Autorów w 2015 roku.....	188
Wykaz nazwisk Recenzentów w 2015 roku.....	192

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 6 (103)

Kraków 2015

Vol. 21

CONTENTS

From the Editor.....	5
MACIEJ TACZANOWSKI: Legal definitions in food law – reasons of forming and forms.....	7
NATALIA SKIEPKO, IWONA CHWASTOWSKA-SIWIECKA, JACEK KONDRATOWICZ: Properties of lycopene and utilizing it to produce functional foods.....	20
JOANNA KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, ANNA STOCHMAL: Clovamide and its derivatives as bioactive phenolic compounds of plant origin.....	33
RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, WOJCIECH BIAŁAS, ANNA OLEJNIK, PRZEMYSŁAW KOWALCZEWSKI, AGNIESZKA DROŹDZYŃSKA, TOMASZ JANKOWSKI: Separation of anthocyanins from black carrot, chokeberry, blackcurrant, and elderberry with the use of preparative chromatography.....	41
MACIEJ BILEK, KINGA STAWARCZYK, AGNIESZKA SIEMBIDA, MACIEJ STRZEMSKI, MARCIN OLSZEWSKI, EWA CIEŚLIK: Content of sugars in tree saps from the Podkarpacie region.....	53
HANNA M. BARANOWSKA, MAREK SIKORA, MAGDALENA KRYSZYJAN, PIOTR TOMASIK, ANNA DOBOSZ, EDYTA M. KUTYŁA-KUPIDURA: Application of NMR method to analyse water binding in starch pastes.....	64
ADAM P. KUCZYŃSKI, BOHDAN ACHREMOWICZ, CZESŁAW PUCHALSKI: Comparing apparent viscosity of gruels produced from instant cereal flakes.....	75
ANNA SZOSLAND-FAŁTYN, BEATA BARTODZIEJSKA, JOANNA KRÓLASIK, BEATA PAZIAK-DOMANŃSKA: Application of environmentally friendly techniques to inactivate <i>Campylobacter</i> sp. in poultry meat.....	87
BOŻENA STODOLAK, ANNA STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, AGNIESZKA WIKIERA: Effect of flaxseed oil cake addition on antioxidant potential of grass pea tempeh.....	96
ZYGMUNT LITWIŃCZUK, ALICJA MATWIJCZUK, ANETA BRODZIAK: Food energy, physical properties, and processing suitability of milk from cows of Polish red whitebacked and simmental breeds kept using low-input system.....	106
GENOWEFA BONCZAR, KRZYSZTOF MACIEJOWSKI, JACEK DOMAGAŁA, DOROTA NAJGEBAUER-LEJKO, MAREK SADY, MARIA WALCZYCKA, MONIKA WSZOŁEK: Effect of probiotic starter cultures on cholesterol level in fermented milk drinks.....	118
WALDEMAR GUSTAW, JUSTYNA KOZIOŁ, ADAM WAŚKO, KATARZYNA SKRZYPCZAK, MONIKA MICHALAK-MAJEWSKA, MACIEJ NASTAJ: Physicochemical properties and survival of <i>Lactobacillus casei</i> in fermented milk beverages produced with addition of selected milk protein preparations.....	129
ANNA MITUNIEWICZ-MAŁEK, MAŁGORZATA ZIARNO, IZABELA DMYTRÓW: Application of frozen goat's milk to production of potentially probiotic fermented drink.....	140
MONIKA GARBOWSKA, ILONA STEFAŃSKA, MARLENA MŁYNEK: Peptidase activity of selected heat-treated <i>Lactobacillus</i> strains.....	150
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Interactions among food components.....	165
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish and EU legislation.....	169
MAGDALENA NIEWCZAS: Book reviews.....	171
Creators of the Polish food science.....	173
ILONA KOŁODZIEJSKA: The 85 th anniversary of the birth of Professor Z. E. Sikorski.....	176
The Food Technologist.....	178
Annual contents.....	183
Index of Authors.....	188
Index of Reviewers.....	192

Only reviewed papers are published

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

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

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 Sośnicki (USA), prof. dr hab. Zdzisław Targoński, prof. dr hab. Tadeusz Trziszka, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz, prof. dr hab. Erwin Wąsowicz, prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, dr John Wojciak (Kanada), prof. dr hab. Maria Wojtatowicz

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

WYDAWCA: POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW 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

PODZIĘKOWANIE DLA PANA PROFESORA TADEUSZA SIKORY

Jako wieloletni Przewodniczący Rady Naukowej czasopisma naukowego **Żywność. Nauka. Technologia. Jakość** pragnę bardzo serdecznie podziękować panu prof. dr hab. Tadeuszowi Sikorze za zainicjowanie i prowadzenie tego dwumiesięcznika. Pan Profesor był pomysłodawcą, twórcą i realizatorem idei powstania polskojęzycznego czasopisma naukowego. Ideę tę realizował z uporem przez wiele lat, doprowadzając do referowania czasopisma przez kilka baz publikacji naukowych, ale także do wprowadzenia na listę JCR i uzyskania współczynnika „Impact Factor”.

Przez ponad 20 lat Pan Profesor pełnił funkcję Redaktora Naczelnego całkowicie społecznie. Aktywnie uczestniczył w całym cyklu wydawniczym czasopisma i dbał o wysoki poziom publikacji.

W związku z decyzją Pana Profesora o rezygnacji z funkcji Redaktora Naczelnego, a także zakończeniem mojej działalności jako przewodniczącego Rady Naukowej, chcę w imieniu swoim, członków Rady i redaktorów złożyć Panu Profesorowi Tadeuszowi Sikorze serdeczne podziękowanie i życzenia dalszych wyzwań, sukcesów naukowych, organizacyjnych i osobistych.

Prof. dr dr h.c. mult. Antoni Rutkowski

OD REDAKCJI

Szanowni Państwo,


właśnie mija 21 lat od ukazania się pierwszego numeru naszego obecnego czasopisma **Żywność. Nauka. Technologia. Jakość** – było to w grudniu 1994 r. Mając ideę, a nie mając zasobów, rozpoczęliśmy realizację przedsięwzięcia, które dla wielu wydawało się wówczas mało realne. Realizacja idei wydawania czasopisma była możliwa dzięki funkcjonowaniu PTTŻ, które afiliowało tę działalność, najpierw Oddział Małopolski, a następnie Zarząd Główny. Dzisiaj nasz dwumiesięcznik jest czasopismem o zasięgu międzynarodowym i mocnej pozycji krajowej.

Po 21 latach prowadzenia społecznie tej działalności, jako założyciel i redaktor naczelny, postanowiłem zrezygnować z kierowania redakcją. Czas na zmianę pokoleniową. Pragnę w tym miejscu podziękować wszystkim, którzy w tym okresie wspierali wydawanie **Żywności**. Osób życzliwych było bardzo wiele i nie sposób ich wymienić. Podziękowania należą się Przewodniczącemu Rady Naukowej Panu Prof. Antoniemu Rutkowskiemu i członkom Rady Naukowej, członkom Redakcji, Autorom i Recenzentom. Podziękowania składam kolejnym Dziekanom Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie za możliwość działania w jego pomieszczeniach. Szczególne podziękowania należą się Koleżankom z Redakcji, a przede wszystkim dr Ewie Ślawnickiej za długoletnią współpracę.

Trwa sztafeta pokoleń, więc przekazuję kierowanie Redakcją w ręce Pana Prof. UR dr hab. Lesława Juszczaaka z życzeniami dalszego rozwoju czasopisma. Jednocześnie deklaruję, że w miarę potrzeb i możliwości będę służył radą i pomocą.

Kraków, grudzień 2015 r.

Redaktor Naczelny



Tadeusz Sikora

MACIEJ TACZANOWSKI

DEFINICJE LEGALNE PRAWA ŻYWNOŚCIOWEGO – PRZYCZYNY TWORZENIA I FORMY

Streszczenie

Teksty prawne, w tym przepisy polskiego i unijnego prawa żywnościowego, powinny charakteryzować się jasnością i jednoznacznością, tak by ich wykładnia nie sprawiała większych trudności i prowadziła do wiarygodnego wyniku. Jedną z podstawowych technik prawodawczych prowadzących do tego celu jest formułowanie definicji legalnych. Za ich pomocą prawodawca narzuca dokładne znaczenie definiowanych terminów, aby nie prowadziły do błędnej interpretacji przepisów prawnych. Definicje legalne formułuje się, jeśli termin jest wieloznaczny, nieostry, nie jest powszechnie zrozumiały lub trzeba nadać mu nowe znaczenie. Ze względu na formę można wyróżnić definicje wyraźne i kontekstowe. Definicje wyraźne, szczególnie jeżeli są liczne, często są grupowane w tzw. słowniczki aktów prawnych, co nie wyklucza, że zarówno definicje wyraźne, jak i kontekstowe mogą być ponadto zlokalizowane poza tymi słowniczkami. W obowiązującym w Polsce prawie żywnościowym, składającym się z polskich i unijnych aktów prawnych, w celu osiągnięcia wspomnianej klarowności i jednoznaczności jego przepisów, wykorzystuje się wszystkie znane formy definiowania terminów.

Słowa kluczowe: prawo żywnościowe, definicje legalne, technika prawodawcza, Polska, Unia Europejska

Wprowadzenie

Jak zaznacza Szymczak [20], *podstawowym warunkiem osiągnięcia pełnego porozumienia przy przekazywaniu treści od nadawcy do odbiorcy jest jednakowe rozumienie przez obie strony społecznie ustalonych znaczeń wyrazów*. Porozumienie to trzeba mieć na względzie szczególnie w przypadku formułowania, jak i odczytywania tekstów prawnych. Regulacje prawne są bowiem sposobem ingerencji organów władzy publicznej w stosunki społeczne zachodzące m.in. w sferze działalności gospodarczej. Konstytucyjny obowiązek ochrony "konsumentów, użytkowników i najemców przed

Dr M. Taczanowski, Katedra Zarządzania Jakością Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywnieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań. Kontakt: taczanow@up.poznan.pl

działaniami zagrażającymi ich zdrowiu, prywatności i bezpieczeństwu oraz przed nieuczciwymi praktykami rynkowymi" (art. 76) jest podstawą ustawowego ograniczania ustrojowej zasady wolności gospodarczej (art. 22 i art. 31 ust. 3 Konstytucji RP z 1997 r.) [7], w tym działalności w zakresie gospodarki żywnościowej.

Z uwagi na znaczenie żywności dla zdrowia człowieka, jak również ze względów ekonomicznych, produkcja i dystrybucja środków spożywczych jest w Unii Europejskiej przedmiotem bardzo rozbudowanych regulacji prawnych, zajmując pod tym względem trzecie miejsce po przemyśle samochodowym i chemicznym [8]. **Prawo żywnościowe** jest zespołem powiązanych ze sobą norm prawnych regulujących jakość żywności oraz jej produkcję i obrót ze względu na ochronę zdrowia człowieka (bezpieczeństwo żywności – *food safety*) i innych jego interesów o charakterze pozazdrowotnym [21].

Znajomość prawa żywnościowego, w tym umiejętność jego interpretacji (wykładni), jest ważnym elementem zarządzania przedsiębiorstwem branży spożywczej, nie tylko ze względu na ochronę konsumentów i wizerunek firmy na rynku spożywczym. Jest ona również niezbędna do stworzenia poprawnych relacji przedsiębiorstwa z organami urzędowej kontroli żywności.

Wykładnią prawa nazywa się proces ustalania znaczenia przepisów prawnych albo produkt tej czynności [1].

Spośród trzech zasadniczych metod wykładni, czyli wykładni językowej, systematycznej i funkcjonalnej, pierwsza odgrywa najistotniejszą rolę, natomiast dwie pozostałe pełnią funkcje pomocnicze. Wykładnia językowa polega na wykorzystywaniu reguł odwołujących się do szeroko rozumianego kontekstu językowego normy [9]. W ramach tej metody rozpatruje się znaczenie interpretowanych słów lub zwrotów w zależności od tego, czy można je zakwalifikować do kategorii języka potocznego, specjalistycznego czy prawnego. Język potoczny jest językiem powszechnie używanym w większości sytuacji życia codziennego, język specjalistyczny jest typowy dla określonych dziedzin wiedzy, np. technologii żywności, a język prawny – charakterystyczny dla tekstów prawnych.

Postulowanymi cechami tekstów prawnych, ułatwiającymi ich wykładnię, są: adekwatność (precyzyjność i wierność oddania intencji prawodawcy), komunikatywność (zrozumiałość dla odbiorców) oraz zwięzłość (zamieszczanie tylko niezbędnych wypowiedzi, stosowanie odesłań zamiast powtórzeń przepisów). Definicje legalne są środkiem techniki prawodawczej, służącym przede wszystkim osiągnięciu adekwatności [1].

Definicje legalne – pojęcie i przyczyny ich formułowania

Chcąc rozpatrzyć pojęcie definicji legalnych i cel ich formułowania, najpierw wypada podać znaczenie samego słowa definicja. Według „Uniwersalnego słownika

języka polskiego PWN” pod red. Dubisza, *definicja* to „określenie znaczenia pojęcia lub wyrażenia, sprowadzające się zwykle do sprecyzowania jego treści i zorientowania się w jego zakresie (...)”, natomiast czasownik *definiować* znaczy „objasniać, określać, formułować znaczenie jakiegoś wyrazu, terminu, pojęcia” [3].

Definicjami legalnymi nazywa się definicje zawarte w tekstach aktów prawnych [9]. Wyraz *legalny* pochodzi wprost od łacińskiego *legalis* [3], które jest przymiotnikiem od słowa *lex*, oznaczającego m.in. ustawę, prawo [19]. Według Zielińskiego definicje legalne występujące w ustawach i innych aktach prawnych mają dwie cechy: są obecne w tekście aktu prawnego i odnoszą się do jakiegoś występującego w nim zwrotu językowego. Mogą się one znajdować w wydzielonych fragmentach tekstów, w tzw. słownikach, ale mogą również znaleźć się w innych miejscach tekstu [26].

Według polskiej techniki prawodawczej, zasadniczo zbieżnej z unijną, definicję legalną danego określenia (terminu) formułuje się, jeżeli:

- dane określenie jest **wieloznaczne** (np. *składnik żywności*),
- dane określenie jest **nieostre**, a jest pożądane ograniczenie jego nieostrości (np. *środek spożywczy znacznej wartości*),
- znaczenie danego określenia **nie jest powszechnie zrozumiałe** (np. *suplement diety, nowa żywność*),
- ze względu na dziedzinę regulowanych spraw istnieje potrzeba ustalenia **nowego znaczenia** danego określenia (np. *zanieczyszczenie*) [18].

Wszystkie wymienione przyczyny formułowania definicji legalnych mogą występować w przypadku danego określenia pojedynczo lub kumulatywnie, w różnych kombinacjach lub natężeniu. Ze względu na klarowność wywodu, podane zostaną przykłady ilustrujące każdą z przyczyn tworzenia definicji indywidualnie. Przytoczone niżej definicje odzwierciedlają stan prawny z 15 listopada 2014 r.

Wieloznaczność terminu

Przykładem definicji legalnej, która służy likwidacji potencjalnej wieloznaczności, może być definicja wyrażenia *składnik żywności*, znajdująca się w art. 3 ust. 3 pkt 34 ustawy z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia [22]. Definicja obowiązująca do 12 grudnia 2014 r. brzmiała następująco:

składnik żywności – każda substancja występująca w żywności, w tym substancje dodatkowe i enzymy, użyta przy wytwarzaniu lub przygotowywaniu środków spożywczych, obecna w gotowym produkcie, nawet jeżeli jest ona w zmienionej formie [22].

Według „Uniwersalnego słownika języka polskiego PWN” pod red. Dubisza [3], *składnik* to część składowa jakiejś całości, jeden z elementów czegoś. W naukach o żywności i żywieniu oraz w towaroznawstwie żywności można spotkać się z określeniem *składnik żywności* w dwóch znaczeniach: 1) substancja odżywcza, jak np. białko, tłuszcz [4], 2) rodzaj i ilość surowców użytych do wytworzenia danego produk-

tu spożywczego, np. rodzaj mąki w chlebie [25]. Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia, wzorem dyrektywy (WE) nr 2000/13, przyjęła rozumienie wyrażenia *składnik żywności* (ang. *ingredient*) w drugim, recepturowym znaczeniu. Analogiczne rozumienie *składnika żywności*, określanego jako *składnik*, przyjęto w art. 2 ust. 2 lit. f rozporządzenia (UE) nr 1169/2011 w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności (...), mającym zastosowanie od 13 grudnia 2014 r. [15].

Nieostrość terminu

Środki spożywcze znacznej wartości, to przykład nieostrego terminu, którego znaczenie należało doprecyzować ze względu na jego użycie jako czynnika powodującego zagrożenie surowszą karą za produkcję i wprowadzenie do obrotu środków spożywczych szkodliwych dla zdrowia lub życia człowieka. W myśl art. 96 ust. 3 ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia, jeżeli sprawca dopuścił się przestępstwa produkcji lub wprowadzenia do obrotu środków spożywczych szkodliwych dla zdrowia lub życia człowieka, które były znacznej wartości, to, ze względu na tę wartość, górna granica grożącej sankcji karnej zostaje podwyższona z 2 lat pozbawienia wolności do lat 5 [22]. Doprecyzowanie okoliczności powodującej tak znaczącą różnicę w wysokości kary nie mogło być pozostawione uznaniu sędziowskiemu. Ze względu na to, że przepisy części ogólnej Kodeksu karnego mają zastosowanie przy wykładni wszelkich przepisów karnych, również tych, które znajdują się poza tym kodeksem (art. 116 k.k.) [23], wartość ta nie musiała być określona w ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Jest ona bowiem zdefiniowana w art. 115 § 5 Kodeksu karnego. Określono tam, że *mieniem znacznej wartości jest mienie, którego wartość w chwili popełnienia czynu zabronionego przekracza 200 000 zł* [23]. Powyższy przykład likwidacji nieostrości terminu jest jednocześnie ilustracją kompleksowości prawa żywnościowego, które w przeważającej mierze ma naturę prawa administracyjnego, a niektóre jego przepisy wchodzą w obręb m.in. prawa karnego.

Niezrozumiałość terminu

Przeniesiony w 2001 r. z ówczesnego projektu dyrektywy (WE) nr 2002/46 do polskiego prawa żywnościowego termin *suplement diety* [2] (w anglojęzycznej wersji dyrektywy – *food supplement*) dla większości osób niezajmujących się zawodowo żywnością może być terminem niezrozumiałym. Na podstawie treści niżej przytoczonej definicji, wydaje się, że polska nazwa oddaje istotę znaczenia bardziej adekwatnie od anglojęzycznej. Aktualnie ustawowa definicja *suplementu diety* brzmi następująco (art. 3 ust. 3 pkt 39):

suplement diety – środek spożywczy, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będący skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny, pojedynczych lub

złożonych, wprowadzany do obrotu w formie umożliwiającej dawkowanie, w postaci: kapsulek, tabletek, drażetek i w innych podobnych postaciach, saszetek z proszkiem, ampulek z płynem, butelek z kroplomierzem i w innych podobnych postaciach płynów i proszków przeznaczonych do spożywania w małych, odmierzonych ilościach jednostkowych, z wyłączeniem produktów posiadających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów prawa farmaceutycznego [22].

Oba słowa tworzące omawiane wyrażenie są w języku polskim obcego pochodzenia. Słowo *suplement* jest pochodzenia łacińskiego i w Polsce powszechnie rozumiane jako uzupełnienie do dzieła lub edycji periodycznej, np. suplement encyklopedii, słownika [3]. Co ciekawe, zgodnie ze słownikiem „The Oxford Encyclopedic English Dictionary” z 1991 r., w języku angielskim słowo *supplement* było już kojarzone z dietą co najmniej od końca lat 80. XX w. i występowało w zwrocie *dietary supplement* [6]. Z kolei słowo *dieta* jest pochodzenia greckiego i wg „Uniwersalnego słownika języka polskiego PWN” w języku potocznym, w kontekście żywieniowym, oznacza „specjalny system odżywiania z ustaleniem jakości i ilości pokarmów, dostosowany do potrzeb organizmu” [3]. W naukach o żywności, wg Gertiga i Gawęckiego [5], *dieta* bez dodatkowego przymiotnika jest pojęciem ogólnym *oznaczającym codzienne pożywienie (rację pokarmową, często sposób żywienia się) jednostek lub całych populacji*, natomiast chcąc mówić o diecie mającej jakąś określoną cechę czy cel, tworzy się terminy szczegółowe poprzez dodanie odpowiedniego przymiotnika, jak np. *dieta bezglutenowa* [5].

Zestawienie obu słów *suplement* i *dieta* w jedno wyrażenie nie tworzy jednoznacznego terminu. Biorąc pod uwagę wymienione w definicji postacie produktu i jego funkcję można by go uznać za rodzaj leku. Już samo zaklasyfikowanie takiego wyrobu do środków spożywczych i objęcie go zakresem przedmiotowym prawa żywnościowego wymaga wiążącej definicyjnej deklaracji odróżniającej suplementy diety od produktów leczniczych, które podlegają prawu farmaceutycznemu.

Nadanie nowego znaczenia

Definicja terminu *zanieczyszczenia* w ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia (art. 3 ust. 3 pkt 57) [22] jest przykładem nadania temu terminowi nowego znaczenia, będącego odpowiednikiem anglojęzycznego słowa *contaminant* z unijnego prawa żywnościowego (art. 1 ust. 1, Regulation (EEC) no 315/93 of 8 February 1993 laying down Community procedures for contaminants in food) [10]. Innymi słowy, ten sam termin w polskim prawie żywnościowym zmienił swój zakres znaczeniowy.

We wcześniejszej ustawie z dnia 11 maja 2001 r. o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia, w jej ostatniej wersji z 2005 r., termin *zanieczyszczenie* był definiowany poprzez odesłanie do definicji art. 1 ust.1 rozporządzenia (EWG) nr 315/93 z dnia 8 lutego 1993 r., ustanawiającego procedury Wspólnoty w odniesieniu do sub-

stancji skażających [ang. *contaminants*] w żywności (art. 3 ust. 1 pkt 7 ustawy) [24]. Definicja z tego rozporządzenia ma następujące brzmienie (art. 1 ust.1 rozporządzenia):

Substancja zanieczyszczająca [ang. contaminant] oznacza każdą substancję nieumyślnie dodaną do żywności, która jest obecna w takiej żywności jako rezultat produkcji (w tym działalność prowadzona w związku z gospodarką roślinną i zwierzęcą a także weterynarią), wytwarzania, przetwarzania, przygotowywania, obróbki, pakowania, opakowywania, transportu lub przechowywania takiej żywności lub jako rezultat skażenia środowiska. Obca materia, taka jak np. fragmenty owadów, włosie zwierząt itd. nie jest objęta niniejszą definicją [11].

Ze względu na wyłączenie niektórych rodzajów „obcej materii” z zakresu wspólnotowego pojęcia *substancji zanieczyszczających*, które w powyższej ustawie z 2001 r. oznaczone były terminem *zanieczyszczenia*, w aktualnie obowiązującej ustawie z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia polski ustawodawca, dostrzegając zapewne niekompletność definicji wspólnotowej, zdecydował się na rozszerzenie znaczenia ustawowego terminu *zanieczyszczenia* o wykluczone elementy. Dotychczasowe wspólnotowe pojęcie zanieczyszczeń oznaczył terminem *substancje zanieczyszczające*, zgodnie z brzmieniem polskojęzycznej wersji rozporządzenia (EWG) nr 315/93. W ten sposób ustawodawca stworzył nową, obecnie obowiązującą polską definicję zanieczyszczeń, która brzmi następująco (art. 3 ust. 3 pkt 57):

zanieczyszczenia [są to] substancje zanieczyszczające, zanieczyszczenia biologiczne oraz ciała obce, szkodniki lub ich części [22].

Dla pełni obrazu warto jeszcze wspomnieć, że tak sformułowane pojęcie zanieczyszczeń nie obejmuje wszystkich substancji obcych w żywności, do których należą jeszcze pozostałości pestycydów, pozostałości substancji farmakologicznie czynnych i pozostałości skażeń promieniotwórczych [21].

Formy definicji legalnych z uwagi na technikę prawodawczą

Definicje legalne można podzielić na **definicje wyraźne**, gdy w przepisie prawnym określone jest bezpośrednio *definiendum* (wyrażenie definiowane) i *definiens* (wyrażenie definiujące) oraz **definicje kontekstowe**, *gdy znaczenie danego pojęcia nie jest wprawdzie bezpośrednio określone w jednym przepisie, ale wynika ono ze sposobu jego użycia w kilku różnych przepisach, z których każdy może służyć do rekonstrukcji znaczenia definiowanego wyrażenia [9].*

Definicje wyraźne

Wszystkie przedstawione wyżej przykłady z prawa żywnościowego, obrazujące przyczyny formułowania przez prawodawcę definicji legalnych, zaliczają się do definicji wyraźnych, i to w ich podstawowej postaci, gdzie po wyrażeniu definiowanym

następuje wyrażenie definiujące [9]. Tego rodzaju definicje są najczęściej zamieszczone na początku aktu prawnego i gdy jest ich większa liczba grupowane są w wydzielonym fragmencie tego aktu, tworząc tzw. **słowniczek** [26]. W przypadku ustaw są to słowniczki ustawowe.

Słowniczki aktów prawnych

Słowniczki mają postać zdania, w którym wprowadzenie do wyliczenia poszczególnych definicji rozpoczyna się przed dwukropkiem charakterystycznymi formułami, np. *Użyte w ustawie określenia oznaczają:* (art. 3 ust. 3 ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia) [22], *Do celów niniejszego rozporządzenia:* (art. 2 ust. 1 rozporządzenia (WE) nr 852/2004) [12]. Po tego rodzaju wprowadzeniu następują definicje oznaczone jako kolejne punkty lub litery. Niektóre unijne akty prawne mają definicje zgrupowane w specjalnie do tego celu przeznaczonym załączniku do aktu prawnego, jak to ma miejsce np. w załączniku I (zatytułowanym Definicje) do rozporządzenia (WE) nr 853/2004 w sprawie higieny środków spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Tam znajdują się definicyjne objaśnienia takich terminów, jak *mięso*, *mięso odkostnione mechanicznie*, *rzeźnia* itd. [13].

Przy lekturze aktów prawnych warto pamiętać, że istnienie formalnie wydzielonego słowniczka nie przesądza, że poza nim nie spotka się w tekście tego aktu dodatkowych definicji, mających zastosowanie w całym akcie prawnym lub w określonej jego części.

Definicje poza słowniczkiem

Jak wspomniano wyżej, pojedyncze definicje mogą pojawić się zarówno w początkowych przepisach ogólnych aktu prawnego, jak również na początku wydzielonego rozdziału lub innej jego wyodrębnionej części. Przykładowo można wskazać na obowiązującą do 12 grudnia 2014 r. definicję *oznakowania środka spożywczego* z art. 45 ust. 2 ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Artykuł 45 rozpoczyna rozdział 11. ustawy zatytułowany „Znakowanie żywności”. Definicja miała następujące brzmienie:

Art. 45. 2. Oznakowanie środka spożywczego obejmuje wszelkie informacje w postaci napisów i innych oznaczeń, w tym znaki towarowe, nazwy handlowe, elementy graficzne i symbole, dotyczące środka spożywczego i umieszczone na opakowaniu, etykietce, obwolucie, ulotce, zawieszce oraz w dokumentach, które są dołączone do tego środka spożywczego lub odnoszą się do niego [22].

Szczególną formą definicji występujących poza słowniczkami w postaci wtrącenia w przepisy merytoryczne są tzw. definicje nawiasowe [26], czyli takie, w których wyrażenie definiowane zapisuje się w nawiasie. Jako przykład z prawa żywnościowego może posłużyć ustawowe objaśnienie terminu *dozwolone substancje*

dodatkowe oraz objaśnienie *sprzedaży wysyłkowej* w ramach przepisu wyliczającego formy działalności niewymagające zatwierdzenia, tylko wpisu do rejestru Państwowej Inspekcji Sanitarnej (art. 10 pkt 1 i art. 63 ust. 2 pkt 10 ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia) [22].

Art. 10. Minister właściwy do spraw zdrowia określi, w drodze rozporządzenia:

1) wykaz substancji dodatkowych (dozwolonych substancji dodatkowych), które mogą być wprowadzane do obrotu i stosowane w żywności, w tym w aromatach, zgodnie z ich funkcjami technologicznymi, oraz szczegółowe warunki ich stosowania, w tym rodzaj środków spożywczych, w których mogą być stosowane oraz ich dopuszczalne maksymalne poziomy.

Art. 63. [...] 2. Zatwierdzenie nie jest wymagane w odniesieniu do:

[...], 10) zakładów prowadzących działalność gospodarczą w zakresie pośrednictwa w sprzedaży żywności "na odległość" (sprzedaży wysyłkowej), w tym sprzedaży przez Internet.

Definicje kontekstowe

Znaczenie wykorzystywanych w tekstach prawnych terminów może wynikać nie tylko z wprost podanego ich objaśnienia w postaci typowo sformułowanej definicji, ale również z interpretacji (wykładni) przepisów, których bezpośrednim celem nie jest definiowanie. Przykładem takiej sytuacji może być początek rozporządzenia (WE) Parlamentu Europejskiego i Rady nr 258/97 z dnia 27 stycznia 1997 r. dotyczącego nowej żywności i nowych składników żywności [14]. Rozumienie niezdefiniowanego wprost terminu *nowa żywność* należy tu odtworzyć z przepisów określających zakres przedmiotowy rozporządzenia i przepisu końcowego. Kontekstowość definicji wynika z braku w tym samym przepisie zwrotu definiowanego (art. 1 ust. 1) i zwrotu definiującego (art. 1 ust. 2) oraz braku wyznaczenia daty precyzującej znaczenie „dotychczasowego wykorzystania do spożycia” (art. 1 ust. 2).

Artykuł 1

- 1. Niniejsze rozporządzenie dotyczy wprowadzania do obrotu we Wspólnocie nowej żywności lub nowych składników żywności.*
- 2. Niniejsze rozporządzenie dotyczy wprowadzania do obrotu we Wspólnocie żywności i składników żywności, które dotychczas nie były w znacznym stopniu wykorzystywane we Wspólnocie do spożycia przez ludzi, a które zaliczają się do następujących kategorii:*
 - a) (skreślony)*
 - b) (skreślony)*
 - c) żywność i składniki żywności o nowej lub celowo zmodyfikowanej podstawowej strukturze molekularnej,*

- d) żywność i składniki żywności składające się z lub wyekstrahowane z drobnoustrojów, grzybów lub wodorostów,
- e) żywność i składniki żywności składające się z lub wyekstrahowane z roślin i składniki żywności pochodzące od zwierząt, z wyjątkiem żywności i składników żywności uzyskanych drogą tradycyjnych metod wytwórczo-hodowlanych, o których już wiadomo że są bezpieczne dla zdrowia,
- f) żywność i składniki żywności, które zostały poddane procesowi wytwórczemu obecnie niebędącemu w użyciu, w efekcie którego powstają istotne zmiany w składzie lub strukturze żywności lub jej składników, co z kolei ma wpływ na ich wartość odżywczą, metabolizm i poziom niepożądanych substancji [14].

Brakującą datę trzeba zinterpretować z końcowego art. 15 rozporządzenia, określającego wejście w życie tego aktu prawnego, czyli 15 maja 1997 r., licząc 90-dniowy okres *vacatio legis* od dnia jego opublikowania w Dzienniku Urzędowym Wspólnoty Europejskiej.

Artykuł 15

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dziewięćdziesiątego dnia po jego opublikowaniu w Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich [14].

Dodatkowo prawodawca, w art. 2 ust. 1, doprecyzowuje od strony negatywnej zakres nowej żywności poprzez wyliczenie substancji i produktów, które do niej nie należą.

Problem spójności terminologicznej definicji legalnych polskiego i unijnego prawa żywnościowego

Chociaż zagadnienie poprawności warstwy terminologicznej polskiej wersji językowej unijnego prawa żywnościowego zasługuje na odrębne obszerne opracowanie, to warto w tym miejscu tę kwestię chociaż zasygnalizować. Z chwilą przystąpienia Polski do Unii Europejskiej, czyli od 1 maja 2004 r., do polskiego porządku prawnego weszły unijne źródła prawa. W przypadku prawa żywnościowego, sfera bezpieczeństwa żywności jest już zdominowana przez prawo unijne, które od około dziesięciolecia jest ustanawiane w formie rozporządzeń. W odróżnieniu od dyrektyw, rozporządzenia są bezpośrednio wiążące w stosunku do swoich adresatów, natomiast dyrektywy muszą być przetransponowane do prawa krajowego i ich cele są realizowane przepisami krajowymi (art. 288 Traktatu o funkcjonowaniu Unii Europejskiej). Niezależnie jednak od tego, czy dana materia jest regulowana w formie rozporządzenia unijnego, czy dyrektywy, unijny i polski prawodawca musi dokonać przetłumaczenia unijnych terminów na język polski. Proces ten powinien być przeprowadzany z poszanowaniem polskiej kultury języka prawnego i specyficznej terminologii poszczególnych dyscyplin prawa, w tym prawa żywnościowego. Sprawa jest szczególnej doniosłości z uwagi na to, że

język polski jest to jeden z urzędowych języków Unii Europejskiej, a unijne akty prawne są ogłaszane w polskiej wersji językowej Dziennika Urzędowego Unii Europejskiej.

Podczas analizy polskich wersji językowych unijnych aktów prawnych stosunkowo łatwo można dostrzec odmienne brzmienie niektórych zasadniczych terminów od ustalonego ich brzmienia w polskim prawie żywnościowym. Zarówno polskie, jak i unijne zasady prawodawstwa, ze względu na wymóg jednoznaczności tekstów prawnych, zakazują stosowania synonimów. Na zasadzie analogii zakaz ten można odnieść również do braku spójności polskich wersji językowych unijnych aktów prawnych z ustaloną polską terminologią prawa żywnościowego.

Przykładem wyżej wskazanej niezgodności terminologicznej może być stosowanie wyrażenia *substancje dodatkowe*. We wskazanej postaci językowej ten termin od ponad czterdziestu lat występuje w polskich przepisach i właśnie on powinien być stosowany w polskojęzycznych wersjach prawa unijnego. Tymczasem od samego początku polskie wersje dawnych dyrektyw i obecnie obowiązujące unijne źródła prawa, z rozporządzeniem (WE) nr 1333/2008 na czele [16], posługują się terminem *dotatki do żywności*, wzorowanym na anglojęzycznym: *food additives*.

Oprócz niespójności samego brzmienia terminów polskiego i unijnego prawa żywnościowego, przynajmniej w jednym przypadku nie uniknięto niespójności nie tylko terminów, ale również pojęć. Tak się stało z istotną, pod względem nadzoru nad higieną żywności, definicją terminu *zakład* (art. 3 ust. 3 pkt 54 ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia) [22]. Ustawa błędnie odsyła do unijnej definicji przedsiębiorstwa spożywczego (ang. *food business*) z art. 3 pkt 2 rozporządzenia (WE) nr 178/2002 [17], zamiast do art. 2 ust. 1 lit. c rozporządzenia (WE) nr 852/2004 w sprawie higieny środków spożywczych, gdzie znajduje się definicja zakładu (ang. *establishment*), krótko określonego jako jednostka przedsiębiorstwa. W rozporządzeniu tym termin *establishment* błędnie przetłumaczono jako *przedsiębiorstwo* [12]. Trzeba zauważyć, że w prawie żywnościowym rozróżnienie przedsiębiorstwa od zakładu ma istotne znaczenie. Jak bowiem wynika m.in. z art. 59 ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia, zindywidualizowanym miejscem do nadzoru, które podlega odrębnej rejestracji, jest zakład, a nie przedsiębiorstwo [22]. Przedsiębiorstwo może być wielozakładowe, a poszczególne zakłady mogą być znacznie oddalone od siebie.

Podsumowanie

Definicje legalne, będące środkiem techniki prawodawczej do kształtowania terminologii tekstów prawnych, są szeroko wykorzystywane w polskim i unijnym prawie żywnościowym. Przykładowo, fundamentalna dla polskiego prawa żywnościowego ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia tylko w samym swoim słowniczku ustawowym (art. 3. ust. 3) aktualnie (listopad 2014 r.) za-

mieszcza 63 definicje legalne (ustawowe) [22], przy czym część z nich odsyła do definicji zawartych w rozporządzeniach unijnych ze względu na zasadę ich bezpośredniego stosowania w prawie krajowym. Polska technika prawodawcza wyróżnia cztery przyczyny formułowania definicji legalnych, tj. wieloznaczność, nieostrość, niezrozumiałość oraz zmianę znaczenia terminu [18]. Każda z nich znajduje odzwierciedlenie w definicjach obowiązującego w Polsce prawa żywnościowego. Co do formy, oprócz definicji wyraźnych, najczęściej zamieszczanych w tzw. słowniczkach aktu prawnego, zawierających w jednym przepisie zwrot definiowany i definiujący, w prawie żywnościowym spotyka się również definicje kontekstowe, w których objaśnienie zwrotu następuje niejako pośrednio, przy okazji regulowania innych spraw, np. zakresu przedmiotowego aktu prawnego. Ze względu na często zdarzające się w aktach prawnych odmienne ukształtowanie znaczenia niektórych wyrazów lub zwrotów (terminów) w stosunku do polszczyzny ogólnej, niezapoznanie się z nimi przed lekturą aktu prawnego może prowadzić do błędnej interpretacji jego przepisów. Na ile to jest istotne w przypadku tytułowego prawa żywnościowego, łatwo zdać sobie sprawę, gdy weźmie się pod uwagę, że przepisy tej dziedziny prawa mają na celu ochronę zdrowia ludzkiego przed zagrożeniami ze strony żywności oraz określają również wzajemne obowiązki i uprawnienia podmiotów działających na rynku spożywczym i organów urzędowej kontroli żywności.

Literatura

- [1] Chauvin T., Stawecki T., Winczorek P.: Wstęp do prawoznawstwa. Wyd. C.H. Beck, Warszawa 2012, ss. 68-69, 221.
- [2] Druk Sejmowy III Kadencji Nr 2286 z 20 października 2000 r.
- [3] Dubisz S. (Red.): Uniwersalny słownik języka polskiego PWN. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2006, t. A–J, ss. 566, 567; t. K–Q, s. 412; t. P–Ś, ss. 1231, 1454.
- [4] Gawęcki J.: Żywność prozdrowotna – terminologia, składniki, informacja dla konsumenta. W: Żywność prozdrowotna. Składniki i technologia. Red. J. Czapski i D. Górecka, Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2014, ss. 28 -31.
- [5] Gertig H., Gawęcki J.: Słownik terminów żywieniowych. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001, ss. 22-23.
- [6] Hawkins J.M., Allen R. (Ed.): The Oxford Encyclopedic Dictionary, Clarendon Press, Oxford 1991, s. 1453.
- [7] Konstytucja Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 2 kwietnia 1997 r. Dz. U. 1997 r. Nr 78, poz. 483 i z 2001 r. Nr 28, poz. 319).
- [8] Meulen van der B., Velde van der M.: European Food Law Handbook. Wageningen Academic Publishers, Wageningen 2009, s. 41.
- [9] Morawski L.: Zasady wykładni prawa. TNOiK, Toruń 2010, ss. 97, 104.
- [10] Regulation (EEC) No 315/93 of 8 February 1993 laying down Community procedures for contaminants in food. O. J. EEC L 37 z 13.02.1993, p.1, as amended.
- [11] Rozporządzenie (EWG) Nr 315/93 z dnia 8 lutego 1993 r. ustanawiającego procedury Wspólnoty w odniesieniu do substancji skażających. Dz. Urz. EWG L 37 z 13.02.1993, s.1, z późn. zm.

- [12] Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych. Dz. Urz. WE L 139 z 30.04.2004, s.1, z późn. zm.
- [13] Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Dz. Urz. WE L 139 z 30.04.2004, s. 55, z późn. zm.
- [14] Rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 stycznia 1997 r. dotyczące nowej żywności. Dz. Urz. WE L 43 z 14.02.1997, s. 1, z późn. zm.
- [15] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) Nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności, zmiany rozporządzeń Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1924/2006 i (WE) nr 1925/2006 oraz uchylecia dyrektywy Komisji 87/250/EWG, dyrektywy Rady 90/496/EWG, dyrektywy Komisji 1999/10/WE, dyrektywy 2000/13/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, dyrektyw Komisji 2002/67/WE i 2008/5/WE oraz rozporządzenia Komisji (WE) nr 608/2004. Dz. Urz. UE L 304 z 22.11.2011, s. 18, z późn. zm.
- [16] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1333/2008 r. z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności. Dz. Urz. WE L 354 z 31.12.2008, s.16, z późn. zm.
- [17] Rozporządzenie (WE) Nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. Dz. Urz. WE L 31 z 1.2.2002, s.1, z późn. zm.
- [18] Rozporządzenie Prezesa Rady Ministrów z dnia 20 czerwca 2002 r. w sprawie „Zasad techniki prawodawczej”. Dz. U. 2002 r. Nr 100, poz. 908, § 146 ust. 1 pkt 1 – 4. Załącznika.
- [19] Rzepiela M.: Lex (hasło). W: Słownik łacińsko – polski J – Z t. 2, Red. J. Korpany, Wyd. Szkolne PWN, Warszawa 2003, s.191.
- [20] Szymczak M.: Wstęp. W: Słownik języka polskiego. M. Szymczak (Red.), Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1988, t. 1 A - K, s. XV.
- [21] Taczanowski M.: Prawo żywnościowe w warunkach członkostwa Polski w Unii Europejskiej. Wolters Kluwer Polska Sp. z o.o., Warszawa 2009, s. 40, 81, 82.
- [22] Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Dz. U. z 2010 r. Nr 136, poz. 914 z późn. zm.
- [23] Ustawa z dnia 6 czerwca 1997 r. Kodeks karny. Dz. U. 1997 r. Nr 88, poz. 533 z późn. zm.
- [24] Ustawa z dnia 11 maja 2001 r. o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia. Dz. U. z 2005 r. Nr 31, poz. 265, Nr 178, poz. 1480.
- [25] Waszkiewicz-Robak B.: Pieczywo. W: Towaroznawstwo żywności przetworzonej. F. Świdorski (Red), Wyd. SGGW, Warszawa 2003, rozdz. 20, s. 361.
- [26] Zieliński M.: Wykładnia prawa – zasady, reguły, wskazówki., Wyd. Prawnicze LexisNexis, Warszawa 2012, ss. 198, 201, 203.

LEGAL DEFINITIONS IN FOOD LAW – REASONS OF FORMING AND FORMS

Summary

Legal texts including the provisions of the Polish and EU food law should be characterized by clarity and explicitness in order not to have difficulties while interpreting them and to produce reliable results while explaining them. One of the basic legislation techniques, which makes it possible to achieve the above objectives, is the formulation of legal definitions. By means of legal definitions, the legislator imposes the exact meaning on the terms being defined, which, otherwise, could be misinterpreted. Legal

definitions are formulated where a term is ambiguous, insufficiently clear-cut, not commonly understandable, or there is a need to give new meaning to it. Regarding the forms, there are direct and indirect (contextual) definitions. The direct definitions, especially if they are numerous in an act, are frequently grouped in the so-called dictionaries of legal acts. However, this does not exclude that both the direct and the indirect definitions can be, also, set somewhere else beyond the dictionaries. The food law, which is in force in Poland, consists of Polish and EU legal acts and uses all the known forms of definitions to achieve the abovementioned clarity and explicitness of legal provisions.

Key words: food law, legal definitions, legislative drafting, Poland, European Union 

NATALIA SKIEPKO, IWONA CHWASTOWSKA-SIWIECKA,
JACEK KONDRATOWICZ

WŁAŚCIWOŚCI LIKOPENU I JEGO WYKORZYSTANIE DO PRODUKCJI ŻYWNOŚCI FUNKCJONALNEJ

Streszczenie

Celem pracy było omówienie aktualnego stanu wiedzy na temat źródeł i właściwości likopenu, a także określenie możliwości jego wykorzystania w przemyśle spożywczym oraz paszowym. Dla firm przemysłu spożywczego produkty wzbogacone w związki bioaktywne, np. likopen, stanowią szansę na zwiększenie ich wartości biologicznej i uzyskanie statusu żywności funkcjonalnej. W związku z tym producenci nieustannie poszukują nowych naturalnych związków o działaniu prozdrowotnym. Likopen w postaci czerwonego barwnika występuje w wielu owocach i warzywach, jednak jego naturalne źródło stanowią przede wszystkim owoce pomidora. Charakteryzuje się on silnymi właściwościami przeciwutleniającymi, zmniejsza ryzyko występowania nowotworów i chorób układu krążenia. Karotenoid ten wykorzystywany jest do produkcji wielu przetworów mięsnych, m.in. parówek, hamburgerów, mortadeli, pasztecików, kielbas fermentowanych, surowych wędlin. Oprócz bezpośredniego dodatku likopenu w procesie technologicznym, istnieje również możliwość zastosowania go w żywieniu zwierząt, co zwiększa nie tylko jakość otrzymywanego surowca (np. mięsa, jaj), ale wpływa również pozytywnie na efekty produkcyjne i funkcje przyżyciowe osobników.

Słowa kluczowe: likopen, działanie przeciwutleniające, właściwości przeciwnowotworowe, żywność funkcjonalna

Wprowadzenie

Obserwuje się wzrost zainteresowania konsumentów żywnością o dodatkowych właściwościach prozdrowotnych, zwanej żywnością funkcjonalną. Jakość takich artykułów spożywczych wynika z obecności w ich składzie substancji bioaktywnych.

Do takich substancji należą m.in. karotenoidy. Z ponad 700 znanych karotenoidów występujących w naturze, jedynie około 24 zostało zidentyfikowanych w ludz-

Mgr inż. N. Skiepmo, dr inż. I. Chwastowska-Siwiecka, prof. dr hab. J. Kondratowicz, Katedra Towaroznawstwa i Przetwórstwa Surowców Zwierzęcych, Wydz. Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn. Kontakt: natalia.skiepmo@uwm.edu.pl

kim osoczu i tkankach, a tylko dwa w siatkówce oka [15, 55]. Wśród nich, oprócz dobrze poznanego β -karotenu, luteiny oraz zeaksantyny, na szczególną uwagę zasługuje likopen (ψ, ψ -karoten), którego organizm człowieka sam nie syntetyzuje i należy dostarczać go wraz z pożywieniem. Spożycie likopenu wśród populacji wielu regionów świata kształtuje się na różnym poziomie i zależy od dostępności surowców (głównie pomidorów) oraz produktów zawierających ten karotenoid. Największe spożycie pomidorów i ich przetworów występuje wśród ludności krajów, w których dominuje dieta śródziemnomorska, czyli w Grecji (163,6 g/dzień), południowej Hiszpanii (97,6 g/dzień) oraz w centralnych Włoszech (85,4 g/dzień). Natomiast najmniejsze spożycie charakteryzuje Holandię (15,7 g/dzień), Francję (22,0 g/dzień) oraz Szwecję (31,9 g/dzień), co wynika z uwarunkowań kulturowych w sposobie żywienia. Zróżnicowanie poziomów spożycia likopenu wynikać może także z odmiennych okresów prowadzonych doświadczeń, sposobów przygotowywania posiłków, warunków uprawy surowców będących źródłem tego karotenoidu, jak również z zastosowanego rodzaju obróbki technologicznej. Właściwości prozdrowotne likopenu zostały potwierdzone w badaniach klinicznych, chociaż mechanizmy działania tego związku nadal nie są do końca poznane [23, 59].

Celem pracy było omówienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego źródeł i właściwości likopenu, a także określenie możliwości jego wykorzystania w diecie człowieka oraz w żywieniu zwierząt.

Źródła pozyskiwania likopenu

Likopen występuje w wielu owocach i warzywach, jednak jego bogate źródło stanowią przede wszystkim pomidory (*Lycopersicon esculentum* Mill.), które przeznaczają się do bezpośredniego spożycia lub do przetworstwa [21]. Przetworstwo pomidorów generuje duże ilości produktów ubocznych (głównie nasion i skórek), które, z uwagi na ochronę środowiska, powinny zostać zutylicowane [7]. Jedną z możliwości utylizacji tych części pomidora jest pozyskiwanie z nich likopenu [39]. Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2011 roku [44], w celu pozyskania likopenu z czerwonych pomidorów dopuszcza się stosowanie rozpuszczalników, takich jak: ditlenek węgla, octan etylu, aceton, propan-2-ol, metanol, etanol oraz heksan.

Nowe linie hodowlane pomidorów muszą spełniać rosnące oczekiwania konsumentów, dotyczące zarówno wyglądu, jak i wartości biologicznej. Szczególnie istotną cechą jakościową pomidorów jest ich odpowiednie wybarwienie, zależne od zawartości barwników, w tym również likopenu. Pigmenty występują w skórce i mięszu w zróżnicowanych ilościach, a ich połączenie tworzy całkowitą barwę owoców [6, 38]. Zawartość poszczególnych związków barwiących zmienia się w trakcie dojrzewania owoców, zależy od warunków uprawy oraz mikroklimatu, głównie temperatury i nasłonecznienia [21]. Według Clintona [10], zawartość likopenu w zależności od odmiany

oraz dojrzałości pomidorów wynosi $0,9 \div 4,2$ mg/100 g. Natomiast McClain i Baush [32] podają, że w intensywnie czerwonych pomidorach likopen może stanowić nawet 5 mg/100 g, a w żółtych – 0,5 mg/100 g. Toor i wsp. [58] stwierdzili, że wysoka temperatura negatywnie oddziałuje na formowanie się likopenu, ponieważ jego zawartość w pomiarach trzech badanych odmian była o 30% mniejsza w miesiącach letnich w porównaniu z zimowymi.

Jak podają Doménech-Asensi i wsp. [13], ψ,ψ -karoten w diecie człowieka aż w 80 % pochodzi z pomidorów i przetworów pomidorowych. Występuje on również jako barwnik w wielu innych warzywach i owocach, np. w arbuzach, papryce, grejpfrutach, truskawkach, papajach, owocach dzikiej róży itd. [32] (tab. 1). Najwięcej likopenu znajduje się jednak w produktach przetworzonych, zwłaszcza gotowanych, takich jak: ketchup, przecier, koncentrat pomidorowy, zupa, sos oraz sok, szczególnie otrzymany z soku zagęszczonego (tab. 2).

Tabela 1. Zawartość likopenu w wybranych owocach i warzywach

Table 1. Content of lycopene in selected fruits and vegetables

Wybrane owoce i warzywa Selected fruits and vegetables	Zawartość likopenu Content of lycopene [mg/100 g ś.m. / f.m.]
Pomidor świeży / Fresh tomato	0,72 ÷ 4,2
Arbuz / Watermelon	2,3 ÷ 7,2
Gujawa różowa / Pink guava	5,23 ÷ 5,50
Papaja / Papaya	0,11 ÷ 5,3
Grejpfrut różowy / Pink grapefruit	0,35 ÷ 3,36
Marchew / Carrot	0,65 ÷ 0,78
Puree z dzikiej róży/ Rosehip puree	0,68 ÷ 0,71
Dynia / Pumpkin	0,38 ÷ 0,46
Bataty / Sweet potato	0,02 ÷ 0,11
Morela / Apricot	0,01 ÷ 0,05

Źródło: / Source:

Opracowanie własne na podstawie [5, 52] / The authors' own study on the basis of [5, 52].

Dostępny w handlu likopen w postaci syntetycznej lub krystalicznej pozyskiwany jest ze specjalnych upraw pomidorów, wymagających wysokich nakładów finansowych, co skłoniło producentów do poszukiwania alternatywnych źródeł i odpowiednich technologii jego pozyskiwania [66]. Likopen syntetyczny stanowi mieszaninę geometrycznych izomerów likopenu (wiązania podwójne o konfiguracji *trans*) i otrzymywany jest metodą chemiczną poprzez kondensację syntetycznych produktów pośrednich, wykorzystywanych powszechnie do produkcji innych karotenoidów stosowanych w żywności. Występuje on w formie czerwonego, krystalicznego proszku,

który jest rozpuszczalny w tłuszczu i w większości rozpuszczalników organicznych, a nierozpuszczalny w wodzie. Odnacza się dużą wrażliwością na światło i tlen, ale jest bardziej trwały podczas chłodniczego przechowywania w atmosferze gazów obojętnych. Dostępne w handlu preparaty likopenu przeznaczone do stosowania w żywności mogą mieć postać zawiesin w olejach jadalnych albo proszku rozprowadzanego wodą lub rozpuszczalnego w wodzie. Ze względu na brak możliwości otrzymywania likopenu krystalicznego w roztworze wodnym i jego dużą podatność na negatywne oddziaływanie światła oraz tlenu, nie nadaje się on do celów przemysłowych. Jedynie odpowiednio przekształcony materiał jest wprowadzany do obrotu i przeznaczony do spożycia [32, 44]. W 1968 roku opatentowano pierwszy preparat likopenu pochodzenia mikrobiologicznego, ekstrahowany z biomasy grzybów *Blakeslea trispora* oraz oczyszczony przez krystalizację i filtrowanie. Składa się on głównie z likopenu, którego wszystkie wiązania podwójne mają konfigurację *trans*, a także z niewielkich ilości innych karotenoidów. W procesie ekstrakcji dopuszcza się stosowanie jedynie dwóch rozpuszczalników: izopropanolu i octanu izobutyli [27, 44]. W dalszym ciągu podejmowane są próby wyprodukowania likopenu z udziałem bakterii *Mycobacterium aurum*, zaliczanych do mikroorganizmów niepatogennych. Kerr i wsp. [26] wykazali, że wydajność biosyntezy likopenu przez te drobnoustroje można zwiększyć, stosując warunki stresowe, takie jak niskie pH czy wysokie stężenie chlorku sodu.

Tabela 2. Zawartość likopenu w wybranych produktach pomidorowych

Table 2. Content of lycopene in selected tomato products

Rodzaj produktu Type of product	Zawartość likopenu Content of lycopene [mg/100 g ś.m. / f.m.]
Pomidor świeży / Fresh tomato	0,72 ÷ 4,2
Pomidor gotowany / Cooked tomato	3,7
Sok pomidorowy / Tomato juice	5,0 ÷ 11,6
Sos pomidorowy / Tomato sauce	6,2
Koncentrat pomidorowy / Tomato paste	5,4 ÷ 150,0
Zupa pomidorowa / Tomato soup	7,99
Proszek pomidorowy / Tomato powder	112,6 ÷ 265,0
Sos pomidorowy do pizzy / Tomato pizza sauce	12,7
Ketchup pomidorowy / Tomato ketchup	9,9 ÷ 13,4

Źródło: / Source:

Opracowanie własne na podstawie [5, 42] / The authors' own study on the basis of [5, 42].

Właściwości przeciwutleniające likopenu

Technolodzy żywności zwracają uwagę na możliwość wykorzystywania w przemyśle spożywczym przeciwutleniaczy naturalnych, co wynika głównie z braku zaufa-

nia konsumentów do związków syntetycznych. Dodatkowo przeciwutleniacze pochodzenia naturalnego nie są limitowane przez przepisy prawa oraz nie wymagają zgody na ich zastosowanie w produkcji artykułów spożywczych [53]. Do najważniejszych przeciwutleniaczy znajdujących się w warzywach i owocach zalicza się: witaminę C, karotenoidy (szczególnie likopen) oraz związki fenolowe. W organizmie człowieka karotenoidy zachowują taką samą reaktywność chemiczną, jak w roślinach, dzięki czemu wychwytyują wolne rodniki i aktywny tlen atomowy, zapobiegając stresowi oksydacyjnemu [55]. Wolne rodniki są to grupy atomów lub cząsteczki zawierające na ostatniej powłoce jeden lub więcej niesparowanych elektronów, co powoduje, że są one niestabilne i bardzo reaktywne [33]. W ustroju człowieka powstają podczas procesu oddychania, autooksydacji licznych związków, zwłaszcza lipidów, w wyniku licznych reakcji enzymatycznych, a także infekcji bakteryjnych lub wirusowych i związanych z tym procesów fagocytozy [41]. Ponadto są niebezpieczne dla organizmu, ponieważ powodują lawinowe powstawanie kolejnych rodników, które, dążąc do stabilnego układu elektronowego, reagują z różnymi komórkami i uszkadzają ich strukturę, a tym samym zakłócają funkcje, co w konsekwencji prowadzi do zmian w materiale genetycznym i wystąpienia stanów patologicznych. Jest to szczególnie niekorzystne dla osób ciężko pracujących fizycznie, uprawiających sport wyczynowy, będących w sytuacjach długotrwałego stresu bądź pod wpływem oddziaływania trucizn [35, 65]. Rodniki mogą powstawać w wyniku zanieczyszczenia środowiska, podczas wielu procesów chemicznych, wskutek reakcji tlenu z paliwem napędowym podczas pracy silników, w czasie tworzenia smogu, a nawet jako efekt działania promieni jonizujących lub nadfioletowych [41].

Likopen jest węglowodorem, składa się z 40 atomów węgla i ma budowę acykliczną (11 sprzężonych i 2 niesprężone wiązania podwójne). Wiele sprzężonych wiązań podwójnych powoduje, że wyróżnia się on wśród karotenoidów najsilniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi i bierze udział w tworzeniu bariery przeciwutleniającej organizmu człowieka [4]. Jak podają Agarwal i Rao [1], likopen jest 2-krotnie lepszym przeciwutleniaczem niż β -karoten i 10-krotnie – niż α - tokoferol. Aktywność ψ, ψ -karotenu polega głównie na zapobieganiu utlenianiu frakcji LDL cholesterolu i obniżaniu ogólnego poziomu cholesterolu, co przyczynia się do zmniejszenia ryzyka wystąpienia chorób układu krążenia (CVD). Ponadto likopen wykazuje również działanie antymutagenne i przeciwnowotworowe [19, 34]. Wszystkie karotenoidy należą do związków polienowych i odznaczają się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi *in vitro* i *in vivo*. Martin i wsp. [31] wykazali, że likopen *in vitro* w większym stopniu redukuje powstawanie miażdżycy u ludzi niż α -karoten, β -karoten, luteina i zeaksantyna. W badaniach *in vivo* na szczurach albinosach, El-Nashar i Abduljawad [14] stwierdzili większą możliwość wykorzystania pomidorów surowych do tłumienia i/lub odwracania stresu oksydacyjnego oraz innych parametrów miażdżycowych zwią-

zanych ze spożyciem diety wysokotłuszczowej, w stosunku do pasty pomidorowej i samego likopenu. Zarówno karotenoidy *in vitro*, jak i *in vivo* (likopen, luteina i β -karoten) wykazują właściwości ochronne wobec ludzkiego DNA. Wspierają naturalne systemy ochrony DNA przed niszczyielskim procesem utleniania [3].

Przeprowadzono wiele badań sprawdzających właściwości przeciwutleniające pojedynczych karotenoidów. Zdecydowanie mniej uwagi poświęcono jednak działaniu przeciwutleniającemu tych związków w mieszaninach syntetycznych i zbadaniu efektu synergicznego. Likopen, zarówno po dodaniu bezpośrednio do diety, jak i do wyizolowanego LDL, w połączeniu z innymi przeciwutleniaczami wykazuje silny synergizm w inhibitowaniu utleniania lipoprotein o niskiej gęstości. Fuhrman i wsp. [18] potwierdzili, że oleożywica z pomidorów powoduje bardzo silne inhibitowanie utleniania LDL przez jony miedzi. Autorzy odnotowali również duży synergizm po połączeniu likopenu z witaminą E, flawonoidami, innymi związkami fenolowymi, kwasem rozmarynowym i karnozolowym z rozmarynu lub z ekstraktu czosnku, zawierającego mieszaninę tych przeciwutleniaczy. Zanfini i wsp. [64] wykazali efekt synergiczny mieszanin dwuskładnikowych, które zawierały α -tokoferol z likopenem lub β -karotenem, a także w mieszaninach o kombinacji likopen- β -karoten, likopen-luteina i luteina- β -karoten. Nie stwierdzono natomiast różnic w działaniu synergistycznym, gdy te same związki połączone w mieszaninę czteroskładnikową.

Większość przeciwutleniaczy w bardzo dużych stężeniach wykazuje właściwości prooksydantów, co jest zjawiskiem wyjątkowo niekorzystnym. W związku z tym praktycznie dla wszystkich egzogennych przeciwutleniaczy można określić stężenie progoowe, przy którym dany związek staje się toksyczny. Poza tym różne związki przeciwutleniające działają z tak zwanym różnym potencjałem antyoksydacyjnym, skutecznym w jednym układzie, ale nie we wszystkich. Wiąże się to ze sposobem działania i możliwością neutralizacji danego rodzaju wolnego rodnika [20, 56].

Właściwości przeciwnowotworowe likopenu

W krajach rozwiniętych choroby nowotworowe stają się obecnie główną przyczyną przedwczesnych zgonów. Dlatego nadal poszukuje się metod profilaktycznego zapobiegania zachorowaniom ludności. Na podstawie badań epidemiologicznych, producenci artykułów spożywczych coraz częściej wykorzystują surowce pochodzenia roślinnego zawierające substancje przeciwdziałające powstawaniu nowotworów [27]. Do grupy tej zalicza się likopen, który wykazuje właściwości przeciwnowotworowe głównie ze względu na silne działanie przeciwutleniające. $\psi\psi$ -karoten zapobiega rozwojowi wielu nowotworów, ale przede wszystkim raka gruczołu krokowego, ponieważ w największym stopniu kumuluje się on w komórkach prostaty. Znajduje się tam około 80 % izomeru likopenu o konfiguracji *cis*, natomiast we krwi udział izomerów *cis* i *trans* rozkłada się po 50 % [24, 62]. Częstotliwość występowania nowotworu gruczo-

łu krokowego jest bardzo zróżnicowana w poszczególnych regionach geograficznych, ponieważ czynniki środowiskowe i żywieniowe mają istotny wpływ na większe ryzyko powstawania tej choroby. Z predyspozycjami genetycznymi było natomiast związane jedynie około 9 % przypadków zachorowań i dotyczyły one głównie młodych mężczyzn [60].

Chociaż poziom zachorowalności na raka żołądka zmniejszył się w większości krajów zachodnich, pozostaje on nadal drugą najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych nowotworami na całym świecie. Szacuje się, że co roku diagnozuje się ten rodzaj raka u około 1 mln pacjentów, co stanowi prawie 10 % wszystkich zgonów z powodu choroby nowotworowej (około 700 tys. osób rocznie) [22]. Raport opublikowany w 2007 roku przez Światowy Fundusz Badań nad Rakiem (WCRF) i Amerykański Instytut Badań nad Rakiem sugeruje, że spożycie niektórych rodzajów artykułów spożywczych może mieć bezpośredni związek z rozwojem nowotworów złośliwych, w tym raka żołądka [28]. Oprócz nieodpowiedniego sposobu odżywiania się, do najważniejszych czynników wpływających na rozwój tej choroby należą: palenie tytoniu oraz zakażenia wywołane przez *Helicobacter pylori* [54]. Mimo wysokiej wartości biologicznej karotenoidów analiza efektywności stosowania likopenu, pomidorów i produktów pomidorowych dostarcza wielu sprzecznych wyników. Najnowsze badania Yanga i wsp. [61] dowodzą jednak, że spożywanie tych produktów może zmniejszać ryzyko wystąpienia raka żołądka.

Istnieje coraz więcej dowodów na pozytywne działanie likopenu i produktów, w których on występuje, na zwalczanie występowania raka szyjki macicy, trzustki, pęcherza moczowego, piersi, przełyku, wątroby czy woreczka żółciowego [5, 28, 37, 43, 61]. W badaniach epidemiologicznych wskazuje się również na istotne zmniejszenie ryzyka nowotworu górnych dróg oddechowych [11]. Według Scolastic i wsp. [49], likopen z pomidorów pełni rolę chemoprewencyjną w czasie chemicznego uszkodzenia nici DNA pod wpływem nadtlenu wodoru, metylometasulfonianu i tlenu 4-nitrochinolinu. Salman i wsp. [47] stwierdzili, że zależnie od użytej dawki ψ, ψ -karotenu może nastąpić zmniejszenie proliferacji komórek białaczki erytroblastycznej, chronicznej białaczki limfoblastycznej i nowotworów jelita. Fornelli i wsp. [17] podają, że hamuje on wzrost komórek nowotworowych raka piersi u kobiet. W celu weryfikacji właściwości przeciwnowotworowych likopenu oraz potwierdzenia lub odrzucenia dotychczasowych danych naukowych, powinno się wykonywać dalsze badania epidemiologiczne.

Wykorzystanie likopenu w przemyśle spożywczym

Popyt na wyroby o właściwościach prozdrowotnych może być czynnikiem rozwoju artykułów żywnościowych wzbogaconych w likopen. Karotenoid ten dodawany jest m.in. do mięsa i jego przetworów, kandyzowanych owoców, napojów bezalkoho-

lowych, wyrobów cukierniczych, lodów, serów topionych, musztardy, past rybnych, a także chipsów ziemniaczanych. Przemysłowa ekstrakcja ψ,ψ -karotenu ma znaczenie nie tylko w przemyśle spożywczym, ale także w paszowym [52]. Likopen jest odporny na obróbkę termiczną, taką jak: gotowanie w wodzie i w parze, ogrzewanie mikrofalowe oraz duszenie. Jego straty w przypadku oddziaływania ciepła są mniejsze niż w przypadku światła oraz dostępu tlenu. Pod wpływem temperatury likopen zawarty w pomidorach ulega przekształceniu do postaci znacznie lepiej wchłanianej z przewodu pokarmowego człowieka, co wynika z intensywności otwarcia komórek. Likopen wbudowany w matrycę komórkową jest słabiej absorbowany niż występujący w stanie wolnym. Dzięki temu, że jest on rozpuszczalny w tłuszczach, można zwiększyć jego przyswajalność po dodaniu nawet niewielkiej ilości tłuszczu do potraw. W związku z tym przetwórstwo żywności może znacznie poprawiać biodostępność likopenu [9].

W opinii konsumentów, jednym z najważniejszych parametrów jakościowych mięsa i wyrobów mięsnych jest barwa. Niestety, produkty często odbarwiają się w początkowych etapach przechowywania, dlatego też producenci stosują azotan(III) sodu lub potasu. Związki te nie tylko poprawiają cechy sensoryczne, ale pełnią również rolę środka konserwującego, zapobiegają rozwojowi bakterii (np. *Clostridium botulinum*), a tym samym przedłużają trwałość przetworów. Mimo wielu zalet mogą być szkodliwe dla człowieka, dlatego powinno się je jak najczęściej zastępować dodatkami naturalnymi, np. likopenem lub produktami bogatymi w ten karoten [12]. Eyiler i Oztan [16] podają, że do wytwarzania parówek można stosować proszek pomidorowy jako środek barwiący na czerwono. Dodatkowo, do uzyskania intensywniejszej czerwieni można użyć kwasu askorbinowego. Wymienieni autorzy wykazali również, że obniżenie poziomu azotanów(III) w parówkach, przy jednoczesnym zachowaniu przedłużonego ich czasu przechowywania, możliwe jest po zastosowaniu odpowiedniej ilości naturalnych dodatków. Poziom azotanów(III) można zmniejszyć do 50 mg/kg w obecności 4 g/100 g proszku pomidorowego, jednak lepsze działanie przeciwutleniające i barwę stwierdzono przy 100 mg/kg azotanów(III) i 2 g/100 g proszku. Barwa jest bardzo ważnym parametrem jakościowym w produkcji mięsa mielonego i farszu używanego w przemyśle spożywczym oraz gospodarstwie domowym. Są to produkty podatne na szybki rozkład, rozwój mikroorganizmów, zmiany fizjologiczne oraz chemiczne, dlatego też często dochodzi do ich odbarwienia po krótkim okresie przechowywania [45]. Badania dowodzą, iż właściwości barwiące likopenu mogą być wykorzystywane również w produkcji niskotłuszczowych kielbas gotowanych [63], pasztecików [8, 48], hamburgerów [50], mortadeli [13], kielbas fermentowanych [7], surowych wędlin [33]. Według Doménech-Asensi i wsp. [13], wymienione badania wykazały, że ψ,ψ -karoten spowodował poprawę barwy wyrobów i ich właściwości odżywczych, spowolnienie procesów utleniania oraz zwiększenie stabilności podczas przechowywania, przy zachowaniu jednocześnie dobrej jakości produktów.

Oprócz bezpośredniego zastosowania likopenu w procesie technologicznym, istnieje również możliwość wykorzystania go jako dodatku w żywieniu zwierząt, co wpływa nie tylko na poprawę jakości otrzymanego surowca, ale również pozytywnie oddziałuje na efekty produkcyjne i funkcje przyżyciowe osobników. Badania z tego zakresu dotyczyły dotychczas głównie żywienia drobiu. Englmaierová i wsp. [15] odnotowali pozytywne oddziaływanie dodatku likopenu i witaminy E w paszy na przyrosty masy oraz jakość mięśni ud kurcząt brojlerów poprzez poprawę stabilności oksydacyjnej i zmniejszenie zawartości cholesterolu. Natomiast Ševčíkova i wsp. [51] wykazali korzystny wpływ kombinacji likopenu i selenu na redukcję dialdehydu malonowego (MDA) mięśni piersiowych po 5 dniach ich chłodniczego przechowywania. Botsoglou i wsp. [4] podają, że 5-procentowy dodatek pulpy z suszonych pomidorów w żywieniu przepiórek japońskich zapobiega utlenianiu lipidów mięsa przechowywanego w warunkach chłodniczych przez 6 lub 9 dób, a 10-procentowy dodatek wywiera efekt prooksydacyjny. Według Lira i wsp. [30], pasza z udziałem odpadów pomidorowych była lepiej pobierana przez kurczęta brojlery, ale przyrost masy ich ciała był niekorzystny. Najprawdopodobniej przyczynił się do tego zbyt duży udział witaminy E w mieszance paszowej. Sahin i wsp. [46] stwierdzili zwiększone spożycie paszy przez przepiórki japońskie utrzymywane w warunkach wysokiej temperatury. Ponadto wykazali wzrost stężenia frakcji HDL w osoczu ptaków i istotne zmniejszenie stężenia frakcji LDL. Tedesco i wsp. [57] przeanalizowali również efekt stosowania likopenu w żywieniu królików. Nie zaobserwowano negatywnego wpływu karotenu na spożycie i przyswajalność paszy, wskaźniki wydajności oraz masę ciała zwierząt. Peiretti i wsp. [40] potwierdzają możliwość stosowania 6-procentowego dodatku pasty pomidorowej w diecie królików bez negatywnych skutków na właściwości tuszki i jakość mięsa. Obserwowano nawet poprawę składu wyższych kwasów tłuszczowych.

Według Leeson i Castona [29] oraz Karadas i wsp. [25], od rodzaju oraz stężenia karotenoidów obecnych w paszy ptaków zależy jakość jaj, zwłaszcza barwa żółtka, która jest istotnym czynnikiem akceptacji produktu przez konsumentów. W opinii potencjalnych klientów jaja o ciemniejszym żółtku charakteryzują się wyższą wartością odżywczą i pochodzą one od kur utrzymywanych systemem ekstensywnym. W Niemczech i Hiszpanii ciemne żółtka preferuje ponad 60 % badanych, natomiast w Wielkiej Brytanii jedynie 33 %. Olson i wsp. [36] wykazali, że dodatek likopenu i witaminy E do mieszanki paszowej kur niosek nie wpłynął na stężenie innych karotenoidów zawartych w żółtku. Natomiast Sahin i wsp. [46] stwierdzili, że witamina E i likopen działają na jaja przepiórcze synergistycznie, czyli przeciwutleniacze mają silniejsze działanie razem niż każdy osobno. Zdaniem Akdemira i wsp. [2], proszek pomidorowy poprawia barwę żółtek i stabilność oksydacyjną jaj kur niosek.

Podsumowanie

Od kilku lat obserwuje się zdecydowany wzrost świadomości konsumentów, którzy oczekują artykułów spożywczych pozytywnie oddziałujących na ich organizm. Dlatego producenci poszukują nowych, naturalnych dodatków pochodzenia roślinnego do wytwarzania żywności funkcjonalnej. Liczne badania dowodzą, że karotenoidy zawarte w owocach i warzywach mają istotne znaczenie w profilaktyce i leczeniu wielu chorób. Najlepszym dowodem na to są właściwości likopenu, który zapobiega powstawaniu cukrzycy, nowotworów, a także chorób układu krążenia. Ponadto obniża on poziom tzw. „złego” cholesterolu (LDL) i przeciwdziała rozwojowi miażdżycy. ψ, ψ -karoten może być wykorzystywany w żywieniu zwierząt lub bezpośrednio w procesie technologicznym wyrobów gotowych. Jednak w celu produkcji żywności funkcjonalnej w skali przemysłowej, z wykorzystaniem tego karotenoidu, należy dokładniej poznać podłoże jego działania.

Literatura

- [1] Agarwal S., Rao V.A.: Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Can. Med. Assoc. J.*, 2000, **163**, 739-744.
- [2] Akdemir F., Orhan C., Sahin N., Sahin K., Hayirli A.: Tomato powder in laying hen diets: effects on concentrations of yolk carotenoids and lipid peroxidation. *Br. Poult. Sci.*, 2012, **5 (53)**, 675-680.
- [3] Astley S.B., Elliott R.M., Archer D.B., Southon S.: Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes. *Br. J. Nutr.*, 2004, **91**, 63-72.
- [4] Botsoglou N., Papageorgiou G., Nikolakakis I., Florou-Paneri P., Giannenas I., Dotas V., Sinapis E.: Effect of dietary dried tomato pulp on oxidative stability of Japanese quail meat. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 2982-2988.
- [5] Bramley P.M.: Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*, 2000, **54**, 233-236.
- [6] Brandt S., Pek Z., Barna E., Lugasi A., Helyes L.: Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *J. Sci. Food Agric.*, 2006, **86**, 568-572.
- [7] Calvo M.M., García M.L., Selgas M.D.: Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Sci.*, 2008, **80**, 167-172.
- [8] Candogan K.: The effect of tomato paste on some quality characteristics of beef patties during refrigerated storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **215**, 305-309.
- [9] Chen J., Shi J., Xue S.J., Ma Y.: Comparison of lycopene stability in water- and oil-based food model systems under thermal- and light-irradiation treatments. *LWT- Food Science and Technology*, 2009, **42**, 740-747.
- [10] Clinton S.K.: Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.*, 1998, **56**, 35-51.
- [11] De Stefani E., Oreggia F., Boffetta P., Deneo-Pellegrini H., Ronco A., Mendilaharsu M.: Tomatoes, tomato-rich foods, lycopene and cancer of the upper aerodigestive tract: a case-control in Uruguay. *Oral Oncol.*, 2000, **36**, 47-53.
- [12] Deda M.S., Bloukas J.G., Fista G.A.: Effect of tomato paste and nitrite level on processing and quality characteristics of frankfurters. *Meat Sci.*, 2007, **76**, 501-50.

- [13] Doménech-Asensi G., García-Alonso F.J., Martínez E., Santaella M., Martín-Pozuelo G., Bravo S., Periago M.J.: Effect of the addition of tomato paste on the nutritional and sensory properties of mortadella. *Meat Sci.*, 2013, **93**: 213-219.
- [14] El-Nashar N.N., Abduljawad S.H.: Impact effect of lycopene and tomato-based products network on cardio-protective biomarkers *in vivo*. *Funct. Food Health Dis.*, 2012, **2** (5), 151-165.
- [15] Englmaierová M., Bubancová I., Vít T., Skřivan M.: The effect of lycopene and vitamin E on growth performance, quality and oxidative stability of chicken leg meat. *Czech J. Anim. Sci.*, 2011, **12** (56), 536-543.
- [16] Eyiler E., Oztan A.: Production of frankfurters with tomato powder as a natural additive. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 307-311.
- [17] Fornelli F., Leone A., Verdesca I., Minervini F., Zacheo G.: The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicol. in Vitro*, 2007, **21**, 217-223.
- [18] Fuhrman B., Volkova N., Rosenblat M., Aviram M.: Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2000, **2**, 491-506.
- [19] Grajek W.: Rola przeciwutleniaczy w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **1** (38), 152-160.
- [20] Halliwell B., Aeschbach R., Loliger J., Aruoma O.I.: The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 1995, **33**, 601-617.
- [21] Jabłońska-Ryś E., Zalewska-Korona M.: Ocena barwy oraz zawartości barwników karotenoidowych w owocach pomidora nowych linii hodowlanych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009, **XLII**, **3**, 926-931.
- [22] Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D.: Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 2011, **61**, 69-90.
- [23] Jenab M., Ferrari P., Mazuir M., Tjonneland A., Clavel-Chapelon F., Linseisen J., Trichopoulou A., Tumino R., Bueno-de-Mesquita H., Lund E.: Variations in lycopene blood levels and tomato consumption across European countries based on the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Study. J. Nutr.*, 2005, **135**, 2032-2036.
- [24] Kaplan L.A., Lau J.M., Stein E.A.: Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin. Physiol. Biochem.*, 1990, **8**, 1-10.
- [25] Karadas F., Grammenidis E., Surai P.F., Acamovic T., Sparks, N.H.C.: Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *Br. Poultry Sci.*, 2006, **47**, 561-566.
- [26] Kerr S., Cale C., Cabral J.M.S., van Keulen F.: Factors enhancing lycopene production by a new *Mycobacterium aurum* mutant. *Biotechnol. Lett.*, 2004, **26**, 103-108.
- [27] Kusznierek B., Piasek A., Lewandowska J., Śmiechowska A., Bartoszek A.: Właściwości przeciwnowotworowe kapusty białej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **6** (55), 20-34.
- [28] Larsson S. C., Orsini N., Wolk A.: Processed meat consumption and stomach cancer risk: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006, **98**, 1078-1087.
- [29] Leeson S., Caston L.: Enrichment of eggs with lutein. *Poultry Sci.*, 2004, **83**, 1709-1712.
- [30] Lira R.C., Rabello C.B.V., Ludke M.D.M., Ferreira P.V., Lana G.R.Q., Lana S.R.V.: Productive performance of broiler chickens fed tomato waste. *Rev. Bras. Zootec.*, 2010, **39**, 1074-1081.
- [31] Martin K.R., Wu D., Meydani M.: The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2000, **150**, 265-274.
- [32] McClain R.M., Bausch J.: Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2003, **37**, 274-285.


- [33] Mercadante A.Z., Capitani C.D., Decker E.A., Castro I.A.: Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. *Meat Sci.*, 2010, **84**, 718-726.
- [34] Niinkoski H., Vikari J., Palmu T.: Cholesterol-lowering effect and sensory properties of sitostanol ester margarine in normocholesterolemic adults. *Scand J. Nutr.*, 1997, **41**, 9-12.
- [35] Nowak K., Żmudzińska-Żurek B.: Pomidory – najlepsze źródło likopenu. *Przem. Spoż.*, 2009, **6**, 26-29.
- [36] Olson J.B., Ward N.E., Koutsos E.A.: Lycopene incorporation into egg yolk and effects laying hen immune function. *Poultry Sci.*, 2008, **87**, 2573-2580.
- [37] Omoni A.O., Aluko R.E.: The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, **16**, 344-350.
- [38] Palozza P., Catalano A., Simone R., Cittadini A.: Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochim. Pol.*, 2012, **1 (59)**, 21-25.
- [39] Papaioannou E.H., Karabelas A.J.: Lycopene recovery from tomato peel under mild conditions assisted by enzymatic pre-treatment and non-ionic surfactants. *Acta Biochim. Pol.*, 2012, **1 (59)**, 71-74.
- [40] Peiretti P.G., Gai F., Rotolo L., Brugiapaglia A., Gasco L.: Effects of tomato pomace supplementation on carcass characteristics and meat quality of fattening rabbits. *Meat Sci.*, 2013, **95**, 345-351.
- [41] Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M.: *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Limited Cambridge 2001.
- [42] Rao A.V., Agarwal S.: Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutr. Res.*, 1999, **2 (19)**, 305-323.
- [43] Rao A.V., Agarwal S.: Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2000, **5 (19)**, 563-569.
- [44] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych. *Dz. U.* 2011 r. Nr 91, poz. 525.
- [45] R sterlie M., Lerfall J.: Lycopene from tomato products added minced meat: Effect on storage quality and colour. *Food Res. Int.*, 2005, **38**, 925-929.
- [46] Sahin K., Onderci M., Sahin N., Gursu M.F., Khachik F., Kucuk O.: Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. *J. Therm. Biol.*, 2006, **31**, 307-312.
- [47] Salman H., Bergman M., Djaldetti M., Besler H.: Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed. Pharmacother.*, 2007, **61**, 366-369.
- [48] S nchez-Escalante A., Torrescano G., Djenane D., Beltran J.A., Roncales P.: Stabilisation of colour and odour of beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*, 2003, **83**, 187-194.
- [49] Scolastici C., Alves De Lima R.O., Barbisan L.F., Ferreira A.L., Ribeiro D.A., Salvadori D.M.F.: Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. in Vitro*, 2007, **21**, 840-845.
- [50] Selgas M.D., Garcia M.L., Calvo M.M.: Effects of irradiation and storage on the physico-chemical and sensory properties of hamburgers enriched with lycopene. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009, **10 (44)**, 1983-1989.
- [51] Šev ikova S., Skřivan M., Dlouha G.: The effect of lycopene supplementation on lipid profile and meat quality of broiler chickens. *Czech J. Anim. Sci.*, 2008, **10 (53)**, 431-440.
- [52] Shi J., Le Maguer M.: Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2000, **1 (40)**, 1-42.
- [53] Sok l-Łętowska A., Oszmiański J.: Właściwości przeciwutleniające naturalnych polifenoli. *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, Technologia Żywności XII*, 1998, **328**, 73-84.
- [54] Steevens J., Schouten L.J., Goldbohm R.A., van den Brandt P.A.: Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut*, 2010, **59**, 39-48.

- [55] Szterk A., Lewicki P.P.: Karotenoidy i ich funkcje biologiczne. *Przem. Spoż.*, 2007, **7**, 32-34.
- [56] Świdorski F., Waszkiewicz-Robak B.: Składniki bioaktywne w żywności funkcjonalnej. *Przem. Spoż.*, 2005, **4**, 20-22.
- [57] Tedesco D., Galletti S., Rossetti S., Morazzoni P.: Dietary tea catechins and lycopene: effects on meat lipid oxidation. In: Indicators of milk and beef quality. *EAAP Publ.*, 2005, **112**, 437-442.
- [58] Toor R.K., Savage G.P., Lister C.E.: Seasonal variation in the antioxidant composition of greenhouse tomatoes. *J. Food Comp. Anal.*, 2006, **19**, 1-10.
- [59] Wawrzyniak A., Hamułka J., Dąbek M.: Analiza czynników warunkujących spożycie likopenu w wybranej grupie młodzieży szkolnej. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010, **XLIII**, **2**, 212-221.
- [60] Wertz K., Siler U., Goralczyk R.: Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, **430**, 127-134.
- [61] Yang T., Yang X., Wang X., Wang Y., Song Z.: The role of tomato products and lycopene in the prevention of gastric cancer: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Med. Hypotheses*, 2013, **80**, 383-388.
- [62] Yeum K.-J., Booth S., Sadowski J., Lin C., Tang G., Krinsky N.I., Russell R.M.: Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, **64**, 594-602.
- [63] Yılmaz I., Simşek O., Işıklı M.: Fatty acid composition and quality characteristics of low-fat cooked sausages made with beef and chicken meat, tomato juice and sunflower oil. *Meat Sci.*, 2002, **62**, 253-258.
- [64] Zanfini A., Corbini G., La Rosa C., Dreassi E.: Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2010, **43**, 67-72.
- [65] Ziemiański Ś., Wartanowicz M.: Rola antyoksydantów żywieniowych w stanie zdrowia i choroby. *Pediatrica Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 1999, **1** (2/3), 97-105.
- [66] Zuurro A., Fidaleo M., Lavecchia R.: Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2011, **49**, 567-573.

PROPERTIES OF LYCOPENE AND UTILIZING IT TO PRODUCE FUNCTIONAL FOODS

S u m m a r y

The objective of the study was to discuss the current knowledge relating to the sources and properties of lycopene and to determine the possibilities of utilizing it in the food and animal feed industries. For food industry companies, the products enriched with bioactive compounds such as lycopene represent an opportunity to increase the biological value thereof and to acquire the status of functional food for them. Therefore, producers constantly seek new natural pro-health compounds. Lycopene in the form of red coloured pigment occurs in many fruits and vegetables; however, its natural source are, first and foremost, tomatoes. It is characterized by strong antioxidant properties and it reduces the risk of developing cancer and cardiovascular diseases. This carotenoid is utilized to manufacture many meat products, among other things: frankfurters, hamburgers, mortadella, patties, fermented sausages, and raw meat products. In addition to utilizing lycopene directly in a technological process, it is also possible to apply it to feed animals, and, in this way, to improve the quality of raw material (e.g. meat, eggs) being produced and to beneficially impact production effects and intravital functions of animals.

Key words: lycopene, antioxidant effect, anti-cancer properties, functional food 

JOANNA KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, ANNA STOCHMAL

KLOWAMID I JEGO POCHODNE JAKO BIOAKTYWNE ROŚLINNE ZWIĄZKI FENOLOWE

Streszczenie

W pracy przedstawiono aktualne dane dotyczące aktywności biologicznej klowamidu i jego pochodnych, jako grupy bioaktywnych związków pochodzenia roślinnego. Klowamid jest pochodną kwasu kawowego o strukturze chemicznej podobnej do kwasu rozmarynowego. Właściwości biologiczne pochodnych klowamidu stanowią stosunkowo nowe zagadnienie w naukach o żywności. Wzrasta jednak zainteresowanie naukowców tą grupą substancji. Źródłem klowamidu i jego pochodnych w diecie człowieka są produkty zawierające kakao. Poza kakaowcem (*Theobroma cacao*) związki te są wytwarzane m.in. przez koniczyny *Trifolium pallidum* (brak polskiej nazwy) i *Trifolium pratense* (koniczyna łąkowa), a także rośliny z rodzaju *Capsicum* (papryka). W literaturze dotyczącej klowamidu i jego pochodnych wskazuje się na ich działanie przeciwutleniające, przeciwplytkowe (przeciwwakrzepowe), przeciwzapalne, a nawet przeciwnowotworowe. Sugeruje się, że klowamid i jego pochodne mogą być w przyszłości wykorzystane w przemyśle spożywczym, jak również w opracowaniu nowych strategii profilaktycznych i leczniczych chroniących zdrowie człowieka.

Słowa kluczowe: klowamid, pochodzenie roślinne, aktywność biologiczna, właściwości przeciwutleniające

Wprowadzenie

Klowamid (N-kawoilo-L-3,4-dihydroksyfenyloalanina, N-kawoildopamina, N-kawoilo-L-DOPA) jest naturalnym, roślinnym związkiem fenolowym – pochodną kwasu kawowego (3,4-dihydroksycynamonowego) – wykazującym znaczne podobieństwo strukturalne do kwasu rozmarynowego. Po raz pierwszy klowamid zidentyfikowano w koniczynie łąkowej (koniczynie czerwonej – *Trifolium pratense*) [22], stąd też pochodzi nazwa tego związku i jego pochodnych (*clovamide/clovamides* – od ang. *clover* – koniczyna).

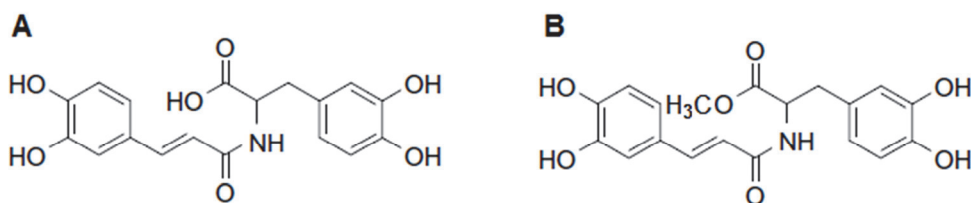
Dr J. Kołodziejczyk-Czepas, Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, prof. dr hab. A. Stochmal, Zakład Biochemii i Jakości Plonów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy.
Kontakt: joannak@biol.uni.lodz.pl

Klowamid i substancje pokrewne syntetyzowane są w wyniku tworzenia wiązania amidowego pomiędzy grupami karboksylowymi kwasów fenylopropenowych, a grupami aminowymi tyrozyny lub jej pochodnych – głównie tyraminy i dopaminy [12]. Związki te należą do metabolitów wtórnych, chroniących tkanki roślinne przed patogenami. Pomimo rosnącego zainteresowania naturalnymi fenolokwasami i ich aktywnością biologiczną [5], rola fenoli klowamidowych jako bioaktywnych składników żywności oraz ich wpływ na zdrowie ludzi stanowią nowe zagadnienia badawcze.

W pracy dokonano przeglądu aktualnych danych dotyczących aktywności biologicznej klowamidu i jego pochodnych w aspekcie możliwości wykorzystania tych związków w przemyśle spożywczym, zwłaszcza w działaniach prozdrowotnych.

Naturalne źródła związków klowamidowych

Źródłem klowamidu i jego pochodnych w diecie człowieka są najczęściej produkty zawierające kakao. Do celów naukowych klowamid izolowany jest z ziaren kakaowca (*Theobroma cacao*). Zawierają one $1,36 \div 2,64$ mg klowamidu/kg suchej masy niepalonego, fermentowanego ziarna, ale jego zawartość zmniejsza się znacząco podczas procesu palenia [1]. Obecność związków klowamidowych stwierdzono także w ziarnach kawy Robusta [3]. Innymi gatunkami syntetyzującymi te substancje są m.in. rośliny z rodzaju *Capsicum* (papryka). W czosnku występuje natomiast N-feruloilotyramina, również zaliczana do związków klowamidowych [14].



Rys. 1. Struktura klowamidu (A) i estru metylowego klowamidu (B)

Fig. 1. Structure of clovamide (A) and clovamide methyl ester (B)

Źródło: / Source:

Modyfikacja własna na podstawie [8] / The authors' own modification on the basis of [8].

Najbogatszym źródłem klowamidów są jednak nadziemne części koniczyny. Spośród 57 gatunków tej rośliny, przebadanych przez Oleszka i wsp. [11] pod względem zawartości związków fenolowych, w pięciu stwierdzono znacznie większą zawartość klowamidu i jego metylowej pochodnej (rys. 1, tab. 1) niż w ziarnach kakaowca [1]. W częściach nadziemnych tych gatunków koniczyny zawartość klowamidów stanowiła $15 \div 37$ % ogólnej ilości związków fenolowych (tab. 1). Największą zawartością tych substancji charakteryzują się części nadziemne koniczyny *T. pallidum* (brak polskiej nazwy) [20].

Tabela 1. Zawartość klowamidów w nadziemnych częściach wybranych gatunków koniczyny
 Table 1. Content of clovamide in aerial parts of selected clover species

<i>Trifolium</i> species	Zawartość klowamidów [mg/g s.m.] Content of clovamide [mg/g dm]	Zawartość związków fenolowych [mg/g s.m.] Content of phenolic compounds [mg/g dm]	Udział klowamidów w sumarycznej zawartości fenoli [%] Percent content of clovamide in total phenols [%]
<i>T. pallidum</i>	12,94	35,06	36,9
<i>T. isodon</i>	9,90	54,77	18,1
<i>T. pratense</i> ss. <i>Sativum</i>	7,91	40,33	19,6
<i>T. squarrosum</i>	7,83	51,77	15,1
<i>T. clypeatum</i>	7,75	27,36	28,3

Źródło: [20] / Source: [20]

Metabolizm związków klowamidowych

Zarówno klowamid, jak i deoksyklowamid (N-*p*-kumaroilo-tyrozyna) wywołują po spożyciu uczucie ściągania w ustach. Charakteryzują się one niskim progiem wy-czuwalnego efektu ściągającego, w zakresie stężeń rzędu kilkudziesięciu $\mu\text{mol/l}$ [19]. Trwają badania dotyczące biodostępności naturalnych pochodnych fenylopropanoido-wych (w tym klowamidów) i ich metabolizmu. W badaniach *in vivo* na myszach wyka-zano w osoczu krwi obecność N-kawoilotyraminy dostarczonej drogą pokarmową [12]. Natomiast w pracach dotyczących absorpcji koniugatów fenylopropanoidowych z ami-nokwasami (NPAs, ang. *N-phenylpropenoyl-L-amino acids*) po spożyciu napoju na bazie kakao stwierdzono, że w odróżnieniu od innych grup roślinnych (poli)fenoli, NPAs nie są metabolizowane szlakiem *O*-glukuronidacji, nie ulegają też sulfonowaniu. Prawdopodobnie w przemianach metabolicznych tych związków istotną rolę odgrywa proces *O*-metylacji lub redukcji w części fenylopropanoidowej [19].

Aktywność biologiczna klowamidu i jego pochodnych

Właściwości przeciwutleniające

Jedne z pierwszych doniesień dotyczących przeciwutleniających właściwości klowamidu i jego pochodnych opublikowali Sanbogi i wsp. [18] w roku 1998. Wyka-zali oni aktywność przeciwutleniającą *in vitro* klowamidu i deoksyklowamidu, wyizo-lowanych z ziaren kakaowca, ocenianą w różnych układach doświadczalnych. Silne właściwości przeciwutleniające stwierdzono na podstawie wyników oznaczeń utlenia-nia kwasu linolowego oraz substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym

(TBARS, ang. *thiobarbituric acid-reactive substances*), jako markera peroksydacji lipidów błon erytrocytów oraz mikrosomów. W układzie z kwasem linolowym klowamid wykazywał silniejsze właściwości przeciwutleniające niż inne roślinne polifenole, takie jak: epikatechina, katechina, kwercetyna, 3-glikozyd kwercetyny, 3-*O*-glikozyd kwercetyny, 3-*O*-arabinozyd kwercetyny oraz dideoksyklowamid (kolejność wymienionych związków odpowiada efektywności ich działania). Ocena peroksydacji lipidów błon erytrocytów wykazała porównywalną efektywność klowamidu, epikatechiny, katechiny i kwercetyny, natomiast 3-*O*-glikozyd kwercetyny, 3-*O*-arabinozyd kwercetyny oraz dideoksyklowamid wykazywały słabsze właściwości przeciwutleniające. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach *in vitro* obejmujących utlenianie mikrosomów. Locatelli i wsp. [8] podali, że zdolność do neutralizacji wolnych rodników przez klowamid kształtowała się na poziomie porównywalnym z kwasem rozmarynowym i kawowym, ale przewyższała efektywność działania przeciwrodnikowego naturalnych i syntetycznych przeciwutleniaczy, takich jak: (-)-epikatechina, kempferol, troloks czy butylohydroksyanizol (BHA, stosowany jako dodatek do żywności: E-320). W opublikowanych wynikach doświadczeń z wykorzystaniem liposomów, wspomniani badacze stwierdzili także przeciwutleniające właściwości klowamidu oraz ekstraktu z ziaren kakaowca [9]. Przeprowadzono także badania porównawcze, dotyczące działania przeciwutleniającego klowamidu, epikatechiny oraz metanolowego ekstraktu z nasion kakaowca, na modelowym układzie linii komórkowych: monocytów oraz kardiomiocytów H9c2, w warunkach stresu oksydacyjnego. Zarówno klowamid, jak i ekstrakt z ziaren kakaowca (choć w mniejszym zakresie) wykazywały znaczącą aktywność przeciwzapalną oraz przeciwutleniającą. Stwierdzono znaczne zmniejszenie generowania anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$), będącego jedną z ważniejszych reaktywnych form tlenu (RFT), powstających w organizmach żywych. Ponadto zaobserwowano hamujący wpływ badanych substancji na wytwarzanie RFT w kardiomiocytach. Wstępne badania ich potencjalnego ochronnego wpływu na kardiomiocyty wykazały również ograniczenie procesu apoptozy przez klowamid i epikatechinę [2].

W badaniach porównawczych Marinova i wsp. [10] oceniano aktywność przeciwutleniającą amidowych pochodnych kwasów cynamonowych i hydroksycynamonowych: kawoilodopaminy, cynamoilodopaminy, *p*-kumaroilodopaminy, feruloilodopaminy, sinapoilodopaminy, kawoilotyraminy i kawoilotryptaminy w zapobieganiu autoksydacji triacylogliceroli oleju słonecznikowego. Badane związki wykazywały aktywność przeciwutleniającą porównywalną lub wyższą niż kwas kawowy, zastosowany jako związek referencyjny. Najsilniejszą aktywność wykazywała jednak kawoilodopamina (klowamid). Działanie przeciwutleniające wykazują także estrowe pochodne klowamidu: N-kawoilo-L-tyrozyna i N-kawoilo-L-dihydroksyfenyloalanina, które badano pod względem ich przydatności jako potencjalnych dodatków do żywności, zabezpieczających tłuszcze przed utlenianiem. Stwierdzono, że substancje te mogą

chronić lipidy (olej sojowy) przed autooksydacją. Badane związki wykazywały znaczącą aktywność przeciwrodnikową (oznaczenia z zastosowaniem rodnika DPPH[•] – rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylowy) i anionorodnika ponadtlenkowego (O₂^{•-}) na poziomie porównywalnym lub przewyższającym efektywność działania znanych przeciwutleniaczy – α -tokoferolu i kwasu askorbinowego [7].

Właściwości przeciwutleniające wykazano ponadto w badaniach dotyczących właściwości biologicznych frakcji klowamidowej ekstraktu uzyskanego z koniczyny *T. pallidum*. Części nadziemne tej rośliny zawierają znaczne ilości klowamidu (0,58 g/g s.m.) oraz jego estru metylowego (0,16 g/g s.m.). Badany ekstrakt wykazywał wyraźne działanie przeciwutleniające w ochronie lipidowych i białkowych składników osocza oraz płytek krwi, w warunkach stresu oksydacyjnego *in vitro* wywołanego działaniem nadtlenoazotynu (ONOO⁻) [6]. W badaniach *in vitro* stwierdzono ponadto neuroprotektoryjne działanie klowamidu, które może być częściowo wynikiem jego działania przeciwutleniającego. W doświadczeniach z wykorzystaniem 3 różnych modeli badawczych komórek ludzkiego nerwiaka (*neuroblastoma*): (1) komórek SH-SY5Y poddanych ekspozycji na stres oksydacyjny, (2) linii komórkowej SK-N-BE traktowanej L-glutaminianem oraz (3) komórek linii SH-SY5Y w warunkach niedotlenienia i reperfuzyjii oceniano ochronne działanie klowamidu oraz kwasu rozmarynowego. Stwierdzono wyraźny efekt neuroprotektoryjny obu związków, sięgający 40 ÷ 60 % redukcji śmiertelności komórek [4].

Aktywność przeciwzapalna

Związki klowamidowe stanowią najsłabiej poznaną grupę fenolowych składników kakao, mogą jednak stanowić ważny składnik przyczyniający się do ogólnego korzystnego, prozdrowotnego działania pochodzących z niego produktów spożywczych (takich jak np. gorzka czekolada). Badania porównawcze działania izolowanego klowamidu oraz ekstraktów uzyskanych z palonych i niepalonych ziaren kakaowca potwierdziły ich działanie przeciwzapalne. W doświadczeniach porównawczych *in vitro*, prowadzonych na ludzkich monocytach, najsilniejszy efekt przeciwzapalny zaobserwowano w próbkach inkubowanych z klowamidem [23]. Natomiast Park i wsp. [13] wykazali, że w badaniach *in vitro* klowamid wykazuje zdolność wiązania się z domeną src SH2 (domena homologiczna do produktu onkogenu *src*), stanowiącą funkcjonalnie ważny fragment wielu białek biorących udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych, m.in. w różnorodnych stanach zapalnych. Obecnie w naukach biologicznych i medycznych poszukuje się związków, które, wiążąc się w sposób specyficzny z domeną SH₂ białek sygnałowych, umożliwiłyby blokowanie niepożądanych szlaków, odgrywających ważną rolę w patofizjologii chorób nowotworowych, zaburzeń autoimmunologicznych oraz przewlekłych procesów zapalnych.

Działanie przeciwplatek

Interesującym aspektem korzystnego wpływu związków klowamidowych na zdrowie człowieka jest ich potencjalne ochronne działanie na układ sercowo-naczyniowy. Ze względu na istotną rolę płytek krwi w patofizjologii chorób układu krążenia prowadzone są liczne prace badawcze dotyczące możliwości profilaktycznego zapobiegania ich aktywacji. W projektowaniu strategii profilaktycznych, których celem jest zapobieganie nadmiernej aktywacji płytek krwi, zwraca się szczególną uwagę na dietę bogatą w naturalne polifenole [21]. Wykazano właściwości przeciwplatekowe klowamidu (N-kawoildopaminy) oraz N-kumaroildopaminy [16]. Związki te hamowały aktywację płytek krwi oraz ich interakcje z leukocytami w warunkach *in vitro*. Przy 0,05 μM (0,018 $\mu\text{g/ml}$) stężeniu badanych pochodnych stwierdzono zmniejszenie ekspresji selektyny P (markera aktywacji płytek krwi) o około 30 %. Efekt przeciwplatekowy potwierdzono również doświadczeniami *in vivo*, w których drogą pokarmową podawano myszom klowamid w dawce 50 i 100 $\mu\text{g}/35$ g masy ciała. Hamujące działanie badanych związków było częściowo znoszone poprzez zastosowanie antagonistów receptorów β_2 -adrenoengicznych, dlatego też sugeruje się udział tych receptorów w obserwowanej inhibicji. Struktura klowamidu jest podobna do niektórych ligandów receptorów β -adrenoengicznych (np. dobutaminy, denopaminy – stosowanych jako leki kardiostimulujące). Dlatego też klowamid i jego pochodne, takie jak N-kumaroildopamina, mogą działać jako agoniści tych receptorów. Efekt przeciwplatekowy klowamidu może być również wynikiem hamowania aktywności cyklooksygenazy (COX), enzymu katalizującego powstawanie różnorodnych biologicznie aktywnych prostanooidów, m.in. związków stymulujących aktywację płytek krwi (tromboksan A_2) oraz biorących udział w procesach zapalnych (prostaglandyny) [13].

Działanie przeciwnowotworowe

Efekt przeciwnowotworowy jest jak do tej pory najsłabiej poznaną aktywnością związków klowamidowych. Park i Schoene [15] wskazują na możliwość hamowania proliferacji komórek nowotworowych przez N-kumaroilotyraminę – badania z wykorzystaniem komórek linii U937 (komórki ludzkiej białaczki monoblastycznej) oraz Jurkat (linia limfocytów T ostrej ludzkiej białaczki limfoblastycznej). Prawdopodobnym mechanizmem działania tego związku jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S na skutek inhibicji aktywacji białkowych kinaz tyrozynowych.

Podsumowanie

Aktywność biologiczna klowamidu i jego pochodnych jest dopiero poznawana – większość dostępnych danych pochodzi z ostatnich kilku lat. Literatura dotycząca związków klowamidowych i ich korzystnego działania obejmuje doniesienia potwier-

dzające przede wszystkim ich aktywność przeciwutleniającą, ale przybywa też publikacji wskazujących na inne korzystne efekty działania tych związków, takich jak właściwości przeciwpłytkowe (przeciwzakrzepowe), przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe.

Literatura

- [1] Arlorio M., Locatelli M., Travaglia F., Coisson J.D., Del Grosso E., Minassi A., Appendino G., Martelli A.: Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem.*, 2008, **106**, 967-975.
- [2] Arlorio M., Coisson J.D., Travaglia F., Locatelli M., Bordiga M., Zamperone A., Pietronave S., Brunelleschi S., Prat M.: Radical scavenging capacity of cocoa polyphenols triggers anti-inflammatory properties in human monocytes and allows protective effects on H9c2 cardiomyoblast exposed to oxidative stress. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2011, **61 (suppl 1)**, 22-23.
- [3] Clifford M.N., Kellard B., Ah-Sing E.: Caffeoyltyrosine from green robusta coffee beans. *Phytochemistry*, 1989, **28**, 1989-1990.
- [4] Fallarini S., Miglio G., Paoletti T., Minassi A., Amoruso A., Bardelli C., Brunelleschi S., Lombardi G.: Clovamide and acid induce neuroprotective effects in *in vitro* models of neuronal death. *Brit. J. Pharmacol.*, 2009, **157**, 1072-1084.
- [5] Gawlik-Dziki U. Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4 (41)**, 29-40.
- [6] Kołodziejczyk J., Olas B., Wachowicz B., Szajwaj B., Stochmal A., Oleszek W.: Clovamide-rich extract from *Trifolium pallidum* reduces oxidative stress-induced damage to blood platelets and plasma. *J. Physiol. Biochem.*, 2011, **67**, 391-399.
- [7] Ley J.P., Bertram H.J.: Synthesis of lipophilic clovamide derivatives and their antioxidative potential against lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 4596-4602.
- [8] Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., Coisson J.-D., Rinaldi M., Arlorio M.: Study of the DPPH[•]-scavenging activity: development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem.*, 2009, **114**, 889-897.
- [9] Locatelli M., Travaglia F., Giovannelli L., Coisson J.D., Bordiga M., Pattarino F., Arlorio M.: Clovamide and phenolics from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) inhibit lipid peroxidation in liposomal systems. *Food Res. Int.* 2013, **50**, 129-134.
- [10] Marinova E., Georgiev L., Totseva I., Seizova K., Milkova T.: Antioxidant activity and mechanism of action of some synthesised phenolic acid amides of aromatic amines. *Czech J. Food Sci.*, 2013, **31**, 5-13.
- [11] Oleszek W., Stochmal A., Janda B.: Concentration of isoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 8095-8100.
- [12] Park J.B.: Quantitation of clovamide-type phenylpropenoic acid amides in cells and plasma using high-performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 8135-8140.
- [13] Park J.B.: Caffeodymine from cocoa has COX inhibitory activity suppressing the expression of a platelet activation marker, P-selectin. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 2171-2175.
- [14] Park J.B.: Isolation and characterization of N-Feruloyltyramine as the P-selectin expression suppressor from garlic (*Allium sativum*). *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57 (19)**, 8868-8872.

- [15] Park J.B., Schoene N.: Synthesis and characterization of N-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, **292**, 1104-1110.
- [16] Park J.B., Schoene N.: Clovamide-type phenylpropenoic acid amides, N-coumaroyldopamine and N-caffeoyldopamine, inhibit platelet-leukocyte interactions via suppressing P-selectin expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, **317**, 813-819.
- [17] Park S.-H., Oh H.-S., Kang M.-A., Cho H., Prasad J.B., Won J., Lee K.-H.: The structure-activity relationship of the series of non-peptide small antagonists for p56lck SH2 domain. *Bioorganic Med. Chem.*, 2007, **15**, 3938-3950.
- [18] Sanbongi C., Osakabe N., Natsume M., Takizawa T., Gomi S., Osawa T.: Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 454-457.
- [19] Stark T., Lang R., Keller D., Hense A., Hofmann T.: Absorption of N-phenylpropenoyl-L-amino acids in healthy humans by oral administration of cocoa (*Theobroma cacao*). *Mol. Nutr. Food Res.*, 2008, **52**, 1201-1214.
- [20] Szajwaj B., Moldoch J., Masullo M., Piacente S., Oleszek W., Stochmal A.: Amides and esters of phenylpropenoic acids from the aerial parts of *Trifolium pallidum*. *Nat. Prod. Commun.*, 2011, **6 (9)**, 1293-1296.
- [21] Vasanthi H.R., ShriShriMal N., Das D.K.: Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease. *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**, 2242-2251.
- [22] Yoshihara T., Yoshikawa H., Sakamura S., Sakuma T.: Clovamides: L-DOPA conjugated with *trans*- and *cis*-caffeic acids in red clover. *Agric. Biol. Chem.*, 1974, **38**, 1107-1109.
- [23] Zeng H.-W., Locatelli M., Bardelli C., Amoroso A., Coisson J.D., Travaglia F., Arlorio M., Brunelleschi S.: Anti-inflammatory properties of clovamide and *Theobroma cacao* phenolic extracts in human monocytes: evaluation of respiratory burst, cytokine release, NF- κ B activation, and PPAR γ modulation. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 5342-5350.

CLOVAMIDE AND ITS DERIVATIVES AS BIOACTIVE PHENOLIC COMPOUNDS OF PLANT ORIGIN

S u m m a r y

In the paper, there are presented up to date data on the biological activity of clovamide and its derivatives as a group of bioactive compounds of plant origin. Clovamide is a derivative of caffeic acid and its chemical structure is similar to that of the rosmarinic acid. Biological properties of the clovamide-type compounds are a relatively new issue in the biological and medicinal sciences. However, scientists show a growing interest in that group of substances. In the human diet, products containing cocoa are a source of clovamide and its derivatives. In addition to *Theobroma cacao*, those compounds are also synthesized, among other things, by *Trifolium pallidum* clover and *Trifolium pratense* (red clover), and species of the *Capsicum* genus. The reference literature on clovamide and its derivatives points to their antioxidative, antiplatelet (antithrombotic), anti-inflammatory, and even anticancer action. It is suggested that, in the future, those properties might be utilized in the food and cosmetic industry as well as when developing new prophylactic and therapeutic strategies to protect human health.

Key words: clovamide, plant origin, biological activity, antioxidant properties ☒

RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, WOJCIECH BIAŁAS, ANNA OLEJNIK,
PRZEMYSŁAW KOWALCZEWSKI, AGNIESZKA DROŹDŻYŃSKA,
TOMASZ JANKOWSKI

SEPARACJA ANTOCYJANÓW Z OWOCÓW ARONII, CZARNEGO BZU, CZARNEJ PORZECZKI I KORZENIA CZARNEJ MARCHWI ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII PREPARATYWNEJ

Streszczenie

Celem badań było opracowanie metody pozyskiwania barwników antocyjanowych z ekstraktów owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki oraz korzeni czarnej marchwi. Separację antocyjanów na poszczególne frakcje przeprowadzono za pomocą chromatografii preparatywnej w kolumnie Agilent Zorbax SB C18 (250 × 21,2 mm). W ekstraktach z owoców aronii i czarnej porzeczki zidentyfikowano cztery barwniki antocyjanowe. Owoce aronii zawierały pochodne cyjanidyny: cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd, cyjanidyno-3-*O*-arabinozyd i cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd, natomiast w owocach czarnej porzeczki stwierdzono obecność pochodnych delfinidyny i cyjanidyny i były to: delfinidyno-3-*O*-glukozyd, delfinidyno-3-*O*-rutynozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd, cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd. Z owoców czarnego bzu pozyskano dwie frakcje, z których każda stanowiła mieszaninę dwóch antocyjanów, pierwsza zawierała cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3,5-*O*-diglukozyd, natomiast druga składała się z cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydu oraz cyjanidyno-3-*O*-glukozydu. Z korzenia czarnej marchwi wyizolowano trzy barwniki antocyjanowe: cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(synapoiloglukozylo)galaktozyd, cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(feruloiloglukozylo)galaktozyd oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(kumaryloglukozylo)galaktozyd. Preparaty antocyjanów w formie stałej otrzymano po zagęszczeniu uzyskanych frakcji w wyparce rotacyjnej i suszeniu sublimacyjnym. Analizę czystości barwników antocyjanowych wykonano za pomocą HPLC w kolumnie analitycznej Agilent Zorbax SB C18 (5 μm, 250 × 4,6 mm). Z 13 otrzymanych stałych preparatów antocyjanów 7 charakteryzowało się czystością większą niż 90 % i były to: cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd i cyjanidyno-3-*O*-arabinozyd, wyizolowane z owoców aronii, delfinidyno-3-*O*-glukozyd, delfinidyno-3-*O*-rutynozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd – otrzymane z owoców czarnej porzeczki oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(feruloiloglukozylo)galaktozyd pozyskany z korzenia czarnej marchwi. Czystość pozostałych preparatów antocyjanów zawierała się w zakresie 51 ÷ 87 %.

*Dr inż. R. Dembczyński, dr inż. W. Białas, dr hab. Anna Olejnik, mgr inż. P. Kowalczewski, mgr inż. A. Drożdżyńska, prof. dr hab. T. Jankowski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań.
Kontakt: rdembcz@up.poznan.pl*

Słowa kluczowe: antocyjany, ekstrakcja, chromatografia cieczowa, chromatografia preparatywna, suszenie sublimacyjne

Wprowadzenie

Barwniki antocyjanowe występują w kwiatach, owocach, a także w liściach, łodygach i korzeniach. Konkretny gatunek rośliny zawiera charakterystyczny zestaw od kilku do kilkunastu antocyjanów o różnej budowie i właściwościach. W związku z powszechnym występowaniem w owocach i warzywach antocyjany, jako tzw. naturalne substancje nieodżywcze, stanowią ważny składnik żywności [8]. Antocyjany wykazują silne działanie przeciwutleniające, polegające na neutralizacji wolnych rodników i usuwaniu negatywnych skutków stresu oksydacyjnego. Przypisuje się im wiele właściwości prozdrowotnych, m.in. pozytywny wpływ na funkcjonowanie wzroku, działanie przeciwzapalne i przeciwmiażdżycowe, zapobieganie powstawaniu i rozwojowi nowotworów. O wysokiej aktywności biologicznej antocyjanów świadczą wyniki eksperymentów z wykorzystaniem kultur komórkowych oraz zwierząt doświadczalnych, jak również wyniki nielicznych badań klinicznych [6, 8, 15].

Należy zauważyć, że w tego typu doświadczeniach powszechnie stosuje się ekstrakty, soki lub liofilizaty owoców, które oprócz antocyjanów zawierają szereg innych związków bioaktywnych o właściwościach przeciwutleniających i prozdrowotnych [13, 14]. W literaturze istnieją doniesienia wskazujące, że oczyszczone preparaty antocyjanów mogą wywoływać korzystny efekt fizjologiczny, który nie występuje lub objawia się w mniejszym nasileniu, gdy organizm otrzymuje antocyjany równocześnie z innymi substancjami [10, 11]. Ponadto poszczególne antocyjany różnią się aktywnością biologiczną, która w dużym stopniu zależy od struktury chemicznej ich cząsteczek [12].

Zawartość antocyjanów w ekstraktach jest relatywnie niewielka i związki te występują w otoczeniu innych polifenoli oraz substancji takich, jak: cukry, kwasy organiczne i lipidy. Produkcja na szeroką skalę antocyjanów występujących w postaci preparatów o czystości przekraczającej 90 % jest, jak dotąd, możliwa jedynie przy zastosowaniu chromatografii przeciwprądowej w układzie ciecz-ciecz (ang. *counter-current chromatography*, CCC) oraz preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie ciecz-ciało stałe. Pierwsza z wymienionych metod polega na selektywnym rozdziale separowanych substancji (względem ich współczynników podziału) pomiędzy dwie niemieszające się fazy ciekłe. Podstawową zaletą tej metody jest brak konieczności stosowania stałej matrycy stanowiącej fazę stacjonarną, co całkowicie eliminuje niekorzystne zjawisko polegające na nieodwracalnej adsorpcji próbki do jej powierzchni. W rezultacie odzysk oczyszczanych substancji wynosi ponad 90 % [1].

Poza chromatografią przeciwwądowną antocyjany można także oczyszczać za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej w odwróconym układzie faz. Dzięki postępowi, jaki w ostatnich latach dokonał się w zakresie konstrukcji preparatywnych kolumn chromatograficznych, proces separacji charakteryzuje się bardzo dobrą powtarzalnością i jest opłacalny ekonomicznie, a uzyskiwane produkty cechują się wysoką czystością [1].

Obecnie w handlu dostępne są nieliczne antocyjany w formie preparatów pojedynczych związków o dużej czystości, ale równocześnie o wysokiej cenie. Koszt zakupu 1 g preparatu o czystości powyżej 95 % może wynosić nawet kilkadziesiąt tysięcy złotych [17].

Celem badań było opracowanie metody otrzymywania barwników antocyjanowych z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki oraz z korzeni czarnej marchwi poprzez ich ekstrakcję, a następnie separację za pomocą chromatografii preparatywnej w odwróconym układzie faz, a w dalszej kolejności określenie czystości uzyskanych liofilizatów antocyjanów.

Materiał i metody badań

Przygotowanie materiału roślinnego i ekstrakcja antocyjanów

Materiałem doświadczalnym były owoce: aronii czarnowoocowej (*Aronia melanocarpa* Elliiata), czarnego bzu (*Sambucus nigra* L.) i czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) oraz korzenie spichrzowe czarnej marchwi odmiany 'Deep Purple' (*Daucus carota* subsp. *sativus* var. *atrorubens* Alef). Materiał roślinny poddawano liofilizacji według procedury opisanej przez Dembczyńskiego i wsp. [2]. Po rozdrobnieniu, wysuszone materiały przechowywano we fiolkach w atmosferze gazowego azotu w temp. -85 °C. Zawartość suchej masy w liofilizatach oznaczano metodą wagową zgodnie z normą PN-EN 12145:2001 [9].

Do ekstrakcji antocyjanów zastosowano roztwory: wodę zakwaszoną kwasem octowym (0,75 % m/m), wodę zakwaszoną kwasem solnym (0,75 % m/m), metanol/wodę/kwas octowy (40 : 60 : 0,5 v/v/v), aceton/wodę/kwas octowy (70 : 29,5 : 0,5 v/v/v). Ekstrakcję wykonywano wielostopniowo w temp. 20 °C, zgodnie z metodą opracowaną przez Dembczyńskiego i wsp. [2]. Ekstrakty przechowywano w temp. -85 °C.

Separacja antocyjanów

Separację antocyjanów zawartych w ekstraktach wykonywano przy użyciu chromatografu ÄKTA Explorer 100 Air (Amersham Pharmacia, Szwecja), wyposażonego w detektor UV/VIS i kolumnę Agilent Zorbax SB C18 (250 × 21,2 mm). Szybkość przepływu fazy ciekłej wynosiła 15 ml/min. Rozdział przebiegał w temp. 20 °C i od-

bywał się w gradiencie. Fazę A stanowił 0,5-procentowy wodny roztwór kwasu mrówkowego, natomiast fazą B był metanol (ekstrakty z owoców) lub acetonitryl (ekstrakt z czarnej marchwi). Programy gradientu do separacji antocyjanów z różnych rodzajów ekstraktów przedstawiały się następująco:

- ekstrakt z owoców aronii i czarnej porzeczki: 0 min 5 % B, 17 min 5 % B, 28 min 20 % B, 35 min 20 % B, 56 min 30 % B, 62 min 30 % B, 84 min 35 % B, 91 min 45 % B, 92 min 100 % B, 97 min 5 % B,
- ekstrakt z owoców czarnego bzu: 0 min 5 % B, 16 min 5 % B, 27 min 24 % B, 35 min 24 % B, 93 min 35 % B, 94 min 100 % B, 105 min 5 % B,
- ekstrakt z czarnej marchwi: 0 min 5 % B, 17 min 5 % B, 70 min 13 % B, 85 min 25 % B, 86 min 100 % B, 91 min 100 % B, 98 min 5 % B.

Z ekstraktów metanolowych, przed podaniem na szczyt kolumny, usuwano metanol przez odparowanie w wyparce rotacyjnej Laborota 4003 HB control (Heidolph, Niemcy) w temp. 40 °C. Wszystkie ekstrakty przed analizą filtrowano przy użyciu filtra 0,45 µm (Millipore, USA). Frakcje antocyjanów (piki o maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 520$ nm) zbierano za pomocą kolektora frakcji do oddzielnych próbek.

Otrzymywanie preparatów antocyjanów w postaci stałej

Frakcje preparatów antocyjanów uzyskane w trakcie chromatografii preparatywnej zagęszczano w wyparce rotacyjnej Laborota 4003 HB control (Heidolph, Niemcy) w temp. 40 °C, przenoszono do szklanych fiolek i zamrażano w temp. -85 °C, a następnie umieszczano w liofilizatorze Beta 1-16 (Martin Christ, Niemcy). Suszenie sublimacyjne prowadzono przez 48 h. Suszenie właściwe odbywało się pod ciśnieniem 10 Pa przez 40 h (20 h w temperaturze półki wynoszącej -15 °C i 20 h – w temp. 15 °C). Dosuszenie przebiegało w temp. 22 °C przez 8 h bez kontroli ciśnienia. Stałe preparaty antocyjanów przechowywano w hermetycznie zamkniętych fiolkach w atmosferze gazowego azotu, w temp. -85 °C.

Analiza czystości preparatów antocyjanów

Analizę czystości barwników antocyjanowych wykonywano za pomocą HPLC. Pomiaru dokonywano przy użyciu chromatografu cieczowego Agilent Technologies 1200 (Agilent Technologies, USA), który składał się z pompy podwójnej G1312B, automatycznego podajnika próbek G1329B oraz detektora diodowego G1315C z przeglądem widma w zakresie 220 ÷ 700 nm. Rozdział wykonywano w kolumnie Agilent Zorbax SB C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm). Fazę A stanowił 5-procentowy wodny roztwór kwasu mrówkowego, natomiast fazą B był metanol (antocyjany z czarnej marchwi – acetonitryl). Analizy prowadzono w temp. 20 °C, a przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min. W trakcie analizy antocyjanów z owoców aronii i czarnej porzeczki zasto-

sowano następujący schemat gradientu: 0 min 5 % B, 2 min 5 % B, 10 min 20 % B, 15 min 20 % B, 30 min 30 % B, 35 min 30 % B, 50 min 45 % B, 55 min 45 % B, 65 min 5 % B, 68 min 5 % B.

W analizie barwników antocyjanowych z owoców czarnego bzu powyższy gradient został zmodyfikowany i kształtował się w następujący sposób: 0 min 5 % B, 2 min 5 % B, 10 min 24 % B, 15 min 24 % B, 30 min 35 % B, 35 min 35 % B, 50 min 45 % B, 55 min 45 % B, 65 min 5 % B, 68 min 5 % B. Podczas chromatografii antocyjanów z czarnej marchwi realizowano gradient według schematu: 0 min 5 % B, 2 min 5 % B, 20 min 10 % B, 40 min 13 % B, 44 min 20 % B, 50 min 25 % B, 55 min 5 % B, 60 min 5 % B. Stałe preparaty antocyjanów rozpuszczano w 5-procentowym wodnym roztworze kwasu mrówkowego i sączono przez filtry o średnicy 0,22 μm .

Czystość preparatów antocyjanów wyrażano w procentach i obliczano jako iloraz powierzchni pików danego związku do sumy powierzchni wszystkich pików na chromatogramie ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

Analiza statystyczna

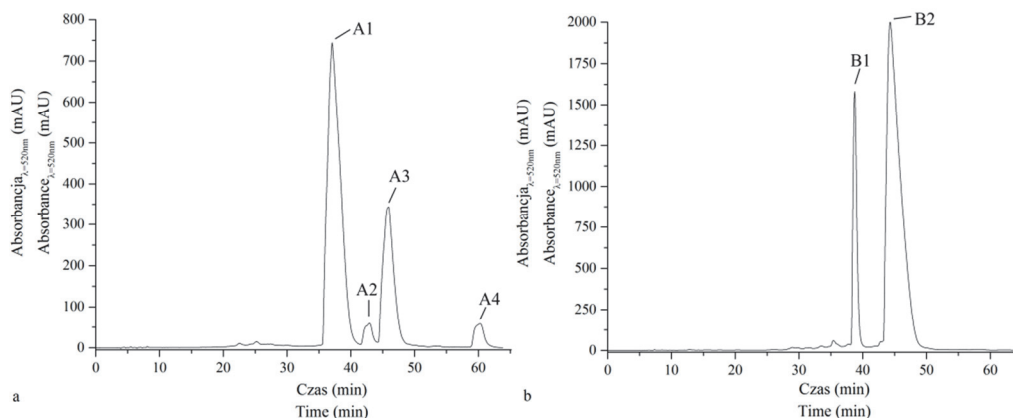
Wyniki przedstawiające czystość preparatów antocyjanów w zależności od rodzaju roztworu zastosowanego do ekstrakcji analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji oraz testu wielokrotnych porównań post-hoc Tukeya. Analizy statystyczne wykonano w programie Statistica 12.0 PL ($p = 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Separacja antocyjanów

Antocyjany zidentyfikowano na podstawie widm i czasów retencji porównywalnych z dostępnymi standardami (cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd, cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd) [7] oraz na podstawie literatury [4, 5, 16].

W ekstraktach aronii zidentyfikowano cztery związki zaliczane do grupy antocyjanów, stanowiących pochodne cyjanidyny (rys. 1a). Podobnie jak w pracy Wu i wsp. [16], w trakcie rozdzielania z kolumny wymywały się kolejno antocyjany zawierające reszty galaktozy, glukozy, arabinozy i ksylozy. W największej ilości występował cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd, który stanowił około 66,21 % wszystkich antocyjanów. Blisko trzykrotnie mniej było cyjanidyno-3-*O*-arabinozydu (25,02 %), natomiast cyjanidyno-3-*O*-glukozyd oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd stanowiły odpowiednio: 2,87 i 3,86 % wszystkich zidentyfikowanych antocyjanów. Inaczej przedstawiał się profil związków antocyjanowych w ekstraktach z czarnego bzu (rys. 1b). W podanych warunkach rozdzielania uzyskano dwa pików, które zgodnie z danymi przedstawionymi przez Wu i wsp.



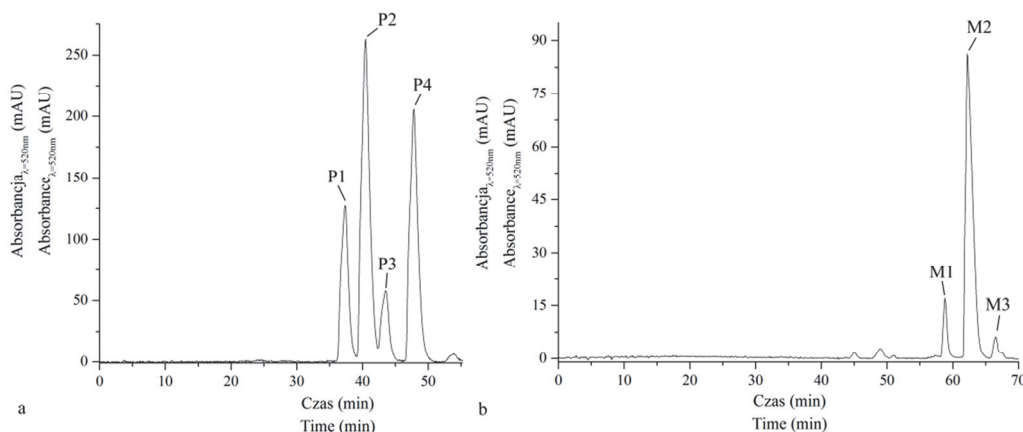
Objaśnienia: / Explanatory notes:

A1 – cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd / cyanidin-3-*O*-galactoside; A2 – cyjanidyno-3-*O*-glukozyd / cyanidin-3-*O*-glucoside; A3 – cyjanidyno-3-*O*-arabinozyd / cyanidin-3-*O*-arabinoside; A4 – cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd / cyanidin-3-*O*-xyloside; B1 – cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozyd+cyanidyno-3,5-*O*-digluukozyd / cyanidin-3-*O*-sambubioside-5-*O*-glucoside+cyanidin-3,5-*O*-diglucoside; B2 – cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd+cyanidyno-3-*O*-glukozyd / cyanidin-3-*O*-sambubioside+cyanidin-3-*O*-glucoside.

Rys. 1. Chromatogramy przedstawiające separację związków antocyjanowych z ekstraktów z owoców aronii (a) oraz czarnego bzu (b) w preparatywnej kolumnie chromatograficznej w odwróconym układzie faz

Fig. 1. Chromatograms depicting separation of anthocyanins from chokeberry (a) and elderberry (b) fruit extracts in the preparative, reverse-phase chromatography column

[16] stanowiły mieszaninę dwóch związków antocyjanowych: cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozydu oraz cyjanidyno-3,5-*O*-digluukozydu (pik B1) i cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydu oraz cyjanidyno-3-*O*-glukozydu (pik B2). Wymienione związki (reprezentowane przez piki B1 i B2) stanowiły odpowiednio: 17,65 % oraz 80,62 % wszystkich antocyjanów obecnych w badanym ekstrakcie. W trakcie separacji w kolumnie preparatywnej nie udało się rozdzielić pików B1 oraz B2 na frakcje zawierające poszczególne związki antocyjanowe. Dopiero zastosowanie kolumny analitycznej umożliwiło rozdział pików B2 na dwa piki, B2a oraz B2b zawierające odpowiednio: cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd oraz cyjanidyno-3-*O*-glukozyd (rys. 3). Przyczyną mniejszej rozdzielczości kolumny preparatywnej w odniesieniu do kolumny analitycznej była prawdopodobnie inna średnica ziaren wypełnienia. W kolumnie preparatywnej średnica ta wynosiła 7 μm , podczas gdy w kolumnie analitycznej – 5 μm . W celu uzyskania czystych związków obecnych w pikach B1 oraz B2 wymagana jest zatem dalsza optymalizacja warunków rozdziału chromatograficznego. Podczas zmiany skali procesu prowadzonego w warunkach przeladunku objętościowego, należy zwrócić uwagę na stosunek długości kolumny do kwadratu średnicy ziaren wypełnienia [3].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

P1 – delfinidyno-3-*O*-glukozyd / delphinidin-3-*O*-glucoside; P2 – delfinidyno-3-*O*-rutynozyd / delphinidin-3-*O*-rutinoside; P3 – cyjanidyno-3-*O*-glukozyd / cyanidin-3-*O*-glucoside; P4 – cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd / cyanidin-3-*O*-rutinoside; M1 – cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(synapoylglukozylo)galaktozyd, / cyanidin-3-*O*-xylosyl(sinapoylglucozyl)galactoside; M2 – cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(feruloilglukozylo)galaktozy / cyanidin-3-*O*-xylosyl(feruloilglucozyl)galactoside; M3 – cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(kumaryloglukozylo)galaktozyd / cyanidin-3-*O*-xylosyl(coumaroylglucozyl)galactoside.

Rys. 2. Chromatogramy przedstawiające separację barwników antocyjanowych z ekstraktów z owoców czarnej porzeczki (a) oraz korzeni czarnej marchwi (b) w preparatywnej kolumnie chromatograficznej w odwróconym układzie faz

Fig. 2. Chromatograms depicting separation of anthocyanins from extracts of blackcurrant (a) fruits and black carrot (b) roots in the preparative, reverse-phase chromatography column

Przy zachowaniu wspomnianej proporcji oraz przy zwiększeniu przepływu eluentu można będzie teoretycznie uzyskać istotną poprawę jakości rozdzielania, pozwalającą na separację obu pików na frakcje odpowiadające pojedynczym związkom. W ekstraktach z czarnej porzeczki zidentyfikowano natomiast dwa związki zaliczane do grupy antocyjanów stanowiących pochodne delfinidyny oraz dwa stanowiące pochodne cyjanidyny (rys. 2a). Analogicznie, jak w pracy Wu i wsp. [16], w trakcie rozdzielania z kolumny wymywały się kolejno: delfinidyno-3-*O*-glukozyd, delfinidyno-3-*O*-rutynozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd oraz cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd. Substancje te stanowiły odpowiednio: 17,54, 41,02, 7,79 i 32,06 % wszystkich antocyjanów obecnych w badanych ekstraktach. W podanych warunkach rozdzielania nie uzyskano pozostałych antocyjanów obecnych w ekstraktach z czarnej porzeczki, stanowiących pochodne petunidyny, pelargonidyny oraz peonidyny [16]. Największe dysproporcje ilościowe pomiędzy poszczególnymi związkami zaobserwowano natomiast w odniesieniu do separacji antocyjanów z ekstraktów czarnej marchwi (rys. 2b). Pomimo że przedstawione dane pod względem liczby pików uzyskanych podczas rozdzielania są zgodne z wynikami przed-

stawionymi przez Kammerer i wsp. [4], to w warunkach chromatografii preparatywnej pozyskano jedynie trzy frakcje zawierające związki antocyjanowe stanowiące pochodne cyjanidyny i zidentyfikowane jako: cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo (synapoilglukozylo)galaktozyd (pik M1), cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo (feruloilglukozylo)galaktozyd (pik M2), cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo (kumaryloglukozylo)galaktozyd (pik M3). Wymienione związki (reprezentowane przez piki M1, M2 oraz M3) stanowiły odpowiednio: 3,32, 88,73 i 1,54 % wszystkich antocyjanów obecnych w badanym ekstrakcie.

Tabela 1. Czystość preparatów antocyjanów w zależności od rodzaju roztworu zastosowanego do ekstrakcji

Table 1. Purity of anthocyanin preparations depending on type of solution applied for extraction

Rodzaj preparatu Preparation type	Czystość preparatów antocyjanów [%] Purity of anthocyanin preparations [%]			
	Kwas octowy Acetic acid	Kwas solny Hydrochloric acid	Metanol/woda/kwas octowy Methanol/water/acetic acid	Aceton/woda/kwas octowy Acetone/water/acetic acid
Aronia / Chokeberry				
A1	96 ^a ± 1,5	97 ^a ± 2,1	96 ^a ± 1,0	95 ^a ± 2,3
A2	76 ^a ± 3,2	76 ^a ± 3,8	73 ^a ± 2,0	72 ^a ± 1,5
A3	96 ^a ± 1,5	97 ^a ± 2,0	96 ^a ± 2,5	94 ^a ± 2,3
A4	88 ^a ± 2,3	87 ^a ± 3,2	91 ^a ± 2,5	90 ^a ± 2,3
Czarny bez / Elderberry				
B1*	85 ^a ± 2,5	84 ^a ± 1,5 ^a	85 ^a ± 1,5	83 ^a ± 2,0
B2a**	67 ^a ± 2,3	65 ^a ± 2,5	66 ^a ± 1,0	64 ^a ± 2,5
B2b**	30 ^a ± 1,5	33 ^a ± 2,3	32 ^a ± 1,7	34 ^a ± 3,2
Czarna porzeczka / Blackcurrant				
P1	94 ^a ± 1,7	95 ± 2,0 ^a	95 ^a ± 1,5	94 ^a ± 0,6
P2	93 ^a ± 2,9	92 ± 2,1 ^a	92 ^a ± 0,6	92 ^a ± 2,3
P3	95 ^a ± 3,2	94 ± 1,5 ^a	96 ^a ± 2,0	94 ^a ± 1,2
P4	100 ^a ± 0,6	99 ± 1,0 ^a	99 ^a ± 1,5	100 ^a ± 0,0
Czarna marchew / Black carrot				
M1	59 ^a ± 3,8	57 ^a ± 4,0	58 ^a ± 3,2	58 ^a ± 1,7
M2	95 ^a ± 1,0	94 ^a ± 1,5	95 ^a ± 2,0	93 ^a ± 1,5
M3	51 ^a ± 3,6	52 ^a ± 2,9	52 ^a ± 3,0	53 ^a ± 3,8

Objaśnienia: / Explanatory notes:

- oznaczenia preparatów jak na rys. 1., 2. i 3. / labelling of preparations as in Fig. 1., 2. and 3.;

* preparat B1 zawiera cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3,5-*O*-diglukozyd, które nie zostały rozdzielone w trakcie chromatografii preparatywnej i analitycznej / B1 preparation comprises cyanidin-3-*O*-sambubioside-5-*O*-glucoside and cyanidin-3,5-*O*-diglucoside, which were not separated during analytical and preparative chromatography;

** preparat B2 zawiera cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd i cyjanidyno-3-*O*-glukozyd, które nie rozdzieliły się w trakcie chromatografii preparatywnej, ale rozdzieliły się w trakcie chromatografii analitycznej / B2 formulation comprises cyanidin-3-*O*-sambubioside and cyanidin-3-*O*-glucoside, which did not separate during preparative chromatography, but they separated in the course of analytical chromatography;

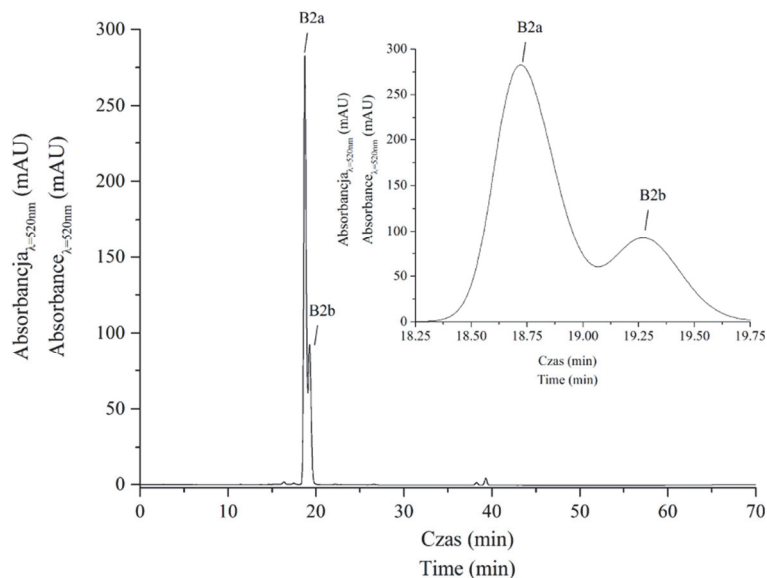
- wyniki podano jako wartość średnia \pm odchylenie standardowe / results are expressed as mean values \pm standard deviation, $n = 3$;

- a– takie same litery w obrębie analizowanego czynnika (wiersze) oznaczają brak statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) / the same letters within one analyzed parameter (rows) denote no statistically significant differences ($p < 0.05$).

Ocena czystości preparatów antocyjanów

Uzyskane za pomocą chromatografii preparatywnej preparaty antocyjanów zagęszczono w wyparce rotacyjnej, a następnie wysuszone sublimacyjnie. Czystość stałych preparatów antocyjanów zbadano przy użyciu kolumny analitycznej Zorbax SB C18 (5 μm , 250 \times 4,6 mm). Przed analizą preparaty rozpuszczono w roztworze wodnym kwasu mrówkowego o stężeniu 5 %. W celu obliczenia czystości preparatów antocyjanów wykorzystano chromatogramy wykreślone przy długości fali $\lambda = 280$ nm (tab. 1), ponieważ przy tej długości fali wykrywano, oprócz poszczególnych antocyjanów, także substancje zanieczyszczające. W świetle widzialnym ($\lambda = 520$ nm), detekcja wielu substancji obecnych w preparacie nie była możliwa. Przykładowo, frakcja M1 (czarna marchew) charakteryzowała się czystością równą ponad 98 % przy $\lambda = 520$ nm, podczas gdy czystość przy $\lambda = 280$ nm nie przekraczała 60 %. Z tej przyczyny zrezygnowano z monitorowania czystości preparatów przy długości fali równej 520 nm.

Nie stwierdzono statystycznie istotnego ($p < 0,05$) wpływu rodzaju ekstrahenta na czystość uzyskanych preparatów antocyjanowych. Preparaty antocyjanów pozyskane z czarnej porzeczki (P1-P4) odznaczały się największą czystością, wynoszącą ponad 92 %. Trzy preparaty (A1, A3 i A4) aronii cechowały się czystością większą niż 87 %, natomiast cyjanidyno-3-*O*-glukozyd (A2) charakteryzował się czystością na poziomie 72 \div 76 %. Z kolei z korzenia czarnej marchwi uzyskano tylko jeden preparat o czystości większej niż 93 % (M2). Czystość pozostałych dwóch preparatów (M1 i M3) nie przekraczała 60 %. Jedynie z czarnego bzu nie zdołano otrzymać preparatów w postaci pojedynczych antocyjanów. Jak już wcześniej wspomniano, preparat B2 był mieszaniną dwóch barwników, w blisko jednej trzeciej składającą się z cyjanidyno-3-*O*-glukozydu (B2b) i w dwóch trzecich z cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydu (B2a). Także preparat B1 był mieszaniną, która w 83 \div 85 % była złożona z dwóch antocyjanów: cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozydu i cyjanidyno-3,5-*O*-diglukozydu. Za pomocą zastosowanych metod nie udało się jednak ustalić zawartości poszczególnych związków w tym preparacie.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

B2a – cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd / cyanidin-3-*O*-sambubioside; B2b – cyjanidyno-3-*O*-glukozyd / cyanidin-3-*O*-glucoside.

Rys. 3. Chromatogram preparatu antocyjanów B2 z czarnego bzu w kolumnie analitycznej w odwróconym układzie faz

Fig. 3. Chromatogram of the B2 anthocyanin preparation from elderberry in the analytical, reverse-phase column

Wnioski

1. Chromatografia preparatywna w kolumnie preparatywnej Zorbax SB C18 (250 × 21,2 mm) umożliwia rozdział antocyjanów obecnych w ekstraktach na poszczególne frakcje.
2. Z 13 otrzymanych stałych preparatów, 7 charakteryzowało się czystością większą niż 90 % i były to: cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd i cyjanidyno-3-*O*-arabinozyd, wyizolowane z owoców aronii, delfinidyno-3-*O*-glukozyd, delfinidyno-3-*O*-rutynozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd – otrzymane z owoców czarnej porzeczki oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(feruloilglukozylo)galaktozyd – pozyskany z korzenia czarnej marchwi. Mniejszą czystością (co najmniej 87 %) cechował się preparat cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd wyizolowany z owoców aronii. Z kolei cyjanidyno-3-*O*-glukozyd z owoców aronii oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(synapoilglukozylo)galaktozyd i cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(kumaryloglukozylo)galaktozyd z korzenia czarnej marchwi zawierały stosunkowo

najwięcej niepożądanych substancji zanieczyszczających (czystość w zakresie 51 ÷ 76 %).

3. Zastosowana metoda separacji pozwoliła także na pozyskanie 2 preparatów antocyjanów z owoców czarnego bzu. Oba były mieszaninami dwóch różnych związków antocyjanowych.

Badania zrealizowano w ramach projektu NN 312 211 338 finansowanego przez MNiSW.

Literatura

- [1] Dai J., Mumper R.J.: Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, **15**, 7313-7352.
- [2] Dembczyński R., Białas W., Olejnik A., Kowalczewski P., Drożdżyńska A., Jankowski T.: Ekstrakcja antocyjanów z korzenia czarnej marchwi, owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, **5 (102)**, 165-181.
- [3] Kamiński M., Kartanowicz R.: Chromatografia cieczowa. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Gdańsk 2004.
- [4] Kammerer D., Carle R., Schieber A.: Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 2407-2412.
- [5] Montilla E.C., Arzaba M.R., Hillebrand S., Winterhalter P.: Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 3385-3390.
- [6] Olejnik A., Tomczyk J., Kowalska K., Grajek W.: Rola naturalnych składników diety w chemiopreencji nowotworów jelita grubego. *Postępy Hig. Med. Dośw.* [online], 2010, **64**, 175-187.
- [7] Oszmiański J., Wojdyło A., Matuszewski P.: Zmiany zawartości związków fenolowych podczas produkcji zagęszczonego soku truskawkowego w warunkach przemysłowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **1 (50)**, 94-104.
- [8] Piątkowska E., Kopeć A., Leszczyńska T.: Antocyjany – charakterystyka, występowanie i oddziaływanie na organizm człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **4 (77)**, 24-35.
- [9] PN-EN 12145:2001. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczenie zawartości suchej masy metodą wagową.
- [10] Prior R.L., Wu X., Gu L., Hager T., Hager A., Wilkes S., Howard L.: Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009, **53**, 1406-1418.
- [11] Prior R.L., Wilkes S., Rogers T., Khanal R.C., Wu X., Hager T.J., Hager A., Howard L.: Dietary black raspberry anthocyanins do not alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3977-3983.
- [12] Prior R.L., Wilkes S.E., Rogers T.R., Khanal R.C., Wu X., Howard L.R.: Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3970-3976.
- [13] Radziejewska-Kubzdela E., Biegańska-Marecik R., Kidon M.: Applicability of vacuum impregnation to modify physico-chemical, sensory and nutritive characteristics of plant origin products – A review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 16577-16610.

- [14] Radziejewska-Kubzdela E., Biegańska-Marecik R.: A comparison of the composition and antioxidant capacity of novel beverages with an addition of red cabbage in the frozen, purée and freeze-dried forms. *LWT- Food Sci. Technol.*, 2015, **62**, 821-829.
- [15] Saluk-Juszczak J.: Antocyjany jako składnik żywności funkcjonalnej stosowanej w profilaktyce chorób układu krążenia. *Postępy Hig. Med. Dośw.* [online], 2010, **64**, 451-458.
- [16] Wu X., Gu L., Prior R.L. McKay S.: Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 7846-7856.
- [17] Wykaz internetowy produktów. Dostęp w Internecie [02.02.2015.]: www.sigmaaldrich.com

SEPARATION OF ANTHOCYANINS FROM BLACK CARROT, CHOKEBERRY, BLACKCURRANT, AND ELDERBERRY WITH THE USE OF PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY

S u m m a r y

The objective of the research study work was to develop a method to obtain anthocyanin pigments from the extracts of chokeberry, elderberry and blackcurrant as well as black carrot roots. The separation of anthocyanins into individual fractions was carried out using preparative chromatography in an Agilent Zorbax SB C18 column (250 × 21.2 mm). Four anthocyanin pigments were identified in the extracts of chokeberry and blackcurrant. Chokeberry fruits contained derivatives of cyanidin, namely: cyanidin-3-*O*-galactoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-arabinoside, and cyanidin-3-*O*-xyloside, while in the fruits of blackcurrant, the derivatives of delphinidin and cyanidin were reported, i.e.: delphinidin-3-*O*-glucoside, delphinidin-3-*O*-rutinoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, and cyanidin-3-*O*-rutinoside. Two fractions were obtained from elderberry fruits and each one was a mixture of two anthocyanins; the first fraction contained cyanidin-3-*O*-sambubioside-5-*O*-glucoside, and cyanidin-3,5-*O*-diglucoside, whereas the second one consisted of cyanidin-3-*O*-sambubioside and cyanidin-3-*O*-glucoside. Three anthocyanins were isolated from the roots of black carrot i.e.: cyanidin-3-*O*-xylosyl(sinapoylglucosyl)galactoside, cyanidin-3-*O*-xylosyl(feruoylglucosyl)galactoside, cyanidin-3-*O*-xylosyl(coumaroylglucosyl)galactoside. Anthocyanin preparations in a solid form were obtained after the produced fractions were concentrated in a rotary evaporator and freeze-dried. A purity analysis of the anthocyanins was carried out by HPLC using an analytical Agilent Zorbax SB C18 column (5 mm, 250 × 4.6 mm). Of the 13 solid anthocyanin preparations, seven were characterized by a purity level above 90 %: cyanidin-3-*O*-galactoside and cyanidin-3-*O*-arabinoside isolated from chokeberry; delphinidin-3-*O*-glucoside, delphinidin-3-*O*-rutinoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, and cyanidin-3-*O*-rutinoside obtained from fruits of blackcurrant, and cyanidin-3-*O*-xylosyl(feruoylglucosyl)galactoside obtained from black carrot roots. The purity of other anthocyanin preparations ranged between 51 and 87 %.

Key words: anthocyanins, extraction, liquid chromatography, preparative chromatography, freeze-drying



MACIEJ BILEK, KINGA STAWARCZYK, AGNIESZKA SIEMBIDA,
MACIEJ STRZEMSKI, MARCIN OLSZEWSKI, EWA CIEŚLIK

ZAWARTOŚĆ CUKRÓW W SOKACH DRZEWNYCH Z TERENU PODKARPACIA

Streszczenie

Oznaczono zawartość cukrów w sokach drzewnych sześciu gatunków drzew rosnących na terenie Podkarpacia. Materiał doświadczalny stanowiły soki z drzew gatunków: brzoza zwisła in. brodawkowata (*Betula pendula* Roth.), brzoza omszona (*Betula pubescens* Ehrh.), grab pospolity (*Carpinus betulus* L.), klon zwyczajny (*Acer platanoides* L.), klon jesionolistny (*Acer negundo* L.) oraz wierzba biała (*Salix alba* L.). Analizę jakościową cukrów przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), a analizę ilościową – metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją światła rozproszonego (HPLC-ELSD). W sokach pozyskanych z drzew z rodzajów: brzoza oraz grab dominowała glukoza oraz fruktoza, a w sokach klonów i wierzby – sacharoza. Średnia zawartość sumy cukrów wynosiła: w sokach grabowych – 0,333 g/100 ml, klonu jesionolistnego – 1,109 g/100 ml, brzozy zwisłej – 0,897 g/100 ml, wierzby białej – 0,672 g/100 ml, brzozy omszonej – 0,475 g/100 ml, zaś klonu zwyczajnego – 1,083 g/100 ml. W soku klonu jesionolistnego oznaczono najwięcej cukrów (1,214 g/100 ml), a w soku grabu – najmniej (0,302 g/100 ml). Jedynie wyniki analizy soku z brzozy zwisłej są porównywalne z sokami brzozowymi pochodzącymi z krajów Europy Północnej i Ameryki Północnej.

Słowa kluczowe: soki drzewne, cukry, syrop brzozowy, syrop klonowy, HPLC-ELSD, HPTLC

Dr n. farm. M. Bilek, Katedra Inżynierii Produkcji Rolno-Spożywczej, Wydz. Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Żelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów, mgr K. Stawarczyk, Zakład Botaniki, Pozawydziałowy Zamiejscowy Instytut Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych, Uniwersytet Rzeszowski, Werynia 502, 36-100 Kolbuszowa, mgr inż. A. Siembida, prof. dr hab. inż. Ewa Cieślik, Katedra Technologii Gastronomicznej i Konsumpcji, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, dr n. farm. inż. M. Strzemski, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. W. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, dr inż. M. Olszewski, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydz. Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12 80-233 Gdańsk.

Wprowadzenie

Świeże wiosenne soki drzew, zwłaszcza rodzajów: klon i brzoza, stanowią wartościowy element diety w wielu regionach świata [27]. W Azji najpopularniejszymi gatunkami, z których pobiera się soki, są: klon mono, klon ginnala i brzoza szerokolistna [5, 10, 11]. Na obszarze Ameryki Północnej najczęściej zbiera się soki z klonów: cukrowego, srebrzystego i czerwonego oraz z brzozy: papierowej, cukrowej i *Betula neoalaskana* [1, 9, 23, 26]. W Europie dominującymi gatunkami, z których pozyskuje się soki, są: brzoza zwisła i omszona oraz klon zwyczajny [22, 27]. Dawniej na obszarze Europy wschodniej, m.in. w Polsce i Rumunii, zbierano sok z grabu pospolitego [27]. Sok z klonu jesionolistnego używany był przez Indian Czejenów do wyrobu cukierków [7], a sok z wierzby spożywano na Syberii [27].

Pozyskiwane wiosną soki z różnych gatunków drzew składają się głównie z wody (ok. 97 %) i cukrów, przy czym dominującym cukrem soków klonowych jest sacharaza, zaś brzozowych – fruktoza i glukoza [22]. Soki drzewne stanowią źródło rozpuszczalnych związków metali [11, 12, 19, 28], wolnych aminokwasów oraz peptydów [13, 14, 16, 19], związków polifenolowych oraz witamin [5, 19, 28]. Obecność składników bioaktywnych determinuje aktywność biologiczną soków drzewnych, stąd są one przedmiotem badań [21, 24].

Wśród głównych celów pozyskiwania soków drzewnych jest ich spożywanie w postaci świeżej, produkcja napojów fermentowanych, a przede wszystkim półprzemysłowe wytwarzanie syropu. Produkt ten stosowany jest powszechnie jako zamiennik cukru, polewa do potraw, dodatek do owoców, deserów oraz sałatek. Coraz częściej stosowany jest również do warzyw, ryb i mięs [4, 9, 17, 27].

Zawartość cukru w sokach drzewnych wyznacza opłacalność ich przetwarzania do postaci syropu. Proces technologiczny polega na stopniowym i długotrwałym odparowywaniu wody z soku drzewnego do uzyskania produktu o pożądanej zawartości ekstraktu, kształtującej się na poziomie ok. 70 °Brix [1, 9, 22, 23, 26]. Do czynników ograniczających opłacalność przetwórstwa soków drzewnych należą także: potencjalne zanieczyszczenie mikrobiologiczne, szybko postępująca fermentacja zebranych soków, jak również ryzyko rozkładu termicznego cukrów (szczególnie fruktozy) podczas odparowywania wody [1, 9, 15, 18, 23, 26].

Wzmożony popyt na produkty naturalne powoduje, że istnieje potrzeba wprowadzenia modyfikacji, innowacji technologicznych, rozwiązań materiałowych i ekologicznych związanych z nowymi produktami. W przypadku soków drzewnych ważne jest, aby pobierać najwięcej soków w sposób najmniej szkodliwy dla drzewa i minimalizować równocześnie zanieczyszczenia. Poszukuje się także innych rozwiązań, np. innych gatunków drzew, z których można byłoby pobierać na większą skalę wiosenne soki i produkować z nich wartościowe syropy [1, 9, 23, 26].

Celem pracy była ocena przydatności soków drzewnych, pozyskanych z terenu Podkarpacia, pod względem zawartości cukrów prostych i sacharozy do produkcji syropów.

Material i metody badań

Soki drzewne gatunków: brzoza zwisła (*Betula pendula* Roth.), brzoza omszona (*Betula pubescens* Ehrh.), grab pospolity (*Carpinus betulus* L.), klon zwyczajny (*Acer platanoides* L.), klon jesionolistny (*Acer negundo* L.) oraz wierzba biała (*Salix alba* L.) pozyskano z osobników rosnących na terenie Instytutu Biotechnologii i Nauk Podstawowych Uniwersytetu Rzeszowskiego, zlokalizowanego na terenie miejscowości Werynia (50,25 °N, 21,83 °E), w województwie podkarpackim. Soki pobierano od 26 lutego do 16 marca 2014 r., w czasie pierwszego tygodnia ich płynięcia. Na wyznaczonym do poboru soków terenie nie stosowano żadnych zabiegów agrotechnicznych. Obszar znajdował się z daleka od zabudowań oraz szlaków komunikacyjnych. Do pobierania soków wytypowano drzewa tego samego gatunku, z tego samego stanowiska, znajdujące się od siebie w odległości nie większej niż 15 m. Wszystkie drzewa, z których pozyskiwano soki, miały średnicę większą niż 25 cm [1].

Własna procedura pobierania próbek, będąca modyfikacją wcześniej opublikowanych metod [8], miała na celu uniknięcie zanieczyszczenia mikrobiologicznego i ewentualnego rozkładu cukrów przez drobnoustroje. Przed przystąpieniem do pobierania soków na drzewie wyznaczonym do poboru (50 cm od wierzchniej warstwy gleby) od strony południowej usuwano fragment kory jałowym dłutem odkażonym preparatem Octenisept (Schülke & Mayr, Norderstedt, Niemcy). Miejsce to dezynfekowano 70-procentowym alkoholem etylowym (POCH, Gliwice, Polska) i po 30 s przystępowano do wiercenia otworów (o głębokości 4 ÷ 6 cm) pod kątem 30°. Czynniono to sterylnym, autoklawowanym wiertłem o średnicy 10 mm. Pozostałe po wierceniu elementy drewna usuwano sterylnym skalpelem (Schreiber, Fridingen, Niemcy). Następnie odczekiwano 5 min od rozpoczęcia wycieku soków, aby umożliwić wypłynięcie z otworu resztek drewna. Po upływie tego czasu miejsce w okolicy otworu nasączano 96-procentowym alkoholem etylowym, opalano gazowym palnikiem przenośnym i przystępowano do pobierania soków. Po otwarciu wlot jałowej probówki wirówkowej o pojemności 15 ml opalano palnikiem, umieszczano w wywierconym otworze i pobierano płynące soki do analizy. W momencie zakończenia poboru każdorazowo wlot probówek opalano palnikiem gazowym i szczelnie zamykano. Po zakończeniu poboru zabezpieczano otwór w drzewie za pomocą maści ochronnej.

Analizę soków techniką wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC, *High Performance Thin Layer Chromatography*) prowadzono w komorze DS-L (Chromdes, Lublin, Polska). Rozdzielenie przeprowadzono na płytkach pokrytych żelem o zmodyfikowanej grupami aminowymi powierzchni HPTLC 60 NH₂ F₂₅₄S

20 × 10 cm (Merck, Darmstadt, Niemcy). Wykonywano wodno-metanolowe (10 : 90 v/v) roztwory wzorcowe fruktozy, glukozy i sacharozy o stężeniu 10 mg/ml oraz mieszaninę wzorców o stężeniu 10 mg/ml każdego z cukrów. Sok w ilości 0,5 ml odparowywano w temp. 20 ± 2 °C do sucha pod strumieniem azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 50 µl wody dejonizowanej, a następnie dodawano 450 µl metanolu. Próbkę o objętości 4 µl nanoszono w postaci pasm o długości 1 cm w odstępach 5 mm aplikatorem TLC Autosampler AS-30 (Desaga, Heidelberg, Niemcy). Fazą ruchomą była mieszanina acetonitrylu i wody dejonizowanej w proporcjach 85 : 15 (v/v). Płytki nasycono parami eluentu w ciągu 10 min, a następnie rozwijano chromatogramy na długości 8 cm. Po wysuszeniu płytki spryskiwano świeżo sporządzonym odczynnikiem wywołującym: mieszaniną acetonowego roztworu aniliny – 10 g/l, acetonowego roztworu difenylaminy – 10 g/l i 85-procentowego kwasu fosforowego w proporcjach 5 : 5 : 1 (v/v/v). Płytki spryskiwano za pomocą spryskiwacza Merck TLC roztworem wywołującym i ogrzewano przez 3 min w temp. 140 °C na płycie grzewczej Camag TLC Plate Heater III. Fotografie płytek chromatograficznych wykonywano z użyciem komory Camag TLC Visualizer (Camag, Muttenz, Szwajcaria).

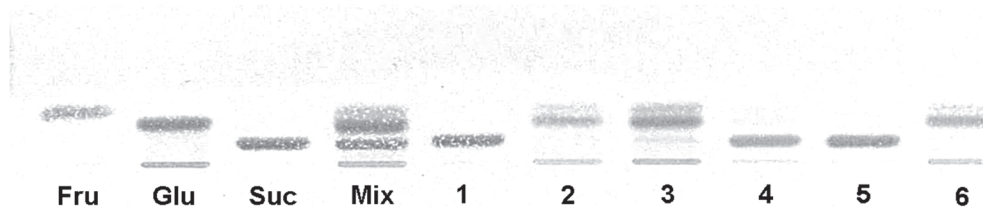
Analizę soków techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC-ELSD, *High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection*) prowadzono metodą zwalidowaną, opublikowaną we wcześniejszej pracy [3]. Zastosowano wysokosprawny chromatograf cieczowy firmy Varian (Walnut Creek, USA), sterowany za pomocą programu Varian Workstation wersja 6.9.1, składający się z dwóch pomp Varian LC 212, automatycznego podajnika próbek Varian-ProStar 410, ewaporacyjnego detektora promieniowania rozproszonego Varian ELSD 385 LC oraz modułu integrującego Varian Star 800. Do rozdzielania chromatograficznego używano kolumny chromatograficznej Cosmosil Sugar-D, 4,6 × 250 mm (Nacalai Tesque, Kyoto, Japonia). Częstotliwość szczytywania danych prowadzono przy 5.0 Hz. Chromatogramy opracowywano za pomocą programu Varian Workstation wersja 6.9.1. Doświadczalnie ustalono optymalne parametry analizy chromatograficznej: przepływ izokratyczny, skład fazy ruchomej – acetonitryl : woda (80 : 20 v/v), natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej – 1 ml/min, objętość dozowanych próbek – 25 µl, temperaturę kolumny – 35 °C, temperaturę tacy automatycznego podajnika próbek – 4 °C. Parametry detektora ELSD: natężenie przepływu strumienia gazu – 1,2 l/min, temperatura rozpylacza – 80 °C, temperatura parownika – 80 °C. Oszacowano podstawowe parametry walidacyjne zastosowanej metody analitycznej. Specyficzność metody została potwierdzona przez porównanie czasów retencji pików badanych próbek z czasami retencji wzorców: fruktozy, glukozy i sacharozy oraz ich mieszaniny. Określona została również liniowość odpowiedzi detektora na zadane stężenia roztworów wzorcowych trzech wymienionych cukrów. Precyzję metody potwierdzono przez dwukrotne powtarzanie nastrzyku każdej z próbek. Kalibrację przeprowadzono na

początku i po zakończeniu analizy. Pięciopunktową krzywą kalibracyjną utworzono ze średnich z dwóch wartości uzyskanych dla każdego poziomu kalibracyjnego. Analizę chromatograficzną poprzedzało odgazowanie próbek w łaźni ultradźwiękowej i przesączenie ich przez filtry strzykawkowe MCE o średnicy porów 0,45 μm (Alchem, Rzeszów, Polska).

Analizie poddano 18 próbek soków wiosennych, pochodzących z 6 gatunków drzew. Każdorazowo oznaczenia zawartości cukrów wykonywano w 2 powtórzeniach. Wyniki opracowano statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (czynnikiem różnicującym grupy był gatunek drzewa, z którego pobierano soki) przy wykorzystaniu programu Statistica v. 10.0. W dalszej części analizy statystycznej, w celu wskazania istotnych różnic pomiędzy danymi grupami, zastosowano test *post hoc* rozsądnej istotnej różnicy (RIR) Tukeya. Różnice uznawano za istotne przy $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie analizy jakościowej wykazano, że soki pozyskane z drzew gatunku: grab pospolity, brzoza zwisła oraz brzoza omszona stanowiły źródło fruktozy i glukozy, natomiast soki z klonu zwyczajnego, klonu jesionolistnego i wierzby białej – sacharozy (rys. 1).



Fru – fruktoza / fructose; Glu – glukoza / glucose; Suc – sacharoza / sucrose; Mix – mieszanina wzorców trzech cukrów / mixture of three sugars; 1 – klon zwyczajny / Norway maple; 2 – grab pospolity / hornbeam; 3 – brzoza omszona / downy birch; 4 – wierzba biała / white willow; 5 – klon jesionolistny / boxelder; 6 – brzoza zwisła / silver birch.

Rys. 1. Chromatogram TLC badanych soków drzewnych

Fig. 1. TLC chromatogram of tree sap samples analyzed

W analizie ilościowej soków drzewnych, wykonanej metodą HPLC-ELSD, potwierdzono wyniki uzyskane metodą HPTLC, z tym, że w jednym z soków brzozy zwisłej wykryto obecność sacharozy (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość cukrów w badanych sokach drzewnych

Table 1. Content of sugars in tree saps analyzed

Gatunek Species	Zawartość cukru w soku drzewnym Content of sugar in tree sap [mg/ml]			Suma cukrów Total sugars [g/100 ml]	
	Fruktoza / Fructose	Glukoza / Glucose	Sacharoza / Sucrose		
Grab pospolity Hornbeam	1.	1,655 ± 0,021	1,9 ± 0,029	-	0,355
	2.	1,556 ± 0,002	1,869 ± 0,008	-	0,343
	3.	1,389 ± 0,005	1,633 ± 0,001	-	0,302
Klon jesionolistny Boxelder	1.	-	-	9,857 ± 0,037	0,986
	2.	-	-	12,142 ± 0,074	1,214
	3.	-	-	11,261 ± 0,018	1,126
Brzoza zwisła Silver birch	1.	4,767 ± 0,019	4,964 ± 0,001	-	0,973
	2.	4,031 ± 0,0	3,544 ± 0,032	-	0,769
	3.	4,34 ± 0,038	3,665 ± 0,02	1,509 ± 0,006	0,95
Wierzba biała White willow	1.	-	-	3,789 ± 0,023	0,378
	2.	-	-	11,683 ± 0,107	1,168
	3.	-	-	4,712 ± 0,023	0,471
Brzoza omszona Downy birch	1.	2,311 ± 0,013	2,342 ± 0,015	-	0,465
	2.	2,766 ± 0,038	3,016 ± 0,01	-	0,579
	3.	1,833 ± 0,003	1,986 ± 0,01	-	0,382
Klon zwyczajny Norway maple	1.	-	-	10,308 ± 0,017	1,031
	2.	-	-	8,541 ± 0,018	0,854
	3.	-	-	13,641 ± 0,053	1,364

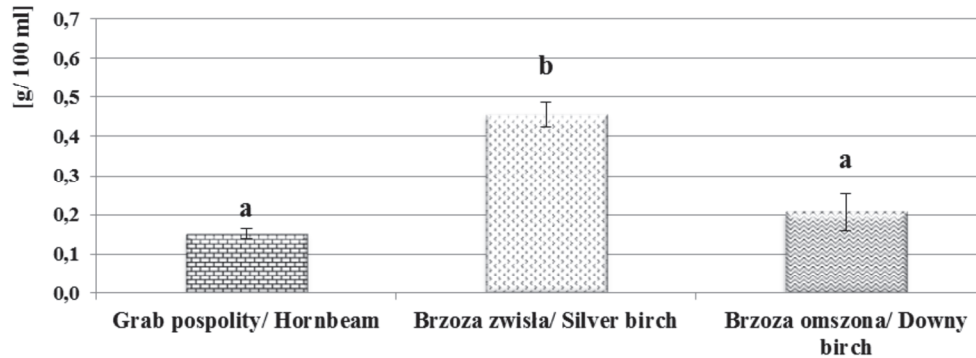
Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 2.

Średnia zawartość cukrów w badanych sokach drzewnych wynosiła w sokach grabowych 0,333 g/100 ml, klonu jesionolistnego – 1,109 g/100 ml, brzozy zwisłej – 0,897 g/100 ml, wierzby białej – 0,672 g/100 ml, brzozy omszonej – 0,475 g/100 ml, a klonu zwyczajnego – 1,083 g/100 ml. Największe różnice sumy cukrów stwierdzono w sokach gatunku wierzba biała (0,378 ÷ 1,168 g/100 ml), zaś najmniejsze – w sokach grabu pospolitego (0,302 ÷ 0,355 g/100 ml). Drzewem o największej zawartości sumy cukrów w soku był osobnik klonu jesionolistnego (1,214 g/100 ml), a o najmniejszej – grabu (0,302 g/100 ml).

Wykazano statystycznie istotne ($p < 0,05$) różnice pod względem zawartości zarówno fruktozy, jak i glukozy (rys. 2 i 3) pomiędzy sokami drzewnymi pozyskanymi z grabu pospolitego oraz brzozy omszonej a sokiem z brzozy zwisłej. Z kolei między sokami z klonu jesionolistnego i zwyczajnego a sokiem pozyskanym z brzozy zwisłej stwierdzono statystycznie istotne ($p < 0,05$) różnice pod względem zawartości sacharozy (rys. 4). Pomędzy sokami drzewnymi pozyskanymi z drzew gatunku klon jesiono-

listny oraz zwyczajny a grab pospolity oraz brzoza omszona wykazano natomiast statystycznie istotne ($p < 0,05$) różnice w zakresie ogólnej zawartości cukrów (rys. 5)

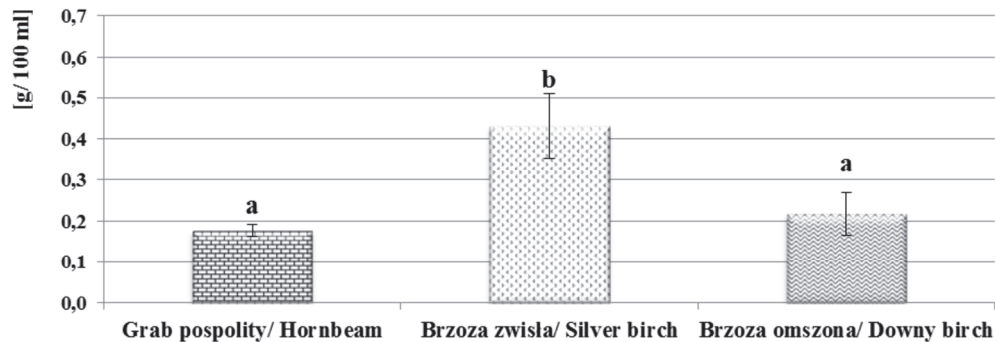


Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b – te same litery oznaczają brak różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupami eksperymentalnymi ($p < 0,05$) / the same letters denote no statistically significant differences among experimental groups ($p < 0,05$)

Rys. 2. Zawartość fruktozy w badanych sokach drzewnych

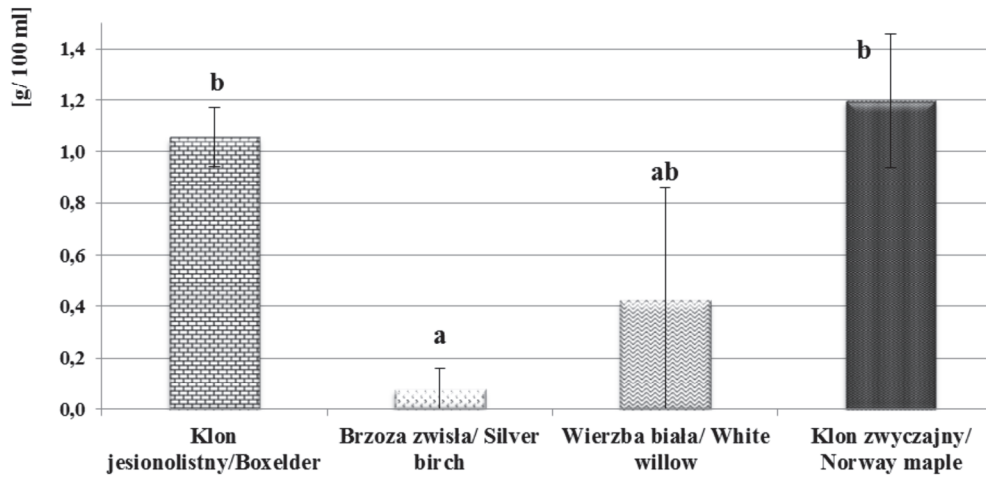
Fig. 2. Content of fructose in tree saps analysed



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

Rys. 3. Zawartość glukozy w badanych sokach drzewnych

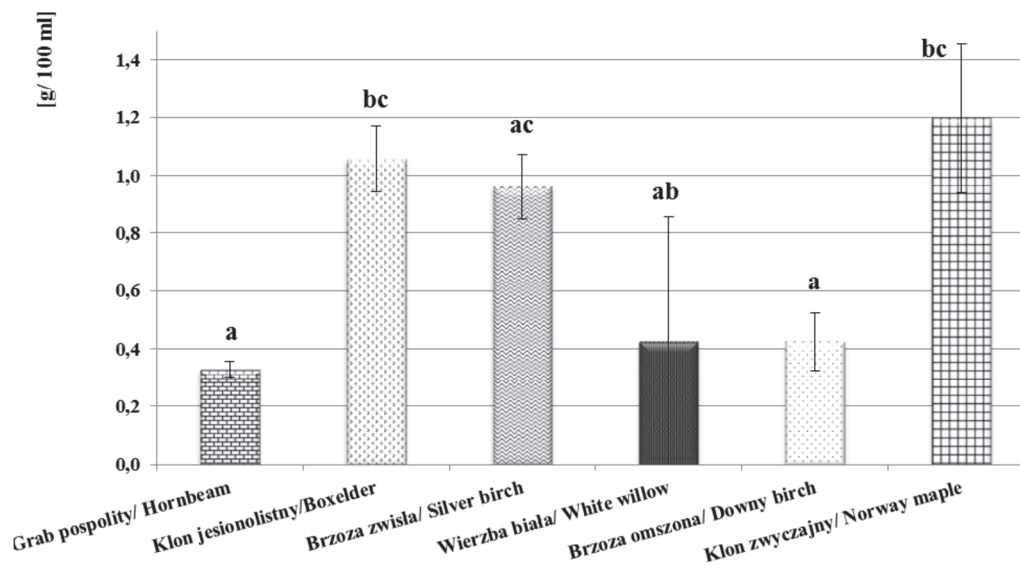
Fig. 3. Content of glucose in tree saps analysed



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

Rys. 4. Zawartość sacharozy w badanych sokach drzewnych

Fig. 4. Content of sucrose in tree saps studied



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

Rys. 5. Ogólna zawartość cukrów w badanych sokach drzewnych

Fig. 5. Content of total sugars in tree saps analyzed

Tylko w sokach brzozy zwisłej, pobranych z terenu Podkarpacia, oznaczono zawartość cukrów zbliżoną do zawartości tych składników w sokach pochodzących z krajów północnoeuropejskich, w których produkuje się syrop brzozowy. W sokach brzozy zwisłej z Łotwy stwierdzono 1,043 g/100 ml sumy cukrów, a w sokach brzozowych z Litwy zawartość sumy cukrów wynosiła 1,07 g/100 ml [28]. W Finlandii soki pobierane z brzozy zwisłej zawierały do 0,93 mg/100 ml sumy cukrów, a z brzozy omszonej – do 0,9 g/100 ml [14].

Badane soki klonowe, jak również sok wierzbowy zawierający sacharozę, były uboższe w cukry niż soki klonowe, z których produkuje się syropy w krajach Ameryki Północnej. W soku klonu cukrowego, najczęściej używanego do produkcji syropu, Larochelle i wsp. [20] stwierdzili do 5,5 g cukrów w 100 g soku, a Holgate [8] – do 2,73 g/100 ml. Soki klonów: czerwonego, amurskiego, srebrzystego i jesionolistnego zawierają cukry w ilościach odpowiednio [g/100 ml]: 4,09, 3,9, 3,43 i 2,54 [6]. Także soki pobrane z klonu zwyczajnego na terenie Łotwy zawierały więcej cukrów – 1,983 g/100 ml [19] niż soki z Podkarpacia.

Wyniki badań wskazują, że sok brzozowy stwarza perspektywę wykorzystania go do produkcji syropów. W Finlandii do produkcji syropu brzozowego stosuje się sok brzozowy o zawartości ekstraktu 1 °Brix (czyli zawierający ok. 1,0 g sumy cukrów w 100 ml), co pozwala na uzyskanie produktu o pożądanych przez nabywców cechach sensorycznych, smakowych i zdrowotnych [17]. Wytwarzanie syropu brzozowego w skali półprzemysłowej na Alasce jest opłacalne, gdy sok brzozowy wykazuje średnią skręcalność właściwą co najmniej 0,74 °Brix (ok. 0,7 g/100 ml sumy cukrów) [2, 4]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych soków brzozy zwisłej. Gatunek ten stanowi ok. 7 % udziału powierzchniowego lasów państwowych i blisko 10 % lasów prywatnych w Polsce [25].

Wnioski

1. Jedynie soki brzozy zwisłej odznaczały się parametrami zbliżonymi do tych, z których produkuje się syrop brzozowy w Finlandii i USA.
2. Średnia zawartość cukrów w sokach klonowych była mniejsza niż w sokach wykorzystywanych do produkcji syropów w Kanadzie i USA.
3. Zawartość cukrów w sokach brzozowych pozyskiwanych z terenu Podkarpacia stwarza perspektywę produkcji syropu brzozowego, natomiast produkcja syropu klonowego może być mniej opłacalna.

Literatura

- [1] A Handbook of Best Management Practices for Massachusetts Maple Syrup Farms [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2014.]: http://ag.umass.edu/sites/ag.umass.edu/files/pdf_doc_ppt/maple_bmp_final.pdf
- [2] Berg A. van den: Birch syrup production to increase the economic sustainability of maple syrup production in the Northern Forest [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2015.]: <http://nsrcforest.org/sites/default/files/uploads/vandenBerg11full.pdf>
- [3] Bilek M., Natłok N., Kaniuczak J., Gorzelany J.: Sugar and inorganic anions content in mineral and spring water-based beverages. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.*, 2014, **3 (65)**, 193-197.
- [4] Cameron M.: Establishing an Alaskan birch syrup industry: Birch syrup-it's the un-maple [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2015]: http://www.nrs.fs.fed.us/pubs/gtr/other/gtr-nc217/gtr_nc217page135.pdf
- [5] Choi Y H., Han S.S., Hyun Ok Lee H.O., Baek S. W.: Biological activity of bioactive components from *Acer ginnala* Max. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2005, **9 (26)**, 1450-1452.
- [6] Conger A.: A comparative analysis of sugar concentrations in various maple species on the St. John's Campus [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2015.]: http://www.employees.csbsju.edu/ssaup/CV/conger_final_report.pdf
- [7] Hart J.: The ethnobotany of the Northern Cheyenne Indians of Montana. *J. Ethnopharmacol.*, 1981, **1 (4)**, 1-55.
- [8] Holgate K.C.: Changes in the composition of maple sap during the tapping season [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2015.]: <http://ecommons.library.cornell.edu/bitstream/1813/4305/1/bulletin742.pdf>
- [9] Hopkins K.: Maple syrup quality control manual [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2015.]: <http://www.umext.maine.edu/onlinepubs/PDFpubs/7038.pdf>
- [10] Jeong-Jeong S., Lee C.H., Kim H.Y., Hwang I.G., Shin C.S., Park E.S., Lee J., Jeong H.S.: Characteristic of *Goroshoe* (*Acer mono* Max.) sap with different collection times after ultra filtration. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 2011, **5 (40)**, 753-758.
- [11] Jeong-Jeong S., 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. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 2012, **1 (41)**, 143-148.
- [12] Jeong-Jeong S., Jeong H.S., Woo S.H., Shin Ch.S.: Consequences of ultrafiltration and ultraviolet on the quality of white birch (*Betula platyphylla* var. japonica) sap during storage. *Aust. J. Crop. Sci.*, 2013, **7 (8)**, 1072-1077.
- [13] Jiang H., Sakamoto Y., Tamai Y., Terezawa M.: Proteins in the exudation sap from birch trees, *Betula platyphylla* Sukatchev var. japonica Hara and *Betula verrucosa* Her. *Eurasian J. For. Res.*, 2001, **2**, 59-64.
- [14] 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.
- [15] Kalio H., Karppinen T., Holmbom B.: Concentration of birch sap by reverse osmosis. *J. Food Sci.*, 1985, **50**, 1330-1332.
- [16] Kalio H., Ahtonen S.: Identification and seasonal variations of amino acids in birch sap used for syrup production. *Food Chem.*, 1989, **33**, 125-132.
- [17] Kalio H., Teerinen T., Ahtonen S., Suihko M., Linko R.R.: Composition and properties of birch syrup (*Betula pubescens*). *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **37**, 51-54.
- [18] Koffi K., Labrie S., Genois A., Aït Aïssa A., Aïder M.: Contribution to the development of a method of maple sap soft drink stabilization by electro-activation technology. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2014, **59**, 138-147.

- [19] Kūka M., Ćakste 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.
- [20] Laroche F., Forget E., Rainville A., Bousquet J.: Sources of temporal variation in sap sugar content in a mature sugar maple (*Acer saccharum*) plantation. Forest Ecol. Manag., 1998, **106**, 307-313.
- [21] Legault J., Girard-Lalancette K., Grenon C., Dussault C., Pichette A.: Antioxidant activity, inhibition of nitric oxide overproduction, and *In vitro* antiproliferative effect of maple sap and syrup from *Acer saccharum*. J. Med. Food, 2010, **2 (13)**, 460-468.
- [22] Luczaj 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.
- [23] Maher K.A.C.: Factors influencing birch sap production in Alaskan birch (*Betula neoalaskana* Sarg.) [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2015.]: <http://www.uaf.edu/files/ces/aknfc/resources/workshops/06FactorInfluenceBirchSap.pdf>
- [24] Peev C., Dehelean C., Mogosanu C., Feflea F., Corina T.: Spring drugs of *Betula pendula* Roth.: Biologic and pharmacognostic evaluation, Studia Univ. VG, SSV, 2010, **3 (20)**, 41-43.
- [25] Raport o stanie lasów w Polsce 2012 [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2015.]: http://bip.lasy.gov.pl/pl/bip/raporty_i_prognozy
- [26] Reference manual [online]. Dostęp w Internecie [4.02.2015.]: http://www.omafra.gov.on.ca/english/food/inspection/maple/pdf/fs_maple_ch3.pdf
- [27] Svanberg I., Sōukand R., Luczaj Ł., Kalle R., Zyryanova O., Dénes A., Papp N., Nedelcheva A., Šeškauskaitė D., Kołodziejska-Degōrska I., Kolosova V.: Uses of tree saps in northern and eastern parts of Europe. Acta Soc. Bot. Pol., 2012, **4 (81)**, 343-357.
- [28] Viškelis P., Rubinskienė M.: Beržų sulos cheminė sudėtis. Sodininkystė ir Daržininkystė, 2011, **3-4 (30)**, 75-82.

CONTENT OF SUGARS IN TREE SAPS FROM THE PODKARPACIE REGION

S u m m a r y

The content of sugars was determined in the tree saps of six species from the Podkarpacie region. The experimental material included the silver birch sap (*Betula pendula* Roth.), downy birch sap (*B. pubescens* Ehrh.), hornbeam sap (*Carpinus betulus* L.), Norway maple sap (*Acer platanoides* L.), boxelder sap (*A. negundo* L.), and white willow sap (*Salix alba* L.). The qualitative analysis of sugars was performed using a high performance thin layer chromatography (HPTLC) method, and the quantitative analysis was carried out with the use of a high performance liquid chromatography method with light scattering detection (HPLC-ELSD). In the birch and the hornbeam saps, glucose and fructose prevailed and in the maple and willow saps: sucrose. The mean content of total sugars was as follows: 0.333 g/100 ml in the hornbeams saps; 1.109 g/100 ml in the boxelder saps; 0.897 g/100 ml in the silver birch saps; 0.672 g/100 ml in the white willow saps; 0.475 g/100 ml in the downy birch saps; and 1.083 g/100 ml in the Norway maple saps. In the boxelder sap, the highest amount of total sugars was determined (1.214 g/100 ml), whereas in the hornbeam sap: the lowest amount of sugars (0.302 g/100 ml). The results of the silver birch analysis are the only ones that could be compared with the tree saps from the countries in Northern Europe and North America.

Key words: tree saps, sugars, maple syrup, birch syrup, HPLC-ELSD, HPTLC 

HANNA M. BARANOWSKA, MAREK SIKORA, MAGDALENA KRYSZYJAN,
PIOTR TOMASIK, ANNA DOBOSZ, EDYTA M. KUTYŁA-KUPIDURA

ZASTOSOWANIE METODY NMR DO ANALIZY WIĄZANIA WODY W KLEIKACH SKROBIOWYCH

Streszczenie

W pracy analizowano wpływ temperatury kleikowania na wiązanie wody w kleikach skrobi ziemniaczanej normalnej i woskowej za pomocą niskopolowego NMR. Badania prowadzono na poziomie molekularnym w kleikach o stężeniach $0,01 \div 0,05$ g/g. Zaproponowano empiryczny model rozkładu czasów korelacji określających dynamikę molekularną frakcji wody wolnej i związanej w żelach. Model ten poszerza, na poziomie molekularnym, wiedzę na temat oddziaływań polimer-polimer i polimer-rozpuszczalnik w układach skrobiowych. Skrobia woskowa ziemniaczana w porównaniu z normalną charakteryzowała się przewagą oddziaływań polimer-polimer nad oddziaływaniami polimer-woda. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że molekuly wody w kleikach skrobi normalnej, przygotowanej w temperaturze 95 °C, wykazywały korzystne powinowactwo do skrobi. Kleiki skrobi woskowej przygotowane w temperaturze 121 °C najsłabiej wiązały wodę.

Słowa kluczowe: czas korelacji, dynamika molekularna wody, niskopolowy NMR, skrobia ziemniaczana, szybkość relaksacji

Wprowadzenie

Natywna skrobia ziemniaczana zawiera zarówno amylozę, jak i amylopektynę, o proporcjach determinowanych pochodzeniem botanicznym. Skrobia ziemniaczana normalna charakteryzuje się przeciętnym stosunkiem zawartości amylozy do amylopektyny, wynoszącym około 1 : 4 [16]. Znana jest również skrobia woskowa, uboga w amylozę.

*Dr hab. H.M. Baranowska, Katedra Fizyki, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 38/42, 60-637 Poznań, prof. dr hab. M. Sikora, dr inż. M. Krystyjan, mgr inż. A. Dobosz, dr inż. E.M. Kutyła-Kupidura, Katedra Technologii Węglowodanów, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, prof. dr hab. P. Tomasik, Krakowska Wyższa Szkoła Promocji Zdrowia, ul. Krowoderska 73, 31-158 Kraków.
Kontakt: hmba@up.poznan.pl*

Skrobia jest nierozpuszczalna w zimnej wodzie. Pod wpływem podwyższonej temperatury wodne zawiesiny skrobi tworzą kleiki [1], które z czasem retrogradują [9], co wynika z rekrystalizacji amylopektyny i amylozy. Proces ten związany jest z istotnymi zmianami w wiązaniu wody w układzie [4]. Zmiany te można śledzić na poziomie molekularnym za pomocą niskopolowego magnetycznego rezonansu jądrowego.

Celem pracy było określenie wpływu temperatury przygotowania kleiku skrobiowego na wiązanie wody poprzez zaproponowanie modelu empirycznego rozkładu czasów korelacji, określających dynamikę molekuł wody w układzie.

Material i metody badań

Do badań użyto skrobi ziemniaczanej normalnej, wyosobnionej z ziemniaków odmiany 'Tajfun', zakupionych w Stacji Oceny Odmian w Węgrzcach koło Krakowa. Skrobia zawierała 86,92 % suchej masy, 111,9 mg/100 g s.m. fosforu całkowitego, 0,13 % tłuszczu i 31,99 % amylozy. Przedmiotem badań były kleiki skrobiowe o stężeniach $0,01 \div 0,05$ g/g.

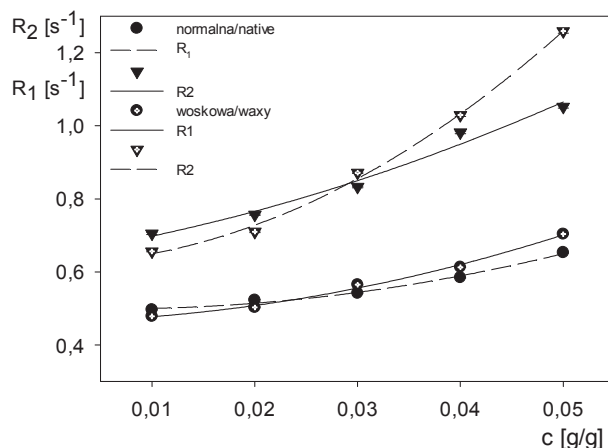
Zawiesiny skrobi o odpowiednim stężeniu umieszczano w zamkniętych próbkach pomiarowych i ogrzewano przez 30 min w temp. 80 lub 95 °C w łaźni wodnej. W czasie ogrzewania próbki wstrząsano do czasu uzyskania struktury kleiku. Próbki przygotowywane w autoklawie wstępnie ogrzewano w temp. 95 °C, wstrząsając do uzyskania struktury kleiku. Następnie umieszczane w autoklawie próbki ogrzewano przez 120 min w temp. 121 °C, przy ciśnieniu 0,1 MPa. Umożliwiło to uzyskanie jednorodnego kleiku. Przygotowane kleiki przechowywano w zamkniętych parafilmem próbkach w temp. 20 ± 2 °C. Pomiarów czasów relaksacji wykonywano po około 20 h od chwili uzyskania przez kleiki temperatury otoczenia. Pozwoliło to na uzyskanie w badanych próbkach w miarę ustabilizowanej struktury sieci polimerowej. Jednocześnie układy nie podlegały jeszcze procesom długoterminowej retrogradacji łańcuchów amylopektyny [9].

Pomiary czasów relaksacji spin-sieć T_1 i spin-spin T_2 prowadzono przy użyciu impulsowego spektrometru NMR PS 15T (Ellab Poznań, Polska) pracującego przy częstotliwości 15 MHz. Do pomiarów czasów relaksacji spin-sieć wykorzystano sekwencję impulsów odwrócenia i odrostu [6]. Odległości między impulsami (TI) zmieniano od 100 do 6500 ms, w zależności od stężenia skrobi w układzie. Czas repetycji TR wynosił 20 s. Sekwencja składała się z 32 powtórzeń. Do obliczeń zbierano 119 punktów pomiarowych z każdego z 32 sygnałów FID. Pomiarów czasów relaksacji spin-spin wykonywano stosując ciąg impulsów CPMG [6]. Odległość między impulsami π wynosiła od 10 do 15 ms w zależności od stężenia skrobi w układzie. Wykonano pięciokrotne powtórzenie każdego ciągu ech w czasie repetycji TR wynoszącym 15 s. Każda sekwencja składała się ze 100 ech spinowych. Pomiarów obu czasów relaksacji wykonano w kontrolowanej temp. 20 °C.

Wartości czasów relaksacji spin-sieć T_1 obliczano, wykorzystując program CracSpin [18]. W programie tym metoda Marquardta umożliwia minimalizację przy dopasowaniu do wieloeksponencjalnego przebiegu krzywej odrostu magnetyzacji. Obliczenia czasów relaksacji spin-spin wykonano przy użyciu programu wyznaczającego parametry krzywych zaniku ech spinowych metodą najmniejszych kwadratów. Wykorzystanie programów pozwala na obliczenia czasów relaksacji i statystycznego opracowania każdej wartości czasu relaksacji. Wartości obu czasów relaksacji są obarczone błędami mniejszymi niż 2 %.

Wyniki i dyskusja

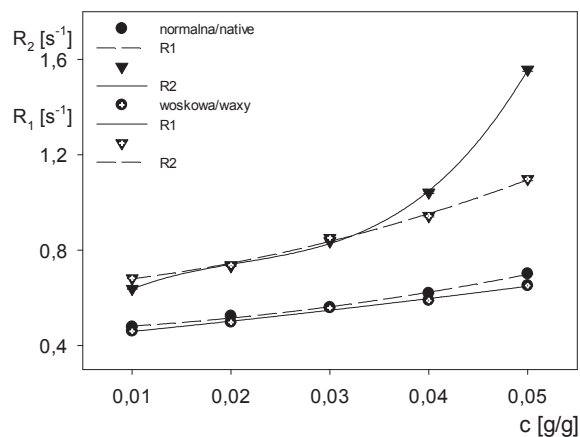
Szybkość relaksacji molekuł wody w układzie biologicznym odzwierciedla szybkość ruchów molekularnych determinowanych przez ich najbliższe otoczenie. Zależności szybkości relaksacji od stężenia skrobi w badanych kleikach przedstawiono na rys. 1 - 3.



Rys. 1. Zależności szybkości relaksacji spin-sieć R_1 i spin-spin R_2 w kleikach skrobi ziemniaczanej przygotowywanych w temperaturze 80 °C

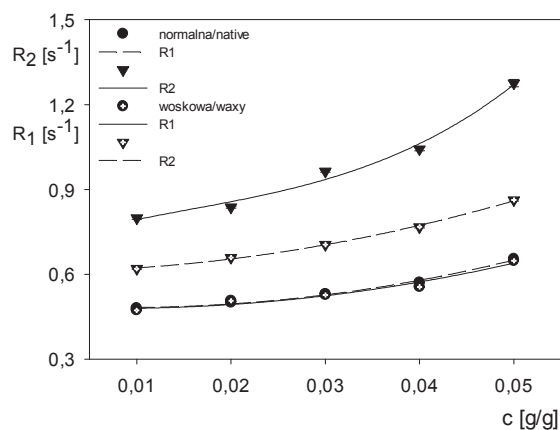
Fig. 1. Dependencies between R_1 spin-lattice and R_2 spin-spin relaxation rates in potato starch pastes prepared at 80 °C

Wraz ze wzrostem stężenia skrobi zwiększały się szybkości relaksacji spin-sieć R_1 oraz spin-spin R_2 . Podobne relacje stwierdzili Choi i wsp [7] oraz Raphaelides i wsp. [15]. Szybkości relaksacji spin-spin przyjmują większe wartości niż szybkości relaksacji spin-sieć. Przyczyną takich różnic jest wolniejszy transfer energii od wzbudzonych spinów do otoczenia niż do sąsiednich spinów. Świadczy to również o ograniczonej reorientacji cząsteczek wody stanowiących rozpuszczalnik dla sieci polimerowej [2, 3].



Rys. 2. Zależności szybkości relaksacji spin-sieć R_1 i spin-spin R_2 w kleikach skrobi ziemniaczanej przygotowywanych w temperaturze 95 °C

Fig.2. Dependencies between R_1 spin-lattice and R_2 spin-spin relaxation rates in the potato starch pastes prepared at 95 °C



Rys. 3. Zależności szybkości relaksacji spin-sieć R_1 i spin-spin R_2 w kleikach skrobi ziemniaczanej przygotowywanych w temperaturze 121 °C

Fig. 3. Dependencies between R_1 spin-lattice and R_2 spin-spin relaxation rates in the potato starch pastes prepared at 121 °C

Stężeniowe zależności szybkości relaksacji można opisać równaniem Zimmermana i Brittina [8]:

$$R_{1,2} = p_w R_{1,2w} + p_H R_{1,2H} \quad (1)$$

gdzie: R_w – szybkość relaksacji wody wolnej, R_H – szybkość relaksacji wody hydratacyjnej, p_w , p_H – frakcje protonów w obu podukładach wody: $p_w + p_H = 1$.

Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów czasów relaksacji, korzystając z powyższej formuły, określono szybkości relaksacji spin-sieć R_{1H} i spin-spin R_{2H} wody hydratacyjnej i wody wolnej w układzie (tab. 1).

Tabela 1. Szybkości relaksacji spin-sieć R_1 i spin-spin R_2 obu frakcji wody w kleikach skrobi ziemniaczanej normalnej i woskowej

Table 1. R_1 spin-lattice and R_2 spin-spin relaxation rates for both water fractions in native and waxy potato starch pastes

Skrobia Starch	Temperatura Temperature [°C]	Woda wolna Free water		Woda związana Bound water	
		Spin-sieć Spin-lattice R_{1w} [s ⁻¹]	Spin-spin Spin-spin R_{2w} [s ⁻¹]	Spin-sieć Spin-lattice R_{1H} [s ⁻¹]	Spin-spin Spin-spin R_{2H} [s ⁻¹]
Normalna Native	80	0,43 ± 0,01	0,59 ± 0,02	3,75 ± 0,24	9,20 ± 0,10
	95	0,41 ± 0,02	0,48 ± 0,02	5,42 ± 0,32	13,48 ± 0,10
	121	0,42 ± 0,01	0,64 ± 0,03	4,19 ± 0,11	11,60 ± 0,22
Woskowa Waxy	80	0,40 ± 0,02	0,45 ± 0,01	5,60 ± 0,20	15,27 ± 0,19
	95	0,41 ± 0,01	0,55 ± 0,01	4,74 ± 0,09	10,39 ± 0,10
	121	0,42 ± 0,02	0,50 ± 0,02	3,99 ± 0,11	7,14 ± 0,08

Szybkości relaksacji spin-sieć i spin-spin wody wolnej, w przypadku obu rodzajów skrobi, niezależnie od temperatury przygotowania przyjmują wartości około 0,4 s, co jest zgodne z danymi literaturowymi [3]. Wzrost szybkości relaksacji w porównaniu z wartościami czystej wody (około 0,33 s⁻¹) świadczy o wzroście uporządkowania wynikającego z ograniczeń związanych z utworzoną siecią biopolimerową [17]. W przypadku molekuł wody hydratacyjnej szybkości relaksacji spin-spin są około 2,5 razy większe niż szybkości relaksacji spin-sieć. Oznacza to istotne ograniczenia mobilności wody. W układzie kleików skrobiowych wodę hydratacyjną tworzą molekuly związane rotacyjnie wiązaniem wodorowym lub jonowym z łańcuchami amylozy czy amylopektyny. Im większa jest szybkość relaksacji, tym krótszy jest jej czas. Uzyskane wyniki potwierdzają, że istotne różnice relaksacji molekuł wody w kleikach skrobi ziemniaczanych ujawniają się w oddziaływaniach spin-spin. Jest to skutkiem oddziaływań protonów wody z protonami grup hydroksylowych jednostek glukozy. W kleikach skrobi normalnej, przygotowanych w temp. 95 °C, molekuly wody hydratacyjnej charakteryzowały się największą szybkością relaksacji. Może to wskazywać na silne wiązanie wody i przewagę oddziaływań woda-polimer nad oddziaływaniami protonów obu frakcji wody. Częsteczki wody stanowią istotny składnik węzłów sieci polimerowej. Powyższe wyniki mogą stanowić uzupełnienie badań stosowanych standardowo

w analizie struktury polimerów w roztworze [13]. Zastosowanie metody niskopolewego NMR może stanowić istotny przyczynek do interpretacji wyników uzyskanych metodami analizującymi właściwości makroskopowe badanych układów [12].

W kleikach skrobi woskowej stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury przygotowania następowało zmniejszenie wartości szybkości relaksacji. Może to świadczyć o tym, że im wyższa jest temperatura, w jakiej przygotowuje się kleik takiej skrobi, tym większą rolę odgrywają oddziaływania pomiędzy łańcuchami skrobi. Wymusza to tworzenie klastrów wody uwięzionych w sieci. Węzły sieci polimerowej tworzone są w dużej mierze bez udziału molekuł wody.

Zaobserwowane różnice relaksacji wody hydratacyjnej w skrobi normalnej i woskowej potwierdzają istotny wpływ amylozy na tworzenie sieci polimerowej. Amylopektyna, rozgałęziony polimer, tworzy w układzie zwarte struktury, które stanowią obszar hydrofobowy. We wnętrzu kłębków polimerowych oddziaływania woda-woda powodują wzrost uporządkowania wody wolnej.

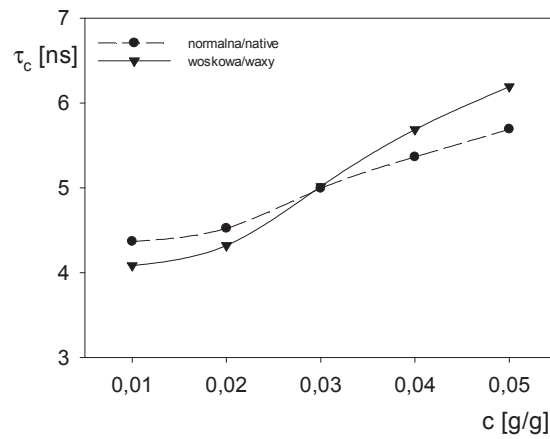
Czasy relaksacji są parametrami makroskopowymi. Na poziomie molekularnym, o ruchliwości molekuł wody w układzie można wnioskować na podstawie wartości średniego czasu korelacji τ_c . Jest to parametr, który na poziomie mikroskopowym opisuje czas potrzebny do obrotu molekuly wody o jeden radian. Związek pomiędzy czasami relaksacji a średnim czasem korelacji opisują równania BPP [11] o postaci:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{6}{20} \frac{\mu_0^2}{16\pi^2} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r_0^6} \left[\frac{\tau_c}{1+(\omega\tau_c)^2} + \frac{4\tau_c}{1+(2\omega\tau_c)^2} \right] \quad (2)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{20} \frac{\mu_0^2}{16\pi^2} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r_0^6} \left[3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1+(\omega\tau_c)^2} + \frac{2\tau_c}{1+(2\omega\tau_c)^2} \right] \quad (3)$$

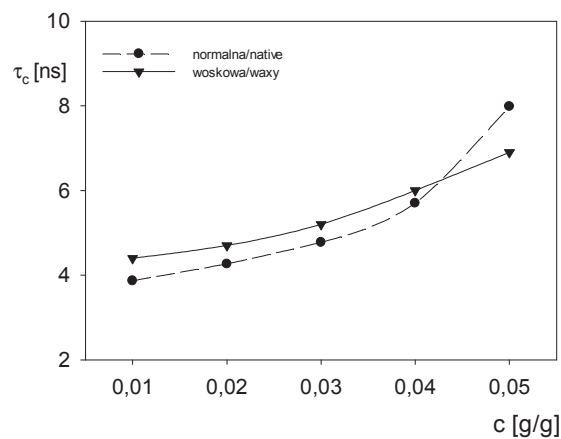
gdzie: μ_0 – przenikalność magnetyczna w próżni, γ – współczynnik giromagnetyczny, \hbar – stała Plancka dzielona przez 2π , r_0 – odległość oddziałujących jąder, ω – częstość rezonansowa.

Powyższe równania posłużyły do obliczenia średnich wartości czasów korelacji molekuł wody w badanych kleikach. Stężeniowe zależności tych parametrów przedstawiono na rys. 4 - 6.



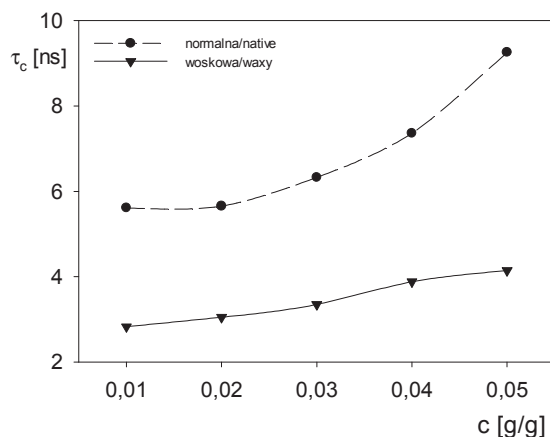
Rys. 4. Zmiany wartości średniego czasu korelacji τ_c w funkcji zawartości skrobi w kleikach skrobi ziemniaczanej normalnej i woskowej, przygotowanych w temperaturze 80 °C

Fig. 4. Changes of the mean correlation times τ_c as a function of the starch content in native and waxy potato starch pastes prepared at 80 °C



Rys. 5. Zmiany wartości średniego czasu korelacji τ_c w funkcji zawartości skrobi w kleikach skrobi ziemniaczanej normalnej i woskowej, przygotowanych w temperaturze 95 °C

Fig. 5. Changes in τ_c mean correlation times depending on starch content in native and waxy potato starch pastes prepared at 95 °C



Rys. 6. Zmiany wartości średniego czasu korelacji τ_c w funkcji zawartości skrobi w kleikach skrobi ziemniaczanej normalnej i woskowej, przygotowanych w temperaturze 121 °C

Fig. 6. Changes in τ_c mean correlation times depending on starch content in native and waxy potato starch pastes prepared at 121 °C

Na rysunkach można zauważyć, że wartości średnich czasów korelacji zmieniają się w zależności od zawartości skrobi w układzie. Nie jest to jednak prosta zależność liniowa. Uwzględniając obecność dwóch frakcji wody w układzie, zaproponowano empiryczny model rozkładu czasów korelacji. W założeniach tego modelu uwzględniono obecność sieci polimerowej rozproszonej w ciągłej fazie ciekłej. Molekuły wody ciekłej mają ograniczoną możliwość ruchów molekularnych, co potwierdziły wartości szybkości relaksacji spin-sieć i spin-spin, które obliczono z równania (1). Frakcja wody związanej w sieci polimerowej charakteryzuje się zdecydowanie większą szybkością relaksacji niż woda wolna. Zatem obie frakcje wody charakteryzują się różną dynamiką molekularną. Zaproponowano empiryczną formułę w postaci równania:

$$\tau_c = \tau_d + \frac{Hc^2}{1-c} (\tau_u - \tau_d) \quad (4)$$

gdzie: τ_d , τ_u – dolna i górna granica widma czasów korelacji, H – parametr opisujący ilość wody związanej ze skrobią.

Podstawienie wyników doświadczalnych do równania (4) wykazało zgodność danych eksperymentalnych z modelem. Współczynniki korelacji zmieniały się w zakresie $0,98 \div 0,92$.

Równanie (4) pozwoliło określić rozkład czasów korelacji w badanych kleikach skrobiowych. Uzyskane na drodze obliczeń wartości parametrów określających górną i dolną granicę rozkładu czasów korelacji zamieszczono w tab. 2.

Tabela 2. Wartości dolnej τ_d i górnej τ_u granicy rozkładu korelacji w kleikach normalnej i woskowej skrobi ziemniaczanejTable 2. Values of τ_d lower and τ_u upper limits of correlation time distribution in native and waxy starch pastes

Skrobia Starch	Temperatura Temperature [°C]	τ_d [s]	τ_u [s]
Normalna Native	80	$(4,372 \pm 0,026) 10^{-9}$	$(2,009 \pm 0,025) 10^{-7}$
	95	$(3,482 \pm 0,032) 10^{-9}$	$(1,657 \pm 0,043) 10^{-7}$
	121	$(5,151 \pm 0,023) 10^{-9}$	$(1,703 \pm 0,048) 10^{-7}$
Woskowa Waxy	80	$(4,063 \pm 0,033) 10^{-9}$	$(1,268 \pm 0,057) 10^{-7}$
	95	$(3,567 \pm 0,034) 10^{-9}$	$(0,911 \pm 0,019) 10^{-7}$
	121	$(3,203 \pm 0,025) 10^{-9}$	$(0,843 \pm 0,018) 10^{-7}$

Otrzymane wyniki wskazują, że τ_d odzwierciedla dynamikę molekuł wody tworzących fazę ciągłą w żelu. O obecności tej frakcji wody świadczą wartości szybkości relaksacji R_{1w} i R_{2w} . Obecność sieci polimerowej powoduje lokalne uporządkowanie struktury wody wolnej. Stąd dolna granica widma czasów korelacji przyjmuje wartości rzędu 10^{-9} s, odpowiadające ruchliwości molekuł wody wolnej w układach biologicznych [14]. Górna granica rozkładu czasów korelacji przyjmuje wartości mniejsze o dwa rzędy wielkości, co upoważnia do stwierdzenia, że odzwierciedla to mobilność molekuł wody związanej trwale z siecią polimerową. Przedstawione wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach metodami optycznymi [5, 10]. W przypadku, gdy w procesie kleikowania nie uzyskuje się pełnego molekularnego rozproszenia skrobi, oddziaływanie polimer-polimer przeważają nad oddziaływaniami polimer-rozpuszczalnik. Kleikowanie w temperaturze powyżej 100 °C może poprawić rozproszenie molekularne skrobi. Jednocześnie obserwuje się jednak hydrolityczną degradację skrobi. Stąd zmniejszenie, w porównaniu z kleikowaniem w temp. 95 °C, szybkości relaksacji wody hydratacyjnej. W kleikach wytworzonych w procesie kleikowania obydwu skrobi poniżej 100 °C, dynamika wody jest podobna. Wskutek sterylizacji dynamika wody w kleikach skrobi woskowej jest mniejsza niż w kleikach skrobi normalnej. Zbliżone do idealnie molekularnego, rozproszenie cząsteczek amylopektyny silniej unieruchamia cząsteczki wody. Efekt ten wywołuje też zwiększenie stężenia kleików. Zapropozowany model rozkładu czasów korelacji i interpretacja uzyskanych parametrów bardziej szczegółowo opisują dynamikę cząsteczek wody w kleikach. W przypadku skrobi normalnej dynamika wody jest najniższa w kleikach sporządzanych w temp. 95 °C (z powodów opisanych już wyżej). W przypadku skrobi woskowej dynamika wody maleje wraz ze wzrostem temperatury sporządzania kleiku. Zwracają również uwagę znacząco niższe wartości dynamiki wody związanej skrobi woskowej, w porównaniu ze skrobią normalną. Oznacza to, że o zmniejszeniu dynamiki wody decyduje głównie obecność amylopektyny.

Wnioski

1. Ze względu na dynamikę molekularną wody najkorzystniejszą temperaturą przygotowania kleików normalnej skrobi ziemniaczanej jest 95 °C. Molekuły wody w tych kleikach wykazują korzystne powinowactwo do skrobi.
2. Dynamika molekularna wody hydratacyjnej jest tym bardziej ograniczona, im wyższa jest temperatura przygotowania kleiku skrobi woskowej. Zarówno górna, jak i dolna granica czasów korelacji przyjmują mniejsze wartości wraz ze wzrostem temperatury przygotowania kleiku. Świadczy to o słabszym wiązaniu w nim wody. Można wnioskować, że skrobia woskowa ziemniaczana w porównaniu z normalną charakteryzuje się przewagą oddziaływań polimer-polimer nad oddziaływaniami polimer-woda.
3. Uzyskane wyniki wskazują, że kleiki ziemniaczanej skrobi woskowej przygotowane w warunkach bardzo wysokiej temperatury wiążą wodę najslabiej. Może to być spowodowane obecnością rozgałęzionych molekuł amylopektyny.
4. Zaproponowany w pracy model empiryczny rozkładu czasów korelacji poszerza, na poziomie molekularnym, wiedzę na temat oddziaływań polimer-polimer i polimer-rozpuszczalnik w układach skrobiowych.

Projekt zrealizowano ze środków Narodowego Centrum Nauki, umowa nr UMO 2011/03/B/NZ9/00152.

Literatura

- [1] Almdal K., Dyre J., Hvidt S., Kramer O.: Towards a phenomenological definition of the term „gel”. *Polymer Gels and Networks*, 1993, **1**, 5-17.
- [2] Baranowska H.M., Sikora M., Krystyan M., Tomasik P.: Contribution to understanding gelatinization of granular starch. In: *Starch recent advances in biopolymer science and technology*. Ed by. M. Fiedorowicz, E Bertoff. Wyd. Oddział Małopolski PTTŻ, Kraków 2010.
- [3] Baranowska H.M.: Charakterystyka żeli skrobiowych określona metodą niskopolowego magnetycznego rezonansu jądrowego. Wyd. UP w Poznaniu, Poznań 2012.
- [4] Baranowska H.M., Sikora M., Krystyan M., Tomasik P.: Evaluation of the time-dependent stability of starch - hydrocolloid binary gels involving nmr relaxation time measurements. *J. Food Eng.*, 2012, **109**, 685-69.
- [5] Blennow A., Mette Bay-Smidt A., Bauer R.: Amylopectin aggregation as a function of starch phosphate content studied by size exclusion chromatography and on-line refractive index and light scattering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2001, **28**, 409-420.
- [6] Brosio E., Gianferri R.: Low-resolution NMR – An analytical tool in foods characterization and traceability. In: *Basic NMR in Foods Characterization*. Ed. by E. Brosio. Ed. Research Signpost, Karella, 2009.
- [7] Choi S.G., Kerr W.L.: ¹H NMR studies of molecular mobility in wheat starch. *Food Res. Int.*, 2003, **36**, 341-348.

- [8] Colsenet R., Mariette F., Cambert M.: NMR relaxation and water self-diffusion studies in whey protein solutions and gels. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 6784-6790.
- [9] Dobosz A., Sikora M., Krystyan M.: Retrogradacja skrobi z dodatkiem i bez dodatku nieskrobiowych hydrokolidów polisacharydowych – metody pomiaru i ich zastosowanie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, **5 (96)**, 5-20.
- [10] Gaborieau M., Castignolles P.: Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 1413-1423.
- [11] Hennel J.W.: *Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego*. Wyd. Inst. Fizyki Jądrowej, Kraków 1997.
- [12] Juna S., Damm M., Kappe C.O., Huber A.: Treatment of waxy corn starch dispersions in a microwave reactor and their hydrodynamic properties determined using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Starch/Stärke*, 2012, **64**, 652-656.
- [13] Millard M.M., Wolf W.J., Dintzis F.R., Willett J. L.: The hydrodynamic characterization of waxy maize amylopectin in 90% dimethyl sulfoxide-water by analytical ultracentrifugation, dynamic, and static light scattering. *Carbohydr. Polym.*, 1999, **39**, 315-320.
- [14] Olszewski K.J.: Nuclear magnetic relaxation dispersion studies of water in protein solutions, denatured protein gels and tissues. *Roczniki AR w Poznaniu*, Poznań 1994.
- [15] Raphaelides S.N., Georgiadis N.: Effect of fatty acids on the rheological behaviour of maize starch dispersions during heating. *Carbohydr. Polym.*, 2006, **65**, 81-92.
- [16] Singh N., Singh J., Kaur L., Sodhi N.S., Gill B.S.: Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem.*, 2003, **81**, 219-231.
- [17] Vorob'ew M.: Monitoring of water ordering in aqueous protein systems. *Food Hydrocoll.*, 2007, **21**, 309-312.
- [18] Węglarz W.P., Harańczyk H.: Two-dimensional analysis of the nuclear relaxation function in the time domain: The Crac-Spin program. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 2000, **33**, 1909-1920.

APPLICATION OF NMR METHOD TO ANALYSE WATER BINDING IN STARCH PASTES

S u m m a r y

In the research study, the effect was analysed of gelatinization temperature on water binding in native and waxy potato starch pastes using a low-field NMR field. The study was conducted at a molecular level in the pastes at concentrations between 0.01 and 0.05 g/g. An empirical distribution model was suggested of correlation times that determined the molecular dynamics of free and bound water fractions in pastes. That model broadens knowledge about the polymer-polymer and polymer-solvent interactions in starch systems. Compared to the native potato starch, the waxy potato starch was characterized by a clear lead of polymer-polymer interactions over the polymer-water interactions. Based on the results obtained, it was concluded that the water molecules had an advantageous affinity to the starch in the native starch pastes prepared at 95 °C. The pastes of waxy potato starch pasted at 121 °C bound the least water.

Key words: correlation time, molecular dynamics of water, low-field NMR, potato starch, relaxation rate



ADAM P. KUCZYŃSKI, BOHDAN ACHREMOWICZ, CZESŁAW PUCHALSKI

PORÓWNANIE LEPKOŚCI POZORNEJ KLEIKÓW OTRZYMANÝCH Z BŁYSKAWICZNYCH PŁATKÓW ZBOŻOWYCH

Streszczenie

Badano charakterystykę kleikowania wodnych mieszanin przygotowanych z ześrutowanych błyskawicznych płatków z czterech zbóż, o różnej ich zawartości w wodzie. Stwierdzono znaczne różnice pod względem lepkości pozornej kleików. Wskazano, że czynnikami różnicującymi lepkość były: pochodzenie skrobi w płatkach, zróżnicowana jej zawartość, zabiegi hydrotermiczne i płatkowanie, interakcje z głównymi składnikami chemicznymi tworzącymi matrycę komórek ziarna zbóż. Wyznaczono liniowe zależności pomiędzy lepkością maksymalną kleików a zawartością płatków w mieszaninie wodnej. Zależności ułatwią porównanie lepkości kleików skrobiowych lub pomogą w doborze zawartości surowca skrobiowego w produktach spożywczych, w których płatki zastępują zagęstniki skrobiowe.

Stwierdzono, że kleiki z płatków jęczmiennych charakteryzowały się największą lepkością, a płatki – największą zawartością β -glukanów (3,79 %), dużą zawartością skrobi (58,3 %), znacznymi ilościami białka (8,04 %), małą zawartością błonnika pokarmowego (7,18 %), lecz o znacznym udziale jego frakcji rozpuszczalnej (4,13 %). Płatki pszenne wykazywały najmniejszą lepkość podczas kleikowania, ale zawierały najwięcej białka (9,36 %), dużo nierozpuszczalnego błonnika (7,92 %) i prawie nie zawierały β -glukanów (0,11 %). Kleiki z płatków żytnich cechowała stosunkowo mała lepkość, pomimo że płatki zawierały najwięcej skrobi (66,1 %), której towarzyszyła największa zawartość błonnika (13,09 %), największa zawartość jego frakcji nierozpuszczalnej (8,84 %), a przeciętna zawartość β -glukanów (1,62 %) i najmniejsza zawartość białka (4,30 %). Kleiki z płatków owsianych miały stosunkowo małą lepkość, a płatki zawierały: najmniej skrobi (50,8 %), najwięcej tłuszczu (6,47 %), stosunkowo dużo białka (8,50 %) i β -glukanów (3,23 %) oraz przeciętnie – błonnika (8,20 %).

Opracowane warunki porównawczych badań lepkości kleików z płatków zbożowych można zastosować w projektowaniu funkcjonalnych produktów żywnościowych, w których środki zagęszczające na bazie skrobi mogą być zastąpione przez płatki zbożowe.

Słowa kluczowe: owies, jęczmień, żyto, pszenica, białko, błonnik, β -glukany, lepkość pozorna

Wprowadzenie

Płatki błyskawiczne produkowane są z oczyszczonego, całego ziarna zbóż, które poddaje się procesowi obróbki hydrotermicznej i płatkowaniu. Płatki zasobne są w wartościowe i dobrze przyswajalne składniki odżywcze i dietetyczne [1]. Są one wolno trawione, usprawniają procesy trawienia, wpływają na długo trwające uczucie sytości i mają znaczący udział w oczyszczaniu organizmu z toksyn [3, 14].

Skrobia jest głównym składnikiem ziarna, a przebieg procesu kleikowania produktów zbożowych, ważny w technologii żywności, zależy od jej rodzaju. Skrobia pochodząca z ziarniaków zbóż wykazuje różne właściwości żelujące. Zmieniają się one w procesie wyodrębniania, oczyszczania, przetwarzania, a następnie przechowywania [6, 14, 17].

Skrobia wykorzystywana jest często jako zagęstnik wielu produktów spożywczych [6]. Różnice w kleikowaniu zawiesin skrobi, a zwłaszcza zmiany lepkości w fazie ogrzewania i chłodzenia kleików, mogą warunkować możliwości wykorzystania surowca, który zawiera skrobię [5, 7]. Rozpatrując skrobię zawartą w błyskawicznych płatkach zbożowych jako zagęstnik, należy uwzględnić jej modyfikację parą wodną i wysoką temperaturą podczas procesu płatkowania, a także interakcje ziarenek skrobiowych ze złożoną matrycą komórkową bogatą w tłuszcze, białka oraz błonnik, w tym pentozany i β -glukany, a nawet udział enzymów w zmianie żelowania skrobi w półproduktach i w produkcie finalnym [15].

Producenci stosują płatki owsiane jako dodatek funkcjonalny w wyrobach piekarskich i ciastkarskich oraz jako zagęstnik w produktach typu „gorący kubek”. Płatki błyskawiczne z innych gatunków zbóż nie znajdują podobnego zastosowania [18, 20]. Dominują raczej dodatki mąki pszennej lub skrobi modyfikowanych z różnych surowców, które charakteryzują się zwiększoną siłą kleikowania i żelowania w stosunku do płatków [10, 11].

Celem pracy było porównanie charakterystyki kleikowania wodnych mieszanin ześrutowanych błyskawicznych płatków z czterech zbóż, o różnych ich zawartościach w kleikach, oraz określenie podstawowych składników chemicznych, które są środowiskiem kleikującym w płatkach.

Material i metody badań

Materiałem do badań były błyskawiczne płatki jęczmienne, owsiane, żytnie i pszenne, wyprodukowane z wykorzystaniem jednej zautomatyzowanej linii wielkoprzemysłowej, z ziarna pochodzącego ze ściśle kontrolowanej uprawy wielohektarowej i wybranych do tej technologii polskich odmian (informacje zastrzeżone przez producenta).

W badaniach lepkości wodnych kleików skrobiowych stosuje się często wiskograf z naczyniem obrotowym, w którym proces analizy zaczyna się wzrostem temperatury od $25 \div 45$ °C do $92 \div 96$ °C, utrzymaniem temperatury przez $5 \div 20$ min i kończy schładzaniem najczęściej do temperatury rozpoczęcia ogrzewania, utrzymywanej przez $5 \div 20$ min. Tak różne warunki prowadzenia analizy dostarczają informacji o cechach skrobi natywnych i modyfikowanych, np. o temperaturze kleikowania czy o warunkach retrogradacji [4, 16]. Stężenia skrobi dobierane są do badań zgodnie z zakresem skali pomiarowej wiskografu i są ustalane, gdy celem jest porównanie próbek, np. przy skrobi natywnej jest to nie więcej niż 8 % (m/m). W tych badaniach wybrano schemat czasowo-temperaturowy analizy, który zbliżony jest do schematów technologicznych użycia zagęstników w przetwórstwie, a także stosowany jest do badania produktów znacznie różniących się lepkością lub zawartością skrobi. W metodzie tej skrócono czas stabilizacji temperatury.

Kleikowanie badano aparatem Viscograph-E Brabender (Brabender Technologie GmbH & Co. KG, Niemcy), w naczyniu obrotowym o pojemności 500 cm^3 , przy 75 obr./min. Płatki śrutowano w młynku LAB MILL 3100 (Perten Ins., Niemcy). Parametry kleikowania określano w wodnej zawieszynie płatków o ich zawartości: 10, 11 i 12 %. Do przygotowania zawiesin używano wody destylowanej. Lepkość zawiesin, w umownych jednostkach lepkości pozornej Brabendera (BU), oznaczano w 75-minutowych cyklach, podczas zwiększania lub obniżania temperatury od 55 do 95 °C z szybkością 0,9 °C/min, utrzymywania temperatury przez 5 min i schładzania do 55 °C. W cyklu oznaczano maksimum lepkości po ogrzaniu – punkt A, a następnie obniżenie lepkości podczas stabilizacji temperatury – punkt B i lepkość kleików po ochłodzeniu – punkt C. Zarejestrowane wiskogramy przeniesiono do programu Excel, porównano między sobą, wyznaczono zależności i przedstawiono graficznie.

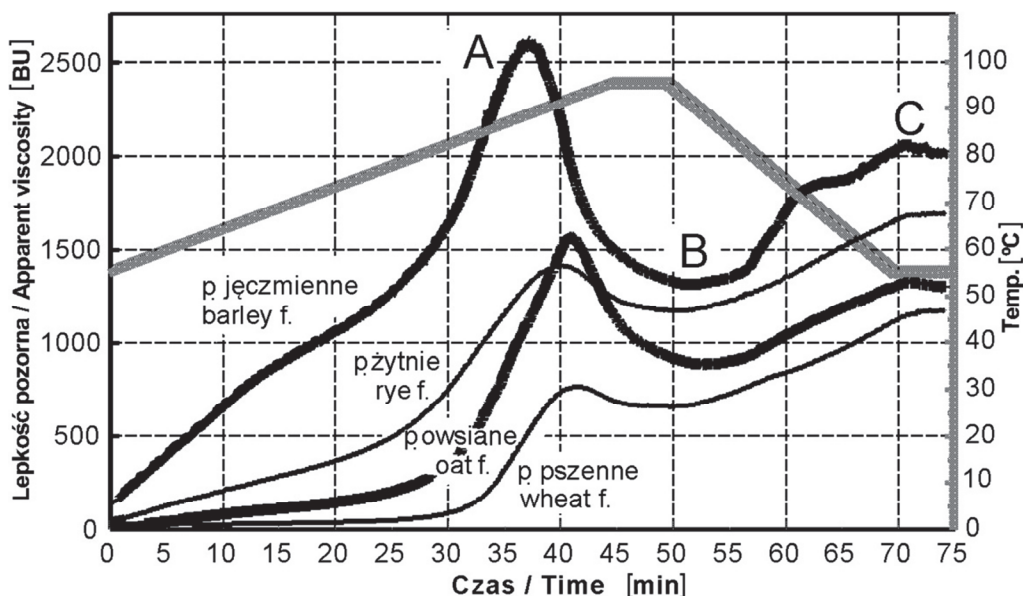
W płatkach oznaczano zawartość: skrobi (AOAC 996.11), błonnika pokarmowego (AOAC 991.43) i β -glukanów (AOAC995.16) [2]. Oznaczano także zawartość: białka ogółem wg PN-EN ISO 2048:2007 [13], tłuszczu metodą ekstrakcji Randalla wg PN-EN ISO 11085:2010 [21] oraz wilgotność wg PN-EN ISO 712:2009 [22]. Zawartość popiołu oznaczano wg ICC-Standard No. 104/1 [9]. Przed wykonaniem oznaczeń chemicznych płatki rozdrabniano w młynku Cyclotec 1093 do uzyskania cząstek o średnicach 0,5 mm (Foss Food Tech. Corp, USA).

Wyniki z 2 - 3 powtórzeń opracowano statystycznie w programie Statgraphics v.15, przy poziomie istotności $p = 0,05$, stosując jednoczynnikową analizę wariancji i test Duncana.

Wyniki i dyskusja

Na rys. 1. przedstawiono typowe krzywe kleikowania (wiskogramy) ześrutowanych błyskawicznych płatków z 4 zbóż, przy ich 11-procentowej zawartości w wodzie

(rys. 1). Wzrost lepkości kleików podczas ogrzewania spowodowany jest wzrastającą absorpcją wody przez ziarenka skrobiowe z matrycy komórkowej płatków zbożowych, w której są umieszczone i pęcznieniem ziarenek skrobiowych, a więc rozpoczętym procesem kleikowania skrobi [8, 12]. Zaobserwowano, że wiskogramy kleików z płatków tego samego rodzaju, niezależnie od ich zawartości, nie różniły się kształtem. W przypadku kleików z różnych płatków, przy 12-procentowej ich zawartości, osiągały maksymalny liniowy zakres (BU) skali wiskografu, a przy zawartości 10 %, gdy lepkość była najmniejsza – bardzo dobrą dokładność oznaczenia. Tym samym stwierdzono, że wiskograf nadaje się do badania kleikowania płatków z czterech zbóż o zawartości 10, 11 i 12 % w wodnych mieszaninach, a także do ich porównań, pomimo znacznych różnic pod względem lepkości i zawartości skrobi.



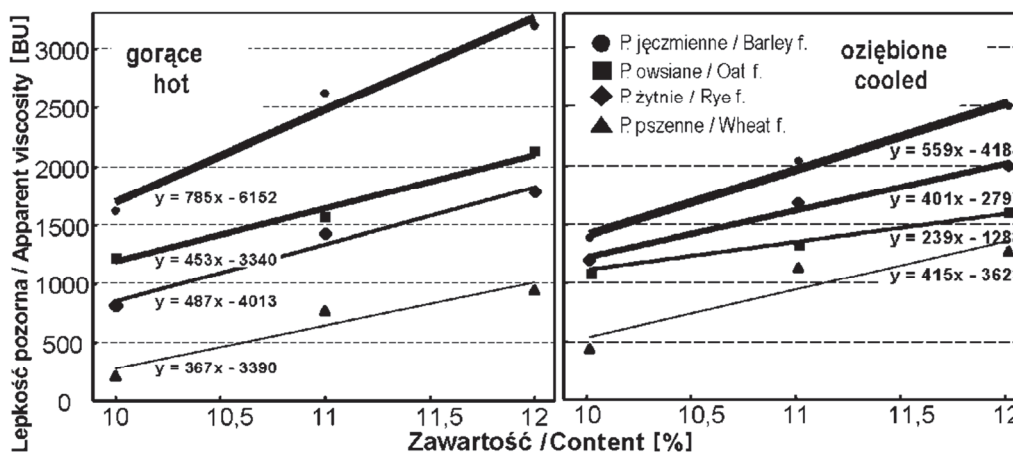
p. – płatki / f. – flakes

Rys. 1. Zmiany lepkości pozornej 11-procentowych wodnych mieszanin ześrutowanych płatków zbożowych w przyjętym schemacie ogrzewania i ochładzania – 0,9 °C/min. Szarym kolorem zaznaczono profil zmian temperatury.

Fig. 1. Changes in apparent viscosity of 11 % aqueous mixtures of ground cereal flakes under assumed warming and cooling scheme: 0.9 °C/min. Profile of changes in temperature was marked grey.

Podczas ogrzewania do temp. 95 °C wszystkie kleiki osiągnęły maksymalną lepkość w punkcie A (rys. 1), tj. w temp. $86 \div 92$ °C. W przypadku próbek o 11-procentowej zawartości płatków największą lepkość (2622 BU) stwierdzono w kleikach z płatków jęczmiennych w temp. 89 °C, czyli niższej niż w pozostałych

kleikach. Natomiast kleik z płatków pszennych charakteryzował się najmniejszą maksymalną lepkością (767 BU) w temp. 92 °C. Kleiki owsiane i żytni były zbliżone do siebie pod względem maksymalnej lepkości, która wynosiła odpowiednio: 1568 BU (92 °C) i 1450 BU (91 °C). Dalszy wzrost temperatury kleików z płatków jęczmiennych i owsianych prowadził do gwałtownego i znacznego zmniejszenia lepkości, natomiast utrzymywanie kleików przez 5 min w temp. 95 °C – do łagodnego zmniejszenia lepkości wszystkich badanych kleików. Dopiero oziębienie kleików wstrzymywało zmniejszanie lepkości w minimum lepkości – punkt B i zwiększało lepkość w fazie dalszego chłodzenia do 55 °C, osiągając kolejne maksimum – punkt C. W kleikach z płatków jęczmiennych stwierdzono największą lepkość po ochłodzeniu (1997 BU). Lepkość kleiku z tych płatków zmalała w stosunku do punktu A, lecz wciąż była największa spośród badanych próbek. Również po ochłodzeniu kleików owsianych ich lepkość w punkcie C (1250 BU) zmniejszyła się w stosunku do punktu A. Natomiast kleiki ze schłodzonych płatków żytnich (1695 BU), a także z pszennych (1175 BU) w punkcie C wykazywały większą lepkość w stosunku do punktu A. Lepkość kleików pszennych była najmniejsza wśród badanych próbek, zarówno maksymalna w okresie ogrzewania, jak i po ochłodzeniu.



Rys. 2. Zmiany maksymalnej lepkości kleikowania w zależności od zawartości ześrutowanych płatków zbożowych w mieszaninach

Fig. 2. Changes in maximum gelatinization viscosity depending on content of ground cereal flakes in mixtures

Podczas oceny lepkości kleików skrobiowych określa się również czas i temperaturę, w której rozpoczyna się kleikowanie. Szybki wzrost lepkości bezpośrednio po rozpoczęciu pomiaru od temp. 55 °C wskazuje na to, że płatki jęczmiennie i żyt-

nie kleikują już w niższych temperaturach niż owsiane oraz pszenne i jest to cechą gatunkową ich skrobi.

Do praktycznych zastosowań płatków zbożowych wyznaczano trzy parametry lepkości z opracowanego cyklu czasowo-temperaturowego. Były to lepkości: maksymalna podczas kleikowania – punkt A, minimalna przy utrzymaniu stałej temperatury (95 °C) – punkt B i maksymalna po ochłodzeniu – punkt C. Lepkość gorących kleików z płatków zbożowych, jak i oziębionych, można regulować, zmieniając zawartość płatków w mieszaninie. Można wtedy uzyskiwać kleiki o lepkości równoważnej kleikom z natywnej skrobi. Do tych celów przydatna jest zależność lepkości pozornej kleików od zawartości płatków w mieszaninach (rys. 2). Zmiany okazały się znacząco zróżnicowane.

Ze wzrostem zawartości płatków jęczmiennych w mieszaninach, przyrosty lepkości w maksimum lepkości (kleiki gorące – punkt A) były największe (785 BU/1 %), a najmniejsze dotyczyły kleików pszennych (376 BU/1 %). Pośrednie i zbliżone do siebie były przyrosty lepkości kleików płatków pszennych i owsianych, odpowiednio: 487 i 453 BU/1 %. Po schłodzeniu (w punkcie C) lepkość kleików była tym większa, im większa była zawartość płatków. W największym stopniu zjawisko to dotyczyło płatków jęczmiennych (559 BU/1 %), a w najmniejszym – owsianych (239 BU/1 %), natomiast na zbliżonym poziomie – żytnich (401 BU/1 %) oraz pszennych (415 BU/1 %). Uzyskano liniowe zależności (rys. 2) do przydatnych w praktyce porównań, które umożliwiają obliczanie zawartości płatków i uzyskanie pożądanej lepkości albo obliczanie lepkości przy wybranej ilości płatków, przy zachowaniu pozostałych warunków badań w wiskografie.

Wykonano także podstawową analizę składu chemicznego płatków zbożowych. Zróżnicowanie wszystkich wartości średnich badanych parametrów płatków z 4 zbóż było statystycznie istotne ($p = 0,05$) – tab. 1. Jedynie w płatkach żytnich i jęczmiennych stwierdzono jednakową zawartość frakcji rozpuszczalnej błonnika. Podstawowym składnikiem płatków jest skrobia. Największą jej zawartość oznaczono w płatkach żytnich (66,1 %), a równie dużą – w płatkach jęczmiennych (58,3 %). W płatkach pszennych stwierdzono największą zawartość białka (9,36 %), a najmniejszą (4,30 %) – w żytnich. Natomiast zawartości białka w płatkach owsianych (8,50 %) i jęczmiennych (8,04 %) kształtowały się na poziomie pośrednim. Płatki owsiane charakteryzowały się najmniejszą wilgotnością (8,6 %), na co wpływ mogła mieć największa zawartość w nich tłuszczu (6,47 %). Wilgotność pozostałych płatków była większa i zbliżona do siebie: jęczmienne – 11,0 %, żytnie – 11,2 %, a pszenne – 11,4 %. Zawartość związków mineralnych w postaci popiołu była najmniejsza w płatkach jęczmiennych (0,9 %), a więc taka, jak w jasnych mąkach nisko wyciągowych, w pozostałych płatkach była poniżej 2 %, czyli podobnie jak w kaszach.

Tabela 1. Skład chemiczny analizowanych płatków zbożowych
Table 1. Chemical composition of analysed cereal flakes

Płatki Flakes	Wilgotność Humidity [%]	Białko Protein [%]	Tłuszcz Fat [%]	Związki mineralne jako popiołów / Mineral compounds as ash [%]	Skrobia Starch [%]	Błonnik / Fibre			β-glukany β-glucans [%]
						Nierozpuszczalny Insoluble [%]	Rozpuszczalny Soluble [%]	Ogółem Total [%]	
Jęczmienne Barley flakes	10,455 ^a	8,24 ^b	2,072 ^a	0,975 ^a	63,53 ^a	3,22 ^a	3,05 ^{ab}	6,27 ^a	2,46 ^{ab}
Owsiane Oats flakes	10,11 ^a	10,07 ^c	6,86 ^b	1,91 ^c	60,7225 ^a	4,89 ^b	4,02 ^b	8,9175 ^{ab}	3,52 ^b
Pszenne Wheat flakes	11,38 ^a	9,39 ^{bc}	2,115 ^a	1,65 ^{bc}	54,125 ^a	7,915 ^c	1,38 ^a	9,3 ^{ab}	0,11 ^a
Żytnie Rye flakes	11,24 ^a	4,295 ^a	1,365 ^a	1,525 ^b	66,07 ^a	8,835 ^c	4,255 ^b	13,09 ^b	1,62 ^{ab}
\bar{x}	10,80	8,00	3,10	1,52	61,11	6,22	3,18	9,39	1,93
s / SD	0,61	2,58	2,53	0,39	5,14	2,61	1,31	2,81	1,44
CV [%]	6	32	81	26	8	42	41	30	75

Objasnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} - wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation; CV – współczynniki zmienności / coefficients of variation;
a, b, c – wartości średnie oznaczone w tej samej kolumnie różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) / mean values designated by
different letters and placed in the same column differ statistically significantly at $p < 0,05$.

Wśród składników funkcjonalnych, do których należy błonnik pokarmowy, w tym β -glukany (tab. 1), również stwierdzono duże zróżnicowanie zawartości. Największą zawartość β -glukanów oznaczono, zgodnie z oczekiwaniami, w płatkach jęczmiennych oraz w owsianych odpowiednio: 3,79 i 3,23 %, natomiast znacznie mniejszą ich ilość stwierdzono w płatkach żytnich (1,62 %) oraz bardzo małą ilość (0,11 %) – w pszennych. Największą zawartość błonnika pokarmowego ogółem (13,09 %) określono w płatkach żytnich, mniejszą – w pszennych (9,30 %) oraz owsianych (8,20 %), a najmniejszą – w jęczmiennych (7,18 %). Najwięcej błonnika nierozpuszczalnego (8,84 %) oraz rozpuszczalnego (4,25 %) było w płatkach żytnich. Natomiast dużą (7,92 %) zawartość frakcji błonnika nierozpuszczalnego stwierdzono w płatkach pszennych, lecz najmniej, spośród zbadanych płatków, było w nich frakcji rozpuszczalnej (1,38 %).

W płatkach zbożowych kleikowaniu ulega główny ich składnik, czyli skrobia. W badaniach zwrócono uwagę na najsilniejsze kleikowanie płatków jęczmiennych, a najsłabsze – pszennych. Płatki jęczmienne zawierały nieznacznie więcej skrobi od pszennych, a jednocześnie zawierały najwięcej β -glukanów i dużo rozpuszczalnego błonnika (podobnie jak płatki żytnie). W płatkach pszennych stwierdzono natomiast minimalną zawartość β -glukanów i rozpuszczalnego błonnika. Płatki pszenne zwykle zawierają najwięcej białka i dużo nierozpuszczalnego błonnika. W tym przypadku można uznać, że matryca komórkowa uwięziła duże ziarenka skrobi pszennej podczas płatkowania i utrudniała ich kleikowanie w fazie ogrzewania mieszaniny. Ograniczenie zdolności kleikowania płatków pszennych uniemożliwiło wzrost lepkości próbek podczas ogrzewania (osiągnięcie punktu A). Drobniejsze ziarenka skrobiowe płatków jęczmiennych, o bardzo rozwiniętej powierzchni kontaktu głównie z frakcją rozpuszczalną błonnika (4,13 %) i β -glukanami, mogły natomiast swobodnie pobierać wodę i kleikować. Zaobserwowano jedynie niewielką, cechującą skrobię tego gatunku, utratę lepkości po ochłodzeniu (punkt C). Mała lepkość kleików z płatków pszennych mogła wynikać ponadto z udziału enzymów amylolitycznych depolimeryzujących skrobię, co wielokrotnie stwierdzano w mąkach wytwarzanych z porośniętego ziarna pszenicy [19, 20].

Porównanie płatków żytnich i owsianych wykazało, że kleikowały one podobnie (rys. 1., punkt A), pomimo różnej zawartości w nich skrobi, której w płatkach żytnich było najwięcej (66,1 %), a w owsianych – najmniej (50,8 %). Duża zawartość nierozpuszczalnego błonnika w płatkach żytnich, podobnie jak w płatkach pszennych, ograniczała maksimum kleikowania (osiągnięcie punktu A), ale po oziębieniu kleik z płatków żytnich miał większą lepkość (punkt C) niż kleik z płatków pszennych. Efekt wyraźnego wzrostu lepkości kleików żytnich i pszennych po ich ochłodzeniu wyklucza bezpośredni wpływ białka na lepkość w punkcie C, gdyż białka w płatkach żytnich było najmniej (4,3 %). Zatem w płatkach owsianych, tak jak i w pszennych, ziarenka

skrobiowe mogły słabo kleikować w otoczeniu białka w pobliżu pierwszego maksimum (punkt A). Kleikowaniu płatków owsianych, pomimo najmniejszej zawartości skrobi, lecz w formie najdrobniejszych ziarenek (charakterystycznych dla tego gatunku), mogła sprzyjać duża zawartość β -glukanów w ich otoczeniu, a także tłuszcze tworzące kompleks z amylozą [4].

Kompleksowa analiza przebiegu kleikowania skrobi i podstawowego składu chemicznego płatków zbożowych dowiodła, że ziarenka skrobiowe w płatkach nie były wydzieloną skrobią zmieszaną ze składnikami chemicznymi w takim stopniu, jak np. w mąkach. Po przetworzeniu ziarna zbóż na płatki błyskawiczne ziarenka skrobi były nadal rozmieszczone w matrycy komórkowej przypominającej matrycę ziarniaków zbóż. Dobrze poznane są różnice w podstawowym składzie chemicznym ziarna zbóż i wyniki tej pracy to potwierdzają. Znane są cechy fizyczne i chemiczne składników analizowanych w pracy, takie jak: przewodzenie wody, hydrofobowość, właściwości strukturotwórcze i absorpcyjne. Zwrócono uwagę na możliwości współdziałania tego złożonego układu z pęczniejącymi ziarenkami skrobi. Przy licznych korelacjach składników chemicznych w ziarniakach zbóż i możliwych interakcjach ze skrobią, a także z warunkami produkcji płatków, trudno jest tradycyjnymi analizami chemicznymi lub technologicznymi wyjaśniać wpływ środowiska na ziarenka skrobiowe, jako strukturę złożoną z amylozy i amylopektyny [14, 20].

Zróznicowane charakterystyki lepkości kleików z błyskawicznych płatków czterech zbóż, różny ich skład chemiczny, a także spodziewany wpływ działań hydrotermicznych oraz płatkowania na zmianę struktury matrycy komórkowej i zawartych w niej ziarenek skrobiowych, stwarzają możliwości wyboru odpowiedniego surowca i jego wykorzystania w roli zagęstnika.

Wnioski

1. Znaczne różnice lepkości kleików otrzymywanych z płatków błyskawicznych wytworzonych z ziarna czterech zbóż były wynikiem różnej zawartości skrobi, jak również udziałem czynników różnicujących właściwości ziarenek skrobi i ich interakcji z otaczającymi składnikami chemicznymi po procesie hydrotermicznym i płatkowaniu.
2. W przypadku płatków jęczmiennych błyskawicznych wykazano ich szybkie kleikowanie, największą lepkość kleików i największą zawartość β -glukanów, dużą zawartość skrobi, znaczne ilości białka, przy małej zawartości błonnika, lecz ze znacznym udziałem jego frakcji rozpuszczalnej.
3. Pod względem zmian lepkości kleików i składu chemicznego błyskawicznych płatków zbożowych wykazano:

- kleiki z płatków pszennych charakteryzowały się najmniejszą lepkością podczas kleikowania, a płatki: największą zawartością białka i dużą – nierozpuszczalnego błonnika,
 - kleiki z płatków żytnich odznaczały się stosunkowo małą lepkością kleikowania, pomimo największej zawartości skrobi i błonnika pokarmowego w płatkach, zwłaszcza jego nierozpuszczalnej frakcji,
 - mała lepkość kleików owsianych może wynikać z najmniejszej zawartości skrobi, dużej zawartości tłuszczu, stosunkowo dużej zawartości białka i β -glukanów w płatkach.
4. Do porównania zróżnicowanych surowców skrobiowych znaczenie aplikacyjne mogą mieć opracowane, liniowe zależności lepkości od zawartości płatków w mieszaninie wodnej. Umożliwiają one obliczanie lepkości w przypadku ustalanych jednakowych zawartości płatków albo obliczanie zawartości materiału w przypadku jednakowych lepkości

Literatura

- [1] Achremowicz B., Gibiński M.: Przetwory owsiane cennym składnikiem naszej diety. *Przegl. Zboż. Młyn.*, 2010, **7 (54)**, 14-15.
- [2] AOAC, Association of Official Agricultural Chemists: 991,43 Total, soluble and insoluble fiber. 995,16 Beta-D-glucan, enzymatic method. 996,11 Total starch. Edt. AOAC, Rockville, Maryland, USA 2014.
- [3] Bartnikowska E.: Przetwory z ziarna owsa jako źródło ważnych substancji prozdrowotnych w żywieniu człowieka. *Biul. IHAR*, 2003, **229**, 235-245.
- [4] Berski W., Ptaszek A., Ptaszek P., Ziobro R., Kowalski G., Grzesik M., Achremowicz B.: Pasting and rheological properties of oat starch and its derivatives. *Carboh. Polym.*, 2011, **2 (83)**, 665-671.
- [5] Czubaszek A., Karolini-Skaradzińska Z.: Effects of wheat flour supplementation with oat products on dough and bread quality. *Pol. J. Food Nut. Sci.*, 2005, **3 (14)**, 281-296.
- [6] Fortuna T., Gałkowska D., Juszcak L.: Porównanie właściwości reologicznych wybranych preparatów skrobi modyfikowanej. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2004, **2 (3)**, 127-136.
- [7] Gates K.F., Sontag-Stohm T., Stoddard L.F.: Interaction of heat-moisture conditions and physical properties in oat processing. *J. Cereal Sci.*, 2008, **48**, 288-293.
- [8] Gupta M., Bawa A.S., Semwal A.D.: Morphological, thermal, pasting and rheological properties of barley starch and their blends. *Int. J. Food Prop.*, 2009, **12**, 595-596.
- [9] ICC, International Cereals Chemists: Standard 104/1. Determination of ash in cereals and cereal products. Dostęp w Internecie [30.05.2015]: www.icc.or.at/standard_methods
- [10] Kawka A., Achremowicz B.: Owies – roślina XXI wieku. Wykorzystanie żywieniowe i przemysłowe. *Nauka. Przyroda, Technologie*, 2014, **3 (80)**, 1-12.
- [11] Klensport D., Jeleń H.: Effect of heat treatment on the flavor of oat flakes. *J. Cereal Sci.*, 2008, **48**, 656-661.
- [12] McMinn A.M., McKee J.D., Magee A.T.: Moisture adsorption of oatmeal biscuit and oat flakes. *J. Food Eng.*, 2007, **79**, 481-493.

- [13] PN-EN ISO 2048:2007 Ziarno zbóż. Oznaczanie azotu i białka. Ragaee S., Abdel-Aal E.S.: Casting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chem.*, 2006, **95**, 9-18.
- [14] Ragaee S., Abdel-Aal E.S.: Casting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chem.*, 2006, **95**, 9-18.
- [15] Rzedzicki Z.: Charakterystyka składu chemicznego wybranych przetworów owsianych. *Biul. IHAR*. 2006, **239**, 269-280.
- [16] Sanaa Ragaee S., Abdel-Aal E.M.: Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chem.*, 2006, **1 (95)**, 9-18
- [17] Singh J., Kaur L., McCarthy O.J.: Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. *Food Hydrocoll.*, 2007, **21**, 1-22.
- [18] Sobczyk M., Haber T., Witkowska K.: Wpływ dodatku płatków owsianych na jakość ciasta i pieczywa pszenne. *Acta Agroph.*, 2010, **2 (16)**, 423-433.
- [19] Sobota A., Rzedzicki Z., Sobieraj M.: Badania składu chemicznego płatków musli. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2012, **2 (45)**, 131-137.
- [20] Zarzycki P., Kasprzak M., Rzedzicki Z.: Właściwości reologiczne kleików z mąki pszennej jako wskaźnik jej wartości wypiekowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, **6 (97)**, 50-66.
- [21] PN-EN ISO 11085:2010. Ziarno zbóż. Oznaczanie tłuszczu metodą ekstrakcji Randalla.
- [22] PN-EN ISO 712:2009. Ziarno zbóż. Oznaczanie wilgoci.

COMPARING APPARENT VISCOSITY OF GRUELS PRODUCED FROM INSTANT CEREAL FLAKES

S u m m a r y

The gelatinization profile was analyzed of aqueous mixtures made from ground instant flakes of four types of cereals and with a varying content of cereal flakes in water. It was found that there were considerable differences in the apparent viscosity of gruels. The following viscosity-differentiating factors were pointed out: origin of starch contained in the flakes, varying contents of starch, hydrothermal treatments and flaking as well as interactions with the main chemical components that formed the matrix on cells of the cereal grain. Linear dependencies were determined between the maximum viscosity of gruels and the content of flakes in the aqueous mixture. Those dependencies make it easier to compare the viscosity of starch gruels or help choose the content level of starch material in food products, in which flakes are to replace starch thickeners.

It was found that the gruels made from barley flakes were characterized by the highest viscosity, whereas the barley flakes: by the highest content of β -glucans (3.79 %), a high content of starch (58.3 %), considerable amounts of protein (8.04 %), and a low content of dietary fibre (7.18 %) together with a substantial content of soluble fraction thereof (4.13 %). The wheat flakes had the lowest viscosity during gelatinization, but they contained the highest amount of protein (9.36 %), a high amount of insoluble fibre (7.18 %), and they contained hardly any β -glucans (0.11 %). The gruels made from rye flakes were characterized by a relatively low viscosity despite the fact that the rye flakes contained the highest amount of starch (66.1 %) accompanied by the highest content of fibre (13.09 %), the highest content of insoluble fraction of fibre (8.84 %), but the average content of β -glucans (1.62 %) and the lowest content of protein (4.30 %). The gruels from oat flakes had a relatively low viscosity, and the oat flakes contained: the lowest amount of starch (50.8 %), the highest fat content (6.47 %), a relatively high amount of protein (8.50 %) and β -glucans (3.23 %), and an average amount of fibre (8.20 %).

The conditions developed for performing comparative tests on the viscosity of gruels from instant cereal flakes might be applied to design functional food products, in which starch-based thickening agents could be replaced by cereal flakes.

Key words: oat, barley, rye, wheat, protein, fibre, β -glucans, apparent viscosity 

ANNA SZOSLAND-FALTYN, BEATA BARTODZIEJSKA, JOANNA KRÓLASIK,
BEATA PAZIAK-DOMAŃSKA

**ZASTOSOWANIE PRZYJAZNYCH DLA ŚRODOWISKA TECHNIK
DEZYNFEKCJI DO INAKTYWACJI *CAMPYLOBACTER SP.*
W MIĘSIE DROBIOWYM**

Streszczenie

Campylobacter uważany jest za jeden z głównych patogenów odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe, zwłaszcza po spożyciu mięsa drobiowego nieprawidłowo przechowywanego bądź poddanego niewłaściwej obróbce termicznej. Intensyfikuje się więc badania w kierunku poszukiwania technik dezynfekcyjnych bezpiecznych dla środowiska i skutecznie eliminujących ten patogen. W Zakładzie Jakości Żywności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Łodzi podjęto badania, których celem było określenie skuteczności technik dezynfekcji ozonem i promieniowaniem UV w inaktywacji bakterii z rodzaju *Campylobacter* sp. na podłożu hodowlanym, a następnie w mięsie drobiowym. Wykazano, że oba czynniki dezynfekcyjne powodowały zmniejszenie liczby bakterii *Campylobacter* sp. W metodzie płytkowej stopień redukcji bakterii wynosił powyżej 2 log jtk/ml, niezależnie od szczepu i czynnika dezynfekującego. Stopień redukcji bakterii w mięsie drobiowym po 30-minutowym wyjaławianiu wynosił od 0,19 log jtk/ml – szczep *C. coli* ATCC 43478 napromieniany UV do 1,16 log jtk/ml – szczep *C. jejuni* (izolat własny) po działaniu ozonem. W zależności od czynnika wyjaławiającego: ozonu lub UV stopień redukcji przyjmował średnio wartości odpowiednio: 1,0 i 0,3 log jtk/ml. Z uwagi na otrzymane wyniki, zastosowanie tylko jednej z badanych technik dezynfekcji we wstępnym procesie oczyszczania mięsa drobiowego nie byłoby działaniem rekomendowanym. Natomiast ich użycie z innymi technikami dekontaminacji mogłoby zwiększyć efektywność sanityzacji i poprawić bezpieczeństwo mikrobiologiczne mięsa drobiowego, dlatego też celowe jest prowadzenie dalszych prac w tym kierunku.

Słowa kluczowe: *Campylobacter*, mięso drobiowe, ozonowanie, napromienianie UV

Wprowadzenie

Campylobacter jest jednym z głównych patogenów odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe. W krajach Unii Europejskiej odnotowano 220 209 zachorowań na kampylobacteriozę w roku 2011 i 214 268 – w roku 2012 [1, 2]. Liczba zarejestrowanych przypadków tej odzwierzęcej choroby utrzymuje się stale na wysokim poziomie. Zatrucie spowodowane jest spożyciem głównie mięsa drobiowego oraz mleka i jego przetworów, przy czym występowanie *Campylobacter* spp. w produktach drobiowych dochodzi nawet do 90 % [3, 11]. Z tego względu intensyfikuje się badania w kierunku poszukiwania technik dezynfekcyjnych bezpiecznych dla środowiska i skutecznie usuwających ten patogen. Duże nadzieje wiąże się z niekonwencjonalnymi technikami dezynfekcji, w tym z wykorzystaniem ozonowania i odkażania promieniowaniem ultrafioletowym.

Technika ozonowania należy do metod ekologicznych, w przeciwieństwie do tradycyjnych metod z użyciem chloru lub innych związków chemicznych. W Europie ozon stosuje się od lat do dezynfekcji wody pitnej. Pierwszy raz zastosowano go w 1907 r. w Nicei [5]. W 1982 r. Urząd Kontroli Leków i Żywności USA (ang. *Food and Drug Administration* – FDA) wpisał ozon na listę substancji bezpiecznych, mających status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*), a w 2001 r. zatwierdził go jako środek biobójczy, w odniesieniu do wszystkich rodzajów żywności, włącznie z mięsem i drobiem [5, 6]. Wielu producentów żywności wykorzystuje ozon jako zamiennik chloru oraz innych substancji chemicznych, na różnych etapach procesów technologicznych, gdyż jedynym produktem resztkowym ozonu jest tlen.

Do ekologicznych technik dezynfekcji zalicza się promieniowanie ultrafioletowe, zwłaszcza przy długości fali $\lambda = 265$ nm, którego biobójcze działanie po raz pierwszy zostało wykorzystane na skalę przemysłową w 1910 r. w Marsylii, do dezynfekcji wody [4, 7]. Powszechnie wprowadzono tę technikę do dezynfekcji wody w Europie w latach 80. XX w. [18]. W USA zezwolono na stosowanie promieniowania UV do pasteryzacji soków owocowych w 2000 r. Uznano, że jest to metoda bezpieczna wtedy, gdy stopień redukcji wysokoopornych patogenów wyniesie 5 log. W 2002 r. rozszerzono aplikacyjny charakter promieniowania o dezynfekcję w procesach przetwórczych różnego typu żywności [17].

Ozonowanie i promieniowanie UV przejawiają biobójcze działanie zarówno w stosunku do bakterii, drożdży, pleśni, wirusów, pierwotniaków, jak i do spor bakterii i grzybów. Inaktywacja drobnoustrojów przez ozon polega na utlenianiu ważnych komponentów błon komórkowych oraz składników zawieszonych w cytoplazmie, podczas gdy promieniowanie UV oddziałuje na DNA, prowadząc do zahamowania procesów replikacji i transkrypcji, a w konsekwencji do uniemożliwienia namnażania organizmów. Obie techniki stosuje się do sanitzacji takich produktów, jak warzywa, owoce i ryby [9, 15].

Pomimo wszechstronnego stosowania obu technik do dezynfekcji różnorodnych produktów, istnieje niewiele doniesień dotyczących wykorzystania ich biobójczego działania w stosunku do bakterii *Campylobacter* sp. w mięsie drobiowym.

Celem pracy było określenie skuteczności technik dezynfekcji ozonem i promieniowaniem UV do inaktywacji bakterii z rodzaju *Campylobacter* sp. na podłożu hodowlanym, a następnie w mięsie drobiowym.

Material i metody badań

Material biologiczny stanowiły szczepy wzorcowe *Campylobacter coli* ATCC 43478 i *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 oraz 2 szczepy wyizolowane z mięsa drobiowego, których przynależność do rodzaju *Campylobacter* sp. została potwierdzona w testach biochemicznych zgodnie z normami oraz testem immunoenzymatycznym Singelpath® *Campylobacter* (Merck, Niemcy) [13, 14].

Material do badań stanowiły zakupione w handlu detalicznym filety z kurczaka bez skóry, w których nie stwierdzono obecności *Campylobacter* sp. zgodnie z normami [13, 14]. Próbkę mięsa drobiowego aseptycznie cięto na kawałki o masie 1 g, opalano w płomieniu palnika przez 15 s i studzono przez 5 min w temp. 20 ± 2 °C – zgodnie z metodą zaproponowaną przez Isohanni i Lyhs [8]. Następnie zanieczyszczano je zawiesiną *Campylobacter* sp. o gęstości podanej niżej i pozostawiano na 15 min w celu wnikięcia komórek bakterii. Tak przygotowane próbki mięsa poddawano działaniu ozonu oraz promieniowaniu UV. W doświadczeniu wykorzystano generator ozonu VOZ-01 (Viaken, Chiny), wytwarzający ozon dzięki wyładowaniu koronowemu, z wydajnością 2000 mg/h oraz niskoprężną rtęciową lampę wyładowczą TUV 15W/G 15 T8 (Philips, Holandia) o mocy 15 W, emitującą promieniowanie ultrafioletowe z maksimum przy $\lambda = 253,7$ nm (UV-C).

Szczepy *Campylobacter* sp. przechowywano w stanie zamrożenia w temp. -20 °C w kriobankach. Przed każdym eksperymentem szczepy uaktywniano przez pojedynczy pasaż na nieselektywnej pożywce Columbia agar z krwią, w atmosferze mikroaerofilnej, w temperaturze 42 ± 1 °C przez 48 h, stosując gotowe zestawy CampyGen™ firmy Oxoid Ltd, (Mitsubishi Gas Chemical Company Inc., Japonia). W celu sprawdzenia skuteczności bakteriobójczego działania ozonu oraz promieniowania UV w stosunku do szczepów *Campylobacter* sp., hodowano je w temp. 42 ± 1 °C przez 48 h na selektywnej pożywce CASA (bioMerieux, Francja) w atmosferze mikroaerofilnej. Następnie sporządzano zawiesinę wyjściową o gęstości 0,5 wg skali Mc Farlanda, co odpowiadało ok. 10^8 jtk/ml oraz szereg rozcieńczeń w postępie geometrycznym. Do kontaminacji płytek z podłożem hodowlanym CASA oraz próbek mięsa drobiowego stosowano zawiesinę o gęstości 10^2 jtk/ml. Wyniki liczby kolonii *Campylobacter* przedstawiono w logarytmach dziesiętnych liczby jednostek tworzących kolonię na 1ml zawiesiny.

*Sprawdzenie skuteczności bakteriobójczego działania ozonu oraz promieniowania UV w stosunku do szczepów *Campylobacter* sp.*

Na płytce z podłożem CASA, z naniesioną zawiesiną *Campylobacter* sp., działano ozonem lub promieniowaniem UV przez 10 min w temp. 20 ± 2 °C, w komorze o pojemności 2,6 m³. Kontrolę stanowiły płytki zaszczerpione bakteriami, niepoddawane dezynfekcji. Kontaminowane bakteriami *Campylobacter* sp. próbki mięsa drobiowego poddawano działaniu ozonu lub promieniowania UV przez 15 i 30 min, w temp. 20 ± 2 °C, w komorze o pojemności 2,6 m³. Próbę kontrolną stanowiły próbki mięsa zaszczerpione bakteriami, niepoddawane dezynfekcji. Następnie płytki inkubowano w warunkach opisanych wyżej.

*Oznaczanie liczby *Campylobacter* sp. w mięsie drobiowym*

Kontaminowane próbki mięsa, dezynfekowane ozonem lub promieniowaniem UV oraz niepoddane dezynfekcji, przenoszono do 9 ml zbuforowanej wody peptonowej i homogenizowano. Tak przygotowane próbki z odpowiednich rozcieńczeń posiewano na podłoże CASA i inkubowano zgodnie z metodą opisaną wyżej.

Eksperymenty powtarzano trzykrotnie.

Stopień redukcji *Campylobacter* sp. po działaniu ozonu i promieniowania UV obliczano z równania:

$$R = \log N_0 - \log N,$$

gdzie:

log N_0 – liczba bakterii bez czynnika dezynfekującego [log jtk/ml],

log N – liczba bakterii po ekspozycji na ozon lub promieniowanie UV [log jtk/ml].

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Obliczano wartości średnie i odchylenia standardowe oraz wykonano analizę wariancji ANOVA. Obliczeń dokonano w programie Excel 2007.

Wyniki i ich dyskusja

W pierwszym etapie badań, przeprowadzonym na zawieszynie czterech szczepów bakterii *Campylobacter* sp. o gęstości 10² jtk/ml, naniesionej na płytce z podłożem CASA po 10 min dezynfekcji ozonem i promieniowaniem UV, uzyskano pełne zahamowanie wzrostu bakterii, którego stopień redukcji wynosił powyżej 2 log jtk/ml (wyniki niepublikowane). Całkowita inaktywacja bakterii, w pierwszej części badań pozwoliła na przeprowadzenie eksperymentu na matrycy mięsnej. Założony w obu częściach badań poziom kontaminacji rzędu 10² jtk/ml był celowy, gdyż uwzględniał minimalną dawkę infekcyjną, która dla *Campylobacter* sp. jest bardzo niska i wynosi 500 ÷ 800 komórek. Zastosowanie wskazanego czasu dezynfekcji z pierwszej części eksperymentu, niezależnie od czynnika, było nieefektywne i nie powodowało inhibicji

wzrostu bakterii *Campylobacter* sp. w mięsie drobiowym. Dopiero wydłużenie czasu do 15 i 30 min spowodowało znaczącą redukcję liczby komórek bakterii. Wyniki tej części badań przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Stopień redukcji komórek bakterii z rodzaju *Campylobacter* sp. w mięsie drobiowym
Table 1. Reduction degree of *Campylobacter* sp. count in poultry meat

Szczepy z rodzaju <i>Campylobacter</i> Strains of <i>Campylobacter</i> genus	N ₀ [log jtk/ml]	N [log jtk/ml]	Stopień redukcji Degree of reduction [log jtk/ml]
Po zastosowaniu 15-minutowej dezynfekcji ozonem / After 15 min ozone disinfection			
<i>C. jejuni</i> ATCC 29428	1,92 ± 0,01	1,52 ± 0,01	0,40 ^a ± 0,01
<i>C. coli</i> ATCC 43478	1,94 ± 0,02	1,69 ± 0,01	0,25 ^a ± 0,01
<i>C. jejuni</i> (izolat własny)	2,17 ± 0,01	1,60 ± 0,02	0,57 ^a ± 0,02
<i>C. coli</i> (izolat własny)	2,16 ± 0,01	1,40 ± 0,01	0,76 ^a ± 0,01
Po zastosowaniu 30-minutowej dezynfekcji ozonem / After 30 min ozone disinfection			
<i>C. jejuni</i> ATCC 29428	1,92 ± 0,01	1,03 ± 0,01	0,89 ^b ± 0,01
<i>C. coli</i> ATCC 43478	1,94 ± 0,02	1,04 ± 0,01	0,90 ^b ± 0,01
<i>C. jejuni</i> (izolat własny)	2,17 ± 0,01	1,01 ± 0,02	1,16 ^b ± 0,02
<i>C. coli</i> (izolat własny)	2,16 ± 0,01	1,12 ± 0,04	1,04 ^b ± 0,03
Po zastosowaniu 15-minutowej dezynfekcji promieniowaniem UV After 15 min UV irradiation			
<i>C. jejuni</i> ATCC 29428	1,92 ± 0,01	1,82 ± 0,01	0,10 ^a ± 0,02
<i>C. coli</i> ATCC 43478	1,94 ± 0,02	1,89 ± 0,02	0,05 ^a ± 0,01
<i>C. jejuni</i> (izolat własny)	2,17 ± 0,01	1,91 ± 0,01	0,26 ^a ± 0,01
<i>C. coli</i> (izolat własny)	2,16 ± 0,01	2,00 ± 0,03	0,16 ^a ± 0,02
Po zastosowaniu 30-minutowej dezynfekcji promieniowaniem UV After 30 min UV irradiation			
<i>C. jejuni</i> ATCC 29428	1,92 ± 0,01	1,64 ± 0,01	0,28 ^b ± 0,01
<i>C. coli</i> ATCC 43478	1,94 ± 0,02	1,75 ± 0,01	0,19 ^b ± 0,01
<i>C. jejuni</i> (izolat własny)	2,17 ± 0,01	1,77 ± 0,01	0,40 ^b ± 0,01
<i>C. coli</i> (izolat własny)	2,16 ± 0,01	1,85 ± 0,02	0,31 ^b ± 0,02

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; N₀ – liczba bakterii bez czynnika dezynfekującego / count of bacteria without disinfectant agent; N – liczba bakterii po ekspozycji na ozon lub promieniowanie UV / count of bacteria after exposition to ozone or UV irradiation; a, b – wartości średnie dla poszczególnych szczepów, oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy p < 0,05 / mean values for individual strains, marked various letters are significantly different at p < 0.05.

Z przeprowadzonych badań wynika, że po 15-minutowej dezynfekcji mięsa drobiowego stopień redukcji bakterii kształtował się od 0,05 log jtk/ml – szczep *C. coli* ATCC 43478 poddany działaniu promieniowania UV do 0,76 log jtk/ml – szczep *C. coli* (izolat własny) poddany działaniu ozonu. Wydłużenie czasu dezynfekcji do 30 min, niezależnie od zastosowanego czynnika dezynfekującego, spowodowało statystycznie istotny ($p < 0,05$) wzrost stopnia redukcji, który wynosił od 0,19 log jtk/ml (szczep *C. coli* ATCC 43478 napromieniany UV) do 1,16 log jtk/ml (szczep *C. jejuni* (izolat własny) po wyjaławianiu ozonem). Najwrażliwszy na działanie ozonu był szczep *C. jejuni* (izolat własny), którego stopień redukcji po 30-minutowym odkażeniu tym czynnikiem wynosił 1,16 log jtk/ml (tab. 1). Zaobserwowano, że szczepy wzorcowe *Campylobacter* sp. były bardziej odporne na stosowane środki dezynfekujące niż dwa pozostałe izolaty, stanowiące naturalne zanieczyszczenie mięsa.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost konsumpcji mięsa drobiowego, który do 2019 r. ma się zwiększyć o 38 % w porównaniu z latami 2007 - 2009 [12]. Popyt na mięso drobiowe kształtuje jego korzystna wartość odżywcza, mała zawartość tłuszczu oraz dostępna cena. Należy jednak podkreślić, że mięso drobiowe jest jednym z szybciej psujących się surowców, zwłaszcza z powodu wysokiej ogólnej liczby drobnoustrojów. Nieprawidłowe przechowywanie bądź spożycie poddanego niewłaściwej obróbce termicznej mięsa drobiowego wiąże się z ryzykiem zakażenia pokarmowego takimi patogenami, jak: *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* i *Campylobacter* – najczęściej przytaczanym w literaturze czynnikiem etiologicznym zatruc, zwłaszcza po spożyciu mięsa drobiowego [16]. Opracowanie techniki skutecznie eliminującej tę bakterię, a równocześnie bezpiecznej dla środowiska, jest sprawą priorytetową.

W badaniach wykazano, że oba czynniki dezynfekcyjne spowodowały zmniejszenie liczby bakterii *Campylobacter* sp. W metodzie płytkowej stopień redukcji bakterii wynosił powyżej 2 log jtk/ml, niezależnie od szczepu i czynnika odkażającego, natomiast w mięsie drobiowym po 30-minutowym wyjaławianiu stwierdzono stopień redukcji od 0,19 log jtk/ml (szczep *C. coli* ATCC 43478 napromieniany UV) do 1,16 log jtk/ml (szczep *C. jejuni*, izolat własny, po działaniu ozonem). Mniejsza przeżywalność szczepów *Campylobacter* sp. na płytkach w porównaniu z mięsem drobiowym wynika z lepszej penetracji obu czynników dezynfekcyjnych. Porowata struktura mięsa umożliwia wnikanie komórek bakterii w głąb produktu i powoduje słabszą przenikalność środków dezynfekcyjnych. Wyniki badań własnych są zgodne z danymi przytaczanymi przez innych naukowców. Isohanni i Lyhs [8] wykazali stopień redukcji *Campylobacter jejuni* z powierzchni mięsa drobiowego po działaniu promieniowaniem UV na poziomie 0,7 log [8]. Muhlisin i wsp. [12], ozonując mięso drobiowe kontaminowane bakteriami *Salmonella* Typhimurium, otrzymali stopień redukcji bakterii rzędu 0,8 log jtk/g [12]. W niniejszych badaniach po 30-minutowym ozonowaniu mięsa drobiowego stopień redukcji bakterii *Campylobacter* sp. kształtował się średnio na poziomie

1,0 log jtk/ml, a po naświetlaniu promieniowaniem UV w tym samym czasie – 0,3 log jtk/ml. Lindqvist i Lindblad [10] wykazali, że już nieznaczny stopień redukcji *Campylobacter* sp. z powierzchni tuszek drobiowych (powyżej 1 log na tuszkę) wpływa znacząco na zmniejszenie ryzyka zatrucia pokarmowego u ludzi tym patogenem, stąd celowe jest prowadzenie dalszych prac w tym kierunku.

Wnioski

1. Techniki dezynfekcji ozonem i promieniowaniem UV powodują zmniejszenie liczby bakterii *Campylobacter* sp. zarówno w metodzie płytkowej, jak i w mięsie drobiowym, jednak przed wprowadzeniem ich do praktycznego stosowania należałoby zbadać ich utleniający wpływ na substancje odżywcze, w które zasobne jest mięso drobiowe.
2. Zastosowanie tylko jednej z badanych technik we wstępnym procesie oczyszczania mięsa drobiowego nie jest rekomendowanym działaniem.
3. Wykorzystanie badanych technik w połączeniu np. z fizycznymi metodami dekontaminacji, polegającymi na działaniu niskich lub wysokich temperatur może zwiększyć efektywność sanizacji i poprawić bezpieczeństwo mikrobiologiczne mięsa drobiowego.

Badania zostały sfinansowane ze środków tematu badawczego: „Badanie aktywności metabolicznej szczepów należących do rodzaju Campylobacter, izolowanych z surowego mięsa drobiowego”. Badania statutowe Zakładu Jakości Żywności w Łodzi, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – nr tematu: 500-01-ZJ-03.

Literatura

- [1] EFSA: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA J. 2013, **4** (11), 3129.
- [2] EFSA: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA J. 2014, **2** (12), 3547.
- [3] Gharst G., Oyarzabal O.A., Hussain S.K.: Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. J. Microbiol. Methods, 2013, **95**, 84-92.
- [4] Gomez-Lopez V., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F.: Pulsed light for food decontamination: A review. Trends Food Sci. Technol., 2007, **18**, 464-473.
- [5] Goncalves A.A.: Ozone – an emerging technology for the seafood industry. Braz. Arch. Biol. Technol., 2009, **6** (52), 1527-1539.
- [6] Guzel-Seydim Z.B., Green A.K., Seydim A.C.: Use of ozone in the food industry. Lebensm. Wiss. Technol., 2004, **37**, 453-460.
- [7] Hijnen W.A.M., Beerendonk E.F., Medema G.J.: Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. Water Res., 2006, **40**, 3-22.

- [8] Isohanni P.M., Lyhs U.: Use of ultraviolet irradiation to reduce *Campylobacter jejuni* on broiler meat. Poultry Sci., 2009, **3 (88)**, 661-668.
- [9] Khadre M.A., Yousef A.E., Kim J.-G.: Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. J. Food Sci., 2001, **9 (66)**, 131-138.
- [10] Lindqvist R., Lindblad M.: Quantitative risk assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. and cross-contamination during handling of raw broiler chickens evaluating strategies at the producer level to reduce human campylobacteriosis in Sweden. Inter. J. Food Microbiol., 2008, **121**, 41-52.
- [11] Moran L., Scates P., Madden R.H.: Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. J. Food Protect., 2009, **9 (72)**, 1830-1835.
- [12] Muhlisin M., Youngjae Ch., Ji Hye Ch., Tae-Wook H., Sung Ki L.: Bacterial counts and oxidative properties of chicken breast inoculated with *Salmonella Typhimurium* exposed to gaseous ozone. J. Food Safety, 2014, **1 (35)**, 137-144, DOI: 10.1111/jfs.12161.
- [13] PN-EN ISO 10272-1:2007 + Ap1:2008. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 1: Metoda wykrywania.
- [14] PKN-ISO/TS 10272-2:2008. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 2: Metoda liczenia kolonii
- [15] Selma M.V., Allende A., Lopez-Galvez F., Conesa M.A., Gil M.I.: Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry. Food Microbiol., 2008, **25**, 809-814.
- [16] Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a food-borne pathogen: A review. Front. Microbiol., 2011, **2**, 1-12.
- [17] United States Food and Drug Administration: Ultraviolet radiation for the processing and treatment of food. Code of Federal Regulations 2002, 21 Part 179.39.
- [18] Włodyka-Bergier A., Bergier T.: Wpływ dezynfekcji wody promieniami nadfioletowymi na potencjał tworzenia halogenowych produktów chlorowania w sieci wodociągowej. Ochrona Środowiska, 2013, **3 (35)**, 53-57.

APPLICATION OF ENVIRONMENTALLY FRIENDLY TECHNIQUES TO INACTIVATE *CAMPYLOBACTER* SP. IN POULTRY MEAT

S u m m a r y

Campylobacter is considered to be one of the major pathogens responsible for food poisoning that occurs particularly after consuming the incorrectly stored or improperly thermally treated poultry meat. Thus, research studies are intensified that are targeted at searching for disinfection techniques, which are environmentally safe and effectively eliminate that pathogen. The Department of Food Quality at the Institute of Agricultural and Food Biotechnology in Łódź undertook research the objective of which was to determine the effectiveness of environmentally friendly disinfection with the use of ozone and ultraviolet irradiation to inactivate *Campylobacter* sp. inoculated on agar plates, and, then, in poultry meat. It was proved that the two disinfecting agents caused the counts of *Campylobacter* spp. to decrease. When applying the method with agar plates, the reduction degree of bacteria was above 2 log cfu/ml regardless of the strain and sanitising agent. After 30 minutes of sterilizing the poultry meat, the reduction degree of bacteria therein ranged from 0.19 log cfu/ml as for the strain of UV irradiated *C. coli* ATCC 43478 to 1.16 log cfu/ml as for the ozone-treated *C. jejuni* (the authors' own strain). Depending on the disinfecting agent: ozone or UV light, the mean degree of reduction was, respectively: 1.0 and 0.3 log cfu/ml UV. Considering the results obtained, it would not be recommended to apply only one of the disinfection methods tested to the initial cleansing process of poultry. However, the use of ozonation and UV irradiation together with

other decontamination techniques could increase the effectiveness of sanitisation and improve the microbiological safety of poultry meat; therefore, it is advisable to continue the research in this field.

Key words: *Campylobacter*, poultry meat, ozonation, UV irradiation ☒

BOŻENA STODOLAK, ANNA STARZYŃSKA-JANISZEWSKA,
AGNIESZKA WIKIERA

WPLYW DODATKU WYTŁOKÓW LNIANYCH NA POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY TEMPE Z NASION ŁĘDŹWIANU

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu dodatku wytlóków z nasion lnu, jako kosubstratu nasion lędźwianu w fermentacji typu tempe, na potencjał antyoksydacyjny otrzymanych produktów.

Sporządzono 5 rodzajów tempe: z samych nasion lędźwianu oraz z dodatkiem 5, 15, 25 i 35 % wytlóków lnianych. Otrzymane produkty zliofilizowano, odfuszczone, a następnie sporządzono wodne i wodno-acetonowe (1 : 1, v/v) ekstrakty, w których oznaczono zawartość fenoli, aktywność antyrodnikową (ABTS⁺⁺ i [•]OH lub DPPH[•]) oraz zdolność do redukcji.

Zawartość fenoli w ekstraktach wodnych była o 20 ÷ 80 % większa w przypadku produktów zawierających wytlóki lniane w porównaniu z tempe z samych nasion lędźwianu. Ekstrakty te charakteryzowały się również o 50 ÷ 100 % większą aktywnością względem rodnika ABTS⁺⁺. Stosunkowo niewielki, 15-procentowy dodatek wytlóków do podstawowego substratu fermentacji spowodował również maksymalny wzrost zdolności do wygaszania rodnika hydroksylowego. Ekstrakty wodne z produktów zawierających 35-procentowy dodatek wytlóków wykazywały o 40 % wyższą i statystycznie istotną ($p < 0,05$) zdolność do redukcji niż tempe z samych nasion lędźwianu. Zawartość fenoli w ekstraktach wodno-acetonowych była 0,5 ÷ 3,5 razy większa w przypadku produktów z dodatkiem wytlóków lnianych. Ekstrakty te wykazywały również 1,5 ÷ 10 razy większą aktywność względem rodnika DPPH[•] oraz 1,7 ÷ 3 razy wyższą zdolność do redukcji w porównaniu z produktem powstałym po fermentacji samych nasion lędźwianu. Aktywność antyoksydacyjna była skorelowana z zawartością fenoli, niezależnie od rodzaju zastosowanego ekstrahenta.

Słowa kluczowe: wytlóki lniane, lędźwian siewny, tempe, fenole rozpuszczalne, aktywność antyrodnikowa, zdolność do redukcji

Wprowadzenie

Nasiona lnu oleistego charakteryzują się unikatowym składem, który stwarza możliwość wykorzystania ich jako komponentu żywności funkcjonalnej. Zawierają $10,5 \div 31,0$ % białka o składzie aminokwasowym porównywalnym z białkiem nasion soi [14], około 40 % tłuszczu i 30 % błonnika pokarmowego. Rozpuszczalny błonnik nasion lnu wykazuje działanie hipocholesterolemiczne, a ponadto zmniejsza wchłanianie glukozy do krwi [3]. Olej nasion lnu bogaty jest w kwas α -linolenowy (ALA), który może stanowić, zależnie od odmiany, $50 \div 70$ % puli wszystkich kwasów tłuszczowych [7]. Dobroczynność spożywania nasion lnu i oleju lnianego wykazano w badaniach z udziałem zwierząt i ludzi [5]. Nasiona lnu są szczególnie bogatym źródłem lignanu secoisolariciresinolu (SDG), który w jelicie grubym przekształcany jest przez bakterie do enterodiolu i enterolaktonu [25]. SDG, jego aglikon SECO oraz pochodzące z nich lignany wykazują aktywność antyoksydacyjną [6, 16] i przeciwrakową [5, 25]. Lignany z nasion lnu mogą odgrywać rolę w obniżaniu ryzyka zachorowalności na choroby układu sercowo-naczyniowego [17]. Ponadto SDG wykazuje działanie przeciwcukrzycowe [5, 28].

Wytłoki lniane (makuchy) stanowią produkt odpadowy po ekstrakcji oleju z nasion. Jadalne makuchy (np. z nasion soi, słonecznika, rzepaku, orzechów ziemnych) o wysokiej wartości odżywczej są zwykle przeznaczane na paszę dla zwierząt, głównie dla przeżuwaczy i ryb [18]. Możliwe jest jednak wykorzystanie wytłoków lnianych jako komponentu produktów spożywczych dla ludzi. Pozyskane z nich izolaty białka oraz ich hydrolizaty o określonych właściwościach mogą służyć jako składniki żywności funkcjonalnej [10, 26, 27]. Ogunronbi i wsp. [13] wykorzystali wytłoki z ciemnobrązowych nasion lnu jako zamiennik mąki do wypieku chlebów, a Nowicka i wsp. [12] zastosowali wytłoki lniane jako komponent przecieru aroniowego. Ciekawą alternatywą zagospodarowania tego odpadu może być zastosowanie wytłoków lnianych jako kosubstratu fermentacji typu tempe. Wyniki wcześniejszych doświadczeń wskazują, że w wyniku fermentacji nasion lędźwianu z dodatkiem makuchów lnianych przy udziale szczepu *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* uzyskuje się produkt o właściwościach funkcjonalnych. Dodatek nawet niewielkiej ilości makuchów lnianych (5 % m/m) do podstawowego substratu, jaki stanowiły nasiona lędźwianu, pozwolił na uzyskanie tempe wzbogaconego w kwas $n-3$ linolenowy. Tłuszcz tego tempe charakteryzował się znacznie korzystniejszym stosunkiem kwasów $n-6/n-3$ w porównaniu z tempe z samych nasion lędźwianu (2,5/1 i 11/1 przy pożądanym od 1/1 do 4/1). Ponadto dodatek makuchów lnianych nie wpływał na zmniejszenie zawartości białka, jak i na obniżenie jego strawności szacowanej metodą *in vitro* [22].

Celem pracy było określenie wpływu dodatku wytłoków lnianych, jako kosubstratu nasion lędźwianu w fermentacji typu tempe, na potencjał antyoksydacyjny otrzymanych produktów.

Material i metody badań

Material doświadczalny

Substratami fermentacji były nasiona lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus*) odmiany 'Krab', zakupione w Hodowli i Nasiennictwie Ogrodniczym Spółnia (Nochowo) oraz wytloki (makuchy) po tłoczeniu oleju lnianego na zimno, otrzymane z Zakładu Tłoczenia Olejów Roślinnych i Produkcji Kosmetyków Efavit (Poznań).

Szczep *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (Institute for Microbial, Taichung, Taiwan) hodowano na agarze brzezkowym. Zarodniki pozyskiwano z dwunastodniowych skosów, stosując sterylne roztwory soli fizjologicznej z dodatkiem peptonu (0,01 g/l) i Tweenu 80 (0,1 ml/l). Zawiesinę zarodników sączone trzykrotnie przez filtry o średnicy porów 11 µm (Nylon Net Filtres, Millipore) w celu pozbycia się fragmentów grzybni. Gęstość zawiesiny szacowano metodą liczenia zarodników w komorze Thoma.

Wytłoki lniane mieszano z taką objętością 5-procentowego kwasu mlekowego, aby zawartość wody w mieszaninie wynosiła 40 %, a pH zawierało się w zakresie 4 ÷ 5. Następnie mieszaninę autoklawowano (temp. 121 °C, 20 min). Po sterylizacji makuchy chłodzono do temp. 20 ± 2 °C.

Nasiona lędźwianu myto, osuszano, gotowano w wodzie przez 30 min, a następnie moczone przez 18 h. Po moczeniu nasiona obłuskiwano ręcznie, dzieląc je jednocześnie na połówki i gotowano ponownie przez 15 min w wodzie zakwaszonej kwasem mlekowym do pH 4,5 ÷ 5,0. Po gotowaniu nasiona odsączano, osuszano i chłodzono do temp. < 30 °C.

Nasiona lędźwianu oraz nasiona lędźwianu z dodatkiem wytlóków lnianych mieszano z zarodnikami *Rhizopus microsporus* ($1,2 \cdot 10^6$ zarodników na 60 g wyjściowej masy substratu). Zainokulowany materiał wkładano do perforowanych woreczków foliowych i formowano zwarty pakiecik o wysokości ok. 3 cm. Fermentację prowadzono w temp. 37 °C przez 2 h (indukcja kiełkowania zarodników), następnie – w 30 °C przez 27 h do uzyskania jednolicie przerośniętych i porośniętych białą grzybnią próbek, bez pierwszych oznak zarodnikowania. Proces zatrzymywano przez 10-minutowe gotowanie na parze, a następnie materiał liofilizowano (liofilizator Alpha, model 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Niemcy, ciśnienie < 1 mbar, 24 h).

Przygotowano 5 rodzajów produktów: tempe z lędźwianu oraz tempe z lędźwianu z dodatkiem 5, 15, 25 i 35 % (m/m) makuchów lnianych (każdy w trzech powtórzeniach). Materiał z trzech powtórzeń mieszano przed liofilizacją.

Metody badań

Przed wykonaniem analiz zliofilizowany materiał odtłuszczano heksanem w aparacie Soxhleta.

Suchą masę (s.m.) oznaczano za pomocą wagosuszarki (WPS 110S, Radwag, Radom).

Fenole rozpuszczalne [g/kg s.m.] oznaczano metodą według Swain i Hillis [24] w ekstraktach wodnych (0,1 mol/l bufor fosforanowy, pH 7,4) o stężeniu 0,5 g w 15 ml oraz w ekstraktach wodno-acetonowych (woda : aceton 1 : 1 v/v) o stężeniu 1 g w 20 ml. Jako standard zastosowano kwas galusowy o stężeniach 0,1 ÷ 1,5 mg %.

Aktywność neutralizacji wolnych rodników przez otrzymane produkty tempe oznaczano względem:

- rodnika hydroksylowego, według Marambe i wsp. [8], w ekstraktach wodnych (0,02 mol/l bufor fosforanowy, pH 7,4). Aktywność antyrodnikową wyrażano jako IC_{50} , co oznacza ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt o zdolności do wygaszania 50 % rodnika hydroksylowego wygenerowanego w warunkach oznaczenia. Niższa wartość IC_{50} oznacza wyższą aktywność przeciwrodnikową;
- rodnika $ABTS^{++}$ (kwas 2,2'-azino-bis (3-etylbentotiazolino-6-sulfonowy)), metodą opisaną przez Starzyńską-Janiszewską i wsp. [21], w ekstraktach wodnych (0,1 mol/l bufor fosforanowy, pH 7,4). Aktywność antyrodnikową wyrażano w ekwiwalentach troloksu [μ mole troloksu/g s.m.] i jako IC_{50} , co oznacza ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt o zdolności do wygaszania 50 % rodników $ABTS^{++}$ w warunkach oznaczenia;
- rodnika $DPPH^{\bullet}$ (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl), metodę opisaną przez Pekkarinena i wsp. [15], w ekstraktach wodno-acetonowych (woda : aceton – 1 : 1 v/v). Aktywność neutralizacji $DPPH^{\bullet}$ wyrażano w μ molach troloksu/g s.m.

Ponadto oznaczano zdolność do redukcji, według Ardestani i Yazdanparast [2], w obu rodzajach ekstraktów. Zdolność do redukcji ($RP_{0,5}$) zdefiniowano jako ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt, wywołujący wzrost absorbancji mierzonej przy długości fali 700 nm o 0,5. Mniejsza wartość $RP_{0,5}$ wskazuje na wyższą zdolność do redukcji.

Ekstrakty z poszczególnych próbek wykonano w dwóch powtórzeniach, natomiast każdą analizę – w 4 lub 6 powtórzeniach.

Wyniki opracowano statystycznie za pomocą programu Statistica wer. 10. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji. W celu porównania wartości średnich zastosowano test NIR ($p < 0,05$). Wyliczono również współczynniki korelacji ($p < 0,05$) pomiędzy zawartością fenoli i aktywnością antyrodnikową badanego materiału.

Wyniki i dyskusja

Zawartość fenoli w ekstrakcie otrzymanym po wymywaniu tempe lędźwianowego buforem fosforanowym wynosiła 2,12 g/kg. Już niewielki dodatek (5 % m/m) wytlóków lnianych spowodował istotny ($p < 0,05$), około 20-procentowy wzrost zawartości fenoli w badanym materiale. W przypadku tempe z największym udziałem wytlóków oznaczony poziom fenoli był wyższy o ponad 80 % niż w produkcie z samych nasion lędźwianu (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość fenoli i aktywność antyoksydacyjna ekstraktów wodnych z tempe
Table 1. Content of phenols and antioxidant activity of aqueous extracts from tempeh

Rodzaj tempe Type of tempeh	Suma fenoli Total phenols [g/kg s.m.] [g/kg dm]	ABTS ^{•+} [μmole troloksu/g s.m.] [μmol trolox/g dm]	ABTS ^{•+} IC ₅₀	•OH IC ₅₀	Zdolność do redukcji RP _{0,5} Reducing power RP _{0,5}
T0	2,12 ^a ± 0,05	21,38 ^a ± 0,52	1,40 ^c ± 0,034	5,04 ^c ± 0,30	43,73 ^d ± 0,36
T5	2,60 ± 0,01 b	32,36 ^b ± 0,94	1,13 ^d ± 0,028	5,66 ^d ± 0,04	36,47 ^c ± 0,48
T15	3,41 ± 0,01 c	39,46 ^c ± 0,64	1,01 ^b ± 0,013	3,98 ^a ± 0,19	28,53 ^b ± 0,38
T25	3,39 ± 0,02 c	38,81 ^c ± 0,40	1,04 ^c ± 0,012	4,8 ^b ± 0,17	28,31 ^b ± 0,62
T35	3,92 ± 0,03 d	45,39 ^d ± 1,02	0,93 ^a ± 0,011	3,92 ^a ± 0,07	27,32 ^a ± 0,73

Objaśnienia: / Explanatory notes:

T0 – tempe bez dodatku wytlóków lnianych (0 % makuchów) / tempeh without flaxseed oil cake added; T35 – tempe z 35-procentowym dodatkiem wytlóków lnianych / tempeh with 35 % of flaxseed oil cake added; IC₅₀ – ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt o aktywności wygaszania 50 % rodników ABTS^{•+}/ •OH w warunkach oznaczenia / quantity of sample (mg) used to make extract able to scavenge 50% of ABTS^{•+}/ •OH under the assay conditions; RP_{0,5} – ilość mg próbki, z której sporządzono ekstrakt wywołujący wzrost absorbancji mierzonej λ = 700 nm o 0,5 / quantity of sample (mg) used to make extract that causes the increase of 0.5 in absorbance measured at λ = 700 nm. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; wartości średnie w kolumnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$ / mean values in column and denoted by different letters differ statistically significantly ($p < 0.05$).

Wzrost zawartości fenoli związany ze zmianą składu substratów fermentacji był skorelowany z aktywnością antyrodnikową i zdolnością do redukcji oznaczoną w ekstraktach wodnych. Istotne współczynniki korelacji Pearsona ($p < 0,05$) wskazują na silną zależność badanych parametrów (tab. 2).

Dodatek wytlóków do nasion lędźwianu spowodował istotny wzrost aktywności ekstraktów wodnych względem wolnego rodnika ABTS^{•+}. Produkty z dodatkiem wytlóków lnianych odznaczały się większą wartością ekwiwalentów troloksu – od 50 % (T5) do ponad 100 % (T35) – niż tempe z samych nasion lędźwianu (tab. 1). Tempe z 15-procentowym udziałem makuchów (T15) wykazywał istotnie ($p < 0,05$) większą aktywność wygaszania rodnika hydroksylogowego niż produkt otrzymany tylko z nasion lędźwianu (T0). Najmniejszą dawkę rodników hydroksylogowych wygenerowanych

w warunkach metody o aktywności neutralizacji 50 % (3,92 mg s.m. stanowiące 4/5 IC₅₀ próbki T0) oznaczono w przypadku tempe z największym udziałem wyłoków. Nie różniła się ona jednak istotnie ($p < 0,05$) od wartości próbki T15. Oznacza to, że stosunkowo niewielki dodatek wyłoków lnianych (15 %) do podstawowego substratu fermentacji spowodował maksymalny wzrost potencjału wygaszania OH[•] w warunkach doświadczenia (tab. 1). Ekstrakty wodne produktów otrzymanych na bazie nasion lędźwianu i wyłoków lnianych charakteryzowały się również istotnie ($p < 0,05$) wyższą zdolnością do redukcji niż ekstrakt z T0. Wskaźnik RP_{0,5} był tym niższy, im większy był udział wyłoków z nasion lnu w substracie poddanym fermentacji. W przypadku T35 dawka próbki (mg s.m.) potrzebna do uzyskania absorbancji równej 0,5 była o 40 % mniejsza niż w tempe z samych nasion lędźwianu (T0) (tab. 1).

Tabela 2. Współczynniki korelacji Pearsona między zawartością fenoli i aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów wodnych z tempe

Table 2. Coefficients of Pearson's correlation between content of phenols and antioxidant activity of aqueous extracts from tempeh

Wyszczególnienie / Item	ABTS ^{•+}	ABTS ^{•+} IC ₅₀	•OH IC ₅₀	RP _{0,5}
Suma fenoli / Total phenols	0,984	-0,943	-0,799	-0,959
ABTS ^{•+}	-	-0,981	-0,728	-0,968
ABTS ^{•+} IC ₅₀	-	-	0,653	0,955
•OH IC ₅₀	-	-	-	0,717

Zawartość sumy fenoli wyekstrahowanych mieszaniną wody i acetonu (1 : 1 v/v) z tempe lędźwianowego wynosiła 1,83 g/kg s.m. Dodatek 5 % wyłoków lnianych do podstawowego substratu procesu spowodował wzrost zawartości fenoli o 50 %. Natomiast w produkcie zawierającym 35 % makuchów stwierdzono ponad 3,5-krotnie większą zawartość rozpuszczalnych fenoli niż w T0 (tab. 3).

Tabela 3. Zawartość fenoli i aktywność antyoksydacyjna ekstraktów wodno-acetonowych

Table 3. Content of phenols and antioxidant activity of aqueous-acetone extracts

Rodzaj tempe Type of tempeh	Suma fenoli / Total phenols [g/kg s.m.] / [g/kg dm]	DPPH [•] [μmole troloksu/g s.m.] [μmol trolox/g dm]	Zdolność do redukcji RP _{0,5} Reducing power RP _{0,5}
T0	1,83 ^a ± 0,021	2,04 ^a ± 0,25	63,57 ^e ± 1,90
T5	2,78 ^b ± 0,024	3,00 ^b ± 0,35	37,73 ^d ± 0,19
T15	4,41 ^c ± 0,084	11,14 ^c ± 0,22	26,95 ^c ± 0,24
T25	5,33 ^d ± 0,072	15,47 ^d ± 0,72	22,80 ^b ± 0,33
T35	6,79 ^e ± 0,12	20,66 ^e ± 0,67	18,84 ^a ± 0,51

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

Zmiany zawartości związków fenolowych w badanych ekstraktach były wysoko skorelowane z aktywnością antyrodnikową i zdolnością do redukcji (istotne współczynniki korelacji Pearsona wynosiły odpowiednio: $r = 0,988$ i $-0,904$, $p < 0,05$) – tab. 4.

Dodatek wyłoków lnianych do nasion łądzwianu spowodował istotny wzrost aktywności ekstraktów wodno-acetonowych względem stabilnego rodnika DPPH*. Aktywność ta, wyrażona w postaci ekwiwalentów troloksu [$\mu\text{mol/g s.m.}$] była od 1,5 (T5) do 10 razy (T35) wyższa w porównaniu z tempe z samych nasion łądzwianu.

Wraz ze wzrostem udziału wyłoków lnianych w fermentowanym substracie wzrastała też istotnie ($p < 0,05$) zdolność do redukcji oznaczona w ekstraktach wodno-acetonowych. $RP_{0,5}$ próbki T5 było 1,7 razy niższe, a próbki T35 – ponad 3 razy niższe w porównaniu z $RP_{0,5}$ próbki T0.

Tabela 4. Współczynniki korelacji Pearsona między zawartością fenoli i aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów wodno-acetonowych z tempe

Table 4. Coefficients of Pearson's correlation between phenols and antioxidant activity of aqueous-acetone extracts from tempeh

Wyszczególnienie / Item	DPPH*	$RP_{0,5}$
Suma fenoli / Total phenols	0,988	-0,904
DPPH*		-0,852

Zawartość fenoli w tempe łądzwianowym była zgodna z wcześniejszymi oznaczeniami autorów [20]. Dodatek wyłoków lnianych, zawierających wyjściowo 9,6 g/kg s.m. fenoli rozpuszczalnych (dane niepublikowane), do podstawowego substratu fermentacji, spowodował istotną zmianę zawartości tych związków w tempe. Niezależnie od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika (bufor, woda i aceton w stosunku 1 : 1) zawartość sumy fenoli zwiększała się wraz ze wzrostem udziału wyłoków w produkcie. Pomimo braku statystycznego porównania danych uzyskanych z dwóch różnych ekstraktów można stwierdzić, że rozpuszczalne związki fenolowe łatwiej przechodziły do fazy wodno-acetonowej. Wiadomo, że podatność fenoli na ekstrakcję jest związana zarówno z ich strukturą chemiczną, lokalizacją w tkance roślinnej, jak i rodzajem materiału. Ilość związków fenolowych oznaczana w danym materiale w dużej mierze zależy od sposobu ekstrakcji [1, 19]. W niniejszej pracy zdecydowano się na ekstrakcję mieszaniną wody z acetonem (1 : 1 v/v) na podstawie wyników badań, które przedstawili Xu i wsp. [29] oraz wyników własnych, wstępnych doświadczeń (dane niepublikowane), które dowodziły większej skuteczności takiego ekstrahenta w izolowaniu rozpuszczalnych związków fenolowych obecnych w produktach tempe.

W celu pełniejszej oceny potencjału antyoksydacyjnego zastosowano kilka różnych testów. Niezależnie od rodzajów ekstraktu, aktywność wygaszania wolnych rodników (ABTS^{•+} i [•]OH lub DPPH[•]) oraz zdolność do redukcji były silnie skorelowane z poziomem fenoli. Podobne obserwacje poczynili Anwar i Przybylski [1], którzy badali aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z nasion lnu.

Tempe z dodatkiem wytlóków lnianych, charakteryzujący się zarówno większą zawartością fenoli rozpuszczalnych, jak i większą aktywnością antyoksydacyjną w porównaniu z tempe lędźwianowym, może poszerzyć asortyment żywności o cechach funkcjonalnych, wzbogacanej w związki bioaktywne pochodzenia naturalnego [4]. Przykładem takich produktów mogą być chleby wypiekane z dodatkiem nasion lnu [11, 23, 9]. W przypadku tempe oznaczone zawartości fenoli, jak i ich antyoksydacyjna aktywność, wynikały nie tylko ze składu substratów, ale też z działania metabolicznego pleśni w czasie fermentacji [21].

Wnioski

1. Dodatek wytlóków lnianych do nasion lędźwianu miał istotny wpływ na zawartość fenoli i aktywność antyoksydacyjną produktów tempe, otrzymanych z tych surowców.
2. Dodatek wytlóków lnianych w ilości 5 ÷ 35 % do nasion lędźwianu wpłynął na wzrost zawartości fenoli rozpuszczalnych w ekstraktach wodnych o 20 ÷ 80 %, a w ekstraktach wodno-acetonowych – o 50 ÷ 270 %.
3. Produkty tempe, zawierające wytloki lniane, charakteryzowały się znacząco wyższą aktywnością względem wolnych rodników ABTS^{•+}, [•]OH, DPPH[•] i większą zdolnością do redukcji w porównaniu z tempe lędźwianowym.
4. Aktywność antyrodnikowa i zdolność do redukcji były wysoko skorelowane z zawartością rozpuszczalnych związków fenolowych w tempe.

Literatura

- [1] Anwar F., Przybylski R.: Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., 2012, **3** (11), 293-301.
- [2] Ardestani A., Yazdanparast R.: Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem., 2007, **1** (104), 21-29.
- [3] Bloedon L.T., Szapary P.O.: Flaxseed and cardiovascular risk. Nutrition Reviews, 2004, **62**, 18- 27.
- [4] Dziki D., Różyło R., Gawlik- Dziki U., Świeca M.: Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. Trends Food Sci. Technol., 2014, **1** (40), 48-61.
- [5] Hall III C., Tulbek M.C., Xu Y.: Flaxseed. In: Advances in food and nutrition research. Ed. S.L. Taylor. Elsevier Academic Press, San Diego, 2006, pp. 2-96.

- [6] Hu C., Yuan Y.Y., Kitts D.D.: Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone *in vitro*. Food Chem. Toxicol., 2007, **45**, 2219-2227.
- [7] Łukaszewicz M., Szopa J., Krasowska A.: Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants. Food Chem., 2004, **88**, 225-231.
- [8] Marambe P.W.M.L.H.K., Shand P.J., Wanasundara J.P.D.: An *in-vitro* investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. J. Am. Oil Chem. Soc., 2008, **12 (85)**, 1155-1164.
- [9] Meral R., Dogan I.S.: Quality and antioxidant activity of bread fortified with flaxseed. Ital. J. Food Sci., 2013, **25**, 51-56.
- [10] Mueller K., Eisner P., Yoshie- Stark Y., Nakada R., Kirchhoff E.: Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). J. Food Eng., 2010, **98**, 453-460.
- [11] Muir A.D., Westcott N.D.: Quantitation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside in baked goods containing flax seed or flax meal. J. Agric. Food Chem., 2000, **9 (48)**, 4048-4052.
- [12] Nowicka P., Teleszko M., Wojdyło A., Oszmiański J.: Ocena walorów sensorycznych i wartości żywieniowej przecieru aroniowego z dodatkiem wyłoków z lnu i suszonych liści stewii. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2014, **1 (92)**, 124-136.
- [13] Ogunronbi O., Jooste P.J., Abu J.O., van Der Merwe B.: Chemical composition, storage stability and effect of cold- pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. J. Food Process. Pres., 2011, **35**, 64-79.
- [14] Oomah B.D., Mazza G.: Flaxseed proteins- a review. Food Chem., 1993, **48**, 109-114.
- [15] Pekkarinen S.S., Stöckmann H., Schwarz K., Heinonen M.I., Hopia A.I.: Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. J. Agric. Food Chem., 1999, **8 (47)**, 3036-3043.
- [16] Prasad K.: Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside- derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol and enterolactone. Int. J. Angiol., 2000, **9**, 220-225.
- [17] Prasad K.: Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. Atherosclerosis, 2005, **179**, 269-275.
- [18] Ramachandran S., Singh S.K., Larroche C., Soccol C.R., Pandey A.: Oil cakes and their biotechnological applications - A review. Bioresource Technol., 2007, **98**, 2000- 2009.
- [19] Remiszewski M., Przygoński K., Kulczak M., Jeżewska M.: Optymalizacja układu ekstrakcyjnego i ocena właściwości przeciwutleniających nasion wybranych roślin strączkowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2006, **1 (46) Supl.**, 127-135.
- [20] Starzyńska- Janiszewska A., Stodolak B., Duliński R., Mickowska B.: The influence of inoculum composition on selected bioactive and nutritional parameters of grass pea tempeh obtained by mixed-culture fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* strains. Food Sci. Tech. Int., 2012, **2 (18)**, 113-122.
- [21] Starzyńska-Janiszewska A., Stodolak B., Jamróz M.: Antioxidant properties of extracts from fermented and cooked seeds of Polish cultivars of *Lathyrus sativus*. Food Chem., 2008, **2 (109)**, 285-292.
- [22] Stodolak B., Starzyńska- Janiszewska A., Mickowska B.: Effect of flaxseed oil- cake addition on the nutritional value of grass pea tempeh. Food Sci. Technol. Res., 2013, **6 (19)**, 1107-1114.
- [23] Strandas C., Kamal- Eldin A., Andersson R., Aman P.: Phenolic glucosides in bread containing flaxseed. Food Chem., 2008, **110**, 997-999.
- [24] Swain T., Hillis W.E.: The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric., 1959, **1 (10)**, 63-68.

- [25] Touré A., Xueming X.: Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bioactive components, and health benefits. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2010, **9**, 261-269.
- [26] Udenigwe C.C., Aluko R.E.: Antioxidant and angiotensin converting enzyme- inhibitory properties of flaxseed protein- derived high Fischer ratio peptide mixture. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 4762-4768.
- [27] Udenigwe C.C., Aluko R.E.: Multifunctional cationic peptide fractions from flaxseed protein hydrolysates. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2012, **67**, 1-9.
- [28] Westcott N.D., Muir A.D.: Flax seed lignan in disease prevention and health promotion. *Phytoch. Rev.*, 2003, **2**, 401-417.
- [29] Xu B.J., Chang S.K.C.: A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.*, 2007, **2 (72)**, 159-166.

EFFECT OF FLAXSEED OIL CAKE ADDITION ON ANTIOXIDANT POTENTIAL OF GRASS PEA TEMPEH

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the effect of flaxseed oil cake, added to grass pea seeds as a tempeh-type fermentation co-substrate, on the antioxidant potential of the products produced.

Five types of tempeh were made: one type made from grass pea seeds only and 4 types with the addition of 5, 15, 25, and 35 % of flaxseed oil cake. The products produced were lyophilized, defatted and, next, aqueous and aqueous-acetone extracts (1:1, v/v) were made, and the following was determined therein: content of phenols, antiradical activity (ABTS+• and •OH or DPPH), and reducing power.

As for the products containing flaxseed oil cake, the content of phenols in aqueous extracts was 20 – 80 % higher than in the tempeh from grass pea seeds only. Moreover, those extracts were characterized by a 50-100 % higher activity towards ABTS+• radical. Additionally, the addition of only 15% - a relatively low amount - of flaxseed oil cake to the basic fermentation substrate caused a maximal increase in the •OH scavenging activity potential. The reducing power of aqueous extracts from products with 35% of flaxseed oil cake added was 40% higher and statistically significant compared to the tempeh from grass pea seeds. The content of phenols in aqueous-acetone extracts was 0.5 – 3.5 times higher in the products with flaxseed oil-cake added. Additionally, these extracts showed a 1.5 - 10 times higher activity towards DPPH• and a 1.7- 3 times higher reducing power compared to the products produced after the fermentation of grass pea seeds only. The antioxidant activity was correlated with the content of phenols irrespective of the type of the used extract.

Key words: flaxseed oil cake, grass pea, tempeh, soluble phenols, antiradical activity, reducing power ☒

ZYGMUNT LITWIŃCZUK, ALICJA MATWIJCZUK, ANETA BRODZIAK

**WARTOŚĆ ENERGETYCZNA, WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE
I PRZYDATNOŚĆ TECHNOLOGICZNA MLEKA KRÓW RASY
POLSKIEJ CZERWONEJ, BIAŁOGRZBIETEJ I SIMENTALSKIEJ
UTRZYMYWANYCH W SYSTEMIE NISKONAKŁADOWYM**

Streszczenie

Określono wartość energetyczną, właściwości fizykochemiczne (kwasowość, gęstość), czas krzepnięcia mleka pod wpływem podpuszczki i stan dyspersji tłuszczu (udział kuleczek tłuszczowych $\leq 6 \mu\text{m}$, $6 \div 10 \mu\text{m}$ i powyżej $10 \mu\text{m}$) w 969 próbkach mleka pobranych od krów 3 ras – polskiej czerwonej (PC), białogrzbietej (BG) i simentalskiej (SIM) – użytkowanych w 13 gospodarstwach w niskonakładowym systemie chowu. Grupę odniesienia stanowiły 243 próbki mleka pobrane od krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej (PHF), użytkowanych w intensywnych technologiach chowu (żywienie TMR). Wykazano, że pozyskane w sezonie jesienno-zimowym mleko od 3 ras krów użytkowanych w systemie niskonakładowym miało istotnie ($p \leq 0,01$) wyższą wartość energetyczną w porównaniu z mlekiem z sezonu wiosenno-letniego. W mleku krów rasy PHF różnice te były zdecydowanie niższe i statystycznie nieistotne. Największą zawartość kazeiny oznaczono w mleku krów rasy polskiej czerwonej (2,84 %) i simentalskiej (2,75 %) pozyskiwanym w sezonie jesienno-zimowym, a najmniejszą i bardzo podobną w obu sezonach – w mleku krów PHF (odpowiednio: 2,52 i 2,57 %). Średni czas koagulacji mleka 3 ras krów użytkowanych w systemie niskonakładowym w porównaniu z mlekiem krów PHF był istotnie ($p \leq 0,01$) krótszy (około 4 min vs. 5 min 37 s). Mleko tych krów miało także istotnie ($p \leq 0,01$) większy udział kuleczek tłuszczowych o dużych średnicach ($> 10 \mu\text{m}$), tzn. białogrzbieta – 9,82 %, simentalska – 9,22 % i polska czerwona – 9,05 %, w porównaniu z mlekiem krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (7,34 %).

Słowa kluczowe: rasy bydła, mleko, wartość energetyczna, właściwości fizyczne, przydatność technologiczna

Wprowadzenie

Oceną wartości użytkowej bydła mlecznego w Polsce objętych jest 12 ras krów. Ze względu na wielkość populacji pierwsze miejsce zajmuje rasa polska holsztyńsko-fryzyjska, drugie – rasa simentalska. Do grupy o użytkowaniu mlecznym zalicza się również wszystkie 4 rasy rodzime, objęte programem ochrony zasobów genetycznych, tzn. polską czerwoną, białogrzbiętą, polską czarno-białą i polską czerwono-białą. Intensyfikacja produkcji zwierzęcej metodą selekcji doprowadziła do wytworzenia ras wysoko produkcyjnych, które w drugiej połowie XX w. zaczęły wypierać rasy miejscowe (lokalne), niestanowiące konkurencji pod względem ekonomicznym.

Rasy rodzime to bardzo cenny rezerwuar genów, zwłaszcza w przypadku bydła, gdy nie można wrócić do protoplastów. Hodowcy cenią rasy lokalne za ich odporność na choroby, długowieczność i łatwość zacieleń [11]. Podstawową formą ochrony zwierząt gospodarskich jest ochrona *in situ*, czyli użytkowanie w rejonach, w których zostały wyhodowane i pozyskiwanie od nich wartościowych surowców. Dotyczy to szczególnie produktów markowych, np. serów należących do lokalnych tradycji kulinarnych. Jedną ze strategii gwarantujących trwałość użytkowania ras rodzimych jest wypromowanie produktów od nich pochodzących, które będą rozpoznawalne ze względu na wysoką jakość i dzięki temu uzyskają wysoką cenę. Przykładem takich działań jest ser Parmigiano Reggiano, produkowany na północy Włoch wyłącznie z mleka krów rasy Reggiana. Cena takiego sera jest o 16 % wyższa od sera Parmigiano Reggiano produkowanego z mleka krów HF czy Brown-Swiss [20, 21].

O jakości technologicznej mleka, a szczególnie o jego przydatności serowarskiej decydują m.in. skład chemiczny (zawartość suchej masy beztłuszczowej, a przede wszystkim kazeiny), jego kwasowość (warunkująca zachowanie właściwości koloidalnych), zdolność do koagulacji enzymatycznej oraz stan dyspersji tłuszczu mlekowego [2, 4, 12].

Celem pracy była ocena przydatności technologicznej mleka pozyskiwanego od dwóch najstarszych polskich rodzimych ras krów, tj. polskiej czerwonej i białogrzbiętej oraz rasy simentalskiej (utrzymywanej głównie w Bieszczadach), użytkowanych w systemie niskonakładowym w drobnych gospodarstwach Polski południowo-wschodniej, na podstawie porównania z grupą odniesienia, którą stanowiło mleko krów polskich holsztyńsko-fryzyjskich użytkowanych, w technologiach intensywnych (żywienie TMR).

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiło 1212 próbek mleka pobranych od krów 4 ras użytkowanych mlecznie: białogrzbiętej (BG), polskiej czerwonej (PC), simentalskiej (SIM) i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej (PHF). Próbkę mleka

pobierano w 14 gospodarstwach towarowych produkujących mleko, z czego 4 utrzymywały krowy rasy białogrzbietej, 5 – polskiej czerwonej, 4 – simentalskiej i 1 – polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Krowy rasy białogrzbietej utrzymywane były na terenie wschodniej Polski w oborach liczących $12 \div 21$ krów, simentalskiej – w rejonie Bieszczad w oborach o obsadzie $13 \div 23$ krów, a polskiej czerwonej – na terenie Beskidu Niskiego w oborach o $11 \div 25$ krów. We wszystkich 13 gospodarstwach zwierzęta utrzymywano w oborach uwięziowych. Krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (jako grupa kontrolna) utrzymywane były na Lubelszczyźnie w oborze wolnostanowiskowej, liczącej 70 krów. Wszystkie obory objęte były oceną wartości użytkowej bydła mlecznego i spełniały wymagania niezbędne do produkcji mleka, które określa Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1662/2006 z dnia 6 listopada 2006 r. [17].

W gospodarstwach utrzymujących rasy lokalne krowy były żywione paszami własnymi. W sezonie wiosenno-letnim podstawą była zielonka pastwiskowa uzupełniana sianem i dodatkiem pasz treściwych (śrut zbożowych). W sezonie jesienno-zimowym podstawę stanowiły: sianokiszonka i siano, w 7 gospodarstwach podawano dodatkowo kiszonkę z kukurydzy, a uzupełnieniem była pasza treściwa. Krowy rasy PHF żywione były przez cały rok w systemie intensywnym (TMR), a w skład dawki TMR wchodziła kiszonka z kukurydzy, sianokiszonka, siano oraz śruty poekstrakcyjne i zbożowe. Gospodarstwa utrzymujące rasy lokalne można zaliczyć do niskonakładowych. Średnia wielkość stada krów wynosiła 17,8 szt., a wydajność za okres laktacji – na poziomie 4201 kg mleka. Pasze pochodziły z trwałych użytków zielonych, które stanowiły 69,7 % powierzchni gospodarstwa. Powierzchnia kukurydzy z przeznaczeniem na kiszonkę, w przeliczeniu na 1 krowę wynosiła tylko 0,039 ha. Gospodarstwo utrzymujące krowy rasy PHF można zaliczyć do intensywnego systemu produkcji. Przeciętna wydajność wynosiła 7143 kg mleka, w strukturze gospodarstwa dominowały grunty orne (58,3 %), na których uprawiano głównie kukurydzę na kiszonkę. Powierzchnia tej uprawy wynosiła na 1 krowę 0,43 ha. Nie stosowano wypasu pastwiskowego.

Próbki mleka pobierano indywidualnie od krowy z całego doju (metodą AT4 [7]) dwukrotnie w ciągu roku, tzn. w sezonie wiosenno-letnim (V - VIII) i jesienno-zimowym (XI - III). Eliminowano próbki o liczbie komórek somatycznych powyżej 400 tys./cm³. W każdej próbce oznaczano: skład chemiczny (zawartość białka, tłuszczu i laktozy) w celu określenia wartości energetycznej mleka – aparatem Infrared Milk Analyzer (Bentley Instruments, USA), zawartość kazeiny – metodą Walkera [12], kwasowość czynną – pH (pH-metrem Elmetron CP-401, Polska) i potencjalną, gęstość – laktodensymetrem, czas krzepnięcia mleka na skutek działania podpuszczki – metodą Scherza [12] oraz udział kuleczek tłuszczowych w poszczególnych przedziałach średnic, tj. $\leq 6 \mu\text{m}$, $6 \div 10 \mu\text{m}$ i pow. $10 \mu\text{m}$ – mikroskopowo (mikroskop OlympusCX41, Japonia) w preparatach wybarwionych Sudanem III [12]. Wartość energetyczną 1 kg

mleka obliczano przy stosowaniu fizjologicznych współczynników energii brutto wg Rubnera i równania podanego przez Pijanowskiego i wsp. [14].

Do opracowania uzyskanych wyników zastosowano program StatSoft Inc Statistica ver. 6. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA dla układów czynnikowych z interakcją), określając wpływ rasy i sezonu produkcji. Istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem NIR Fischera (najmniejszych istotnych różnic) przy poziomie $p = 0,05$ i $p = 0,01$.

Wyniki i dyskusja

Uzyskana w badaniach dobową wydajność mleka 3 ocenianych ras krów, użytkowanych w systemie niskonakładowym, była zdecydowanie mniejsza od wydajności krów rasy PHF, użytkowanych w systemie intensywnym (tab. 1). W przypadku krów rasy SIM różnice te sięgały od 6 kg w sezonie wiosenno-letnim do 15 kg w sezonie jesienno-zimowym. Wydajność krów ras rodzimych wynosiła $10 \div 12$ kg mleka w okresie jesienno-zimowym i 15 kg – w wiosenno-letnim, była więc mniejsza o około 10 kg w sezonie wiosenno-letnim i prawie o 20 kg w sezonie jesienno-zimowym. Wykazano istotny ($p \leq 0,01$) wpływ sezonu produkcji na wydajność mleczną wszystkich 4 ocenianych ras. Krowy utrzymywane w systemie niskonakładowym, tzn. żywione tradycyjnie (z wypasem pastwiskowym w lecie oraz z sianokiszonką i sianem w zimie), uzyskiwały zdecydowanie większą wydajność w sezonie wiosenno-letnim: SIM o 3,8 kg (23 %), PC o 2,9 kg (24 %), a BG aż o 4,9 kg (47 %) niż w jesienno-zimowym. W intensywnym sposobie użytkowania krów rasy PHF większą wydajność (średnio 31,4 kg) uzyskiwano w sezonie jesienno-zimowym niż w wiosenno-letnim (25,8 kg). Różnice między sezonami pod względem mlecznej produktywności krów ocenianych ras związane były z wartością pokarmową podawanych im pasz, co podkreśla wielu autorów [1, 3, 5, 16]. Mleko od 3 ras krów: PC, SIM i BG, użytkowanych w systemie niskonakładowym, z sezonu jesienno-zimowego miało istotnie ($p \leq 0,01$) wyższą wartość energetyczną, odpowiednio o [%]: 5,6, 6,5 i 8,0 % niż mleko tych krów z sezonu wiosenno-letniego. W mleku krów rasy PHF różnice te były zdecydowanie mniejsze (2,5 %) i statystycznie nieistotne (tab. 1).

Rasa i sezon produkcji miały istotny wpływ na kwasowość ocenianego mleka. Najwyższą kwasowością (zarówno czynną, jak i potencjalną) charakteryzowało się mleko krów rasy PC z sezonu wiosenno-letniego (wartość pH – 6,64 i °SH – 7,26), a najniższą – BG z sezonu jesienno-zimowego (wartość pH – 6,72 i °SH – 6,53). Należy jednak podkreślić, że we wszystkich wyróżnionych podgrupach (rasa \times sezon) kwasowość potencjalna ocenianego mleka mieściła się w przedziale $6,0 \div 7,5$ °SH, co odpowiada zaleceniom normy PN-A-86002:1999 [15]. W przypadku gęstości nie wykazano generalnie istotnego wpływu rasy, jak i sezonu produkcji (z wyjątkiem gęstości mleka rasy simentalskiej) na tę cechę (tab. 1).

Tabela 1. Wydajność dobową, wartość energetyczną i właściwości fizykochemiczne mleka krów ocenianych ras
 Table 1. Twenty-four hr milk yield, food energy, and physical-chemical properties of milk from cows of analysed breeds

Rasa Breed	Sezon produkcji Production season	n	Wydajność do- bowa 24-hr milk yield [kg]		Wartość ener- getyczna Food Energy [kcal/kg]		Kwasowość / Acidity			Gęstość Density [g/cm ³]		
			\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	pH	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	
Białogrzbieta (BG) Whitebacked	jesiennie- zimowy autumn-winter	170	10,44 ^A	6,31	764,53 ^B	90,87	6,72	0,10	6,53	1,09	1,0301	0,015
	wiosennie-letni spring-summer	161	15,35 ^B	6,15	708,15 ^A	76,73	6,72	0,12	6,71	0,90	1,0288	0,002
Polska czerwona (PC) Polish Red	jesiennie- zimowy autumn-winter	166	11,80 ^A	5,33	812,66 ^B	77,83	6,74 ^B	0,07	7,17	1,17	1,0289	0,004
	wiosennie-letni spring-summer	158	14,68 ^B	6,10	769,82 ^A	75,77	6,64 ^A	0,33	7,26	0,92	1,0289	0,002
Simentalska (SIM) Simmental	jesiennie- zimowy autumn-winter	188	16,17 ^A	6,41	766,23 ^B	85,75	6,79 ^B	0,07	6,89	0,84	1,0294 ^b	0,002
	wiosennie-letni spring-summer	126	19,96 ^B	5,24	719,44	59,13	6,64 ^A	0,08	6,77	0,81	1,0290 ^a	0,002
Polska holsztyńska- fryzyjska (PHF) Polish Holstein- Friesian	jesiennie- zimowy autumn-winter	119	31,44 ^B	7,26	766,94	86,93	6,69 ^A	0,09	6,57	0,73	1,0302	0,002
	wiosennie-letni spring-summer	124	25,78 ^A	7,41	747,98	73,31	6,73 ^B	0,07	6,67	0,96	1,0342	0,037

Wpływ czynnika / Impact of factor						
Rasa / Breed		xx	xx	x	xx	ns
Sezon produkcji / Production season		xx	xx	xx	x	ns
Interakcja rasa × sezon produkcji/ Interaction: breed × production season		xx	ns	xx	ns	ns

Objaśnienia: / Explanatory notes:

n – liczba próbek /number of samples; \bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD- standard deviation; A, B, a, b – różnice statystycznie istotne między sezonami w obrębie rasy: A, B – $p \leq 0,01$, a, b – $p \leq 0,05$ / statistically significant differences between seasons within the breed: A, B – $p \leq 0,01$, a, b – $p \leq 0,05$;

Wpływ czynnika: x – istotny przy $p \leq 0,05$, xx – istotny przy $p \leq 0,01$, ns – nie stwierdzono / Impact of factor: x – significant at $p \leq 0,05$, xx – significant at $p \leq 0,01$, ns – not stated.

Jak wykazano, rasa krów nie miała wpływu na zawartość suchej masy beztłuszczowej, różnicowała natomiast istotnie zawartość kazeiny w mleku (tab. 2). Najwięcej kazeiny oznaczono w mleku krów PC i SIM, pozyskiwanym w sezonie jesienno-zimowym (odpowiednio: 2,84 i 2,75 %). W przypadku 3 ras krów użytkowanych w systemie niskonakładowym stwierdzono istotny ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) wpływ sezonu produkcji na zawartość kazeiny w mleku, co należy wiązać z tradycyjnym systemem żywienia [5, 9]. W mleku krów rasy PHF, użytkowanych w intensywnej technologii (żywienie TMR), stwierdzono najmniejszą zawartość kazeiny (w stosunku do 3 pozostałych ras) i bardzo zbliżoną w obu sezonach produkcji (odpowiednio: 2,52 i 2,57 %). O przydatności mleka do produkcji serów decyduje również stosunek białka do tłuszczu. Najkorzystniejszy (średnio 0,85) stwierdzono w mleku krów rasy SIM, natomiast w mleku pozostałych 3 ras był on bardzo podobny ($0,80 \div 0,81$). W mleku krów rasy BG wykazano istotnie ($p \leq 0,01$) większą wartość tego wskaźnika w sezonie jesienno-zimowym (0,84) w porównaniu z wiosenno-letnim (0,78). Istotnie wyższą wartość stosunku białkowo-tłuszczowego w mleku krów rasy SIM wykazali również Barłowska i wsp. [4] oraz Litwińczuk i wsp. [13]. W tych ostatnich badaniach mleko pochodziło od krów SIM użytkowanych w technologii intensywnej (żywienie TMR), co by wskazywało, że rasa ta ma genetycznie zakodowany korzystny stosunek białka do tłuszczu w mleku.

Zdolność krzepnięcia mleka pod wpływem podpuszczki jest bardzo cennym wskaźnikiem w produkcji serowarskiej. Czas koagulacji enzymatycznej mleka prawidłowo krzepnącego powinien wynosić $4 \div 10$ min [12]. Wykazano, że czas koagulacji podpuszczkowej mleka 3 ras krów użytkowanych w systemie niskonakładowym był na zbliżonym poziomie, tzn. wyniósł średnio około 4 min i był on istotnie ($p \leq 0,01$) krótszy od czasu krzepnięcia mleka krów PHF użytkowanych w intensywnej technologii (średnio 5 min 37 s). W przypadku wszystkich ras (za wyjątkiem BG) wykazano istotny wpływ sezonu produkcji na czas krzepnięcia mleka. Korzystniejszy w tym względzie był sezon wiosenno-letni. Auldist i wsp. [2] podają, że skrzepy parakazeinowe o najwyższej jakości uzyskiwano z mleka krów rasy normandzkiej i montbeliarde o największym udziale kazeiny. De Marchi i wsp. [6] wykazali, że spośród 5 ras bydła (holsztyńsko-fryzyjskiej, brown swiss, simental, rendeny i alpinegray) mleko krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej miało najmniejszą krzepliwość (podobnie jak w badaniach własnych). Pod wpływem podpuszczki najszybciej krzepło mleko lokalnej rasy renderna, a powstały skrzep był najbardziej zwięzły i jędrny. Tyrisevä i wsp. [19] twierdzą, że mleko pochodzące od krów żywionych zieloną pastwiskową szybciej ulega koagulacji enzymatycznej, co znajduje potwierdzenie w badaniach własnych. We wszystkich 13 gospodarstwach utrzymujących krowy rasy PC, BG i SIM stosowano wypas pastwiskowy.

Tabela 2. Wskaźniki przydatności technologicznej mleka krów ocenianych ras
Table 2. Indicators of processing suitability of milk from cows of analysed breeds

Rasa Breed	Sezon produkcji Production season	Sucha masa beztuszczo- Non-fat dry matter [%]		Kazeina Casein [%]		Białko/Tłuszcz Protein to fat proportion		Czas krzep- nięcia Coagulation time [min]		Udział kuleczek tłuszczowych / Percentage rate of fatty globules [%]					
		\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	male/small <6 μm	\bar{x}	s / SD	średnie/medium 6-10 μm	s / SD	duże/large >10 μm
Białgrzbiet (BG) Whitebacked	wiosenno-zimowy autumn-winter	8,88	1,00	2,63 ^b	0,46	0,84 ^B	0,10	4:09	2:33	57,13	10,39	32,93	7,96	9,92	4,97
	wiosenno-letni spring-summer	9,08	1,23	2,51 ^a	0,42	0,78 ^A	0,12	4:34	2:06	58,49	9,30	37,78	6,99	9,72	5,02
Polska czerwona (PC) Polish Red	wiosenno-zimowy autumn-winter	8,98	1,13	2,84 ^B	0,59	0,80	0,13	4:02 ^b	2:10	62,10	10,42	28,58	7,11	9,38	6,00
	wiosenno-letni spring-summer	9,21	1,13	2,56 ^A	0,40	0,80	0,11	4:00 ^a	1:43	62,94	10,69	28,42	7,53	8,70	8,85
Simentalska (SIM) Simmetal	wiosenno-zimowy autumn-winter	9,02	1,24	2,75 ^B	0,48	0,86	0,12	4:50 ^B	2:27	54,37 ^A	10,79	35,84 ^B	8,65	9,74 ^B	3,07
	wiosenno-letni spring-summer	8,95	1,19	2,57 ^A	0,42	0,84	0,14	3:45 ^A	1:44	59,22 ^B	7,93	32,33 ^A	6,58	8,45 ^A	3,24
Polska holendersko- fryzyska (PHF) Polish Holstein- Friesian	wiosenno-zimowy autumn-winter	9,13	1,14	2,57	0,35	0,80	0,13	6:09 ^B	3:11	63,42 ^A	9,73	30,04 ^B	8,01	6,59 ^a	6,02
	wiosenno-letni spring-summer	8,95	0,93	2,52	0,34	0,81	0,12	5:08 ^A	2:32	70,51 ^B	13,34	21,44 ^A	9,31	8,06 ^b	5,18
Wpływ czynnika / Impact of factor															
Rasa / Breed		ns		xx		xx		xx		Xx		xx		xx	
Sezon produkcji / Production season		x		xx		ns		xx		Xx		xx		xx	
Interakcja rasa × sezon produkcji Interaction: breed × production season		x		ns		ns		xx		Xx		xx		xx	

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

Tłuszcz mleczny, w tym stan jego dyspersji, decyduje również o przydatności mleka do przetwórstwa. Średnica kuleczek tłuszczowych ma bowiem wpływ na jakość wyrobów mleczarskich. Wykazano, że mleko wszystkich 3 ras krów użytkowanych w systemie niskonakładowym różniło się pod tym względem od mleka PHF (tab. 2). Miało bowiem istotnie ($p \leq 0,01$) większy udział kuleczek o dużych rozmiarach (BG – 9,82 %, PC – 9,05 % i SIM – 9,22 %), w porównaniu z mlekiem krów PHF (7,34 %), przy jednocześnie niższym udziale małych kuleczek tłuszczowych (odpowiednio [%]: 57,89, 62,51 i 56,32 w stosunku do 67,04). Większa zawartość dużych kuleczek tłuszczowych w tłuszczu mlecznym ułatwia, zdaniem Gonzalesa i wsp. [10] oraz Dewettincka i wsp. [8], procesy produkcji serów twardych, które szybciej dojrzewają i mają lepszą konsystencję. Masło wyprodukowane z takiego mleka (o większym udziale dużych kuleczek tłuszczowych) według tych autorów wykazuje lepszą barwę i konsystencję oraz zawiera mniej cholesterolu (mniejsza powierzchnia otoczek tłuszczowych).

Wyższą jakość technologiczną mleka krów ras lokalnych należy zapewne wiązać z niskonakładowym systemem ich użytkowania, ale prawdopodobnie także z uwarunkowaniami genetycznymi. Sawicka-Zugaj i Litwińczuk [18] wykazali znacznie większą zmienność genetyczną obu najstarszych polskich ras bydła, tzn. polskiej czerwonej i białogrzbietej w porównaniu z polską holsztyńsko-fryzyjską. Autorzy stwierdzili w obrębie 24 mikrosatelitarnych *loci* DNA krów rasy polskiej czerwonej 181 alleli, białogrzbietej – 171, a polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej – tylko 146. Być może niektóre z tych alleli, które występują jeszcze u krów ras lokalnych (a zostały już utracone przez krowy ras wysoko produkcyjnych w procesie intensywnej selekcji) warunkują korzystniejsze cechy jakościowe tego surowca.

Wnioski

1. Pozyskiwane w sezonie jesienno-zimowym mleko od krów utrzymywanych w systemie niskonakładowym miało istotnie ($p \leq 0,01$) wyższą wartość energetyczną w porównaniu z mlekiem z sezonu wiosenno-letniego. W mleku krów PHF użytkowanych w systemie intensywnym różnice te były zdecydowanie niższe i statystycznie nieistotne.
2. Rasa krów i sezon produkcji miały istotny wpływ na kwasowość ocenianego mleka, jednak z zaznaczeniem, że kwasowość wszystkich ocenianych próbek była na odpowiednim poziomie.
3. Największą zawartość kazeiny stwierdzono w mleku krów rasy polskiej czerwonej i simentalskiej, pozyskiwanym w sezonie jesienno-zimowym (2,84 i 2,75 %). W przypadku 3 ras krów użytkowanych w systemie niskonakładowym stwierdzono istotny ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) wpływ sezonu produkcji na zawartość kazeiny w mle-

- ku. Najmniejszą zawartość kazeiny i bardzo zbliżoną w obu sezonach produkcji (2,52 i 2,57 %) stwierdzono w mleku krów PHF.
4. Czas koagulacji enzymatycznej mleka pozyskiwanego od 3 ras krów użytkowanych w systemie niskonakładowym był na zbliżonym poziomie, tzn. wynosił średnio około 4 min i był istotnie ($p \leq 0,01$) krótszy w odniesieniu do mleka krów PHF użytkowanych w systemie intensywnym (średnio 5 min 37 s).
 5. Mleko 3 ras krów użytkowanych w systemie niskonakładowym zawierało istotnie ($p \leq 0,01$) więcej kuleczek tłuszczowych o dużych rozmiarach (powyżej 10 μm), tj. białogrzbieta – 9,82 %, simentalska – 9,22 % i polska czerwona – 9,05 %, w porównaniu z mlekiem krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (7,34 %).
 6. Mleko krów ras rodzimych (polskiej czerwonej i białogrzbiętej) oraz simentalskiej użytkowanych w systemie niskonakładowym stanowi marginalną część surowca przerabianego w Polsce przez przemysł mleczarski, może jednak stanowić cenny surowiec do wyrobu produktów regionalnych i tradycyjnych, które przy odpowiedniej promocji mogą stanowić ważne źródło dochodu w gospodarstwie.

Literatura

- [1] Adamska A., Rutkowska J.: Sezonowe zmiany składu triacylogliceroli i tłuszczu mleka krów rasy simentalskiej z region mazowieckiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **5 (84)**, 145-154.
- [2] Auldust M., Mullins C., O'Brien B., O'Kennedy B.T., Guinee T.: Effect of cow breed on milk coagulation properties. *Milchwissenschaft*, 2002, **57**, 140-143.
- [3] Barłowska J., Litwińczuk Z., Topyła B.: Parametry fizykochemiczne tłuszczu mleka krów różnych ras z okresu żywienia wiosenno-letniego. *Med. Weter.*, 2005, **61 (8)**, 937-939.
- [4] Barłowska J., Litwińczuk Z., Król J., Topyła B.: Technological usefulness of milk cows of six breeds maintained in Poland relative to lactation phase. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2006, **15/56 (1)**, 17-21.
- [5] Brodziak A., Barłowska J., Król J., Litwińczuk Z.: Effect of breed and feeding on content of selected whey proteins in cow's milk in spring-summer and autumn-winter seasons. *Ann. Anim. Sci.*, 2012, **2 (12)**, 261-269.
- [6] De Marchi M., Dal Zotto R., Cassandro M., Bittante G.: Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. *J. Dairy Sci.*, 2007, **8 (90)**, 3986-3992.
- [7] Decyzja Komisji 2006/427/WE z 20 czerwca 2006 r. ustanawiająca metody oceny wartości użytkowej i metody oceny wartości genetycznej zwierząt hodowlanych czystorasowych z gatunku bydła. *Dz. U. WE L 169 z 22.06.2006*, s. 56.
- [8] Dewettinck K., Rombaut R., Thienpont N., Trung Le T., Messens K., Camp J.V.: Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 436-457.
- [9] Feleńczak A., Ferting A., Szarek J., Czaja H., Kurbiel A.: Zmiany składu i cech fizykochemicznych mleka krów rasy simental w zależności od sezonu. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 2003, **17**, 849-851.
- [10] Gonzales S., Duncan S.E., O'Keefe S.F., Sumner S.S., Herbein H.: Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. *J. Dairy Sci.*, 2003, **(86)**, 70-77.
- [11] Litwińczuk Z. (Red.): *Ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich i dziko żyjących*. Wyd. PWRiL, Warszawa 2011, s. 295.

- [12] Litwińczuk Z. (Red.): *Towaroznawstwo surowców i produktów zwierzęcych z podstawami przetwórstwa*. Wyd. PWRiL, Warszawa 2012, s. 553.
- [13] Litwińczuk Z., Kowal M., Barłowska J.: Podstawowy skład chemiczny oraz udział kwasów tłuszczowych i zawartość cholesterolu w mleku krów czterech ras użytkowanych w intensywnych technologiach chowu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, **4 (95)**, 108-121.
- [14] Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A.: *Ogólna technologia żywności*. WNT, Warszawa 2000.
- [15] PN-A-86002:1999: Mleko surowe do skupu.
- [16] Reklewska B., Bernatowicz E., Reklewski Z., Kuczyńska B., Zdziarski K., Sakowski T., Słoniewski K.: Functional components of milk produced by Polish Black-and-White, Polish Red and Simmental cows. *EJPAU*, 2005, **3 (8)**, 25.
- [17] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1662/2006 z dnia 6 listopada 2006 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. *Dz.U. UE Nr L 320*.
- [18] Sawicka-Zugaj W., Litwińczuk Z.: Genetic variation in the population of three Polish cattle breeds included into the programme of genetic resources protection and Holstein-Friesian breed, estimation on the basis of polymorphism of 24 microsatellite DNA sequences. *Afr. J. Biotechnol.*, 2012, **11 (77)**, 14116-14122.
- [19] Tyrisevä A.M., Ikonen T., Ojala M.: Repeatability estimates for milk coagulation traits and non-coagulation of milk in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Res.*, 2003, **(70)**, 91-98.
- [20] Zannoni M., Pignoni S., Hunter E.A.: Risultati di un test sensoriale sui consumatori di Parmigiano-Reggiano. *Scienza e Tecnica Lattiero-casearia*, 2000, **6 (51)**, 356-380.
- [21] Zannoni M.: Evolution of the sensory characteristics of Parmigiano-Reggiano cheese to the present day. *Food Quality and Preferences*. Article in Press, 2010, **21**, 901-905.

**FOOD ENERGY, PHYSICAL PROPERTIES, AND PROCESSING SUITABILITY OF MILK
FROM COWS OF POLISH RED WHITEBACKED AND SIMMENTAL BREEDS KEPT USING
LOW-INPUT SYSTEM**

S u m m a r y

There were determined: food energy, physical properties (acidity, density), rennet coagulation time, and dispersion state of fat (percentage rate of fatty globules $\leq 6 \mu\text{m}$, 6-10 μm and above 10 μm) in 969 samples of milk from 3 breeds of cows: Polish Red, Whitebacked, and Simmental, which were utilized in 13 farms applying a low input system. The control group of samples consisted of 243 milk samples collected from the Polish Holstein-Friesian (PHF) cows utilized with the use of intensive husbandry technologies (TMR feeding). It was shown that the milk, produced in the autumn-winter season by the three cow breeds kept using a low input system, had a significantly ($p \leq 0.01$) higher food energy value compared to the milk produced during the spring-summer season. Those differences were definitely much lower and statistically insignificant in the cow's milk from the PHF breed. The highest content of casein was determined in the milk from the Polish Red (2.84%) and Simmental (2.75%) cows and produced in the autumn-winter season, whereas the lowest content of casein, very similar for the two seasons (2.52 % and 2.57%, respectively) was reported in the milk from the PHF cows. A mean coagulation time of milk from the three breeds of cows utilized using a low input system was significantly ($p \leq 0.01$) shorter (ca. 4 min vs. 57 min 37 sec) compared to the milk from the PHF cows. Additionally, the milk from those cows had a significantly ($p \leq 0.01$) higher percentage rate of fatty globules showing large diameters ($> 10 \mu\text{m}$),

namely: Whitebacked – 9.82 %, Simmental – 9.22 %, and Polish Red – 9.05 %, in comparison to the milk from the Polish Holstein-Friesian cows (7.34 %).

Key words: cattle breed, milk, food energy, physical properties, processing suitability 

GENOWEFA BONCZAR, KRZYSZTOF MACIEJOWSKI, JACEK DOMAGAŁA,
DOROTA NAJGEBAUER-LEJKO, MAREK SADY, MARIA WALCZYCKA,
MONIKA WSZOŁEK

WPLYW PROBIOTYCZNYCH KULTUR STARTEROWYCH NA ZAWARTOŚĆ CHOLESTEROLU W MLECZNYCH NAPOJACH FERMENTOWANYCH

Streszczenie

Z mleka krowiego poddanego pasteryzacji i zaszczepionego kulturami starterowymi DVS: YC-180 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* oraz *Streptococcus thermophilus*), YO-MIX 207 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*), LA-5 (*Lactobacillus acidophilus*) i BB-12 (*Bifidobacterium bifidum*) wyprodukowano napoje fermentowane. W mleku i wyprodukowanych z niego 1- i 14-dniowych napojach fermentowanych oznaczono zawartość tłuszczu, pH i kwasowość miareczkową, a także zawartość cholesterolu metodą enzymatyczną z użyciem oksydazy cholesterolowej. Mleko pasteryzowane zawierało średnio 20,0 mg/100 g cholesterolu, a jego tłuszcz - 5,64 mg/g. W wyprodukowanych jednodniowych napojach fermentowanych z udziałem szczepionek YC-180, YO-MIX 207, LA-5 i BB-12 stwierdzono statystycznie istotną ($p \leq 0,05$) redukcję poziomu cholesterolu, w porównaniu z mlekiem, odpowiednio do [%]: 49,4, 41,3, 44,8 i 45,9 początkowej jego zawartości w 100 g mleka i odpowiednio do [%]: 54,9, 44,3, 46,3 i 48,0 w 1 g tłuszczu mleka. Kultury starterowe wykazały zróżnicowanie pod względem zdolności do zmniejszania zawartości cholesterolu, przy czym największe – szczepionka YO-MIX 207, a najmniejsze – YC-180. Podczas 14-dniowego przechowywania napojów w warunkach chłodniczych zaobserwowano dalsze zmniejszenie poziomu cholesterolu w napojach i w ich tłuszczu, średnio o około 15 %.

Słowa kluczowe: mleko, kultury starterowe, probiotyczne napoje fermentowane, cholesterol

Wprowadzenie

Bakterie fermentacji mlekowej odgrywają pozytywną rolę w obniżaniu poziomu cholesterolu w organizmie człowieka [10, 16, 17, 23, 24, 30, 31, 32, 37]. Z badań

Prof. dr hab. G. Bonczar, dr inż. K. Maciejowski, prof. dr hab. J. Domagała, dr inż. D. Najgebauer-Lejko, dr inż. M. Sady, dr inż. M. Walczycka, dr hab. M. Wszolek, prof. nadzw., Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków. Kontakt: g.bonczar@ur.krakow.pl

niektórych autorów wynika, że mają one zdolność obniżania poziomu cholesterolu już w mleku po jego zaszczepieniu i inkubacji [12, 21, 25, 36]. Za zjawisko wiązania cholesterolu przez bakterie fermentacji mlekowej odpowiedzialny jest obecny w ich ścianie komórkowej peptydoglikan [4, 13, 22]. Wiązanie to ma charakter fizyczny (tzw. adhezja) lub chemiczny (tzw. asymilacja) [19]. Z badań przeprowadzonych przez Hosono i Tono-Okat [9] oraz Usmana i Hosono [33] wynika, że peptydoglikan wyizolowany z bakterii zawiera od 28 ÷ 34 % całkowitej ilości cholesterolu, który został wbudowany w komórki lub w ścianę komórkową bakterii. Ziarno i wsp. [38] wskazują, że różnice w poziomie związanego cholesterolu przez drobnoustroje są uzależnione od właściwości chemicznych i strukturalnych peptydoglikanu obecnego w komórkach mikroorganizmów. Wymienieni autorzy uważają, że ściany komórkowe martwych bakterii fermentacji mlekowej wykazują także zdolność do wiązania cholesterolu, przy czym ilość cholesterolu usuniętego przez żywe komórki bakterii jest znacznie większa niż tego, który zostaje przyłączony przez martwe komórki. Wyniki badań innych autorów dowodzą, że wiązanie cholesterolu przez pałeczki fermentacji mlekowej jest większe niż przez paciorkowce. Smith i wsp. [27], Fujishiro i wsp. [5] oraz Lu i wsp. [20] uważają, że przyczyną obniżania poziomu cholesterolu w napojach fermentowanych są enzymy mające zdolność rozkładania cholesterolu (np. reduktaza lub oksydaza cholesterolowa), które są produkowane przez niektóre drobnoustroje.

Obserwuje się zróżnicowanie redukcji zawartości cholesterolu w mleku w zależności od kultur bakteryjnych stosowanych do jego zaszczepiania. Akalin i wsp. [1] oraz Juśkiewicz i Panfil-Kuncewicz [12] zaobserwowali mniejszą redukcję poziomu cholesterolu w jogurcie uzyskanym z mleka zaszczepionego *Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus acidophilus* w porównaniu z jogurtem wyprodukowanym z dodatkiem kultur *Streptococcus thermophilus* oraz *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ci ostatni wykazali, że w jogurtach o mniejszej zawartości tłuszczu następuje większa redukcja zawartości cholesterolu w porównaniu z jogurtami wysokotłuszczowymi. Hang i Luo [8] stwierdzili, że niektóre szczepy *Lactobacillus acidophilus* i *Lactococcus diacetilactis* mogą obniżyć poziom cholesterolu nawet o 45 % w śmietanie w porównaniu ze śmietanką. Z badań przeprowadzonych przez Ziarno i wsp. [39] wynika natomiast, że w śmietanie przechowywanej przez 14 dni zawartość cholesterolu zmniejsza się o 35 % w porównaniu z jego poziomem w śmietance. Autorzy dowiedli, że czas przechowywania wpływa na zmniejszenie zawartości cholesterolu w produkcie oraz na żywotność i ilość mikroorganizmów w mlecznych produktach fermentowanych. Zmniejszenie zawartości cholesterolu w maśle po dodaniu do plazmy bakterii *Lactobacillus acidophilus* zaobserwowali również Kiszka i wsp. [14].

Prozdrowotne właściwości bakterii probiotycznych znane są dzięki prowadzonym badaniom [15, 30, 34, 35, 40, 41], w tym dotyczącym obniżenia poziomu cholesterolu

w organizmie człowieka pod wpływem żywności zawierającej te probiotyczne mikroorganizmy [7, 26, 29]. Uwagę poświęca się również badaniu wpływu niektórych gatunków bakterii probiotycznych na obniżenie poziomu cholesterolu w napojach fermentowanych wyprodukowanych z ich udziałem. Znacznie mniej publikacji dotyczy oceny zmian zawartości cholesterolu w mleku po jego inkubacji ze szczepami probiotycznymi, szczególnie w postaci pojedynczych kultur *Bifidobacterium* lub *Lactobacillus*, mogących mieć zastosowanie w przemysłowej produkcji napojów probiotycznych.

Celem pracy było określenie wpływu kultur starterowych o zróżnicowanym składzie (w tym probiotycznych), po inkubacji w mleku w optymalnych dla nich warunkach temperatury i czasu, na zmiany zawartości cholesterolu w napojach fermentowanych świeżych i przechowywanych w warunkach chłodniczych przez 14 dni, w porównaniu z mlekiem przed inkubacją.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym było mleko surowe pobierane 3-krotnie w okresie od maja do czerwca 2012 r. Mleko pochodziło od krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej z okolic Krakowa. Każdorazowo mleko dzielono na 5 części. Każdą z nich pasteryzowano w temp. 95 °C przez 10 min. Jedną część mleka chłodzono do temp. 45 °C i zaszczepiano 2-procentowym dodatkiem zakwasu DVS jogurtowego YC-180 (Christian Hansen, Dania), zawierającego szczepy *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* oraz *Streptococcus thermophilus*, a następnie w tej temperaturze inkubowano przez 6 h do uzyskania skrzepu o pH 4,6 ÷ 4,8. Uzyskany napój oznaczono jako YC-180. Drugą część mleka chłodzono również do temp. 45 °C, zaszczepiano 2-procentowym dodatkiem zakwasu DVS YO-MIX 207 (Christian Hansen, Dania), zawierającego szczepy *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*. Mleko z zakwasem inkubowano przez 6 h do uzyskania pH 4,6 ÷ 4,8. Uzyskany napój oznaczono jako YO-MIX. Trzecią część mleka chłodzono do temp. 38 °C, dodawano 2 % zakwasu DVS LA-5 (Christian Hansen, Dania), zawierającego szczepy *Lactobacillus acidophilus* i w tej samej temperaturze inkubowano przez 12 h do uzyskania skrzepu o pH 4,6 ÷ 4,8, uzyskując napój fermentowany LA-5. Z czwartą częścią mleka postępowano jak z poprzednią, przy czym mleko zaszczepiano szczepionką BB-12 (Christian Hansen, Dania), zawierającą pojedynczy szczep *Bifidobacterium bifidum*, uzyskując napój BB-12. Piątą część mleka spasteryzowanego przeznaczano do przeprowadzenia analiz. Napoje fermentowane przechowywano w warunkach chłodniczych (4 °C) przez 14 dni.

Przeprowadzono analizy mleka pasteryzowanego, napojów fermentowanych świeżych i 14-dniowych.

We wszystkich próbkach mleka oznaczano (w trzech powtórzeniach):

- zawartość tłuszczu – metodą objętościową Gerbera [18],
- oznaczenie kwasowości miareczkowej ($^{\circ}\text{SH}$) – metodą Soxhleta-Henkla [18],
- oznaczenie kwasowości czynnej (pH) – metodą potencjometryczną za pomocą pH-metru CP-502 Elmetron Polska [18],
- oznaczenie zawartości cholesterolu – metodą enzymatyczną z użyciem oksydazy cholesterolowej według Grossmanna i wsp. [6], opracowaną przez firmę R-Biopharm (Boehringer Mannheim/R-Biopharma-Enzymatische Bioanalytik). Metoda ta polega na pomiarze absorbancji roztworu kontrolnego i roztworu badanego po dodaniu odczynnika – enzymu oksydazy cholesterolowej, przy długości fali $\lambda = 405$ nm. Pomiaru absorbancji dokonywano w spektrofotometrze Helios Gamma i Delta Spectro-Lab. (Thermo Elektron Corp., Wielka Brytania).

W świeżych i 14-dniowych napojach fermentowanych oznaczano:

- zawartość tłuszczu – metodą Gerbera [18],
- kwasowość czynną (pH) – metodą potencjometryczną za pomocą pH-metru [18].
- kwasowość miareczkową metodą Soxhleta-Henkla [18],
- zawartość cholesterolu – metodą enzymatyczną, jak podano wyżej, z użyciem oksydazy cholesterolowej według Grossmanna i wsp. [6], opracowaną przez firmę R-Biopharm [Boehringer Mannheim/R-Biopharma-Enzymatische Bioanalytik].

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń opracowano statystycznie za pomocą programu komputerowego Statistica v. 8.0. Obliczono wartości średnie analizowanych parametrów i odchylenia standardowe. Przeprowadzono jedno- i dwuczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano wielokrotnym testem rozstępu Duncana na poziomach istotności $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$.

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono wyniki oznaczania wybranych właściwości mleka krowiego pasteryzowanego oraz wyprodukowanych z niego świeżych napojów fermentowanych.

Średnie zawartości tłuszczu w badanym mleku pasteryzowanym i w napojach fermentowanych nie różniły się statystycznie istotnie, natomiast stwierdzono statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,01$) między mlekiem i napojami pod względem kwasowości czynnej i miareczkowej. Najwyższym pH charakteryzowały się napoje BB (wyprodukowane z udziałem *Bifidobacterium bifidum*), a najniższym – YC (wyprodukowane z udziałem *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*), co może świadczyć o większych zdolnościach fermentacyjnych tradycyjnych kultur starterowych w porównaniu z probiotycznymi, a szczególnie z *Bifidobacterium bifidum*.

Tabela 1. Właściwości mleka i świeżych napojów fermentowanych

Table 1. Properties of milk and freshly fermented milk drinks

Rodzaj napoju Type of fermented milk drink	Zawartość tłuszczu Content of fat [%]	Kwasowość miareczkowa Titratable acidity [°SH]	pH
	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$
Mleko pasteryzowane Pasteurized milk	3,70 ± 0,35	6,50 ^A ± 0,06	6,82 ^A ± 0,03
YC	3,39 ± 0,16	29,0 ^B ± 1,42	4,39 ^B ± 0,02
YO-MIX	3,47 ± 0,37	28,2 ^B ± 1,27	4,49 ^B ± 0,17
BB	3,57 ± 0,38	25,6 ^B ± 5,52	4,80 ^B ± 0,91
LA	3,53 ± 0,43	27,2 ^B ± 6,80	4,71 ^B ± 0,48

Objaśnienia: / Explanatory notes:

YC – napój fermentowany z *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* / drink fermented using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*; YO-MIX – napój fermentowany z *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* / drink fermented using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*; BB – napój fermentowany z *Bifidobacterium bifidum* / drink fermented using *Bifidobacterium bifidum*; LA – napój fermentowany z *Lactobacillus acidophilus* / drink fermented using *Lactobacillus acidophilus*;

\bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe; / SD- standard deviation; n = 3

A, B – wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$) / mean values in column and denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.01$;

We wszystkich wyprodukowanych napojach fermentowanych stwierdzono statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$) mniejszą zawartość cholesterolu niż w mleku pasteryzowanym (tab. 2). Spośród probiotycznych bakterii starterowych największą redukcję cholesterolu, w porównaniu z mlekiem, spowodowały kultury YO-MIX (z udziałem *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) – o 58,7 % w przeliczeniu na 100 g produktu i o 55,5 % – na 1 g tłuszczu. Nie stwierdzono natomiast różnic pod względem zawartości tego składnika między poszczególnymi napojami fermentowanymi.

Juśkiewicz i Panfil-Kuncewicz [12] oceniali stopień redukcji cholesterolu w mleku przez kultury starterowe o składzie mikrobiologicznym zbliżonym do wykorzystanych w niniejszej pracy: YC (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) i YO-MIX (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*). Stwierdzili, że kultury starterowe YC w większym stopniu redukują zawartość cholesterolu niż YO-MIX (odpowiednio o: 19,8 ÷ 22,2 % i 3,1 ÷ 3,2 %). Badania własne wskazywały na odwrotną tendencję, ale różnice między ocenianymi napojami fermentowanymi nie były statystycznie istotne. Marshall [21] podaje, że kultury starterowe zawierające *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei* mają szczególne zdolności do obniżania zawartości cholesterolu. Zheng i Lu [36] przebadali zdolność redukowania

cholesterolu w medium mlecznym przez 14 szczepów bakterii w tym: 5 szczepów *Lactobacillus acidophilus*, a także *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lactococcus lactis*. Stwierdzili, że 2 szczepy: *Lactobacillus acidophilus* i *Lactococcus diacetylactis* wpłynęły na zmniejszenie zawartość cholesterolu > 45 %, a pozostałe – w zakresie 40 ÷ 45 %. Serajzadeh i Alemzadeh [25] podają, że zdolność do redukcji cholesterolu w napojach fermentowanych wykazują zarówno wolne, jak i immobilizowane komórki bakterii *Lactobacillus acidophilus*.

Tabela 2. Zawartość cholesterolu w mleku oraz w mlecznych napojach fermentowanych, determinowana rodzajem napoju

Table 2. Content of cholesterol in milk and fermented milk drinks as determined by drink type

Rodzaj napoju Type of drink	Zawartość cholesterolu / Content of cholesterol			
	$\bar{x} \pm s / SD$ [mg/g tłuszczu] [mg/g fat]	[% zawartości w stosunku do tłuszczu mleka] [Expressed as percentage % of milk fat]	$\bar{x} \pm s / SD$ [mg/100 g napoju] [mg/100 g drink]	[% zawartości w stosunku do mleka] [Expressed as percentage % of milk]
Mleko pasteryzowane Pasteurized milk	5,46 ^A ± 0,42	100,0	20,00 ^A ± 1,6	100,0
YC	3,00 ^B ± 0,16	54,9	9,88 ^B ± 0,05	49,4
YO-MIX	2,42 ^B ± 0,23	44,3	8,26 ^B ± 0,21	41,3
BB	2,53 ^B ± 0,29	46,3	8,95 ^B ± 1,01	44,8
LA	2,62 ^B ± 0,11	48,0	9,18 ^B ± 0,70	45,9

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

Po przeprowadzeniu analizy dotyczącej wpływu czasu przechowywania i rodzaju kultur probiotycznych na zawartość tłuszczu w napojach fermentowanych oraz na ich kwasowość miareczkową i czynną stwierdzono brak statystycznie istotnego wpływu (przy $p \leq 0,05$) obu czynników doświadczalnych na zawartość tłuszczu. Nie stwierdzono również istotnego wpływu rodzaju kultur starterowych i czasu przechowywania na kwasowość napojów (tab. 3).

Stwierdzono natomiast statystycznie istotny wpływ zarówno rodzaju kultur starterowych, jak i czasu przechowywania na zawartość cholesterolu w napojach fermentowanych w przeliczeniu na 1 g tłuszczu ($p \leq 0,01$) oraz w przeliczeniu na 100 g napoju ($p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$) – tab. 4. We wszystkich napojach z dodatkiem kultur probiotycznych zawartość cholesterolu była mniejsza niż w napoju YC. Zawartość cholesterolu została najbardziej zredukowana w napojach probiotycznych YO-MIX, w

mniejszym

Tabela 3. Kwasowość czynna (pH) i miareczkowa oraz zawartość tłuszczu w mlecznych napojach fermentowanych, determinowane rodzajem użytej kultury starterowej i czasem przechowywania

Table 3. pH and titratable acidity, and content of fat in fermented milk drinks as determined by type of starter culture and time of storage

Czynniki Factors		Zawartość tłuszczu Content of fat [%]	Kwasowość miareczkowa Titratable acidity [°SH]	pH
		$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$	$\bar{x} \pm s / SD$
Czas przechowywania Storage time [dni / days]	1	3,48 ± 0,15	27,48 ± 1,95	4,60 ± 0,14
	14	3,54 ± 0,14	30,53 ± 1,60	4,41 ± 0,11
Rodzaj napoju Type of drink	YO	3,33 ± 0,12	29,97 ± 0,93	4,33 ± 0,04
	YO-MIX	3,47 ± 0,23	29,60 ± 0,91	4,42 ± 0,04
	BB	3,66 ± 0,25	26,67 ± 3,57	4,76 ± 0,26 1
	LA	3,60 ± 0,26	29,80 ± 3,73	4,51 ± 0,23

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1 / Meanings of symbols as in Tab. 1 1.

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 12 (dni / days), n = 6 (napoje / drinks).

Tabela 4. Zawartość cholesterolu w mlecznych napojach fermentowanych, determinowana rodzajem użytych kultur starterowych i czasem przechowywania

Table 4. Content of cholesterol in fermented milk drinks as determined by type of starter cultures used and storage time

Czynniki Factors		Zawartość cholesterolu / Content of cholesterol			
		[mg/g tłuszczu] / [mg/g of fat]		[mg/100 g napoju] / [mg/100 g of drink]	
		\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
Czas przechowywania Storage time [dni] / [days]	1	2,64 ^A	0,11	9,07 ^A	0,32
	14	2,25 ^B	0,08	7,71 ^B	0,30
Rodzaj napoju Type of drink	YC	2,77 ^{Aa}	0,14	9,17 ^A	0,32
	YO-MIX	2,20 ^B	0,17	7,54 ^B	0,39
	BB	2,30 ^b	0,15	8,26	0,67
	LA	2,50	0,09	8,59	0,49

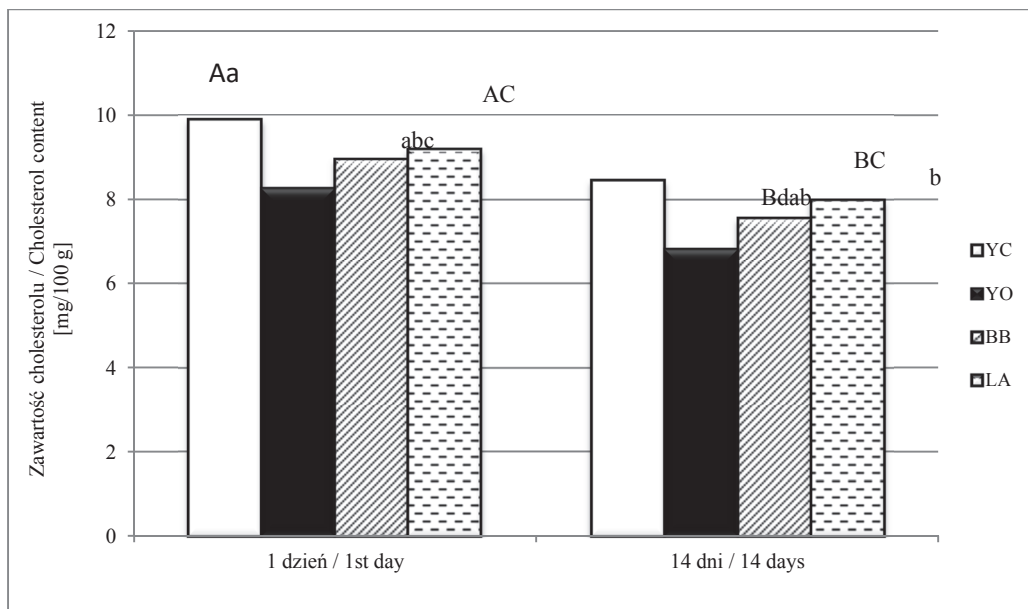
Objaśnienia: / Explanatory notes:

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1 / Meanings of symbols as in Tab. 1.

A, B – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$) w obrębie czynnika / mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.01$ within factor; a, b - wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$)

w obrębie czynnika / mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$ within factor.

zaś stopniu – w napojach BB i LA (tab. 4). Do istotnego ($p \leq 0,01$) zmniejszenia zawartości cholesterolu w badanych napojach przyczynił się również 14-dniowy okres przechowywania (tab. 4, rys. 1). Wielu autorów podkreśla, że zdolność i efektywność wiązania cholesterolu przez bakterie fermentacji mlekowej zależą od ich gatunku i szczepu [2, 3, 4, 9, 39]. Juśkiewicz i Panfil-Kuncewicz [12] oraz Tabuchi i wsp. [28] twierdzą, że zdolność ta zależy także od fazy wzrostu i żywotności bakterii. Największa redukcja cholesterolu następuje podczas logarytmicznego wzrostu komórek.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1 / Meanings of symbols as in Tab. 1.

A, B, C – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$) / mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.01$;

a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

Rys. 1. Zawartość cholesterolu w mleknych napojach fermentowanych zróżnicowanych rodzajem użytych kultur starterowych, podczas przechowywania

Fig. 1. Content of cholesterol in milk drinks, fermented using different types of starter cultures, during storage

Wnioski

1. Zastosowanie bakterii probiotycznych do fermentacji mleka wpłynęło na istotną redukcję zawartości cholesterolu, która pogłębiała się podczas 14-dniowego przechowywania napojów fermentowanych.
2. Pomiędzy napojami stwierdzono istotne różnice pod względem zdolności redukcji cholesterolu, wynikające z rodzaju użytych kultur bakterii kwasu mlekowego.
3. Tradycyjne kultury jogurtowe (YC – *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) w mniejszym stopniu redukowały zawartość cholesterolu w mleku w porównaniu z kulturami probiotycznymi.

Badania zrealizowano i sfinansowano z tematu DS/3700/WTŻ w latach 2011 i 2015.

Literatura

- [1] Akalin S.A., Fenderya S., Akbulut N.: Variability and activity of *Bifidobacteria* in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2004, **6** (39), 613-621.
- [2] Baj J., Markiewicz Z.: *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2006.
- [3] Brashears M.M., Gilliland S.E., Buck L.M.: Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 2103-2110.
- [4] Dambekodi P.C., Gilliland S.E.: Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 1818-1824.
- [5] Fujishiro K., Uchida H., Shimokawa K., Nakano M., Sano F., Ohta T., Kaya-Hara N., Asiaka K., Umwajimat T.: Purification and properties of a new *Brevibacterium steroli* cum cholesterol oxidase produced by *E. coli* MM294/pn H10. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **215**, 243-248.
- [6] Grossmann A., Timmen H., Klostermeyer H.: Die enzymatische Bestimmung von Cholesterin in Milchfett – eine Alternative zu den bisher gebräuchlichen Methoden. *Milchwissenschaft*, 1976, **31**, 721-724.
- [7] Grundy S.M.: Cholesterol, factors determining levels in blood. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. Roginski H., Fuquay J., Fox P., Academic Press Elsevier Science, 2004, **3**, 1604-1611.
- [8] Hang J.C., Luo C.Y.: Cholesterol removal from foods using lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol.*, 1998, **3** (19), 20-22.
- [9] Hosono A., Tono-Okat T.: Binding of cholesterol with lactic acid bacterial cells. *Milchwissenschaft*, 1995, **50**, 556-559.
- [10] Huang Y., Wang X.J., Wang J.F., Wu F., Sui Y.J., Yang L.F., Wang Z.G.: *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *J. Dairy Sci.*, 2013, **5** (96), 2746-2753.
- [11] Huang Y., Wu F., Wang X.J., Sui Y.J., Yang L.F., Wang J.F.: Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *J. Dairy Sci.*, 2013, **5** (96), 2816-2825.
- [12] Juśkiewicz M.E., Panfil-Kuniewicz H.: Reduction of cholesterol content in milk with dairy thermophilic cultures application. *Milchwissenschaft*, 2003, **7/8** (58), 370-373.

- [13] Kimoto H., Ohmono S., Okamoto T.: Cholesterol removal from media by lactococci. *J. Dairy Sci.*, 2002, **85**, 3182-3188.
- [14] Kisza J., Staniewski B., Juśkiewicz M., Rosiński P.: Reduction of cholesterol in butter depending cream acidity. *Pol. J. Food Nutr. Scie.*, 1996, **5/46**, 4, 19-28.
- [15] Koziół J., Gustaw W.: Stymulowanie wzrostu bakterii fermentacji mlekowej przez białka mleka. *Przeł. Mlecz.*, 2012, **12**, 10-14.
- [16] Kumar M., Nagpal R., Kumar R., Hemalatha R., Verma V., Kumar A., Chakraborty C., Singh B., Marotta F., Jain S., Yadav H.: Cholesterol – lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp. Diab. Res.*, 2012, 902917.
- [17] Lee H., Yoon H., Ji Y., Kim H., Park H., Lee J., Shin H., Holzapfel W.: Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, **1** (145), 155-161.
- [18] Litwińczuk A., Litwińczuk Z., Barłowska J., Florek M., Król J., Grodzicki T., Kędzierska-Matysek M., Skąlecki P.: Metody oceny towaroznawczej surowców i produktów zwierzęcych. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Lublin 2011.
- [19] Long M.T., Shah N.P.: Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Sci.*, 2005, **88**, 55-66.
- [20] Lu Y.L., Tang Y., Wang L., Chen Y., Yang S., Wang W.: Bioconversion of yolk cholesterol by extracellular cholesterol oxidase from *Brevibacterium* sp. *Food Chem.*, 2002, **77**, 457-463.
- [21] Marshall V.M.: Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *J. Soc. Dairy Technol.*, 1993, **2** (46), 49-56.
- [22] Naverd K.P., Fryer E.B., Fryer H.C.: Effects of skim milk, skim milk powder, orotic acid and uric acid on lipid metabolism in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 1990, **1** (2), 640-646.
- [23] Pan D.D., Zeng X.Q., Yan Y.T.: Characterization of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *J. Sci. Food Agric.*, 2011, **3**, (91), 512-518.
- [24] Schiby V.K., Mishra H.N.: Fermented milks and milk products as functional foods – a Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2013, **5** (53), 482-496.
- [25] Serajzadeh S., Alemzadeh I.: Milk cholesterol reduction using immobilized *Lactobacillus acidophilus* ATCC 1643 in sodium – alginate. *Int. J. Food Eng.*, 2008, 4, 8.
- [26] Sieber R., Eyer H.: Cholesterol removal from dairy products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. Roginski H. Academic Press Elsevier Science, 2004, **3**, 1611-1617.
- [27] Smith M., Sullivan C., Goodman N.: Enzymatic determination of cholesterol in egg yolk. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 1991, **65**, 1221-1224.
- [28] Tabuchi M., Tanura A., Yamada N., Ishidat T., Hododam M., Hosono A.: Hipocholesterolemic effect of disable and heat-sterilized cells of *Lactobacillus* GG in rats fed a high cholesterol diet. *Milchwissenschaft*, 2004, **5/6** (58), 249-253.
- [29] Takano T., Yamamoto V.: Health effects of fermented milks. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. Roginski H. Academic Press Elsevier Science, 2004, **2**, 1063-1069.
- [30] Toit M., Franz C.M.A.P., Dicks L.M.T., Schillinger U., Haberer P., Warlies B.: Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary mini pig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faces pH and faces moisture content. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, v. 40 issues 1-2, 93-104.
- [31] Tok E., Aslim B.: Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiology and Immunology*, 2010, **5**, (54), 257-264.
- [32] Uroic K., Nikolic M., Kos B., Pavunc A.L., Beganovic J., Lukic J., Jovcic B., Filipic B., Miljkovic M., Golic N., Topisirovic L., Cadez N., Raspor P., Suskovic J.: Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh soft cheese and Serbian white pickled cheese. *Food Technol. Biotechnol.*, 2014, **2** (52), SI, 232-241

- [33] Usman B., Hosono A.: Binding of cholesterol on the cells and peptidoglycan of *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*, 1999, **54**, 495-498.
- [34] Vijayendra S.V.N., Gupta R.V.: Assessment of probiotic and sensory properties of dahi and yoghurt prepared using bulk freeze-dried cultures in buffalo milk. *Ann. Microbiol.*, 2012, **62**, 939-947.
- [35] Zaręba D., Ziarno M.: Przeżywalność bakterii kwasu mlekowego i bifidobakterii w jogurtach handlowych. *Przegl. Mlecz.*, 2013, **9**, 14-20.
- [36] Zheng Y.C., Lu Y.L.: Cholesterol removal from foods using lactic acid bacteria. *Food Science*, 1998, **3 (19)**, 20-22.
- [37] Zheng Y.C., Lu Y.L., Wang J.F., Yang L.F., Pan C.Y., Huang Y.: Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan Kefir grains. *PLOS ONE*, 2013, vol 8, issue 7.
- [38] Ziarno M., Sękuł E., Makowska M.: Wiązanie cholesterolu przez kultury starterowe mezofilnych paciorkowców mlekowych. *Biotechnologia*, 2006, **2 (73)**, 234-246.
- [39] Ziarno M.: Studia nad wiązaniem i usuwaniem cholesterolu przez komórki bakterii fermentacji mlekowej i bifidobakterii w warunkach *ex vivo*. *Rozprawy naukowe i monografie*. Wyd. SGGW, Warszawa 2009.
- [40] Ziarno M., Sękuł E., Lafaya A.A.: Cholesterol assimilation by commercial yoghurt starter cultures. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2007, **1 (6)** 83-94.
- [41] Ziarno M., Godlewska A.: Znaczenie i wykorzystanie bakterii rodzaju *Lactobacillus* w mleczarstwie. *Med. Weter.*, 2008, **1 (64)**, 35-39.

EFFECT OF PROBIOTIC STARTER CULTURES ON CHOLESTEROL LEVEL IN FERMENTED MILK DRINKS

S u m m a r y

Fermented drinks were produced from pasteurized cow's milk inoculated using the following DVS starter cultures: YC-180 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*), YO-MIX 207 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*), LA-5 (*Lactobacillus acidophilus*), and BB-12 (*Bifidobacterium bifidum*). In the milk and in the fermented milk drinks made from it and stored for 1 and 14 days, the following was determined: content of fat, pH value, titrable acidity, and cholesterol level using an enzymatic method with a cholesterol oxydase. The pasteurized milk contained 20.0 mg/100 g of cholesterol on average, whereas its fat contained 5.64 mg/g of cholesterol. Compared to the milk, in the produced one-day old milk drinks fermented using YC-180, YO-MIX 207, LA-5 and BB-12 starters, a statistically significant ($p \leq 0.05$) reduction was found in the level of cholesterol; it amounted to, respectively: 49.4 %, 41.3 %, 44.8 %, and 45.9 % of the initial content of cholesterol in 100 g of milk and to, respectively: 54.9 %, 44.3 %, 46.3 %, and 48.0 % in 1 g of milk fat. The starter cultures applied differed in their capacity to decrease the content of cholesterol: the capacity of YO-MIX 207 inoculating culture was the strongest, whereas that of YC-180 was the weakest. During chilled storage of drinks for 14 days, a further decrease was reported in the cholesterol level in the drinks and in their fat: 15 % on average.

Key words: milk, starter cultures, fermented probiotic drinks, cholesterol ☒

WALDEMAR GUSTAW, JUSTYNA KOZIOŁ, ADAM WAŚKO,
KATARZYNA SKRZYPCZAK, MONIKA MICHALAK-MAJEWSKA,
MACIEJ NASTAJ

**WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I PRZEŻYWALNOŚĆ
LACTOBACILLUS CASEI W MLECZNYCH NAPOJACH
FERMENTOWANYCH OTRZYMANÝCH Z DODATKIEM
WYBRANYCH PREPARATÓW BIAŁEK MLEKA**

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu wyselekcjonowanych preparatów białek mleka na właściwości fizykochemiczne i reologiczne mlecznych napojów fermentowanych, otrzymanych przy użyciu potencjalnie probiotycznych bakterii *Lb. casei*. Preparaty białek mleka zastosowane do produkcji mlecznych napojów fermentowanych wpływały stymulująco na wzrost szczepu *Lb. casei* L26. Po 3-tygodniowym przechowywaniu w warunkach chłodniczych mlecznych napojów fermentowanych, otrzymanych z pełnego mleka w proszku, najwyższą liczbę komórek bakterii szczepu *Lb. casei* L26 ($3,50 \times 10^8$ jtk/ml) stwierdzono w produktach wzbogaconych 1 % koncentratu białek serwatkowych (WPC). Dodatek preparatów białek serwatkowych miał wyraźny wpływ na właściwości reologiczne mlecznych napojów fermentowanych. Skrzepy mlecznych napojów fermentowanych otrzymane z mleka odtłuszczonego charakteryzowały się wyższymi wartościami takich parametrów, jak twardość czy współczynnik konsystencji. Twardość skrzepów mlecznych napojów fermentowanych otrzymanych z odtłuszczonego mleka w proszku (OMP) wynosiła 0,51 N. Skrzepy napojów z dodatkiem 2 % izolatu białek serwatkowych (WPI) cechowały się twardością – 1,65 N. Produkty otrzymane przy użyciu szczepu *Lb. casei* L26 charakteryzowały się dużą synerezą, niezależnie od zawartości tłuszczu w mleku. Wzrost stężenia WPI od 0,5 do 2 % w napojach fermentowanych otrzymanych z OMP powodował stopniowe zmniejszenie ilości wydzielonej serwatki z 11,98 do 1,03 %. Oprócz poprawy właściwości fizykochemicznych mlecznych napojów fermentowanych, wzbogacanie ich preparatami białek mleka wpływało na zwiększenie walorów prozdrowotnych oraz nadawało produktom cechy żywności funkcjonalnej.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus*, mleczne napoje fermentowane, preparaty białek serwatkowych, reologia, synereza

Prof. dr hab. W. Gustaw, dr J. Kozioł, mgr inż. K. Skrzypczak, dr inż. M. Michalak-Majewska, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, dr A. Waśko, dr inż. M. Nastaj, Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin. Kontakt: waldemar.gustaw@up.lublin.pl

Wprowadzenie

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) stosowane są powszechnie do produkcji żywności fermentowanej. Najczęściej są to bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, a wśród nich *Lb. casei*. Do najbardziej znanych szczepów *Lb. casei* należy Shirota, który jest szczepem o właściwościach probiotycznych. Szczep ten został zastosowany do produkcji fermentowanego napoju mlekowego Yakult, wprowadzonego na rynek japoński w 1935 r. [17]. Probiotyczne szczepy *Lb. casei* wykazują właściwości prozdrowotne, udokumentowane klinicznie. Metabolity wytwarzane przez ten szczep wykazują m.in. działanie antibakteryjne i antywirusowe [8, 24]. Probiotyczne szczepy *Lb. casei* stosowane są zarówno w mlecznych, jak i w mięsnych produktach fermentowanych [3, 25, 26].

Mleko zawiera niezbędne składniki odżywcze potrzebne do wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, jednak nie występują one w odpowiedniej ilości i w formie dostępnej dla komórek bakteryjnych, co ogranicza ich namnażanie [19]. Dodatkowe źródło aminokwasów może stymulować wzrost bakterii probiotycznych, szczególnie w przypadku zastosowania kultur starterowych niezawierających w swoim składzie *Lb. bulgaricus* [27]. Białka mleka zawierają wszystkie niezbędne aminokwasy, które są źródłem azotu organicznego dla bakterii [10]. W celu uzyskania odpowiedniej tekstury mlecznych napojów fermentowanych najczęściej stosowany jest dodatek hydrokolooidów polisacharydowych lub preparatów białkowych [9, 21-23]. W literaturze jest stosunkowo niewiele prac naukowych poświęconych badaniom wpływu białek mleka na stymulowanie wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Preparaty białek serwatkowych czy hydrolizaty kazeiny dodawane są w celu skrócenia czasu fermentacji *Lb. acidophilus*, gdyż są źródłem aminokwasów i węglowodanów potrzebnych do wzrostu komórek bakteryjnych [5]. Laktoferyna stymulowała wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, ale również szczepów *Lb. acidophilus* [12]. Wybrane preparaty białek mleka stymulowały wzrost bakterii *Lb. acidophilus* zastosowanych do otrzymania mlecznych napojów fermentowanych [14].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu wyselekcjonowanych preparatów białek mleka na właściwości fizykochemiczne i reologiczne mlecznych napojów fermentowanych, otrzymanych metodą termostatową przy użyciu potencjalnie probiotycznych bakterii *Lb. casei*, oraz określenie wpływu wybranych preparatów białek mleka na przeżywalność bakterii *Lb. casei* podczas chłodniczego przechowywania tych napojów.

Material i metody badań

Material biologiczny użyty w badaniach stanowił szczep *Lactobacillus casei* LAFTI L26 ((DSM, Polska)

Do przeprowadzenia badań zastosowano: podłoże podstawowe MRS (BTL, Łódź), mleko pełne w proszku (PMP) (OSM, Krasnystaw), odłuszczone mleko w proszku (OMP) (Biomlek, Chełm); koncentrat białek serwatkowych (WPC 65) (Milei GmbH, Allgau, Niemcy), izolat białek serwatkowych (WPI) (Milei GmbH, Allgau, Niemcy), serwatkę w proszku demineralizowaną (SPD) (Euroserum, Port-Sur-Saone, Francja) oraz kazeinoglikomakropeptyd (CGMP), (Arla Food, Dania) i α -laktoalbuminę (α -la) (Arla Food, Dania).

Określenie wpływu preparatów białek mleka na wzrost bakterii w płynnym podłożu hodowlanym

W celu określenia wpływu wybranych preparatów białek mleka na wzrost badanych szczepów bakterii dokonano pomiaru gęstości optycznej hodowli bakteryjnych (OD), prowadzonych przez 48 h w temp. 37 °C, przy wykorzystaniu automatycznego czytnika wzrostu drobnoustrojów - Bioscreen C (OY Growth Curves, Finlandia) [15]. Hodowlę prowadzono na zmodyfikowanym podłożu MRS, w którym źródłem azotu były wybrane preparaty białek mleka w stężeniu 0,25 %.

Otrzymanie mlecznych napojów fermentowanych

Sterylnie, 10-procentowe regenerowane OMP zaszczepiano 100 μ l zawiesiny komórek bakterii *Lb. casei* L26 i inkubowano w temp. 37 °C do czasu uzyskania liczby komórek bakterii na poziomie $10^7 \div 10^8$ jtk/ml [6]. Przygotowane w ten sposób inokulum posłużyło do szczepienia 13-procentowych roztworów mleka w proszku. Mleczne napoje fermentowane z dodatkiem monokultury bakterii *Lb. casei* L26 i wybranych preparatów białek mleka w ilości [%]: 0,5, 1 i 2 otrzymano metodą termostatową [14].

Określenie wielkości synerезy w mlecznych napojach fermentowanych

Wielkość synerезy oznaczano po 12 h od zakończenia procesu fermentacji według metody Kozioł i wsp. [14] oraz Amatayakula i wsp. [1].

*Wpływ preparatów białek mleka na wzrost *Lb. casei* L26 w mlecznych napojach fermentowanych*

Liczba komórek bakteryjnych *Lb. casei* L26 w mlecznych napojach fermentowanych oznaczano metodą płytkową. Posiewy płytkowe wykonywano po 12 h od zakończenia fermentacji na podłożu MRS-agar z dodatkiem 0,2 % chlorku litu i 0,3 % propionianu sodu. Każdy posiew wykonywano w dwóch powtórzeniach. Po zakończeniu hodowli bakteryjnych obliczano ogólną liczbę bakterii zgodnie z wcześniej stosowaną metodą [13].

*Wpływ preparatów białek mleka na przeżywalność *Lb. casei* L26 w mlecznych napojach fermentowanych podczas ich chłodniczego przechowywania*

Liczbę komórek bakterii *Lb. casei* L26 oznaczano metodą płytkową. Posiewy płytkowe wykonywano po 1, 7, 14 oraz 21 dniach chłodniczego przechowywania skrzepów kwasowych w temp. 4 °C, na podłożu MRS-agar z dodatkiem 0,2 % chlorku litu i 0,3 % propionianu sodu. Każdy posiew wykonywano w dwóch powtórzeniach.

Reologiczne właściwości mlecznych napojów fermentowanych

Twardość skrzepów mlecznych napojów fermentowanych oznaczano za pomocą analizatora tekstury TA-xT2i (Stable Micro Systems, Godalming, UK) po 12 h przechowywania w temp. 4 °C. Próbkę badano, stosując zmodyfikowany test TPA [14, 15]. Średnica trzpienia wynosiła 15 mm, głębokość penetracji 20 mm, natomiast prędkość przesuwu głowicy analizatora – 1 mm/s. Pomiary wykonywano w dwóch seriach po pięć powtórzeń.

Wyznaczano krzywe płynięcia w zakresie gradientu szybkości ścinania $0 \div 150 \text{ s}^{-1}$, w temp. 20 °C, w ciągu 120 s. Oznaczeń dokonywano przy użyciu układu stożek – płytka (C60/2°Ti) i reometru RS 300 (Haake, Karlsruhe, Niemcy). Wyznaczony przebieg krzywych płynięcia analizowano z wykorzystaniem modelu Herschela-Bulkleya (RheoWin 3, Haake, Karlsruhe, Niemcy).

Analiza statystyczna

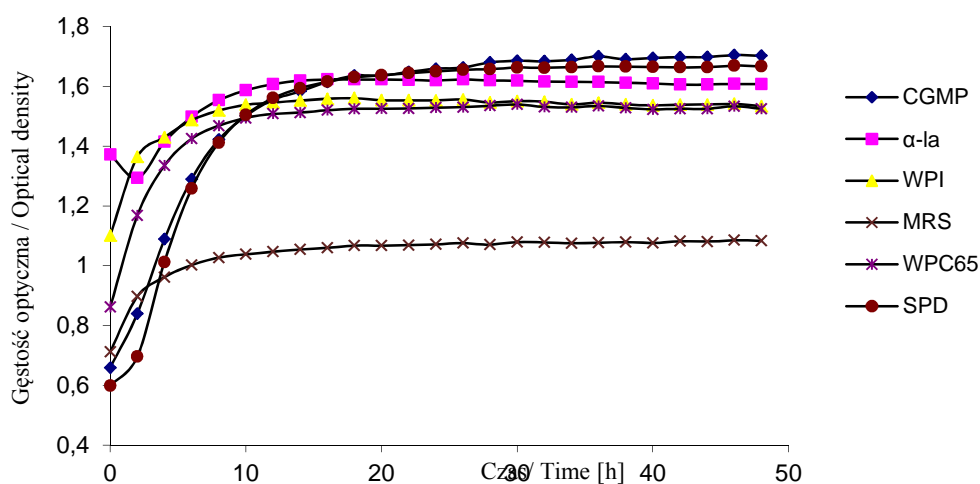
Analizę statystyczną wykonano stosując program Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) przy poziomie istotności $p \leq 0,05$. Do oceny różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano test Tukeya.

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badań określono wpływ wybranych preparatów białek mleka na wzrost *Lb. casei* L26 w zmodyfikowanym podłożu MRS. Zmiany gęstości optycznej (OD) podczas hodowli szczepu L26 w płynnych pożywkach MRS z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka przedstawiono na rys. 1. Na podłożach z dodatkiem preparatów białek mleka wartości OD wzrastały systematycznie od pierwszych godzin hodowli i były zdecydowanie wyższe w porównaniu z hodowlą w podstawowym podłożu MRS. Na tej podstawie można stwierdzić, że preparaty białkowe stymulowały wzrost szczepu *Lb. casei* L26. Najlepszy wzrost bakterii obserwowano w przypadku hodowli na podłożach z dodatkiem CGMP i SPD (rys. 1). Podobne wyniki uzyskano podczas wzrostu *Lb. casei* Lc-1 na regenerowanej serwatce [7].

W następnym etapie badań otrzymywano mleczne napoje fermentowane przez *Lb. casei* L26 z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka. Wzbogacenie miało wpływ na liczbę komórek bakterii w uzyskanych napojach zarówno z OMP, jak i PMP

(tab. 1). Największą liczbą komórek bakterii *Lb. casei* L26 charakteryzowały się produkty otrzymane z dodatkiem CGMP i WPI. Znaczący wpływ na stymulację wzrostu szczepu L26 wywierały również dodatki WPC65 i SPD. Najślabszym stymulatorem wzrostu badanego szczepu była α -la. W mlecznych napojach fermentowanych z α -la, liczba komórek bakteryjnych utrzymywała się na poziomie 10^8 . Jednak liczba komórek L26 w produktach z dodatkiem α -la nadal przewyższała ich ilość w mlecznych napojach fermentowanych wyprodukowanych z samego OMP lub PMP. Podobne wyniki uzyskano w badaniu wzrostu bakterii kwasu mlekowego na regenerowanej serwatce w przypadku szczepów *Lb. acidophilus* oraz *Lb. casei*. Liczba komórek bakteryjnych w tych hodowlach wynosiła przeciętnie 10^9 jtk/ml [7, 18].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

CGMP – kazeinoglikomakropeptyd / casein glycomacropeptide; α -la – α -laktoalbumina / α -lactalbumin; WPI – izolat białek serwatkowych / whey protein isolate; MRS – podłoże podstawowe MRS / basic growth medium; WPC 65 – koncentrat białek serwatkowych / whey protein concentrate; SPD – serwatka w proszku demineralizowana / demineralised whey powder

Rys. 1. Wpływ dodatku preparatów białek mleka na wzrost *Lb. casei* L26.

Fig 1. Effect of milk protein preparations added on growth of *Lb. casei* L26.

W tab. 2. przedstawiono wartości twardości skrzepów mlecznych produktów z PMP i OMP modyfikowanych przez dodatek preparatów białek mleka, otrzymanych po fermentacji przez szczep *Lb. casei* L26. Dodatek preparatów białek mleka nie powodował statystycznie istotnego ($p < 0,05$) wzrostu twardości skrzepów wszystkich produktów otrzymanych z OMP, poza próbką z 2-procentowym dodatkiem WPI. Po-

dobne zależności obserwowano podczas analizy pomiaru twardości skrzepów napojów otrzymanych z PMP. Największą twardością charakteryzowały się skrzepy z WPI.

Tabela 1. Liczba komórek szczepu *Lb. casei* L26 w mlecznych napojach fermentowanych, otrzymanych z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka [jtk/ml]

Table 1. Count of bacterial cells of *Lb. casei* L26 strain in fermented milk beverages produced with addition of milk protein preparations [cfu/ml]

Dodatek preparatu Preparation added [%]	OMP					PMP				
	CGMP	α -la	WPC65	WPI	SPD	CGMP	α -la	WPC65	WPI	SPD
0	$2,7 \times 10^8$					$2,8 \times 10^8$				
0,5	$3,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$3,7 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$
1	$3,5 \times 10^9$	$3,7 \times 10^8$	$2,4 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$4,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
2	$3,8 \times 10^9$	$4,1 \times 10^8$	$2,5 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$	$3,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$

Objaśnienia: Explanatory notes:

OMP – odtłuszczone mleko w proszku /skimmed milk powder; PMP – pełne mleko w proszku/full fat milk powder. Pozostałe objaśnienia jak pod rys. 1. / Other explanatory notes as in Fig. 1.

Tabela 2. Twardość skrzepów mlecznych napojów fermentowanych z udziałem *Lb. casei* L26 [N]

Table 2. Hardness of curds of fermented milk beverages with *Lb. casei* L26 [N] strain

Dodatek preparatu Preparation added [%]	OMP					PMP				
	CGMP	α -la	WPC65	WPI	SPD	CGMP	α -la	WPC65	WPI	SPD
0	$0,51^a \pm 0,08$					$0,34^{ab} \pm 0,03$				
0,5	$1,14^{abc} \pm 0,28$	$0,79^{ab} \pm 0,04$	$0,75^{ab} \pm 0,08$	$0,68^a \pm 0,07$	$0,97^{ab} \pm 0,07$	$0,46^{ab} \pm 0,04$	$0,54^{abc} \pm 0,05$	$0,38^{ab} \pm 0,06$	$0,65^{abcd} \pm 0,08$	$0,37^{ab} \pm 0,02$
1	$1,04^{abc} \pm 0,13$	$0,90^{ab} \pm 0,05$	$0,57^a \pm 0,05$	$0,84^{ab} \pm 0,06$	$0,88^{ab} \pm 0,03$	$0,47^{ab} \pm 0,07$	$0,65^{abcd} \pm 0,10$	$0,50^{ab} \pm 0,05$	$0,67^{abcd} \pm 0,02$	$0,52^{abc} \pm 0,05$
2	$1,09^{abc} \pm 0,39$	$0,99^{ab} \pm 0,05$	$0,57^a \pm 0,03$	$1,65^{bcd} \pm 0,09$	$0,62^a \pm 0,07$	$0,41^{ab} \pm 0,06$	$0,76^{bcde} \pm 0,03$	$0,34^{ab} \pm 0,03$	$1,04^{cdef} \pm 0,12$	$0,38^{ab} \pm 0,03$

Objaśnienia: Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie \pm odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations. Różnice między wartościami średnimi w kolumnach (dla OMP lub PMP) oznaczonymi różnymi literami są statystycznie istotne ($p < 0,05$) / Differences among means in columns (for OMP or PMP) denoted by different letters are statistically significant ($p < 0,05$)

W tab. 3. przedstawiono wartości współczynnika konsystencji (K) uzyskane podczas badania skrzepów kwasowych otrzymanych z mleka odtłuszczonego i pełnego z dodatkiem preparatów białek mleka w wyniku fermentacji monokulturą *Lb. casei*

L26. Wszystkie badane napoje fermentowane wykazywały właściwości pseudopalstyczne. Wartości K napojów mlecznych otrzymanych z OMP były wyższe w porównaniu z próbkami otrzymanymi z PMP. Dodatek do obu rodzajów mleka preparatów białkowych powodował, w większości przypadków, wzrost wartości K. Wysokimi wartościami K charakteryzowały się napoje mleczne otrzymane z OMP z dodatkiem SPD i α -la.

Tabela 3. Wartości współczynnika konsystencji (K) mlecznych napojów fermentowanych przez szczep *Lb. casei* L26 [Pa·sⁿ]

Table 3. Values of consistency index (K) of milk beverages fermented using *Lb. casei* L26 strain [Pa·sⁿ]

Dodatek preparatu Preparation added [%]	OMP					PMP				
	CGMP	α -la	WPC65	WPI	SPD	CGMP	α -la	WPC65	WPI	SPD
0	105,6 ^{cd} ±12,9					16,8 ^a ±4,4				
0,5	226,5 ^{ef} ±1,9	263,8 ^g ±15,3	170,9 ^c ±14,1	106,3 ^{cd} ±11,5	271,2 ^g ±9,7	37,4 ^{ab} ±8,2	58,5 ^{ab} ±15,9	20,8 ^{ab} ±6,8	70,0 ^{abc} ±6,1	36,9 ^{ab} ±11,8
1	215,4 ^{ef} ±7,1	348,5 ^{hi} ±4,7	42,6 ^{ab} ±1,7	100,0 ^{cd} ±11,7	373,3 ^h ±6,8	23,7 ^{ab} ±7,8	62,4 ^{ab} ±23,4	22,9 ^{ab} ±7,5	78,1 ^{abc} ±18,7	44,2 ^{ab} ±20,1
2	232,3 ^{ef} ±5,2	665,5 ^j ±7,3	28,3 ^a ±2,4	84,0 ^{bc} ±9,1	670,8 ^j ±10,1	13,6 ^a ±5,1	83,9 ^{abc} ±32,8	23,4 ^{ab} ±5,4	135,5 ^c ±36,3	28,3 ^{ab} ±6,9

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Tabela 4. Poziom synerazy mlecznych napojów fermentowanych, z dodatkiem preparatów białek mleka otrzymanych w wyniku fermentacji przez szczep *Lb. casei* L26 [%]

Table 4. Syneresis volume of fermented milk beverages with milk protein preparations added, produced by fermentation using *Lb. casei* L26 strain [%]

Dodatek preparatu Preparation added [%]	OMP					PMP				
	CGMP	α -la	WPC65	WPI	SPD	CGMP	α -la	WPC65	WPI	SPD
0	24,24 ⁱ ±0,99					26,77 ⁱ ±1,34				
0,5	22,72 ^h ±1,17	18,46 ^e ±0,87	15,38 ^{ef} ±0,98	11,98 ^d ±0,76	22,87 ^h ±0,87	24,54 ⁱ ±0,77	19,83 ^g ±1,07	17,82 ^f ±0,88	14,35 ^{cd} ±0,95	24,30 ⁱ ±0,65
1	21,92 ^h ±2,02	18,05 ^e ±0,59	9,72 ^c ±0,75	1,09 ^a ±0,03	22,27 ^h ±0,82	22,29 ^h ±2,04	17,18 ^{ef} ±0,34	14,21 ^{cd} ±0,10	11,94 ^{bc} ±0,59	22,36 ^h ±1,17
2	19,14 ^f ±0,96	10,09 ^c ±1,03	4,39 ^{ab} ±0,23	1,03 ^a ±0,04	12,30 ^d ±0,44	16,60 ^{ef} ±0,89	10,56 ^b ±0,76	10,74 ^{bc} ±0,88	6,08 ^a ±1,03	11,31 ^{bc} ±1,00

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Wyznaczenie poziomu synerazy mlecznych napojów fermentowanych pozwoliło określić wpływ zastosowanych preparatów białek mleka oraz szczepów bakteryjnych

na zwięzłość i stabilność skrzepu kazeinowego otrzymanych napojów fermentowanych. Zastosowanie szczepu *Lb. casei* L26 do fermentacji mleka regenerowanego skutkowało otrzymaniem żeli kwasowych o dużym poziomie synerезy (tab. 4). W przypadku napojów kontrolnych otrzymanych z 13-procentowego OMP lub PMP oznaczono zbliżony poziom synerезy. Dodatek preparatów białek mleka w ilości 0,5 i 1% nie wpłynął lub wpływał w niewielkim stopniu na zmniejszenie synerезy. Tylko po dodaniu WPI zaobserwowano najmniejsze wydzielanie serwatki zarówno w przypadku napojów z OMP, jak i PMP. Najwięcej serwatki wydzielały produkty otrzymane z OMP z 0,5-procentowym dodatkiem CGMP. Wielkość synerезy wszystkich produktów z dodatkiem szczepu *Lb. casei* L26 wyraźnie zmniejszyła się po dodaniu 2 % preparatów białek mleka. Podobną prawidłowość zaobserwowano we wcześniejszych badaniach nad wpływem dodatku preparatów białek serwatkowych na wielkość synerезy mlecznych napojów fermentowanych [14, 16]. Mniejszą synerезę po dodaniu większych stężeń białek mleka można wytłumaczyć, gęściejszym usieciowaniem tych skrzepów w porównaniu z jogurtami kontrolnymi [20].

Tabela 5. Przeżywalność szczepu *Lb. casei* L26 w mlecznych napojach fermentowanych z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka, podczas chłodniczego przechowywania

Table 5. Survival of *Lb. casei* L26 strain in cold-stored fermented milk beverages with selected milk proteins preparations added

Czas przechowywania [dni] Storage time [days]	<i>Lb. casei</i> L26 [jtk/ml]		
	PMP	PMP+1 % CGMP	PMP+1 % WPC65
1	$4,24 \times 10^8$	$2,48 \times 10^9$	$1,94 \times 10^9$
7	$1,03 \times 10^8$	$1,55 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$
14	$6,18 \times 10^7$	$5,77 \times 10^8$	$4,90 \times 10^8$
21	$5,22 \times 10^7$	$8,64 \times 10^7$	$3,50 \times 10^8$

Liczba komórek szczepu *Lb. casei* L26 w napojach mlecznych z PMP z dodatkiem 1 % CGMP lub WPC65 po 1 dniu od zakończenia fermentacji była większa o jeden rząd wielkości w porównaniu z próbą kontrolną (tab. 5). Prawdopodobnie zastosowane preparaty białek mleka wpływały na poprawę wzrostu *Lb. casei* L26 w czasie inkubacji próbek. Następne dni chłodniczego przechowywania napojów fermentowanych powodowały zmniejszenie liczby komórek bakteryjnych w próbce o jeden rząd wielkości – w przypadku dodatku WPC65 lub o dwa rzędy wielkości (z dodatkiem CGMP oraz próba kontrolna). Po 21 dniach chłodniczego przechowywania najwięcej żywych komórek bakteryjnych *Lb. casei* L26 stwierdzono w napojach fermentowanych, otrzymanych z PMP z dodatkiem 1 % WPC 65 ($3,50 \times 10^8$). Większą przeżywalność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* podczas chłodniczego przechowywania jogurtów z dodatkiem koncentratu białek serwatkowych obserwowali również Kailasapathy

i Supriadi [11]. Podobną tendencję stwierdzili Antunes i wsp. [2], którzy w jogurtach z mleka odtłuszczonego z dodatkiem WPC stwierdzili zwiększenie liczby żywych komórek *L. acidophilus* o 1,8 cyklu logarytmicznego, po 21 dniach przechowywania w temp. 5 °C, w porównaniu z próbą kontrolną. Mniejszą przeżywalność komórek bakterii po zastosowaniu CGMP potwierdzają wcześniejsze wyniki badań uzyskane przez Cicvárek i wsp. [4], którzy stosowali dodatek tego preparatu w celu zwiększenia przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej.

Wnioski

1. Wybrane preparaty białek mleka (CGMP, α -la, SPD, WPI i WPC65) wykorzystane do produkcji mlecznych napojów fermentowanych stymulowały wzrost potencjalnie probiotycznego szczepu bakterii *Lb. casei* L26.
2. Dodatki preparatów białek serwatkowych miały korzystny wpływ na właściwości reologiczne mlecznych napojów fermentowanych. Skrzepy mlecznych napojów fermentowanych otrzymane z mleka odtłuszczonego charakteryzowały się wyższymi wartościami takich parametrów, jak twardość skrzepów czy współczynnik konsystencji.
3. Wzrost stężenia preparatów białek mleka nie powodował w większości przypadków istotnych różnic ($p < 0,05$) twardości skrzepów kwasowych otrzymanych przy użyciu szczepu *Lb. casei* L26.
4. Produkty otrzymane przy użyciu szczepu *Lb. casei* L26 charakteryzowały się dużą synerżą, niezależnie od zawartości tłuszczu w mleku. Wzrost stężenia preparatów białek mleka w napojach fermentowanych powodował stopniowe zmniejszanie ilości wydzielonej serwatki.
5. Po trzytygodniowym okresie przechowywania produktów uzyskanych z pełnego mleka w proszku w warunkach chłodniczych, najwyższą przeżywalność komórek bakterii szczepu *Lb. casei* L26 zaobserwowano w próbkach wzbogaconych 1-procentowym dodatkiem WPC.

Literatura

- [1] Amatayakul T., Sherkat F., Shah N.P.: Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. *Food Hydrocoll.*, 2006, **20**, 314-32.
- [2] Antunes A.E.C, Cazetto T.F, Abolini H.M.: Viability of probiotic microorganisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *Int. J. Dairy Technol.*, 2005, **3**, 169-173.
- [3] Aryana K.J., McGrew P.: Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2007, **10 (40)**, 1808-1814.


- [4] Cicvárek J, Čurda L., Elich O., Dvorakova E., Dvorak M.: Effect of caseinomacropeptide concentrate addition on the growth of bifidobacteria. Czech J. Food Sci., 2010, **6 (28)**, 485-494.
- [5] Dave R.I., Shah N.P.: Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. J. Dairy Sci., 1998, **81**, 2804-2816.
- [6] Donkor O.N., Nilmini S., Stolic P., Vasiljevic T., Shah N.: Survival and activity of selected probiotic lactic acid bacteria and probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. Int. Dairy J., 2007, **17**, 657-665.
- [7] Drgalic I., Tratnik L., Bozanic R.: Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. Lait, 2005, **85**, 1-9.
- [8] Guillemard E., Tanguy J., Flavigny A., de la Motte S., Schrezenmeir J.: Effects of consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 on common respiratory and gastrointestinal infections in shift workers in a randomized controlled trial. J. Am. Coll. Nutr., 2010, **5 (295)**, 455-468.
- [9] Gustaw W., Kordowska-Wiater M., Koziół J.: The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yoghurt production. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 2011, **4 (10)**, 455-466.
- [10] Hajirostamloo B.: Comparison of nutritional and chemical parameters of soymilk and cow milk. World Academy of Science, Eng. Technol., 2009, **57**, 436-438.
- [11] Kailasapathy K., Supriadi D.: Effect of whey protein concentrate on the survival of *Lactobacillus acidophilus* in lactose hydrolyzed yogurt during refrigerated storage. Milchwissenschaft, 1996, **51 (10)**, 566-569.
- [12] Kim W.S., Ohashi M., Tanaka T., Kumura H., Kim G.Y., Kwon I.K., Goh J.S., Shimazaki K.: Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Biometals, 2004, **3 (17)**, 279-83.
- [13] Kisielewska E., Kordowska-Wiater M.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i mikrobiologii żywności. UP w Lublinie, Lublin 2004.
- [14] Koziół J., Gustaw W., Waško A., Skrzypczak K., Sławińska A., Sołowiej B.: Wpływ wybranych preparatów białek mleka na wzrost i przeżywalność *Lactobacillus acidophilus* oraz właściwości reologiczne mlecznych napojów fermentowanych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2014, **3 (94)**, 41-55.
- [15] Koziół J., Skrzypczak K., Gustaw W., Waško A.: Wpływ preparatów białek mleka na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2013, **3 (88)**, 83-98.
- [16] Kuecukcetin, A. Effect of heat treatment of skim milk and final fermentation pH on graininess and roughness of stirred yogurt. Int. J. Dairy Technol., 2008, **4 (61)**, 385-390.
- [17] Nowak A., Ślizewska K., Libudzisz Z.: Probiotyki – historia i mechanizmy działania. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2010, **4 (71)**, 5-19.
- [18] Pescuma M., Hébert E.M., Mozzi F., Font de Valdez G.: Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. Food Microbiol. 2008, **3 (25)**, 442-451.
- [19] Poch M., Bezkorovainy A.: Bovine milk κ -casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus *Bifidobacterium*. J. Agric. Food Chem., 1991, **39**, 73-77.
- [20] Puvanenthiran A., Williams R.P.W., Augustin M.A.: Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey proteins ratios. Int. Dairy J., 2002, **12**, 383-391.
- [21] Sołowiej B.: Wpływ preparatów serwatkowych na przylegalność analogów serów topionych do różnych materiałów opakowaniowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2013, **2 (87)**, 80-91.
- [22] Sołowiej B., Gustaw W., Nastaj M.: Wpływ dodatku koncentratów białek serwatkowych na właściwości reologiczne analogów serów topionych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2008, **5 (60)**, 226-234.

- [23] Solowiej B., Mleko S., Gustaw W., Udeh K.O.: Effect of whey protein concentrates on texture, meltability and microstructure of acid casein processed cheese analogs. *Milchwissenschaft*, 2010, **2** (65), 169-173.
- [24] Śmietanka K., Minta Z., Tomczyk G., Domańska-Blicharz K., Bartnicka B., Szewczyk B., Grzywaczewski G.: Prevalence of avian influenza virus infections in poultry and wild birds. *Medycyna Weter*, 2005, **6** (61), 676-679.
- [25] Wójciak K., Dolatowski Z.J., Okoń A.: The effect of probiotic strains on oxidative stability of cured pork meat products. *Fleischwirtschaft*, 2012, **1**, 100-104.
- [26] Wójciak K.M., Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D., Trząskowska M.: The effect of the *Lactobacillus casei* Lock 0900 Probiotic Strain on the Quality of Dry - Fermented Sausage During Chilling Storage. *J. Food Quality*, 2012, **5** (35), 353-365.
- [27] Zaręba D., Ziarno M., Obiedziński M.: Przeżywalność bakterii jogurtowych i probiotycznych w układach modelowych mleka niefermentowanego i fermentowanego. *Med. Weter.* 2008, **8** (64), 1007-1011.

**PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND SURVIVAL OF *LACTOBACILLUS CASEI*
IN FERMENTED MILK BEVERAGES PRODUCED WITH ADDITION OF SELECTED MILK
PROTEIN PREPARATIONS**

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the effect of selected milk protein preparations on physicochemical and rheological properties of the fermented milk beverages produced using potentially probiotic *Lb. casei* bacteria. Milk protein preparations used, in the production of fermented milk beverages, stimulate the growth of the *Lb. casei* L26 strain. After three weeks of cold storage, the highest survival rate of the *Lb. casei* L26 strain ($3,50 \times 10^8$ (cfu/ml) was reported in the products enriched by adding 1% of WPC (whey protein concentrate). The addition of whey protein preparations had an apparent effect on the rheological properties of fermented milk beverages. The curds of fermented milk products produced from skimmed milk were characterized by higher values of the parameters such as hardness or consistency index. The hardness of the curds of fermented milk beverages produced of the skimmed milk powder (OMP) was 0.51 N. The curds of the beverages produced with the addition of 2% of WPI (whey protein isolate) were characterized by a hardness value of 1.65 N. The products produced using the *Lb. casei* L26 strain were characterized by a high syneresis regardless of the content of fat in milk. The increase of WPI concentration from 0.5 to 2% in the fermented milk beverages made of SMP caused the amount of whey secreted to decrease from 11.98 to 1.03%. In addition to the improved physicochemical properties of the fermented milk beverages, supplementing them with milk protein preparation enhanced the pro-healthy values thereof and gave them the characteristics of functional foods.

Key words: *Lactobacillus*, fermented milk drinks, whey protein preparations, rheology, syneresis 

ANNA MITUNIEWICZ-MAŁEK, MAŁGORZATA ZIARNO,
IZABELA DMYTRÓW

ZASTOSOWANIE ZAMRAŻALNICZO UTRWALONEGO MLEKA KOZIEGO DO WYROBU POTENCJALNIE PROBIOTYCZNEGO NAPOJU FERMENTOWANEGO

Streszczenie

Celem pracy była ocena wybranych cech jakościowych potencjalnie probiotycznych napojów fermentowanych, wyprodukowanych z zamrażalniczo utrwalonego, a przed fermentacją rozmrożonego, mleka koziego przy użyciu dwóch monokultur probiotycznych, podczas 3-tygodniowego przechowywania (5 ± 1 °C). Wyprodukowano dwa wyroby doświadczalne: przy użyciu szczepu *Lactobacillus acidophilus* La-5 i przy użyciu szczepu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. W celu porównawczym wyprodukowano również jogurt z tradycyjną kulturą jogurtową YC-X16. Napoje doświadczalne poddano ocenie sensorycznej i fizykochemicznej po 1, 7, 14 i 21 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych (5 ± 1 °C). W produktach otrzymanych przy użyciu monokultur probiotycznych dodatkowo oznaczono liczbę bakterii.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że mleko kozie poddane procesowi zamrażalniczego przechowywania po rozmrożeniu może być wykorzystane do produkcji mlecznych napojów fermentowanych z udziałem probiotyków. Napoje fermentowane zostały wysoko ocenione pod względem cech sensorycznych, a analizowane cechy fizykochemiczne (kwasowość miareczkowa, pH, zawartość aldehydu octowego oraz tekstura skrzepów) uwarunkowane były rodzajem napoju i czasem chłodniczego przechowywania. W próbkach potencjalnie probiotycznych napojów fermentowanych liczba komórek wynosiła ponad $1,2 \times 10^8$ jtk/g, czyli spełnione zostało minimum terapeutyczne w odniesieniu do bakterii probiotycznych, określone przez FAO/WHO na poziomie 10^6 jtk/g.

Słowa kluczowe: mrożone mleko kozie, napoje fermentowane, probiotyki, właściwości fizykochemiczne

Dr inż. A. Mituniewicz-Malek, dr hab. inż. I. Dmytrów, Zakład Technologii Mleczarskiej i Przechowalnictwa Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, al. Piastów 17, 70-310 Szczecin, dr hab. inż. M. Ziarno, Zakład Biotechnologii Mleka, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-787 Warszawa. Kontakt: aniamalek4@wp.pl

Wprowadzenie

Napoje fermentowane mogą być produkowane nie tylko z mleka krowiego, ale także z mleka owczego lub koziego, przy udziale kultur tradycyjnych, jak również kultur wzbogaconych w szczepy probiotyczne z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Mleko kozie jest produktem wyjątkowo wartościowym i odżywczym, a wszelkie jego zalety są zachowane w mlecznych napojach fermentowanych. Ograniczona sezonowość w pozyskiwaniu mleka koziego powoduje, że w pewnych okresach roku na rynku brak jest produktów z tego mleka. Jedną z możliwości przeciwdziałania wskazanej sytuacji może być produkcja wyrobów z mleka koziego poddanego procesowi zamrażalniczego przechowywania [11, 12, 15].

Celem pracy była ocena wybranych cech jakościowych potencjalnie probiotycznych napojów fermentowanych, wyprodukowanych z zamrażalniczo utrwalonego mleka koziego przy użyciu dwóch monokultur probiotycznych z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, podczas trzytygodniowego przechowywania w temp. 5 ± 1 °C.

Material i metody badań

Material do badań stanowiły dwa potencjalnie probiotyczne napoje fermentowane wyprodukowane w warunkach laboratoryjnych, otrzymane z mrożonego mleka koziego przy użyciu liofilizowanych monokultur probiotycznych z rodzajów *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* La-5, Chr. Hansen, Polska) i *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, Chr. Hansen, Polska), a także jogurt z tradycyjną kulturą jogurtową YC-X16 (Chr. Hansen, Polska). Surowcem do ich produkcji było zbiorcze mleko kozie zakupione pod koniec września 2012 roku w indywidualnym gospodarstwie ekologicznym „Kozi Gródek” w Wołczkowie k. Szczecina. Mleko pasteryzowano metodą zbiornikową (85 °C/15 ÷ 20 min), chłodzono do temp. 10 °C i pakowano w worki foliowe, które po zamrożeniu przechowywano w temp. -22 °C przez 6 miesięcy. Po upływie tego okresu mleko poddawano procesowi powolnego rozmrażania (8 ÷ 10 °C/ 2 ÷ 4 h). Proces rozmrażania prowadzono zgodnie z zaleceniami rozporządzenia WE nr 852/2004 [16], aby zminimalizować rozwój obcej mikroflory. Rozmrażanie odbywało się w warunkach hamujących rozwój mikroflory mezofilnej, a czas procesu był zbyt krótki, aby namnożyła się mikroflora psychrofilna [21]. Następnie mleko podgrzewano do temp. 40 °C i normalizowano w nim zawartość suchej masy do 14 % (kozim proszkiem mlecznym firmy Danmis, Polska). Tak przygotowane mleko dzielono na trzy partie i każdą z nich zaszczepiano jedną z trzech wcześniej uaktywnionych kultur bakterii (5 % zakwasu roboczego otrzymanego przez inkubację naważki kultury w mleku w temp. 40 °C przez 4 ÷ 8 h, w dawce 0,6 g/1000 cm³ mleka). Do otrzymania pierwszego potencjalnie probiotycznego napoju (NP-LA) zastosowano monokulturę szczepu *Lb. acidophilus* La-5, a do drugiego

(NP-BB) – monokulturę szczepu *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Liczba komórek *Lb. acidophilus* La-5 w zakwasie roboczym wynosiła $9,2 \pm 0,1$ jtk/g, natomiast w przypadku *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 stwierdzono populację na poziomie $8,9 \pm 0,1$ jtk/g. Trzecim napojem był jogurt (NP-JOG), do wyrobu którego użyto tradycyjnej kultury jogurtowej YC-X16. Inkubację przygotowanych napojów prowadzono w temp. $42 \text{ }^\circ\text{C}$ aż do uzyskania skrzepu (po $4,5 \div 7$ h), po czym schładzano je do temp. $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ i w takich warunkach przechowywano przez trzy tygodnie. Próbkę do analiz pobierano po 1, 7, 14 i 21 dniach chłodniczego przechowywania. Otrzymane napoje oceniano sensorycznie oraz poddawano analizie fizykochemicznej. Dodatkowo w produktach otrzymanych przy użyciu monokultur probiotycznych oznaczano liczbę żywych komórek bakterii, aby ocenić, czy produkt osiągnie rekomendowane minimum terapeutyczne.

Ocenę sensoryczną przeprowadzał przeszkolony zespół składający się z pięciu osób. Oceniano wygląd, smak, zapach i konsystencję napojów w skali 5-punktowej [14]. Analiza fizykochemiczna obejmowała oznaczenie: kwasowości czynnej (pH) przy użyciu pehametru (model IQ150, PIAP, Polska) i kwasowości miareczkowej [1], zawartości aldehydu octowego [5] oraz tekstury (TPA). Analizę profilu tekstury wykonywano przy użyciu analizatora tekstury TA.XT plus z zestawem komputerowym (Stable Micro System, Anglia). Próbkę napojów penetrowano walcem aluminiowym o średnicy 20 mm na głębokość 25 mm z szybkością $5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ i siłą nacisku 1N [2]. Wyznaczano twardość, adhezyjność, spoistość, gumiaistość oraz odbojność, przy czym w pracy ograniczono się do analizy twardości, która jest określana jako końcowa siła wymagana do osiągnięcia ustalonej deformacji. Liczbę żywych komórek potencjalnie probiotycznych bakterii oznaczano metodą płytkową wgłębną [7, 13]. Do oznaczenia liczby komórek bakterii szczepu *Lb. acidophilus* La-5 używano pożywki MRS agar (Merck, Niemcy), natomiast do oznaczenia liczby komórek *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 używano pożywki BSM agar (Fluka, Niemcy) z dodatkiem czynnika selektywnego BSM-suplement. W obu przypadkach posiewy hodowano w warunkach beztlenowych w cieplarni o temp. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 72 h. Wynik posiewów wyrażano jako jednostki tworzące kolonie w przeliczeniu na 1 g produktu [jtk/g].

Wyniki analiz fizykochemicznych opracowano statystycznie przy użyciu programu Statistica P 27. 1. Normalność rozkładu oceniano testem K-S i Lillieforsa, a jednorodność wariancji – testem Levene’a. Do oszacowania różnic między wartościami średnimi zastosowano test Duncana. Testowanie prowadzono przy $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$.

Wyniki i dyskusja

W ocenie sensorycznej wykazano, że napoje fermentowane z mleka koziego przechowywane przez 21 dni charakteryzowały się dobrymi walorami sensorycznymi (tab. 1). W trakcie 3 tygodni chłodniczego przechowywania wygląd analizowanych

produktów oceniono bardzo wysoko ($4,9 \div 5,0$ pkt). Wszystkie próbki (NP-LA, NP-BB i NP-JOG) odznaczały się zwartym, jednolitym skrzepem bez wycieku serwatki (synerzy) oraz bez gazowania. Mituniewicz-Małek i wsp. [8] nie stwierdzili pogorszenia wyglądu próbek podczas 10 i 21 dni chłodniczego przechowywania (5 ± 1 °C) napojów fermentowanych z mleka koziego. W badaniach własnych zapach otrzymanych napojów był charakterystyczny dla mleka fermentowanego, bez obcych zapachów, ale z nutą specyficznego zapachu koziego, który w miarę wydłużającego się okresu przechowywania przybierał na intensywności, co skutkowało obniżeniem ocen. Pod względem zapachu po 21 dniach najniżej oceniony został napój NP-LA. Zmiany intensywności zapachu w produktach doświadczalnych z mleka koziego, w ostatnim okresie ich przechowywania, stwierdził również Żbikowski [23]. Pod względem smaku najwyżej oceniony został produkt NP-BB ($4,5 \div 5,0$ pkt) w ciągu całego okresu przechowywania. Smak napoju był charakterystyczny dla mleka fermentowanego, z wyczuwalną nutą mleka koziego, bez obcych posmaków. Bardziej intensywny posmak mleka koziego towarzyszył pozostałym produktom doświadczalnym (NP-LA i NP-JOG), przy czym wraz z wydłużającym się okresem chłodniczego przechowywania smak wszystkich napojów był coraz mniej akceptowany, chociaż w odniesieniu do smaku próbkom nadal przypisywano wysokie oceny. Obniżenie jakości sensorycznej, związanej z odczuwaniem bardziej wyraźnego posmaku koziego, odnotowali także inni autorzy [3, 9]. Pod względem konsystencji najwyższe noty ($4,2 \div 5,0$ pkt) przyznano produktowi NP-BB. Należy nadmienić, że w napojach przechowywanych do 7 dni konsystencja była zwarta, jednolita i dość gęsta, a po 14 i 21 dniach uległa wyraźnemu rozluźnieniu. Zbliżone wyniki w odniesieniu do konsystencji produktów mlecznych otrzymanych z udziałem monokultur uzyskali Mituniewicz-Małek i wsp. [8].

Wykazano, że napoje doświadczalne charakteryzowały się zróżnicowanym pH, a najwyższy jego zakres ($4,30 \div 4,56$) stwierdzono w napoju NP-BB. Natomiast najniższym zakresem pH ($3,95 \div 4,38$) odznaczał się produkt NP-LA (tab. 2). W przypadku wszystkich badanych produktów po 21 dniach przechowywania wartość pH uległa zmniejszeniu w stosunku do wyników po pierwszym okresie badań (tab. 4). Kwasowość miareczkowa napojów doświadczalnych kształtowała się w zakresie $35,47 \div 42,80$ °SH i we wszystkich próbkach stwierdzono jej przyrost po 21 dniach przechowywania (tab. 2 i 4). Najwyższą kwasowość miareczkową oznaczono w produkcie NP-LA w ostatnim dniu badań. Wyniki kwasowości czynnej (pH) i miareczkowej (°SH) napojów fermentowanych z mleka koziego uzyskane przez Domagałę [3] oraz Mituniewicz-Małek i wsp. [8] były zbliżone do stwierdzonych w toku realizowanych badań własnych.

Tabela 1. Wyniki oceny sensorycznej (w skali 5-punktowej) napojów fermentowanych z mleka koziego zamrażalniczo utrwalonego

Table 1. Results of sensory assessment (five -point scale) of fermented drinks made from frozen goat's milk

Produkt Product	Cechy / Specification															
	Wygląd Appearance				Smak Taste				Zapach Aroma				Konsystencja Consistency			
	Czas przechowywania [dni] / Storage time [days]															
	1	7	14	21	1	7	14	21	1	7	14	21	1	7	14	21
NP-LA	5,0	5,0	4,9	5,0	5,0	4,8	4,6	4,0	5,0	5,0	4,5	4,0	4,5	4,4	4,2	4,0
NP-BB	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,9	4,5	5,0	5,0	4,7	4,5	5,0	5,0	4,5	4,2
NP-JOG	5,0	4,9	5,0	5,0	5,0	5,0	4,6	4,2	5,0	5,0	4,7	4,2	4,6	4,5	4,3	4,0

Objaśnienia: / Explanatory notes:

NP-LA – napój wyprodukowany przy użyciu szczepu *Lb. acidophilus* La-5 / drink produced with use of *Lb. acidophilus* La-5; NP-BB – napój wyprodukowany przy użyciu szczepu *Bif. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 / drink produced with use of *Bif. animalis* subsp. *lactis* Bb-12; NP-JOG – napój wyprodukowany przy użyciu tradycyjnej kultury jogurtowej YC-X16 / drink produced with use of traditional YC-X16 yoghurt culture.

Tabela 2. Kwasowość miareczkowa i wartość pH napojów fermentowanych wyprodukowanych z zamrażalniczo utrwalonego mleka koziego, poddanych chłodniczemu przechowywaniu

Table 2. Titratable acidity and pH value of fermented drinks made from frozen goat's milk and subjected to refrigerating storage

Produkt Product	Czas przechowywania [dni] / Storage time [days]							
	1		7		14		21	
	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
pH / pH								
NP-LA	4,38	0,05	3,99	0,57	4,15	0,09	3,95	0,14
NP-BB	4,56	0,1	4,47	0,06	4,33	0,06	4,3	0,07
NP-JOG	4,40	0,22	4,19	0,02	4,21	0,04	4,13	0,05
Różnice Differences	-		NP-LA : NP-BB*		-		-	
Kwasowość miareczkowa / Titratable acidity [SH ^o]								
NP-LA	37,07	3,630	38,53	0,611	41,20	0,400	42,80	0,400
NP-BB	35,47	2,309	38,67	1,405	41,20	0,400	40,27	1,617
NP-JOG	36,43	2,940	41,60	0,693	36,67	0,231	39,24	1,134
Różnice Differences	-		-		NP-JOG : NF-LA** NP-JOG : NF-BB**		NP-JOG : NF-LA**	

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Objaśnienie symboli jak pod tab. 1/ Explanatory notes as in Table 1; \bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation; ** – różnica statystycznie istotna na poziomie $p \leq 0,01$ / statistically significant difference at $p \leq 0.01$; * – różnica statystycznie istotna na poziomie $p \leq 0,05$ / statistically significant difference at $p \leq 0.05$; n = 6.

W ciągu trzech tygodni trwania doświadczenia napoje charakteryzowały się niewielką zawartością aldehydu octowego ($0,479 \div 1,621 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), ale znajdującą potwierdzenie w wynikach innych autorów [4, 9]. Małą zawartość aldehydu octowego w kozich napojach fermentowanych (jogurtach oraz napojach probiotycznych) stwierdzili Mituniewicz-Małek i wsp. [8, 9]. W trakcie chłodniczego przechowywania najmniej aldehydu octowego ($0,479 \div 1,169 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) oznaczono w produkcie NP-LA. Z danych literaturowych [8, 9, 10] wynika, że zawartość aldehydu octowego ulega sukcesywnemu zmniejszeniu wraz z wydłużaniem okresu chłodniczego przechowywania, co miało odzwierciedlenie w toku realizowanych badań własnych (tab. 3). Zdaniem Ozer i wsp. [10], zmniejszenie zawartości aldehydu octowego w napojach fermentowanych ma związek ze zmianami pH, które z kolei warunkują jego redukcję do innych związków np. etanolu.

Tabela 3. Zawartość aldehydu octowego i twardość napojów fermentowanych wyprodukowanych z zamrażalniczo utrwalonego mleka koziego, poddanych chłodniczemu przechowywaniu

Table 3. Content of acetaldehyde and hardness of fermented drinks made from frozen goat's milk subjected to refrigerating storage

Produkt Product	Czas przechowywania [dni] / Storage time [days]							
	1		7		14		21	
	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD	\bar{x}	s / SD
Aldehyd octowy / Acetaldehyde [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]								
NP-LA	1,544	0,735	1,169	0,037	0,479	0,045	0,562	0,037
NP-BB	2,281	0,077	1,702	0,135	0,947	0,053	0,644	0,046
NP-JOG	1,599	0,505	1,621	0,032	1,029	0,077	0,496	0,022
Różnice Differences	NP-JOG : NF-BB** NP-LA : NF-BB**		NP-LA : NF-BB*		NP-JOG : NF-LA*		-	
Twardość / Hardness [N]								
NP-LA	0,229	0,017	0,263	0,061	0,313	0,017	0,368	0,084
NP-BB	0,240	0,006	0,237	0,003	0,273	0,028	0,363	0,091
NP-JOG	0,229	0,011	0,249	0,014	0,258	0,011	0,264	0,025
Różnice Differences	-		-		-		NP-JOG : NF-LA* NP-JOG : NF-BB*	

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

Tekstura produktu zależy m.in. od jakości surowca, rodzaju wykorzystanej kultury bakteryjnej czy dodatków, jak również od sposobu prowadzenia procesu fermentacji [6]. W badaniach własnych stwierdzono, że do 7 dni chłodniczego przechowywania skrzepy wszystkich napojów doświadczalnych charakteryzowały się zbliżoną twardością ($0,229 \div 0,263 \text{ N}$). Po 14 dniach w skrzepie produktu NP-LA nastąpił większy przyrost twardości (o 19 %) niż w przypadku skrzepu napoju NP-BB (o 15 %) oraz

NP-JOG (o 3,6 %). Po trzech tygodniach nastąpił przyrost twardości skrzepów wszystkich produktów doświadczalnych (średnio o ok. 17,6 %), przy czym największą twardością (0,566 N) odznaczał się skrzep napoju NP-BB (tab. 3 i 4). Otrzymane wyniki dowodzą wpływu zastosowanych kultur na twardość skrzepów produktów fermentowanych z mleka koziego, co jest potwierdzeniem danych literaturowych [2, 8]. Ponadto w toku przeprowadzonych badań stwierdzono przyrost twardości skrzepów napojów z mleka koziego wraz z wydłużaniem okresu chłodniczego przechowywania, co również potwierdza wyniki innych autorów [8, 18]. Według Vinderola i wsp. [18], cechy reologiczne produktów mlecznych zależne są od kwasowości czynnej i im niższe jest pH, tym ich twardość jest większa.

Tabela 4. Wyniki analizy wariancji badanych cech mlecznych napojów fermentowanych z mleka koziego
Table 4. Results of analysis of variance of analyzed features of fermented milk beverages produced from goat's milk

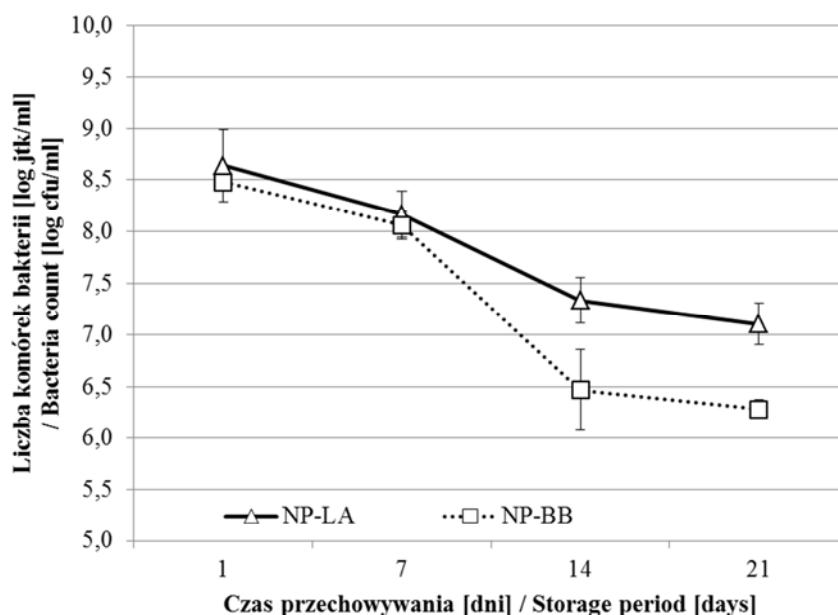
Badane cechy Analyzed characteristics	Istotność różnic w czasie przechowywania [dni] Significant differences during storage [days]
NP-YOG	
pH	-
Kwasowość miareczkowa	7 : 1, 14**
Aldehyd octowy	21 : 1, 7**; 14 : 1, 7, 21*
Twardość	
NP-LA	
pH	1 : 7, 21*
Kwasowość miareczkowa	1 : 21**; 7 : 1, 21*
Aldehyd octowy	1 : 14, 21**; 7 : 14**; 7 : 21*
Twardość	1 : 21**; 7 : 21*
NP-BB	
pH	-
Kwasowość miareczkowa	1 : 14*
Aldehyd octowy	1, 7 : 14, 21**; 1 : 7**
Twardość	1, 7 : 21**; 14 : 1, 21*

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Objaśnienie symboli jak pod tab. 1/ Explanation of symbols as in Tab. 1; ** – różnica statystycznie istotna na poziomie $p \leq 0,01$ / statistically significant difference at $p \leq 0.01$, * – różnica statystycznie istotna na poziomie $p \leq 0,05$ / statistically significant difference at $p \leq 0.05$.

Logarytm początkowej liczby komórek *Lb. acidophilus* La-5 w napoju NP-LA wynosił średnio 8,6 jtk/g, natomiast w przypadku napoju NP-BB logarytm początkowej liczby żywych komórek *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 wynosił 8,5 jtk/g. Populacja żywych komórek szczepów potencjalnie probiotycznych ulegała stopniowej reduk-

cji podczas 3 tygodni chłodniczego przechowywania mlecznych napojów fermentowanych, jednak do końca tego okresu pozostawała na poziomie ponad 10^6 jtk/g (rys. 1), czyli spełnione zostało minimum terapeutyczne w odniesieniu do bakterii probiotycznych, określone przez FAO/WHO na poziomie 10^6 jtk/g produktu. Jak wynika z danych literaturowych [20], kryterium to nie zawsze jest spełniane przez wszystkie szczepy probiotyczne. Pomimo tego, wyniki otrzymane w badaniach własnych są porównywalne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy [8, 19, 22].



Rys. 1. Średnia liczba komórek bakterii (z zaznaczonym odchyleniem standardowym) w próbkach mleka koziego fermentowanego przez *Lb. acidophilus* La-5 (NP-LA) lub *Bif. animalis* subsp. *lactis* (NP-BB)

Fig. 1. Mean count of bacteria (including standard deviation as marked) in samples of goat's milk fermented using *Lb. acidophilus* La-5 (NP-LA) or *Bif. animalis* subsp. *lactis* (NP-BB)

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że mleko kozie poddane procesowi zamrażalniczego przechowywania (6 miesięcy) może stanowić surowiec do wyrobu mleka fermentowanego ze szczególnym uwzględnieniem napojów otrzymywanych przy udziale monokultur szczepów probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Przez 21 dni chłodniczego przechowywania wszystkie produkty doświadczone charakteryzowały się odpowiednimi cechami jakościowymi, a otrzymane produkty potencjalnie probiotyczne (NP-LA i NP-BB) spełniały kryterium minimum terapeutycznego, określonego przez FAO/WHO na poziomie 10^6 jtk/g.

Wnioski

1. Produkty otrzymane z mleka koziego (poddanego procesom zamrażalniczego przechowywania, a następnie rozmrożenia) charakteryzowały się pożądanymi walorami sensorycznymi przez cały okres chłodniczego przechowywania. W przypadku smaku i konsystencji wyżej oceniono napój wyprodukowany przy użyciu szczepu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 niż szczepu *Lactobacillus acidophilus* La-5.
2. Właściwości fizykochemiczne (pH, kwasowość miareczkowa, zawartość aldehydu octowego oraz twardość skrzepów) mlecznych napojów fermentowanych otrzymanych z mleka koziego, po jego zamrażalniczym przechowywaniu, były determinowane rodzajem zastosowanego szczepu i czasem chłodniczego przechowywania.
3. Mleko kozie utrwalone zamrażalniczo z powodzeniem może być po rozmrożeniu surowcem do produkcji mlecznych napojów fermentowanych, ze szczególnym uwzględnieniem tych o charakterze potencjalnie probiotycznym.
4. Fermentowane napoje mleczne potencjalnie probiotyczne, otrzymane z mleka koziego utrwalonego zamrażalniczo, przechowywane chłodniczo przez 21 dni, spełniają kryterium minimum terapeutycznego określonego przez FAO/WHO na poziomie 10^6 jtk/g.

Literatura

- [1] Bylund H.: Dairy Processing Handbook, Tetra Processing Systems AB, 1995, Sweden.
- [2] Domagała J., Juszcak L.: Flavour behaviour of goat's milk yoghurt and bioyoghurts. EJPAU, Food Sci. Technol., 2003, **7**, 2.
- [3] Domagała J.: Zmiany tekstury i mikrostruktury jogurtu z mleka koziego pod wpływem wybranych czynników. Rozprawy, Kraków 2005, **309 (425)**.
- [4] Kornacki K.: Mikrobiologia mleka i jego przetworów. W: Mleczarstwo – zagadnienia wybrane. Red. S. Ziajka. T. I. Wyd. ART. w Olsztynie, Olsztyn 1997, ss. 119-161.
- [5] Lees G.J., Jago G.R.: Methods for the estimation of acetaldehyde in cultured dairy products. Australian J. Dairy Technol., 1969, **24**, 181-185.
- [6] Marzec A.: Tekstura żywności. Przem. Spoż., 2007, **5**, 6-10.
- [7] Merck Microbiology Manual. 12th Edition; Merck: Darmstadt 2007, Germany.
- [8] Mituniewicz-Malek A., Dmytrów I., Balejko J., Ziarno M.: Komercyjne kultury probiotyczne *Lactobacillus* sp. (*Lb. paracasei*, *Lb. casei* i *Lb. acidophilus*) w napojach fermentowanych z mleka koziego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2013, **3 (88)**, 99-110.
- [9] Mituniewicz-Malek A., Dmytrów I., Jasińska M., Balejko J., Szymczak B.: Traditional yoghurt culture vs. selected quality properties of fermented beverages produced from goat's milk. EJPAU, 2011, **3 (14)**, #7.
- [10] Ozer B., Kirmaci H.A., Oztekin S., Hayaloglu A., Atamer M.: Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yoghurt production. Int. Dairy J., 2007, **17**, 199-207.
- [11] Park Y. W.: Effect of 5 years long-term frozen storage on sensory quality of Monterey Jack caprine milk cheese. Small Ruminant Res., 2013, **2 (209)**, 136-140.
- [12] Park Y.W., Gerard P.D., Drake M.A.: Impact of frozen storage on flavor of caprine milk cheeses. J. Sens. Stud., 2006, **6 (21)**, 654-663.

- [13] PN-EN ISO 6887-1:2000P. Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych.
- [14] PN-ISO 22935-2:2013-07P. Mleko I przetwory mleczne. Analiza sensoryczna. Część 2: Zalecane metody sensoryczne.
- [15] Riberio A.C., Riberio S.D.A.: Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Res.*, 2010, **2-3 (89)**, 225-233.
- [16] Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych.
- [17] Uysal H., Kilic S., Kavas G., Akbulut N., Kesenkas H.: Production and some properties of Bifighert made from goat milk and cow-goat milk mixtures by ultrafiltration and addition of skim milk powder. *Milchwiss*, 2003, **11/12 (58)**, 636-639.
- [18] Vinderola C.G., Prosello W., Molinari F., Ghiberto D., Reinheimer J.A.: Growth of *Lactobacillus paracasei* A 13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristic of the product, *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, **135**, 171-174.
- [19] Zaręba D., Ziarno M.: Przeżywalność bakterii kwasu mlekowego i bifidobakterii w jogurtach handlowych. *Przeegl. Mlecz.*, 2013, **9**, 14-20.
- [20] Zaręba D.: Przeżywalność probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* w mleku niefermentowanym i fermentowanym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5 (60)**, 189-196.
- [21] Ziarno M., Molska I., Gronczyńska M.: Jakość i trwałość mleka pasteryzowanego w 84°C/19-22 s. *Med. Weter.*, 2005, **61 (10)**, 1165-1168.
- [22] Ziarno M., Zaręba D., Ścibisz I.: Przeżywalność probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej w modelowych jogurtach owocowych. *Brom. Chemia Toksykol.*, 2011, **3 (XLIV)**, 645-649.
- [23] Żbikowski Z.: Zmiany w jogurcie podczas przechowywania w różnych opakowaniach. *Przeegl. Mlecz.*, 2012, **1**, 16-20.

APPLICATION OF FROZEN GOAT'S MILK TO PRODUCTION OF POTENTIALLY PROBIOTIC FERMENTED DRINK

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the selected qualitative characteristics of potentially probiotic fermented drinks made from goat's milk that was, first, frozen, and, next, defrozed prior to fermentation using two separate sets of probiotic monocultures, during a 3-week storage (5 ± 1 °C). Two experimental products were produced: one using a *Lactobacillus acidophilus* La-5 strain and the second using a Bb-12 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. To enable comparison, a yoghurt with YC-X16, a traditional yoghurt culture, was produced. The experimental drinks were sensory assessed and their physiochemical properties were evaluated after the 1st, 7th, 14th and 21st day of storage under the cooling conditions (5 ± 1 °C). Additionally, in the products obtained using probiotic monocultures, the count of bacteria was determined.

On the basis of the results obtained, it was confirmed that the goat's milk, stored under the frozen conditions, could be used to produce fermented milk drinks with probiotics. The sensory features of the fermented drinks were highly rated and their psychochemical features analysed (titratable acidity, pH, acetaldehyde content, and texture of curds) depended on the type of drink and the time of cooling storage. In the samples of the potentially probiotic fermented drinks, the number of cells exceeded 1.2×10^8 cfu/g; therefore, the therapeutic minimum, defined by FAO/WHO to be 10^6 cfu/g, was met in relation to probiotic bacteria.

Key words: frozen goat's milk, fermented drinks, probiotics, physiochemical properties ☒

MONIKA GARBOWSKA, ILONA STEFAŃSKA, MARLENA MŁYNEK

AKTYWNOŚĆ PEPTYDAZ WYBRANYCH SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS* PODDANYCH OBRÓBCE TERMICZNEJ

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie aktywności amino- i dipeptydaz wybranych kultur bakterii mlekowych (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*), poddanych działaniu temperatury 50 ÷ 75 °C, przez 1, 15 i 25 min. Badane kultury *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy o podobnej specyficzności substratowej, ale z różną aktywnością. Wykazywały one wyższą aktywność aminopeptydaz w porównaniu z aktywnością dipeptydaz. Średnia aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* była wyższa o 45 % od średniej aktywności bakterii *Lb. casei*. Wyższą o 25 % aktywnością aminopeptydaz charakteryzował się szczep *Lb. casei*. Szczep ten wykazywał największą specyficzność względem substratów: Ala-Leu, Ala-Ala, Gly-Leu, natomiast *Lb. acidophilus* – względem Ala-Ala oraz Ala-pNa. Najwyższą aktywność amino- i dipeptydaz *Lb. casei* oraz dipeptydaz *Lb. acidophilus* stwierdzono po obróbce termicznej bakterii przez 15 min. W przypadku amino- i dipeptydaz *Lb. casei* ich aktywność wynosiła odpowiednio: 5,10 i 0,83 U·min⁻¹·mg⁻¹ oraz 1,66 U·min⁻¹·mg⁻¹ – w przypadku dipeptydaz *Lb. acidophilus*. Z kolei średnia aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* wzrastała wraz z wydłużaniem czasu ogrzewania – najwyższe jej wartości uzyskano po 25 min (3,89 U·min⁻¹·mg⁻¹). Wykazano, że wydłużenie czasu obróbki termicznej wpłynęło statystycznie istotnie (p < 0,05) na wzrost aktywności aminopeptydaz badanych kultur bakterii, co wskazuje na ich wysoką termostabilność.

Słowa kluczowe: : bakterie kwasu mlekowego, aminopeptydazy, dipeptydazy, aktywność proteolityczna, obróbka termiczna

Wprowadzenie

Proteoliza jest procesem biochemicznym odgrywającym zasadniczą rolę w wytwarzaniu i przechowywaniu mleknych produktów fermentowanych. Podczas produkcji sera rozkład kazeiny do polipeptydów, peptydów i aminokwasów jest bardzo

Dr inż. M. Garbowska, Międzyzakładowa Grupa Problemowa ds. Mleczarstwa, dr n. wet. I. Stefańska, mgr inż. M. Młynek, Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.
Kontakt: monika.garbowska@ibprs.pl

istotny, ponieważ powstałe w wyniku proteolizy produkty są prekursorami specyficznych cech smakowo-zapachowych, tworzonych przez takie związki, jak: alkohole, aldehydy, kwasy, estry oraz związki siarkowe [24]. Smak gorzki, będący wynikiem nagromadzenia peptydów hydrofobowych (zwłaszcza bogatych w prolinę), jest technologicznym wskaźnikiem jakościowym serów typu Gouda i Cheddar [25].

System proteolityczny bakterii kwasu mlekowego składa się z trzech elementów: 1) proteinaz związanych ze ścianą komórkową (CEPs – *cell envelope proteinases*), które rozpoczynają degradację kazeiny do oligopeptydów, 2) systemów transportu peptydów do wnętrza komórki, 3) różnorodnych wewnątrzkomórkowych peptydaz rozkładających peptydy do krótszych peptydów i aminokwasów [2, 22].

Specyficzność CEPs odgrywa zasadniczą rolę w wytwarzaniu gorzkich peptydów [4, 20]. Peptydazy kultur bakterii kwasu mlekowego (LAB - *lactic acid bacteria*), takie jak: PepN, PepX, PepO2, PepO3 biorą udział w degradacji gorzkich peptydów i są odpowiedzialne za jakość sensoryczną produktów mlecznych [5, 6, 26, 18]. Ważne jest, aby proteoliza przebiegała w sposób zrównoważony, czyli sprzyjający tworzeniu odpowiedniego smaku i zapachu, a zapobiegający nagromadzeniu gorzkich polipeptydów i peptydów [24].

Produkcja serów, w tym dojrzewanie, jest procesem złożonym, często zależnym od zastosowanych kultur starterowych. Kultura starterowa dodawana do mleka, głównie w celu zakwaszenia i właściwego dojrzewania, nadaje finalne i charakterystyczne cechy danemu gatunkowi sera. Podczas dojrzewania sera rozkład białek zachodzi głównie pod wpływem enzymów podpuszczki (np. renniny). Bakterie fermentacji mlekowej po całkowitym przefermentowaniu laktozy zaczynają stopniowo wymierać, a ich wpływ na przemiany białek polega wówczas na działalności uwolnionych po lizie komórek enzymów proteolitycznych. W celu przyspieszenia procesu dojrzewania nie można jednak stosować zwiększonej ilości startera lub dodatkowych zbyt aktywnych kultur bakterii. Więcej bakterii oznacza większą i szybszą produkcję kwasu mlekowego w początkowych etapach wyrobu sera i przekwaszenie masy serowej przed dojrzewaniem. W technologii serowarstwa opracowano metody „osłabiania” kultur bakteryjnych, które zapobiegają tworzeniu nadmiernych ilości kwasu mlekowego przed soleniem i dojrzewaniem sera [4, 15]. Sposobem ograniczającym przeżywalność komórek i zmniejszenie ich aktywności kwaszącej, najłatwiejszym do zastosowania przemysłowego, jest metoda szoku termicznego pod wpływem wysokiej temperatury. Z zastosowaniem termizowanych kultur LAB wiąże się wiele korzyści, jednak nie jest to ciągle metoda szeroko stosowana w produkcji, co może być wynikiem zmiany końcowych cech sensorycznych serów otrzymanych z zastosowaniem dodatkowych kultur bakterii oraz kosztów takiego procesu. Badania dotyczące zastosowania dodatkowych osłabionych termicznie kultur w serowarstwie dotyczyły głównie bakterii ogrzewanych w temp. 50 ÷ 72 °C, najczęściej przez 10 ÷ 20 s. Nieliczne badania z tego zakre-

su dotyczyły dodatkowych kultur bakterii ogrzewanych do 65 °C w ciągu kilku min [14].

Zastosowanie dodatkowych kultur *Lactobacillus* do produkcji sera może wpływać na kontrolę procesu dojrzewania oraz wzrostu spontanicznej flory bakteryjnej tworzonej przez niestarterowe bakterie kwasu mlekowego (NSLAB – *non starter lactic acid bacteria*). [21]. Zastosowanie pałeczek mlekowych z rodzaju *Lactobacillus*, osłabionych poprzez obróbkę termiczną, w produkcji serów podpuszczkowych dojrzewających może być dobrym rozwiązaniem w przyspieszaniu dojrzewania serów z uwagi na ich dużą stabilność biochemiczną (podstawowe cechy tych kultur kodowane są w DNA chromosomalnym) [9] oraz stosunkowo wysoką aktywność peptydazową. Cechy LAB, takie jak: wytwarzanie kwasu, aktywność proteinaz i peptydaz, autoliza, synteza związków hamujących są niezwykle ważne ze względu na możliwość ich zastosowania jako kultur dodatkowych w produkcji serów [3].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu obróbki termicznej wybranych szczepów *Lactobacillus* stosowanych w mleczarstwie na aktywność amino- i dipeptydaz.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły dwie kultury bakterii kwasu mlekowego: *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (FD-DVS LA-5, Chr. Hansen, Dania) oraz *Lactobacillus casei*-431 (F-DVS CRL-431, Chr. Hansen, Dania).

W badaniach zastosowano 6 dipeptydów: Ala-Ala, Leu-Gly, Gly-Leu, Leu-Leu, Gly-Glu, Ala-Leu (Sigma Aldrich, Polska), 4 aminopeptydy: Leu-pNA, Lys-pNA, Ala-pNa i Gly-pNA (Sigma Aldrich, Polska), podłoże mikrobiologiczne: MRS-bulion (Merck, Polska), bufor fosforanowy pH 7,0 (Sigma Aldrich, Polska) oraz odczynniki: ninhydrynę (Sigma Aldrich, Polska), kwas trichlorooctowy – TCA (POCH, Polska), kwas octowy, (POCH, Polska), etanol (POCH, Polska), odczynnik Folina i Ciocalteu'a (POCH, Polska), metanol (POCH, Polska).

Aktywność amino- i dipeptydaz oznaczano według metody opisanej przez El Soda'a i Desmazeaud [8]. W celu określenia aktywności peptydaz przygotowano hodowlę płynną badanej kultury starterowej. Do 100 ml pożywki MRS-bulion dodawano 2 % danej kultury bakteryjnej. Obróbka termiczna badanych bakterii *Lactobacillus* sp. prowadzona była w temp.: 50, 55, 60, 65, 70, 75 °C przez 1, 15 oraz 25 min. Następnie badane szczepy poddawano dezintegracji ultradźwiękami przy użyciu dezintegratora Sonics, Vibra cell, VCX130 (Sonics & Materials, Inc., USA) w układzie: 30 s puls włączony / 15 s puls wyłączony przez 15 min, z wykorzystaniem amplitudy 90 %. W czasie dezintegracji próbki zanurzone były w mieszaninie etanolu z lodem, aby zapobiec nadmiernemu przegrzaniu. Zdezintegrowaną biomasę rozpuszczano w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0 i odwirowywano (10000 g, temp. 4 °C, 25 min). Aktywność amino- i dipeptydaz określano także w próbkach niepoddanych

obróbce termicznej (próba kontrolna). W ekstrakcie enzymatycznym oznaczano również zawartość białka metodą Lowry'ego [16].

Jednostkę aktywności specyficznej definiowano jako zmianę absorbancji o 0,01 w czasie 1 min reakcji enzymatycznej, w przeliczeniu na 1 mg białka, mierzonej przy długości fali $\lambda = 410$ nm (aminopeptydazy) lub $\lambda = 570$ nm (dipeptydazy) [8]. Pomiar absorbancji wykonywano przy użyciu spektrofotometru UV-VIS (Genesis 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu komputerowego StatGraphicPlus 4.1. Przeprowadzono jedno- lub wieloczynnikową analizę wariancji. Do zweryfikowania istotności różnic między wartościami średnimi stosowano test Tukeya ($p = 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Aktywność enzymatyczna dipeptydaz *Lb. casei*, rozkładających substraty Ala-Leu, Gly-Leu, Leu-Gly, Leu-Leu, Gly-Glu i Ala-Ala, zawierała się odpowiednio w zakresach [$U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]: $0 \div 3,65$, $0 \div 2,20$, $0 \div 0,57$, $0 \div 0,71$, $0 \div 1,37$, $0 \div 2,83$ (tab. 1), natomiast aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* względem tych substratów mieściła się odpowiednio w zakresach [$U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]: $0 \div 2,94$, $0 \div 3,48$, $0,38 \div 2,25$, $0 \div 1,71$, $0 \div 1,81$, $0 \div 10,92$ (tab. 2).

Zakresy aktywności aminopeptydaz kultury *Lb. casei* wobec Ala-pNa, Gly-pNa, Leu-pNa, Lys-pNa wynosiły odpowiednio [$U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]: $0,39 \div 8,47$, $0,64 \div 6,98$, $1,25 \div 10,62$, $1,38 \div 7,41$ (tab. 3), natomiast w przypadku kultury *Lb. acidophilus* wynosiły odpowiednio [$U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]: $0,75 \div 9,96$, $0 \div 4,25$, $0,39 \div 9,23$, $0,15 \div 3,49$ (tab. 4).

Po porównaniu obu badanych kultur bakterii stwierdzono, że aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus*, w porównaniu z *Lb. casei*, była wyższa względem substratów: Ala-Ala, Gly-Leu, Leu-Gly, Gly-Glu oraz Leu-Leu. Jedynie hydroliza dipeptydu Ala-Leu przez *Lb. casei* powodowała wyższą średnią aktywność enzymatyczną w porównaniu z *Lb. acidophilus*. Interesujące jest, że średnia aktywność enzymatyczna *Lb. acidophilus* wobec Ala-Ala przyjmowała najwyższe wartości spośród wszystkich badanych substratów. Z kolei średnia aktywność dipeptydaz *Lb. casei* w porównaniu z aktywnością *Lb. acidophilus* względem Ala-Ala była ponad trzykrotnie mniejsza.

Według danych literaturowych aktywność dipeptydaz wobec substratu Ala-Ala charakteryzuje duża zmienność w zależności od badanego drobnoustroju. Cichosz i wsp. [7] nie stwierdzili aktywności peptydaz syntetyzowanych przez *Lb. acidophilus* względem tego dipeptydu, natomiast enzymy *Lb. casei* i *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* rozkładały go z aktywnością odpowiednio: 1,25 i 1,08 $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Również szczep *Lb. helveticus* SBT 2171 nie wykazywał aktywności wobec Ala-Ala [27]. Magboul i McSweeney [17] podają poziom aktywności enzymatycznej względnej szczepu *Lb. curvatus* DPC 2024 równy 99 %.

Tabela 1. Aktywność dipeptydaz *Lactobacillus casei* ogrzewanych w temp. 50 ÷ 75 °C przez 1, 15 i 25 minTable 1. Dipeptidase activity of *Lactobacillus casei* that were heat-treated at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 min

Substrat Substrate	Czas obróbki termicznej Heat-treatment time [min]	Temperatura / Temperature [°C]						
		K	50	55	60	65	70	75
		Aktywność dipeptydaz / Dipeptidase activity [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ białka] / [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ of protein]						
Ala-Leu	1	1,21 ^{ab} ± 0,48	2,15 ^b ± 0,69	1,18 ^{ab} ± 0,79	1,67 ^{ab} ± 1,28	0,20 ^a ± 0,13	0,74 ^{ab} ± 0,36	0,80 ^{ab} ± 0,13
	15	1,21 ^c ± 0,48	0,00 ^a ± 0,00	0,62 ^b ± 0,44	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
	25	1,21 ^a ± 0,48	2,63 ^{abc} ± 0,65	1,96 ^{ab} ± 1,03	2,54 ^{abc} ± 0,80	3,39 ^{bc} ± 0,26	2,47 ^{abc} ± 0,03	3,65 ^c ± 0,72
Gly-Leu	1	1,88 ^b ± 1,25	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
	15	1,88 ^a ± 1,25	2,20 ^a ± 0,04	1,65 ^a ± 1,37	1,18 ^a ± 0,10	1,59 ^a ± 0,01	1,94 ^a ± 0,43	1,23 ^a ± 0,10
	25	1,88 ^b ± 1,25	0,21 ^a ± 0,14	0,48 ^a ± 0,27	0,20 ^a ± 0,13	0,39 ^a ± 0,35	0,91 ^{ab} ± 0,32	0,76 ^{ab} ± 0,30
Leu-Gly	1	0,01 ^a ± 0,006	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
	15	0,01 ^a ± 0,006	0,28 ^a ± 0,22	0,00 ^a ± 0,00	0,23 ^a ± 0,20	0,38 ^a ± 0,34	0,00 ^a ± 0,00	0,57 ^a ± 0,56
	25	0,01 ^a ± 0,006	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
Leu-Leu	1	0,47 ^a ± 0,44	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
	15	0,47 ^a ± 0,44	0,18 ^a ± 0,11	0,43 ^a ± 0,40	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,04 ^a ± 0,04	0,71 ^a ± 0,62
	25	0,47 ^a ± 0,44	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
Gly-Glu	1	0,60 ^a ± 0,58	1,37 ^a ± 0,14	1,01 ^a ± 0,03	0,94 ^a ± 0,26	1,33 ^a ± 1,19	0,55 ^a ± 0,15	0,53 ^a ± 0,19
	15	0,60 ^{ab} ± 0,58	0,99 ^b ± 0,37	0,00 ^a ± 0,00	1,22 ^b ± 0,63	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,12 ^a ± 0,11
	25	0,60 ^b ± 0,58	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
Ala-Ala	1	2,83 ^b ± 0,90	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
	15	2,83 ^b ± 0,90	2,43 ^b ± 0,37	0,99 ^a ± 0,28	2,02 ^{ab} ± 0,15	2,31 ^b ± 0,10	2,40 ^b ± 0,36	2,22 ^b ± 0,57
	25	2,83 ^b ± 0,90	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00

Objaśnienia: / Explanatory notes:

K – próbka nieogrzewana (kontrolna) / non-heated sample (control); n = 5;

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

Wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszu różnią się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) / Mean values in rows and denoted by different letters are statistically significantly different ($p < 0.05$).

Tabela 2. Aktywność dipeptydaz *Lactobacillus acidophilus* ogrzewanych w temp. 50 ÷ 75 °C przez 1, 15 i 25 min

Table 2. Dipeptidase activity of *Lactobacillus acidophilus* that were heat-treated at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 min

Substrat Substrate	Czas obróbki termicznej Heat-treatment time [min]	Temperatura / Temperature [°C]						
		K	50	55	60	65	70	75
		Aktywność dipeptydaz / Dipeptidase activity [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ białka] / [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ of protein]						
Ala-Leu	1	1,66 ^c ± 0,52	0,00 ^a ± 0,00	0,59 ^{abc} ± 0,57	0,62 ^{abc} ± 0,58	0,41 ^{ab} ± 0,13	0,37 ^{ab} ± 0,12	1,22 ^{bc} ± 0,83
	15	1,66 ^b ± 0,52	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
	25	1,66 ^{bcd} ± 0,52	0,00 ^a ± 0,00	0,99 ^{ab} ± 0,83	2,33 ^{de} ± 0,03	1,18 ^{bc} ± 0,14	2,20 ^{cde} ± 0,61	2,94 ^e ± 0,41
Gly-Leu	1	1,42 ^{ab} ± 0,91	0,70 ^a ± 0,26	2,09 ^b ± 0,18	2,08 ^b ± 0,05	1,93 ^b ± 0,24	2,03 ^b ± 0,33	2,38 ^b ± 0,38
	15	1,42 ^b ± 0,91	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
	25	1,42 ^{ab} ± 0,91	3,48 ^b ± 1,35	0,00 ^a ± 0,00	0,58 ^{ab} ± 0,01	0,26 ^a ± 0,20	0,46 ^{ab} ± 0,36	1,38 ^{ab} ± 0,01
Leu-Gly	1	0,85 ^{ab} ± 0,01	1,78 ^c ± 0,03	1,15 ^{bc} ± 0,67	0,89 ^{ab} ± 0,13	0,38 ^a ± 0,31	0,93 ^{ab} ± 0,24	0,83 ^{ab} ± 0,15
	15	0,85 ^a ± 0,01	1,13 ^a ± 0,13	0,64 ^a ± 0,19	0,69 ^a ± 0,20	0,66 ^a ± 0,65	1,24 ^a ± 0,20	0,77 ^a ± 0,68
	25	0,85 ^a ± 0,01	0,62 ^a ± 0,61	1,05 ^a ± 0,19	1,33 ^{ab} ± 0,19	2,25 ^b ± 0,62	0,91 ^a ± 0,38	1,53 ^{ab} ± 0,36
Leu-Leu	1	0,39 ^b ± 0,23	0,14 ^{ab} ± 0,13	0,00 ^a ± 0,00	0,01 ^a ± 0,01	0,00 ^a ± 0,00	0,05 ^a ± 0,04	0,00 ^a ± 0,00
	15	0,39 ^b ± 0,23	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
	25	0,39 ^a ± 0,23	1,55 ^b ± 0,40	1,31 ^b ± 0,45	1,71 ^b ± 0,44	1,15 ^{ab} ± 0,05	1,15 ^{ab} ± 0,48	1,60 ^b ± 0,24
Gly-Glu	1	0,47 ^a ± 0,15	0,32 ^a ± 0,27	0,53 ^a ± 0,20	1,81 ^a ± 1,51	1,36 ^a ± 1,14	0,78 ^a ± 0,01	0,98 ^a ± 0,17
	15	0,47 ^{ab} ± 0,15	0,86 ^{ab} ± 0,22	0,94 ^b ± 0,44	0,64 ^{ab} ± 0,05	0,59 ^{ab} ± 0,58	0,38 ^{ab} ± 0,02	0,15 ^a ± 0,12
	25	0,47 ^b ± 0,15	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00	0,00 ^a ± 0,00
Ala-Ala	1	1,23 ^{bc} ± 0,27	0,91 ^b ± 0,11	1,02 ^b ± 0,18	0,24 ^a ± 0,23	1,68 ^c ± 0,16	1,05 ^b ± 0,46	0,97 ^b ± 0,28
	15	1,23 ^a ± 0,27	4,78 ^{ab} ± 1,51	10,92 ^c ± 1,87	10,58 ^c ± 0,15	10,33 ^c ± 0,93	8,69 ^{bc} ± 1,86	9,72 ^{bc} ± 0,83
	25	1,23 ^a ± 0,27	0,00 ^a ± 0,00	0,18 ^a ± 0,16	1,41 ^a ± 0,63	0,00 ^a ± 0,00	0,13 ^a ± 0,12	0,19 ^a ± 0,13

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

Tabela 3. Aktywność aminopeptydaz *Lactobacillus casei* ogrzewanych w temp. 50 ÷ 75 °C przez 1, 15 i 25 minTable 3. Aminopeptidase activity of *Lactobacillus casei* that were heat-treated at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 min

Substrat Substrate	Czas obróbki termicznej Heat-treatment time [min]	Temperatura / Temperature [°C]						
		K	50	55	60	65	70	75
		Aktywność aminopeptydaz / Aminopeptidase activity [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ białka] / [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ of protein]						
Ala-pNa	1	2,45 ^a ± 0,26	2,42 ^a ± 0,16	2,69 ^{ab} ± 0,07	2,67 ^{ab} ± 0,01	2,91 ^b ± 0,27	2,73 ^{ab} ± 0,12	2,81 ^{ab} ± 0,16
	15	2,45 ^a ± 0,26	8,13 ^{cd} ± 0,19	8,47 ^d ± 1,22	7,46 ^{cd} ± 0,08	5,72 ^{bcd} ± 0,05	4,51 ^{ab} ± 0,12	5,33 ^{bc} ± 1,03
	25	2,45 ^{ab} ± 0,26	2,77 ^{ab} ± 0,24	3,68 ^{ab} ± 0,45	2,19 ^{ab} ± 0,73	5,22 ^b ± 1,12	0,39 ^a ± 0,13	0,39 ^a ± 0,14
Gly-pNa	1	5,49 ^c ± 0,32	2,92 ^a ± 0,16	3,17 ^a ± 0,51	3,36 ^a ± 0,14	4,23 ^b ± 0,07	3,52 ^a ± 0,13	4,16 ^b ± 0,27
	15	5,49 ^c ± 0,32	5,42 ^c ± 0,30	6,89 ^d ± 0,08	6,98 ^d ± 0,28	3,86 ^b ± 0,14	3,36 ^b ± 0,24	1,11 ^a ± 0,19
	25	5,49 ^b ± 0,32	6,40 ^b ± 1,66	3,52 ^{ab} ± 0,08	3,01 ^{ab} ± 0,55	3,89 ^{ab} ± 1,08	0,74 ^a ± 0,21	0,64 ^a ± 0,07
Leu-pNa	1	5,54 ^c ± 0,26	1,78 ^{ab} ± 0,67	3,26 ^b ± 0,15	1,28 ^{ab} ± 0,22	1,36 ^{ab} ± 0,03	1,67 ^{ab} ± 0,10	1,25 ^a ± 0,09
	15	5,54 ^{bc} ± 0,26	5,79 ^{bcd} ± 0,29	6,79 ^d ± 0,32	6,68 ^{cd} ± 0,77	6,07 ^{cd} ± 0,25	4,87 ^b ± 0,86	1,49 ^a ± 0,33
	25	5,54 ^b ± 0,26	3,77 ^{ab} ± 0,30	4,78 ^b ± 0,85	10,62 ^c ± 1,28	3,88 ^{ab} ± 1,29	2,20 ^a ± 0,32	1,48 ^a ± 0,48
Lys-pNa	1	4,96 ^{ab} ± 1,09	4,41 ^{ab} ± 0,24	7,41 ^b ± 1,28	3,55 ^a ± 0,13	3,37 ^a ± 0,28	3,37 ^a ± 0,13	3,45 ^a ± 0,51
	15	4,96 ^c ± 1,09	5,26 ^c ± 0,07	5,76 ^c ± 0,22	5,75 ^c ± 0,40	3,91 ^b ± 0,08	3,44 ^b ± 0,03	1,38 ^a ± 0,05
	25	4,96 ^c ± 1,09	3,17 ^b ± 0,06	2,62 ^{ab} ± 0,13	2,23 ^{ab} ± 0,12	2,09 ^a ± 0,22	1,66 ^a ± 0,14	1,64 ^a ± 0,17

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

Stwierdzono różnice pod względem stopnia hydrolizy Leu-Gly przez peptydazy badanych kultur bakterii. *Lb. acidophilus* rozkładał Leu-Gly ze średnią aktywnością 1,02 U·min⁻¹·mg⁻¹ w całym zakresie temperatury, natomiast *Lb. casei* wykazywał tylko minimalną aktywność równą 0,07 U·min⁻¹·mg⁻¹ względem tego substratu. Aktywność dipeptydaz względem Leu-Gly, podawana w literaturze przedmiotu, jest stosunkowo wysoka, co jest rozbieżne z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy. Cichosz i wsp. [7] podają, że aktywność enzymatyczna szczepów *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* oraz *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* wobec Leu-Gly wynosiła odpowiednio: 4,42, 6,12 oraz 3,02 U·min⁻¹·mg⁻¹. Z kolei *Lb. curvatus* rozkładał ten dipeptyd z aktywnością względną równą 62 % [17]. Również peptydazy *Lb. helveticus* SBT2171 wykazywały aktywność względem tego dipeptydu [27].

Tabela 4. Aktywność aminopeptydaz *Lactobacillus acidophilus* ogrzewanych w temp. 50 - 75 °C przez 1, 15 i 25 minTable 4. Aminopeptidase activity of *Lactobacillus acidophilus* that were heat-treated at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 min

Substrat Substrate	Czas obróbki termicznej Heat-treatment time [min]	Temperatura / Temperature [°C]						
		K	50	55	60	65	70	75
Aktywność aminopeptydaz / Aminopeptidase activity [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ białka] / [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ of protein]								
Ala-pNa	1	5,32 ^a ± 0,34	6,01 ^a ± 0,63	5,79 ^a ± 0,13	5,41 ^a ± 0,06	5,37 ^a ± 0,28	5,25 ^a ± 0,18	5,99 ^a ± 0,31
	15	5,32 ^c ± 0,34	0,94 ^{ab} ± 0,22	4,21 ^{bc} ± 1,61	0,87 ^{ab} ± 0,54	1,18 ^{ab} ± 0,04	1,19 ^{ab} ± 0,94	0,75 ^a ± 0,67
	25	5,32 ^a ± 0,34	7,20 ^b ± 0,30	9,96 ^c ± 1,07	5,44 ^a ± 0,14	8,02 ^c ± 1,56	4,25 ^a ± 0,12	4,37 ^a ± 0,46
Gly-pNa	1	2,26 ^b ± 0,27	2,07 ^{ab} ± 0,37	2,19 ^b ± 0,42	0,69 ^a ± 0,18	2,34 ^b ± 0,65	1,99 ^{ab} ± 0,15	2,24 ^b ± 0,35
	15	2,26 ^a ± 0,27	3,14 ^a ± 1,01	2,92 ^a ± 0,23	2,73 ^a ± 0,38	2,22 ^a ± 0,29	4,25 ^a ± 1,28	1,61 ^a ± 0,13
	25	2,26 ^b ± 0,27	1,17 ^{ab} ± 0,38	0,24 ^a ± 0,16	0,75 ^a ± 0,43	0,91 ^a ± 0,59	0,23 ^a ± 0,11	0,00 ^a ± 0,00
Leu-pNa	1	5,33 ^b ± 1,25	0,48 ^a ± 0,01	0,47 ^a ± 0,01	0,39 ^a ± 0,01	0,46 ^a ± 0,02	0,44 ^a ± 0,01	0,54 ^a ± 0,07
	15	5,33 ^a ± 1,25	3,48 ^a ± 0,11	4,76 ^a ± 0,34	4,92 ^a ± 0,75	4,07 ^a ± 0,70	4,34 ^a ± 0,57	4,88 ^a ± 0,32
	25	5,33 ^a ± 1,25	9,23 ^b ± 2,77	6,83 ^{ab} ± 0,78	6,30 ^a ± 0,85	4,97 ^a ± 0,06	4,89 ^a ± 0,04	4,82 ^a ± 0,36
Lys-pNa	1	2,98 ^b ± 1,14	0,25 ^a ± 0,02	0,24 ^a ± 0,01	0,15 ^a ± 0,01	0,19 ^a ± 0,02	0,21 ^a ± 0,01	0,20 ^a ± 0,02
	15	2,98 ^b ± 1,14	1,30 ^a ± 0,26	2,28 ^{ab} ± 0,25	2,75 ^{ab} ± 0,95	2,42 ^{ab} ± 0,18	2,90 ^b ± 0,77	2,22 ^{ab} ± 0,54
	25	2,98 ^{bc} ± 1,14	3,49 ^c ± 0,24	2,93 ^{bc} ± 0,25	3,28 ^c ± 1,73	1,77 ^{abc} ± 0,68	1,24 ^{ab} ± 0,31	0,85 ^a ± 0,02

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

Seo i wsp. [23] stwierdzili, że dipeptydaza pochodząca z *B. longum* BORI po ogrzewaniu w temp. 80 °C przez 10 min utrzymała 60 % aktywności wyjściowej. Garbowska i wsp. [11] określili, że peptydazy ogrzewanej kultury CHN-19 wykazywały zdolność hydrolizy wszystkich badanych dipeptydów. Peptydazy te charakteryzowała największa aktywność wobec dipeptydów zawierających aminokwasy hydrofobowe (leucyna, fenyloalanina), których obecność często stwierdzana była w gorzkich peptydach. Specyficzność ta może być korzystna w zastosowaniu takiego startera do produkcji serów podpuszczkowych, jako prekursora w rozkładzie gorzkich peptydów i kształtowaniu właściwego smaku. Poddana obróbce cieplnej (50 ÷ 80 °C, 15 s, 10

i 30 min) kultura bakterii mlekowych (CHN-19) w dużym stopniu zachowywała aktywność peptydolityczną.

Aktywność aminopeptydaz badanych kultur bakterii względem Ala-pNa i Leu-pNa była bardzo zbliżona. Zaobserwowano natomiast różnice aktywności peptydaz w stosunku do pozostałych badanych substratów. Zarówno względem Gly-pNa, jak i Lys-pNa, określono dwukrotnie wyższą aktywność peptydaz *Lb. casei*, która wynosiła odpowiednio: 3,98 i 4,06 U·min⁻¹·mg⁻¹ w całym zakresie badanej temperatury w porównaniu z aktywnością peptydaz syntetyzowanych przez *Lb. acidophilus* (1,79 U·min⁻¹·mg⁻¹ w przypadku obu substratów). Aguirre i wsp. [1] stwierdzili najwyższą aktywność aminopeptydaz szczepów LAB (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, *Lb. helveticus* CRL 1062, *Lb. reuteri* CRL 1099) względem substratów zawierających na N-końcu łańcucha leucynę i lizynę. Requena i wsp. [19] podają, że w przypadku *Lb. casei* ssp. *casei* IFPL 731 aktywność aminopeptydaz względem Leu-pNa była trzykrotnie wyższa niż wobec Lys-pNa i blisko sześciokrotnie wyższa niż w przypadku Ala-pNa. Peptydazy bakterii *Lb. helveticus* CNRZ 32, *Lb. helveticus* ATCC 10797 oraz *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 12278 były zdolne do hydrolizy Ala-pNa, Leu-pNa oraz Lys-pNa, natomiast Gly-pNa rozkładany był przez te bakterie w znacznie mniejszym stopniu [13].

Najwyższą aktywność amino- i dipeptydaz syntetyzowanych przez *Lb. casei* stwierdzono po obróbce cieplej bakterii przez 15 min. Podobnie najwyższą aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* określono po zastosowaniu 15-minutowej obróbki cieplej. Z kolei średnia aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* wzrastała wraz z wydłużaniem czasu obróbki termicznej. Najwyższe wartości uzyskano po ogrzewaniu bakterii przez 25 min. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że enzymy syntetyzowane przez *Lb. acidophilus*, odpowiedzialne za rozkład dipeptydów, wykazują wyższą aktywność po działaniu wysoką temperaturą w porównaniu z *Lb. casei*. Oceniając wpływ czasu obróbki termicznej na aktywność peptydolityczną badanych kultur *Lactobacillus* wykazano statystycznie istotne ($p < 0,05$) różnice odnoszące się jedynie do aktywności aminopeptydaz. W przypadku *Lb. casei* wyższą średnią aktywność aminopeptydaz oznaczono po ogrzewaniu kultury przez 15 min, a niższą – po obróbce termicznej przez 1 i 25 min. Z kolei aminopeptydazy syntetyzowane przez *Lb. acidophilus* wykazywały wyższą średnią aktywność po ogrzewaniu przez 25 min, a najniższą – po 1 min. Czas obróbki termicznej nie wpływał różnicująco na aktywność dipeptydaz badanych kultur bakterii.

Najwyższą aktywność dipeptydaz *Lb. casei* w temperaturze optymalnej (czyli w temperaturze obróbki termicznej badanych kultur bakterii, po zastosowaniu której dipeptydazy wykazywały maksymalną aktywność enzymatyczną względem danego substratu) wykazywały enzymy hydrolizujące Ala-Leu (3,65 U·min⁻¹·mg⁻¹), natomiast najmniejszą – Leu-Gly (0,57 U·min⁻¹·mg⁻¹). Natomiast dipeptydazy *Lb. acidophilus*

z wysoką aktywnością rozkładały Ala-Ala ($10,92 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), a z najniższą – Leu-Leu ($1,71 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Substraty zawierające w składzie resztę alaniny, takie jak Ala-Leu i Ala-Ala, wykorzystywane były efektywnie przez obie badane kultury bakterii (aktywność odpowiednio: $3,65$ i $2,83 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ – *Lb. casei* oraz $2,94$ i $10,92 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ – *Lb. acidophilus*). Wysoką aktywność wykazywały peptydazy syntetyzowane przez *Lb. casei* i *Lb. acidophilus* wobec Gly-Leu (odpowiednio: $2,20$ i $3,48 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Gdy na N-końcu substratu znajdowała się reszta aminokwasu alifatycznego – leucyny, dipeptydy takie, jak Leu-Gly i Leu-Leu hydrolizowane były z najniższą aktywnością, odpowiednio: $0,57$ i $0,71 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ w przypadku *Lb. casei* oraz $2,25$ i $1,71 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ w przypadku *Lb. acidophilus*. Jednocześnie stwierdzono, że aktywność peptydaz badanych kultur bakterii względem Leu-Gly była mniejsza niż wobec Gly-Leu. Porównywalną aktywność dipeptydaz *Lb. casei* ($1,37 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) i *Lb. acidophilus* ($1,81 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) stwierdzono w stosunku do jednego dipeptydu zawierającego resztę o kwasowym charakterze (Gly-Glu) – tab. 5.

Tabela 5. Aktywność dipeptydaz badanych bakterii *Lactobacillus* w temperaturze optymalnej dla hydrolyzy danego substratu

Table 5. Dipeptidase activity of examined *Lactobacillus* bacteria at temperature optimal for hydrolysis of given substrate

Substrat Substrate	Maksymalna aktywność enzymatyczna [$\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka] Maximum enzymatic activity [$\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein]	
	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
Ala-Leu	3,65 (75 °C/25 min)	2,94 (75 °C/25 min)
Gly-Leu	2,20 (50 °C/15 min)	3,48 (50 °C/25 min)
Leu-Leu	0,71 (75 °C/15 min)	1,71 (60 °C/25 min)
Gly-Glu	1,37 (50 °C/1 min)	1,81 (60 °C/1 min)
Leu-Gly	0,57 (75 °C/15 min)	2,25 (65 °C/25 min)
Ala-Ala	2,83 (kontrolna/control)	10,92 (55 °C/15 min)

Najwyższą aktywność aminopeptydaz *Lb. casei* w temperaturze optymalnej stwierdzono względem substratu Leu-pNa ($10,62 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), natomiast w przypadku peptydaz *Lb. acidophilus* wobec Ala-pNa ($9,96 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Stosunkowo niewielką aktywność aminopeptydaz szczepów *Lactobacillus* oznaczono wobec Gly-pNa ($6,98 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ – *Lb. casei* i $4,25 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ – *Lb. acidophilus*). Aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* i *Lb. casei* względem jednego substratu zawierającego aminokwas polarny (Lys-pNa) wynosiła odpowiednio: $3,49$ i $7,41 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ – tab. 6.

Tabela 6. Aktywność aminopeptydaz badanych bakterii *Lactobacillus* w temperaturze optymalnej dla hydrolizy danego substratuTable 6. Aminopeptidase activity of examined *Lactobacillus* bacteria at temperature optimal for hydrolysis of given substrate

Substrat Substrate	Maksymalna aktywność enzymatyczna [U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ białka] Maximum enzymatic activity [U min ⁻¹ mg ⁻¹ of protein]	
	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
Ala-pNa	8,47 (55 °C/15 min)	9,96 (55 °C/25 min)
Gly-pNa	6,98 (60 °C/15 min)	4,25 (70 °C/15 min)
Leu-pNa	10,62 (60 °C/25 min)	9,23 (50 °C/25 min)
Lys-pNa	7,41 (55 °C/1 min)	3,49 (50 °C/25 min)

W badaniach bakterii wyizolowanych z tradycyjnego hiszpańskiego sera Genestoso wykazano, że aktywność peptydolityczna w znacznym stopniu zależy od szczepu badanego drobnoustroju [12]. Autorzy podają, że występuje szeroka zmienność aktywności, zarówno wśród ziarniaków, jak i pałeczek mlekowych. Określili wysoką specyficzną badanych bakterii względem substratu Leu-Leu, a niską wobec Leu-Gly. Jednocześnie najwyższe wartości aktywności aminopeptydaz stwierdzili w stosunku do Leu-pNa, a niewielkie – wobec Ala-pNa. W niniejszej pracy również stwierdzono nieznaczną aktywność dipeptydaz względem Leu-Gly, ale, w przeciwieństwie do badań przedstawionych przez Gonzáleza i wsp. [12], wykazano stosunkowo niską aktywność enzymów badanych kultur bakterii względem Leu-Leu oraz Ala-pNa.

W badaniach własnych wykazano, że w przypadku aktywności dipeptydaz *Lb. casei* czynnikiem statystycznie istotnym ($p < 0,05$) był rodzaj użytego substratu. Określono, że spośród wszystkich badanych substratów najniższą aktywność wykazywały peptydazy w stosunku do Leu-Gly i Leu-Leu (odpowiednio: 0,07 i 0,13 U·min⁻¹·mg⁻¹), natomiast największą – wobec Ala-Leu (1,32 U·min⁻¹·mg⁻¹). Również w przypadku peptydaz *Lb. acidophilus* wykazano różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$), a największą aktywność dipeptydaz określono względem dipeptydu Ala-Ala (3,17 U·min⁻¹·mg⁻¹).

W ocenie statystycznej dotyczącej aminopeptydów jako substratów nie wykazano różnic statystycznie istotnych w zakresie hydrolizy i wpływu na aktywność enzymatyczną *Lb. casei*. Z kolei w przypadku aktywności aminopeptydaz *Lb. acidophilus* określono, że czynnikiem statystycznie istotnym ($p < 0,05$) był rodzaj substratu. Największą aktywność wykazywały enzymy względem Ala-pNa oraz Leu-pNa, natomiast mniejszą – wobec Lys-pNa i Gly-pNa. W przypadku aminopeptydaz syntetyzowanych przez *Lb. casei*, w odróżnieniu od syntetyzowanych przez *Lb. acidophilus*, wyższą średnią aktywność określono wobec Leu-pNa, Lys-pNa i Gly-pNa. Jedynie względem Ala-pNa stwierdzono większą aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus*.

Najwyższą średnią aktywnością charakteryzowały się dipeptydazy *Lb. acidophilus* ($1,17 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), co stanowi wartość prawie dwukrotnie wyższą w porównaniu z aktywnością dipeptydaz *Lb. casei*, która wynosiła $0,64 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Natomiast wyższą średnią aktywność aminopeptydaz wykazywały peptydazy *Lb. casei* ($4,05 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) w porównaniu z *Lb. acidophilus* ($3,05 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Otrzymane wyniki wskazują na podobną specyficzność substratową enzymów badanych kultur bakterii mlekowych. Obie kultury wykazywały jednak różną aktywność zarówno di-, jak i aminopeptydaz po działaniu na nie czynnikiem stresowym, jakim była temperatura i czas jej działania.

W niniejszej pracy wykazano, że ogrzewane szczepy *Lactobacillus* w znacznym stopniu zachowywały aktywność peptydaz, co może pozytywnie wpływać na proces koagulacji mleka i zapobiegać powstawaniu smaku gorzkiego w serach. Aktywność peptydolityczna badanych bakterii wskazuje na możliwość ich zastosowania jako dodatkowych kultur starterowych. Jest to ważne we wczesnych etapach produkcji sera, w czasie kształtowania się jego charakterystycznego smaku.

Wnioski

1. Badane kultury *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy o podobnej specyficzności substratowej, ale ze zróżnicowaną aktywnością.
2. *Lb. casei* wykazywał największą specyficzność względem substratów: Ala-Leu, Ala-Ala, Gly-Leu, natomiast *Lb. acidophilus* – względem Ala-Ala oraz Ala-pNa.
3. Najwyższą aktywność specyficzną dipeptydaz *Lb. casei* stwierdzono względem substratu Ala-Leu w próbkach ogrzewanych w temp. $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 25 min ($3,65 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). W przypadku *Lb. acidophilus* najwyższą aktywność dipeptydaz ($10,92 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) stwierdzono wobec Ala-Ala w próbce ogrzewanej w temp. $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 15 min. W przypadku aminopeptydaz najwyższą aktywność *Lb. casei* ($10,62 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) stwierdzono względem Leu-pNa w próbce ogrzewanej w temp. $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 25 min. Najwyższa aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* wynosiła $9,96 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ wobec Ala-pNa, w próbce ogrzewanej w temp. $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 25 min.
4. Najwyższą aktywność dipeptydaz *Lb. casei* określono w próbkach kontrolnych (niepoddanych obróbce termicznej), natomiast w przypadku aminopeptydaz równie wysoką aktywność enzymatyczną, jak w próbkach kontrolnych, stwierdzono w próbkach ogrzewanych w temp. 50 , 55 i $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Najwyższą aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* uzyskano w próbkach ogrzewanych w temp. 60 i $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a wśród aminopeptydaz w próbce kontrolnej i poddanej obróbce termicznej – w $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Średnia aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* była wyższa o 45 % od aktywności tych enzymów kultury *Lb. casei*. Z kolei wyższą o 25 % aktywnością aminopeptydaz charakteryzował się *Lb. casei*.
6. Wykazano, że wydłużenie czasu obróbki termicznej wpływa istotnie ($p < 0,05$) na wzrost aktywności aminopeptydaz badanych kultur pałeczek mlekowych.

Niniejsza praca była finansowana w ramach tematu statutowego Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego nr 500-01-GM-01.

Literatura

- [1] Aguirre L., Hebert E.M., Garro M.S., Savoy de Giori G.: Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains on soybean proteins. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2014, **59**, 780-785.
- [2] Beganović J., Kos B., Pavunc A.L., Uroić K., Džidara P., Šušković J.: Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*, 2013, **20**, 58-64.
- [3] Bozoudi D., Kotzamanidis Ch., Hatzikamari M., Tzanetakis N., Menexes G., Litopoulou-Tzanetaki E.: A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. *Int. J. Food Microbiol.*, 2015, **200**, 87-96.
- [4] Broadbent J.R., Barnes M., Brennand 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.
- [5] Chen Y.S., Christensen J.E., Strickland M., Steele J.L.: Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 1276-1282.
- [6] Christensen J.E., Steele J.L.: Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. Bacteriol.*, 2003, **185**, 3297-3306
- [7] Cichosz G., Kornacki M., Giczewska M., Konopka A.: Aktywność peptydazowa wybranych szczepów *Lactobacillus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **46**, 66-74.
- [8] El Soda M., Desmazeaud M.J.: Les peptides hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.*, 1982, **28**, 1181.
- [9] El-Soda M.: The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, **12**, 239-252.
- [10] Garbowska M., Pluta A.: Metody przyspieszania dojrzewania serów. *ZPPNR*, 2014, **578**, 27-38.
- [11] Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A.: Dipeptidase activity and growth of heat-treated commercial dairy starter culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, **175**, 2602-2615.
- [12] González L., Sacristán N., Arenas R., Fresno J.M., Tornadizo M.E.: Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from traditional Spanish cheese. *Food Microbiol.*, 2010, **27**, 592-597.
- [13] Khalid N.M., El Soda M., Marth E.H.: Peptide hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 29-45.
- [14] Klein N., Lortal S.: Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening – a review. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 751-762.

- [15] Law B.A.: Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for New technology. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 383-398.
- [16] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.
- [17] Magboul A.A., McSweeney P.L.H.: Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 107-116.
- [18] O'Sullivan O., O'Callaghan J., Sangrador-Vegas A., McAuliffe O., Slattery L., Kaleta P., Callanan M., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Beresford T.: Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.*, 2009, **9** (50), 1-9.
- [19] Requena T., Pelaez C., Fox P.F.: Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Z. Lebensm. Unters. For.*, 1993, **196**, 351-355.
- [20] Rodriguez J., Requena T., Goudéranche H., Maubois J.L., Juárez M.: Accelerated ripening of reduced fat semi-hard cheese from a mixture of cow's, goat's and ewe's ultrafiltrated milk by using a Lac-Prt-strain of lactococci. *Le Lait*, 1996, **76**, 513-522.
- [21] Ruysen T., Janssens M., van Gasse B., van Laere D., van der Eecken N., De Meerleer M., Vermeiren L., van Hoorde K., Martins J.C., Uyttendaele M., De Vuyst L.: Characterisation of Gouda cheeses based on sensory, analytical and high-field 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy determinations: Effect of adjunct cultures and brine composition on sodium-reduced Gouda cheese. *Int. Dairy J.*, **33**, 2013, 142-152.
- [22] Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P.: Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **71**, 394-406.
- [23] Seo J.M., Ji G.E., Cho S.H., Park M.S., Lee H.J.: Characterization of a *Bifidobacterium longum* BORI dipeptidase belonging to the U34 family. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 5598-5606.
- [24] Smit G., Smit B.A., Engels W.J.M.: Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, **29**, 591-610.
- [25] Smukowski M., Wendorff W.L., Ping Y., Rao R.D.: Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 364.
- [26] Sridhar V.R., Hughes J.E., Welker D.L., Broadbent J.R., Steele J.L.: Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl. Environ. Microb.*, 2005, **71**, 3025-3032.
- [27] Tan P.S.T., Sasaki M., Bosman B.W., Iwaszki T.: Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* SBT2171. *Appl. Environ. Microb.*, 1995, **61**, 3430-3435.

PEPTIDASE ACTIVITY OF SELECTED HEAT-TREATED *LACTOBACILLUS* STRAINS

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the amino- and dipeptidase activity of selected lactic acid bacteria cultures (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*) subjected to heat-treatment at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 minutes. The analyzed *Lactobacillus* cultures synthesized peptidases that had a similar substrate specificity but different activities. They showed a higher activity of aminopeptidases compared to the activity of dipeptidases. The mean dipeptidase activity of *Lb. acidophilus* was 45% higher than that of *Lb. casei*. The *Lb. casei* strain was characterized by a 25% higher activity of aminopeptidases. This strain exhibited the highest specificity to the Ala-Leu, Ala-Ala, and Gly-Leu substrates, whereas the *Lb. acidophilus* strain – to the Ala-Ala and Ala-pNA substrates. The highest activity of the amino- and dipeptidases of *Lb. casei* and of the dipeptidases of *Lb. acidophilus* was reported after the bacteria were heat-treated for 15 min. As for the amino- and dipeptidases of *Lb. casei*, their activity was, respectively: 5, 10, and 0.83 U/min/mg, and as for the dipeptidases of

Lb. acidophilus, it was 1.66 U/min/mg. The mean aminopeptidase activity of *Lb. acidophilus* increased along with the increasing heat-treatment time; its highest values were reached after 25 min (3.89 U/min/mg). It was proved that the increasing of the heat-treatment time significantly impacted the growth of aminopeptidase activity of lactic acid bacteria; this fact confirms their high temperature resistance.

Key words: lactic acid bacteria, aminopeptidases, dipeptidases, proteolytic activity, heat-treatment ☒

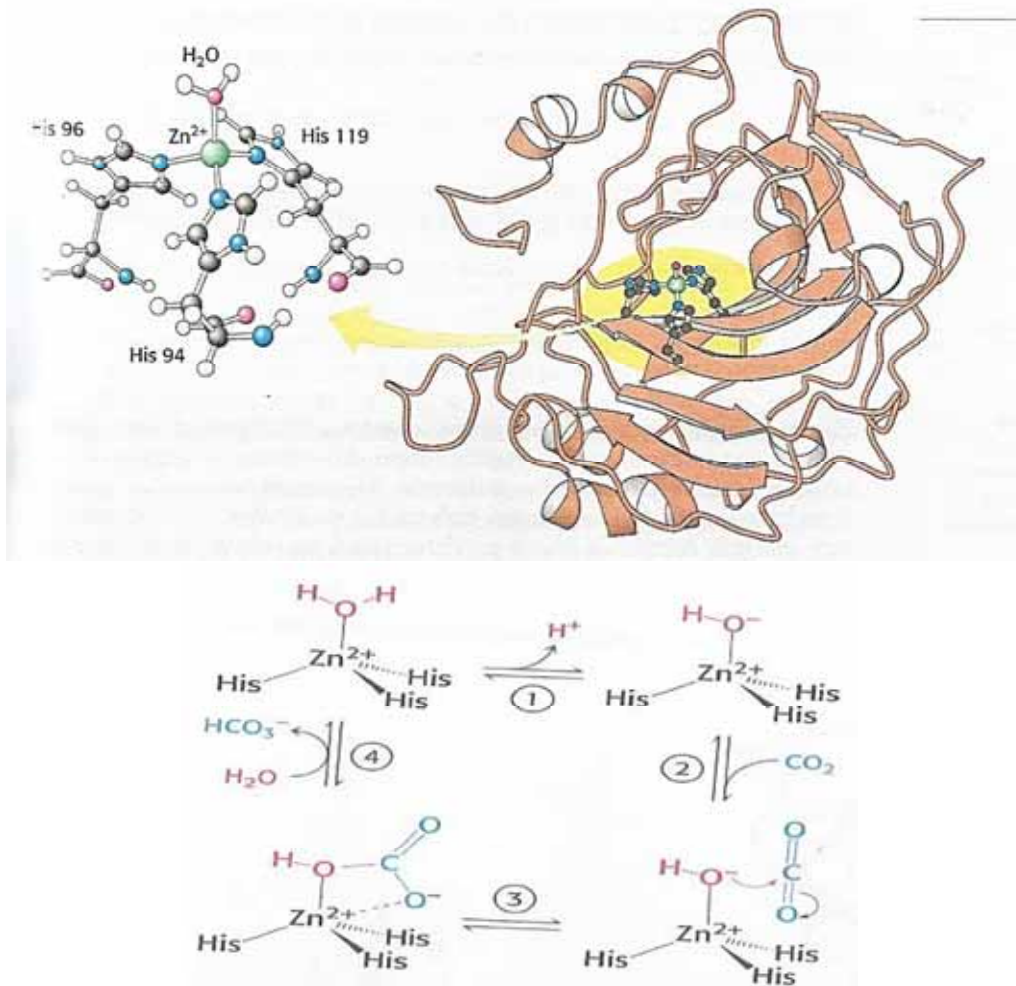
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA

INTERAKCJE SKŁADNIKÓW ŻYWNOŚCI

Prezentujemy 30. część cyklu nt. „Interakcje składników żywności”. Druk materiałów z tego cyklu rozpoczęliśmy w *Żywności* nr 1 (74), 2011.

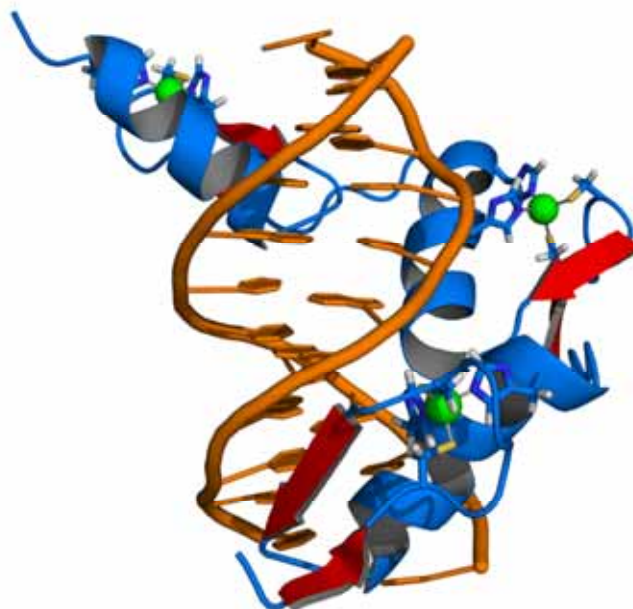
Mówiąc o makro- i mikroelementach w organizmach roślinnych i zwierzęcych, należy pamiętać, że występują one w nich w postaci kationów różnowartościowych i to często skompleksowanych z białkami. Warto przy tej okazji wyjaśnić pojęcie jonu kompleksowego, mianowicie jako cząsteczki kompleksowej utworzonej z elementów, które istnieją w roztworze jako odrębne twory łatwe do rozpoznania. Na przykład $Zn(CN)_4^{2+}$ może powstać z Zn^{2+} i CN^- , które są pospolitymi cząsteczkami w roztworze wodnym. Należy również pamiętać, że cynk może angażować w tworzenie wiązań chemicznych tylko dwa elektrony z zewnętrznej powłoki s, ponieważ usunięcie elektronów z całkowicie zapełnionej podpowłoki d wymagałoby zbyt dużej ilości energii. Oznacza to, że cynk nie tworzy związków na stopniu utlenienia wyższym niż 2+. Przykładem oddziaływania jonów cynku z białkiem enzymatycznym jest anhydraza węglanowa katalizująca reakcję hydratacji CO_2 i dehydratacji HCO_3^- w organizmie człowieka. Schemat struktury przestrzennej ludzkiej anhydrazy węglowodanowej II i jej miejsca wiążącego jony Zn^{2+} oraz mechanizm jej działania przedstawiono na rys. 1. Działanie to można skomentować w trzech etapach: (a) aktywacja cząsteczek wody przez jony Zn^{2+} prowadzi do powstania jonu hydroksylowego; (b) połączenie ditlenku węgla z centrum aktywnym anhydrazy węglanowej prowadzi do reakcji z jonem hydroksylowym, przekształcając go w jon wodorowęglanowy; (c) regeneracja miejsca aktywnego dehydrogenazy węglanowej polega na uwolnieniu jonu wodorowęglanowego i ponownym związaniu następczej cząsteczki wody. Podsumowując, można powiedzieć, że związanie jonów cynku obecnych w anhydrazie węglanowej z wodą prowadzi do powstania jonu wodorowęglanowego dzięki ułatwionemu uwolnieniu protonu i bezpośredniemu zbliżeniu obu reagentów.

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

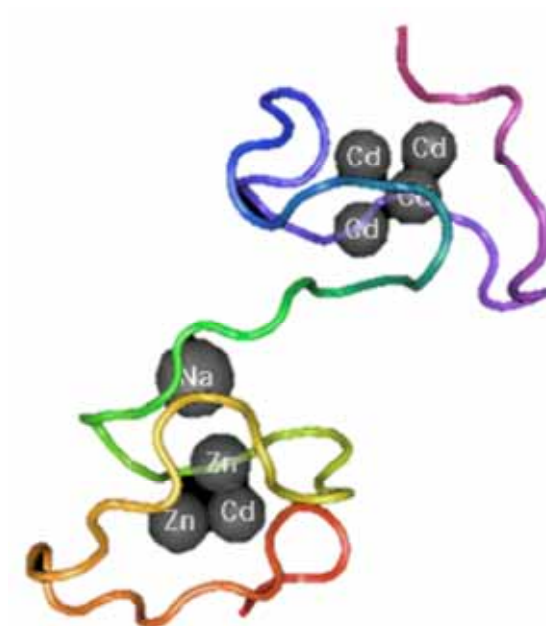


Rys. 1. Struktura przestrzenna ludzkiej anhidrazy węglowodanowej II i jej miejsca wiążącego cynk oraz mechanizm jej działania


Kolejnym przykładem kompleksu jonów cynku (Zn^{2+}) z białkiem jest tzw. palec cynkowy (Cys_2His_2) pełniący rolę czynnika regulującego ekspresję genów (rys. 2). Domena wiążąca DNA zbudowana jest z zestawu krótkich motywów peptydowych wiążących jony cynku (Zn^{2+}) poprzez dwie reszty cysteinowe i histydynowe. Genom ludzki koduje kilkaset białek zawierających motywy palców cynkowych.



Rys. 2. Diagram wstążkowy kompleksu białka ZIF268 z DNA, zawierającego trzy motywy palca cynkowego.



Rys. 3. Metalotioneina wiążąca jony cynku i innych metali ciężkich

Na zakończenie należy przypomnieć, że we krwi nie ma specyficznych przenośników białkowych jonów cynku (Zn^{2+}). Są one transportowane w połączeniu z albuminą osocza i magazynowane w komórkach w postaci metaloproteiny, zwanej metalotioneiną, która wiąże także jony miedzi i jony niektórych innych metali ciężkich (rys. 3). 

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 30 listopada 2015 r.

Polskie akty prawne

1. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 19 września 2013 r. w sprawie warunków wstępnego uznawania grup producentów owoców i warzyw, uznawania organizacji producentów owoców i warzyw oraz warunków i wymagań, jakie powinny spełniać plany dochodzenia do uznania (tekst jednolity) (Dz. U. 2015 r., poz. 1530).

Opublikowany został jednolity tekst Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie warunków wstępnego uznawania grup producentów owoców i warzyw, uznawania organizacji producentów owoców i warzyw oraz warunków i wymagań, jakie powinny spełniać plany dochodzenia do uznania.

2. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 19 października 2015 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie środków dopuszczonych do skażania alkoholu etylowego (Dz. U. 2015 r., poz. 1780).

W rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 25 czerwca 2008 r. w sprawie środków dopuszczonych do skażania alkoholu etylowego (Dz. U. z 2013 r., poz. 201) załącznik do rozporządzenia otrzymał nowe brzmienie.

Środki skażające określone w załączniku do rozporządzenia, o którym mowa mogą być stosowane jako środki skażające alkohol etylowy przez 6 miesięcy od dnia wejścia w życie niniejszego rozporządzenia.

3. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dn. 27 października 2015 r. w sprawie wzoru wniosku o wydanie zezwolenia na wprowadzenie do obrotu produktu GMO (Dz. U. 2015 r., poz. 1820).
W załączniku do rozporządzenia został podany wzór wniosku o wydanie zezwolenia na wprowadzenie do obrotu produktu GMO.

Unijne akty prawne

1. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2015/1833 z dn. 12 października 2015 r. zmieniające rozporządzenie (EWG) nr 2568/91 w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyciżczyny oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy (Dz. Urz. UE L, 2015 r. nr 266, s. 29).
Wprowadzona zmiana dotyczy m.in. metody wykrywania obecności obcych olejów roślinnych w oliwie z oliwek.
2. Rozporządzenie Komisji (UE) 2015/1933 z dn. 27 października 2015 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych we włóknach kakao, chipsach bananowych, suplementach diety, suszonych ziołach i suszonych przyprawach (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. Urz. UE L, 2015 r. nr 282, s. 11).
Zmienione zostały wartości najwyższych dopuszczalnych poziomów wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych we włóknach kakao, chipsach bananowych, suplementach diety, suszonych ziołach i suszonych przyprawach. Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia 1 kwietnia 2016 r. Środki spożywcze wymienione w załączniku do niniejszego rozporządzenia, które zostały w sposób zgodny z prawem wprowadzone do obrotu przed dniem 1 kwietnia 2016 r., mogą pozostawać w obrocie po tym dniu aż do upływu ich daty minimalnej trwałości lub terminu przydatności do spożycia. ☒

NOWE KSIĄŻKI

Foodborne Pathogens and Food Safety

[Patogeny w żywności i bezpieczeństwo żywności]

Bari M.L., Ukuku D.O.

Wydawnictwo: CRCPress 2015, stron 318, ISBN 9781498724081, cena 80,75 £

Zamówienia: www.crcpress.com

W książce podjęto zagadnienie patogenów w żywności. Zawarto w niej opinie specjalistów w dziedzinie mikrobiologii, naukowców zajmujących się żywnością oraz praktyków. Zapewnienie bezpieczeństwa żywności jest problemem w krajach rozwiniętych i rozwijających się. Patogeny obecne w żywności są zagrożeniem występującym w zapewnieniu zdrowia społeczeństw. W ostatnich latach wciąż obserwuje się rosnącą liczbę zatruc pokarmowych. Zagadnienie przeciwdziałania występowaniu patogenów w żywności powinno być uwzględnione na etapie projektowania produktu spożywczego, procesów przetwórczych, organizacji międzynarodowej wymiany handlowej. Scharakteryzowano takie zagadnienia, jak: mikroorganizmy w żywności – ich rozwój, przetrwanie w żywności; patogeny odporne na działanie leków; wpływ klimatu na rozwój zagrożeń bezpieczeństwa żywności; analiza i ocena ryzyka bezpieczeństwa żywności; status bezpieczeństwa żywności w ujęciu globalnym. Książka jest polecana dla osób interesujących się jakością i bezpieczeństwem żywności, mikrobiologów, technologów żywności oraz osób działających zawodowo w obszarze żywności.

Aware Food Choices: Bridging the Gap Between Consumer Knowledge About Nutritional Requirements and Nutritional Information

[Świadomy wybór żywności. Wypełniając lukę pomiędzy wiedzą konsumenta o wartości odżywczej a informacjami o wartości odżywczej]

Tarabella A., Burchi B.

Wydawnictwo Springer 2016, stron 112, ISBN 978-3-319-23856-2, cena 41.64 €

Zamówienia: www.springer.com

Autorki scharakteryzowały sposób rozumienia przez konsumenta informacji o wartości odżywczej umieszczonej na opakowaniu produktów spożywczych. Korzystając ze szczegółowego przeglądu literatury przedmiotu, można stwierdzić, że wiedza konsu-

mentów oraz rozumienie informacji o wartości odżywczej są bardzo niewielkie. Autorki dokonały również analizy zmian, jakie miały miejsce w sposobie znakowania produktów spożywczych w zakresie wartości odżywczej. Na podstawie przeprowadzonych badań określono główną konkluzję, że konsument najpierw musi zrozumieć informację o wartości odżywczej umieszczonej na opakowaniu produktów spożywczych, aby dokonywać świadomego wyboru „zdrowej” żywności. Dlatego ważne są wszelkie kampanie edukujące konsumentów w tym obszarze.

Książka polecana jest dla osób interesujących się zagadnieniami związanymi z żywnością, dietetyką, zachowaniami konsumentów na rynku.

Meat Quality: Genetic and Environmental Factors

[Jakość mięsa: uwarunkowania genetyczne i środowiskowe]

Przybylski W., Hopkins D.

Wydawnictwo: CRCPress 2015, stron 472, ISBN 9781482220315, cena 102,85 £

Zamówienia: www.crcpress.com

Poddano analizie czynniki wpływające na jakość mięsa – wołowiny, wieprzowiny oraz baraniny, biorąc pod uwagę wpływ sposobu chowu, gatunku, płci na jakość mięsa. Scharakteryzowano również nowoczesne sposoby produkcji mięsa i ich wpływ na jego jakość. Jakość mięsa ma duże znaczenie, ponieważ wśród konsumentów można zauważyć rosnące wymagania. Autorzy przygotowali tę książkę na podstawie ich wieloletniego doświadczenia badawczego i dydaktycznego, jak również krytycznego przeglądu literatury przedmiotu. Książka polecana jest dla studentów technologii żywności, towaroznawstwa, zoologii, naukowców i osób zawodowo zajmujących się żywnością.

Funkcjonowanie wybranych ogniw łańcucha żywnościowego w Polsce w kontekście rozwoju biogospodarki

Domańska K., Komor A., Krukowski A., Nowak A.

Wydawnictwo: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 2015, stron 150, ISBN 978-83-7259-237-8, cena 39,00 zł

Zamówienia: <http://wydawnictwo.up.lublin.pl>

Autorzy omówili regionalne zróżnicowanie potencjału i poziomu rozwoju rolnictwa, przemysłu spożywczego i handlu żywnością, czyli trzech sektorów będących podstawowymi ogniwami łańcucha żywnościowego. Podjęta tematyka łączy się z koncepcją rozwoju biogospodarki, ukierunkowaną na unowocześnianie gospodarki żywnościowej.

Książka jest polecana dla studentów kierunków związanych z żywnością oraz agrobiznesem.

Opracowała: Magdalena Niewczas-Dobrowolska

TWÓRCY POLSKIEJ NAUKI O ŻYWNOSCI

POLSCY UCZENI PO II WOJNIE ŚWIATOWEJ PROF. DR HAB. INŻ. ŁUCJA FORNAL (1939 – 2011)



Łucja Fornal (z domu Mzyk) urodziła się 22 października 1939 roku w Lublińcu. W 1962 roku ukończyła Wydział Mleczarski Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie. Pracę magisterską pt. „Wstępne badania nad inter- i transestryfikacją tłuszczów zwierzęcych” wykonała pod kierunkiem prof. dra Antoniego Rutkowskiego w Katedrze Technologii Żywności i Przechowywania. Po ukończeniu studiów, od 1 października 1962 roku rozpoczęła pracę na stanowisku asystenta w wyżej wymienionej Katedrze.

Pani Profesor związała 47 lat swojego życia zawodowego z olsztyńską Uczelnią – obecnie Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim) i z Wydziałem, którego była absolwentką – obecnie Wydziałem Nauki o Żywności).

Na podstawie dysertacji pt. „Zmiany oleju rzepakowego w procesie technologicznym a dokładność analizy zawartości tokoferoli przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej”, wykonanej pod kierunkiem prof. dra Antoniego Rutkowskiego, Łucja Fornal uzyskała w 1968 roku stopień doktora nauk technicznych. W 1979 roku, po przedstawieniu rozprawy habilitacyjnej pt. „Konserwacja wilgotnego ziarna pszenicy niskocząsteczkowymi kwasami organicznymi”, uzyskała stopień doktora habilitowanego nauk technicznych. W ramach stypendium FAO im. Andre Meyera, w okresie od 1 października 1979 roku do 29 listopada 1980 roku, doc. dr hab. inż. Łucja Fornal odbywała staż naukowy w Kenii (University of Nairobi), gdzie realizowała projekt badawczy pt. „Microclimate in grain storage structures”.

W 1987 roku Rada Państwa nadała Łucji Fornal tytuł profesora nadzwyczajnego nauk technicznych. Od 1992 roku do przejścia na emeryturę pracowała na stanowisku profesora zwyczajnego w Katedrze Technologii Produktów Roślinnych, a po przemia-

nowaniu – w Katedrze Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych. W okresie 25.09 – 25.10 1993 roku Pani Profesor przebywała jako *visiting professor* w Norwegii (Agricultural University of Norway in As), wykładając i udzielając konsultacji na temat zastosowania ekstruzji w przetwórstwie ziarna zbóż.

W początkowym okresie pracy w Uczelni Pani Profesor realizowała zadania badawcze w zespole prof. Antoniego Rutkowskiego, kierownika Katedry Technologii Żywności i Przechowalnictwa w latach 1960 - 1969. Dotyczyły one technologii otrzymywania tłuszczów, a szczególnie ich funkcji w kształtowaniu trwałości produktów żywnościowych, wykorzystania do celów jadalnych oleju rzepakowego (ówcześnie wysokoerukowego) oraz badań jego składników chemicznych.

W późniejszym okresie działalność naukowa Pani Profesor była związana z technologią przechowywania zbóż, chemią i przetwórstwem zbóż (ze szczególnym uwzględnieniem technologii ekstruzji surowców zbożowych) oraz oceną jakości technologicznej ziarna pszenicy i jęczmienia browarnego z wykorzystaniem cyfrowej analizy obrazu (DIA).

Prof. dr hab. inż. Łucja Fornal była inicjatorką wielu kierunków badawczych realizowanych nie tylko w macierzystej Uczelni, ale i w jednostkach pozauczelnianych. Na szczególne podkreślenie zasługuje zainicjowanie przez Panią Profesor kierunku badawczego dotyczącego toksycznych i alergizujących białek ziarna zbóż oraz nasion roślin strączkowych, realizowanego przez pięć zespołów UWM w Olsztynie oraz pięć zespołów innych krajowych ośrodków naukowych. W latach 2004 - 2008 prof. dr hab. inż. Łucja Fornal była koordynatorem merytorycznym i organizacyjnym projektu badawczego zamawianego pt. „Identyfikacja i sposoby przeciwdziałania toksyczności i alergienności nasion ważnych roślin uprawnych”, w ramach którego zorganizowała dwie konferencje: I Krajową Konferencję Naukową (2005 r.) i II Krajową Konferencję Naukowo-Szkoleniową (2007 r.) pt. „Alergeny i składniki powodujące nietolerancje pokarmowe występujące w surowcach roślinnych i żywności”. Koordynatorem instytucjonalnym wyżej wymienionego projektu był Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, a wynikiem jego zrealizowania było także uzyskanie dotacji finansowej na utworzenie w latach 2007 - 2008 Środowiskowego Laboratorium Badań Proteomicznych Żywności.

Na dorobek naukowy Prof. Łucji Fornal składa się 145 oryginalnych prac twórczych (w tym 19 z listy JCR) oraz liczne referaty i komunikaty wygłoszone lub prezentowane na konferencjach naukowych międzynarodowych i krajowych. Wyrazem uznania osiągnięć naukowych Pani Profesor było kilkakrotne zapraszanie Jej do wygłoszenia referatów plenarnych na Sesjach Naukowych Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN.

Wyróżniającym osiągnięciem Pani Profesor była także redakcja naukowa monografii pt. „Wybrane zagadnienia z zakresu alergenów nasion zbóż i roślin strączko-

wych”, wydanej w 2007 roku przez Wydawnictwo Naukowe PTTŻ w Krakowie, jak również współredakcja naukowa (razem z prof. dr hab. Jerzym Dziubą) pracy zbiorowej pt. „Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności”, wydanej w 2009 roku przez WNT w Warszawie.

Prof. dr hab. inż. Łucja Fornal pełniła liczne funkcje w macierzystej Uczelni, wśród których wymienić należy: funkcję członka Senatu oraz przewodniczącej Senackiej Komisji Nauki w latach 1987 - 1992, prodziekana ds. nauki Wydziału Technologii Żywności w latach 1990 - 1993, kierownika Katedry Technologii Produktów Roślinnych w latach 1989 - 1998, przewodniczącej Komisji Etyki w latach 2001 - 2007, a także pełnomocnika Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie ds. realizacji projektu *Eurequa „Former a la qualite: un enjeu european pour l'agriculture”*, w ramach programu *Leonardo da Vinci 2000* (lata 1999 - 2001). Panią Profesor wyróżniały także inne znaczące dokonania. W latach 1991 - 2002 była członkiem Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN. W latach 1991 - 1996 była przewodniczącą Sekcji Technologii Żywności KBN. W 1998 roku była przewodniczącą Komitetu Organizacyjnego XXIX Sesji Naukowej Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN w Olsztynie. W latach 1990 - 2000 wielokrotnie wygłaszała wykłady zamawiane przez Agencję Rynku Rolnego w Olsztynie. W latach 1994 - 2002 była przewodniczącą Rady Naukowej Zakładu Badawczego Przemysłu Piekarskiego (ZBPP) oraz przewodniczącą Rady Naukowej Centralnego Laboratorium Technologii Przetwórstwa i Przechowywania Zbóż (CLTPiPZ). Prof. dr hab. Łucja Fornal była również członkiem Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, Komitetu Nauk o Żywności PAN, członkiem Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie (2003 - 2007) oraz członkiem Rady Nauki przy Ministrze Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2004 - 2008).

Pani Prof. Łucja Fornal była cenionym nauczycielem akademickim o znaczących zasługach w kształceniu kadr. Pod Jej opieką zostało wykonanych kilkadziesiąt prac dyplomowych – magisterskich i inżynierskich. Była promotorem 5 prac doktorskich. Dwie osoby z Jej doktorantów uzyskały tytuł profesora. Była recenzentem kilkudziesięciu prac doktorskich, habilitacyjnych oraz postępowań o stopień doktora habilitowanego i tytuł profesora.

Za swoją działalność zawodową Pani Profesor została odznaczona Medalem Zasłużony dla Warmii i Mazur, Medalem Zasłużony dla Uczelni, Medalem Zasłużony Pracownik Rolnictwa, Złotym Krzyżem Zasługi, Medalem Komisji Edukacji Narodowej, Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski oraz Złotym Laurem UWM.

Profesor Łucja Fornal zmarła 3 listopada 2011 roku. Została pochowana na cmentarzu parafialnym w Sadowie koło Lublińca.

Katarzyna M. Majewska

JUBILEUSZ 85-LECIA URODZIN PROFESORA ZDZISŁAWA EDMUNDA SIKORSKIEGO



W czasopiśmie *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, [2011, 2 (75), 180-183] ukazał się obszerny biogram 80-letniego wówczas Profesora. Jubilat dożył w dobrej formie do drugiego jubileuszu – 85-lecia i nadal jest aktywny naukowo. W Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Uniwersytetu Gdańskiego pojawia się co najmniej raz w tygodniu. W miarę możliwości Profesor chętnie służy koleżankom pomocą i radą, także zdalnie, korzystając z łączności elektronicznej.

W opinii Profesora Sikorskiego, z perspektywy 85 lat życia i ponad 60 lat pracy zawodowej, najwyżej ceni On wsparcie, jakiego udzielił kilkunastu osobom w ich rozwoju naukowym oraz książki, które napisał i zredagował.

Z oczywistych względów, wynikających z wieku i statusu emeryta, Profesor nie prowadzi już projektów badawczych, ale dużo starań poświęca dalszemu rozwojowi serii monografii CRC pt. „Chemical and Functional Properties of Food Components”. Do bieżącego roku ukazało się 19 książek, przy dużym udziale polskich naukowców. Ostatnie dwa tomy to “Food Oxidants and Antioxidants”, “Chemical, Biological, and Functional Properties”, ed. Grzegorz Bartosz (2014) oraz “Meat Quality, Genetic and Environmental Factors”, eds. Wiesław Przybylski i David Hopkins (2015). Dwudziesty tom „Toxins and Other Harmful Compounds in Foods”, redagowany przez Agatę Witczak i Zdzisława Sikorskiego powinien się ukazać w roku 2016.

Publikacje Pana Profesora z ostatnich 5 lat:

- Sikorski Z.E., Kołakowski E.: Seafood quality issues. In: Environmental Effects on Seafood Availability, Safety, and Quality. Daczowska-Kozon E.G., Pan B.S. eds, CRC Press, Boca Raton, London, New York 2011, pp. 10-37.
- Kołakowska A., Sikorski Z.E.: Lipids and food quality, pp. 71-80; oraz Sikorski Z.E., Sinkiewicz I.: The role of lipids in meat, pp. 327-340. In: Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipids, Second Edition, Sikorski Z.E., Kołakowska A. eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2011.
- Sikorski Z.E.: Foreword. In: Dictionary of Food Compounds with CD-ROM, Second Edition, Yannai S. ed., CRC Press, Boca Raton, London, New York 2012, xi-xiv.
- Sinkiewicz I., Sikorski Z.E.: Skład i właściwości dymu wędzarniczego. W: Technologia wędzenia żywności. Red. Kołakowski E., PWR i L, Warszawa 2012, ss. 107-138.
- Sikorski Z.E., Sinkiewicz I.: Smoking: Traditional. In: Encyclopedia of Meat Sciences 2e, Volume 3, Devine C., Dickeman M. eds. in chief, Elsevier, Oxford 2014, pp. 321-327.
- Sikorski Z.E., Sinkiewicz I.: Principles of Smoking. In: Handbook of Fermented Meat and Poultry. Second Edition. Toldra F., Hui Y.H., Astiasarian I., Sebranek J.H., Talon R. eds., Wiley Blackwell, Oxford 2015, pp. 39-45.
- Sikorski Z.E.: Zakres i rola chemii żywności, ss. 1-8; oraz Białka, ss.171-240; W: Chemia żywności. Tom I. Red. Sikorski Z.E., Staroszczyk H., Wyd. WNT, Warszawa 2015.
- Sikorski Z.E.: Smoked Foods: Principles and Production. In: The Encyclopedia of Food and Health vol. 5, Caballero B., Finglas P., Toldrá F. eds., Academic Press, Oxford 2016, pp. 1-5.

Inna działalność Jubilata w tym okresie to opracowanie kilku recenzji prac doktorskich i rozpraw habilitacyjnych, 2 opinii dot. wniosków o tytuł naukowy, recenzji prac przeznaczonych do druku w różnych czasopismach naukowych oraz kilku okolicznościowych wykładów.

Profesor zachowuje możliwość pracy dzięki temu, że dba o zdrowie – prawidłowo się odżywia i codziennie odbywa dwugodzinne spacery nad Zatoką Gdańską.

Szanownemu Jubilatowi składamy najserdeczniejsze gratulacje, dziękując za ogromny wkład wniesiony w rozwój nauki o żywności oraz życzymy dużo zdrowia, pomyślności i dalszej naukowej aktywności.

Ilona Kołodziejska
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

TECHNOLOG ŻYWNOSCI

INFORMATOR POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI

Rok 25 Nr 6

grudzień 2015

DZIAŁALNOŚĆ TOWARZYSTWA

Zarząd Główny

W dniu 23 listopada 2015 r. w Poznaniu odbyło się zebranie ZG PTTŻ. Przyjęto sprawozdania z działalności ZG, Oddziałów i Sekcji w roku 2015 oraz przedstawiono plany działalności w 2016 r. Omówiono propozycje zmian w statucie Towarzystwa oraz nowe regulaminy. Omówiono najważniejsze kwestie związane ze zbliżającym się Walnym Zebraniem Delegatów PTTŻ, które odbędzie się 9 grudnia 2015 r. w Warszawie.

ZG PTTŻ przyjął rezygnację prof. Tadeusza Sikory z funkcji prezesa Oddziału Wydawnictwo Naukowe PTTŻ i z funkcji redaktora naczelnego dwumiesięcznika *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* z dniem 31 grudnia 2015 r.

ZG PTTŻ powołał prof. UR dr hab. Lesława Juszcza na funkcję prezesa Oddziału Wydawnictwo Naukowe PTTŻ i na funkcję redaktora naczelnego dwumiesięcznika *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* z dniem 1 stycznia 2016 r.

W związku z rezygnacją prof. dr Antoniego Rutkowskiego z funkcji przewodniczącego Rady Naukowej dwumiesięcznika *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* ZG podjął uchwałę o zakończeniu kadencji Rady Naukowej z dniem 31 grudnia 2015 r.

ZG powołał skład nowej Rady Naukowej dwumiesięcznika *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* na kadencję 1.01.2016 - 31.12.2018. Skład nowej RN będzie podany na stronie redakcyjnej czasopisma w nr 1(104)/2016. ZG dokonał także zmian w składzie redakcji.

Walne Zebranie Delegatów PTTŻ

W dniu 9 grudnia 2015 r. w Warszawie odbyło się Walne Zebranie Delegatów PTTŻ. Sprawozdanie z działalności merytorycznej i finansowej przedstawił prezes Towarzystwa prof. Edward Pospiech. Sprawozdanie Komisji Rewizyjnej przedstawił jej przewodniczący prof. Krzysztof Surówka, a w imieniu Sądu Koleżeńskiego informacje przedstawiła prof. Grażyna Krasnowska.

WZD udzieliło absolutorium ustępującemu zarządowi.

W wyniku przeprowadzonych wyborów prezesem Towarzystwa na kadencję 2016 - 2018 została prof. dr hab. Agnieszka Kita. Wybrano również nowy Zarząd Główny, Komisję Rewizyjną i Sąd Koleżeński.

WZD wybrało nowych Członków Honorowych Towarzystwa, którymi zostali: prof. Danuta Kołożyn-Krajewska, prof. Dorota Witrowa-Rajchert i prof. Zdzisław Targoński.

WZD przyjęło zmiany w statucie Towarzystwa.

Oddział Gdański

W dniu 3 listopada 2015 r. odbyło się Walne Zebranie Delegatów Oddziału Gdańskiego, podczas którego wybrano Zarząd Oddziału na kolejną kadencję. Skład zarządu jest następujący: prezes – prof. AM dr hab. inż. Aleksandra Wilczyńska, zastępca prezesa – prof. dr hab. Maria Śmiechowska, sekretarz – dr inż. Renata Korzeniowska-Ginter, skarbnik – dr Edyta Malinowska-Pańczyk, członek zarządu – dr Hanna Staroszczyk.

Oddział Lubelski

W dniu 3 listopada 2015 r. odbyło się Walne Zebranie Delegatów Oddziału Lubelskiego, podczas którego wybrano Zarząd Oddziału na kolejną kadencję. Skład zarządu jest następujący: prezes – dr hab. inż. Małgorzata Karwowska, zastępca prezesa – prof. dr hab. Joanna Barłowska, sekretarz – dr hab. inż. Paweł Glibowski, skarbnik – dr inż. Karolina Wójciak, członkowie zarządu – dr hab. inż. Dariusz Stasiak, dr Urszula Złotek.

Oddział Łódzki

W dniu 6 listopada 2015 r. odbyło się Walne Zebranie Delegatów Oddziału Łódzkiego, podczas którego wybrano Zarząd Oddziału na kolejną kadencję. Skład zarządu jest następujący: prezes – dr hab. inż. Joanna Leszczyńska, zastępca prezesa – dr inż. Elżbieta Polak, sekretarz – dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk, skarbnik – dr hab. inż. Wiesława Krysiak, członkowie zarządu – dr inż. Anna Diowks, dr inż. Joanna Rosicka-Kaczmarek.

Oddział Szczeciński

W dniu 25 listopada 2015 r. odbyło się Walne Zebranie Delegatów Oddziału Szczecińskiego, podczas którego wybrano Zarząd Oddziału na kolejną kadencję. Skład zarządu jest następujący: prezes – dr hab. Izabela Dmytrów, zastępca prezesa – dr inż. Arkadiusz Żych, sekretarz – dr inż. Agnieszka Strzelczak, skarbnik – dr inż. Anna Mituniewicz-Małek.

Oddział Warszawski

W dniu 29 września 2015 r. odbyło się Walne Zebranie Delegatów Oddziału Warszawskiego, podczas którego wybrano Zarząd Oddziału na kolejną kadencję. Skład zarządu jest następujący: prezes – dr hab. inż. Ewa Jakubczyk, zastępca prezesa – dr inż. Dorota Nowak, sekretarz – dr inż. Ewa Gondek, skarbnik – dr hab. inż. Dorota Pietrzak, członkowie zarządu – dr hab. Edyta Lipińska, prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska.

Oddział Wielkopolski

W dniu 25 października 2015 r. odbyło się Walne Zebranie Delegatów Oddziału Wielkopolskiego, podczas którego wybrano Zarząd Oddziału na kolejną kadencję. Skład zarządu jest następujący: prezes – dr hab. Dorota Piasecka-Kwiatkowska, zastępca prezesa – dr hab. Hanna Baranowska, sekretarz – dr inż. Mirosława Krzywdzińska-Bartkowiak, skarbnik – dr inż. Michał Piątek, członkowie zarządu – prof. dr hab. Grażyna Lewandowicz, prof. dr hab. Marian Remiszewski, dr inż. Agnieszka Makowska.

Oddział Wrocławski

W dniu 10 listopada 2015 r. odbyło się Walne Zebranie Delegatów Oddziału Wrocławskiego, podczas którego wybrano Zarząd Oddziału na kolejną kadencję. Skład zarządu jest następujący: prezes – prof. UP dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska, zastępca prezesa – prof. UE dr hab. inż. Małgorzata Krzywonos, sekretarz – dr inż. Radosław Spychaj, skarbnik – dr inż. Małgorzata Korzeniowska, członkowie zarządu – prof. dr hab. inż. Agnieszka Kita, dr inż. Elżbieta Gąsiorek, dr inż. Piotr Juszczyk.

WAŻNIEJSZE MIĘDZYKRAJOWE I KRAJOWE
KONFERENCJE NAUKOWE W 2016 r.

Luty

- 5 **POZNAŃ = II Wielkopolska Konferencja – Nauka Gospodarce Żywnościowej, nt. „25 lat technologii żywności w warunkach gospodarki rynkowej“**
Organizatorzy: Oddział Wielkopolski PTTŻ, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
Kontakt: konferencja.sekretariat@gmail.com

Marzec

- 11 - 12 **WROCLAW = 1st International Scientific Conference „Man – health – food“**
Organizatorzy: Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Katedra Anatomii Prawidłowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
Informacje: www.up.wroc.pl/konferencje

Kwiecień

- 7 - 8 **PIEŠŤANY, Słowacja = XIII Scientific Conference with International Participation “Food Safety and Control”**
Informacje: www.bezpecnostpotravin.sk
Kontakt: Jozef.Golian@uniag.sk

Wrzesień

- 12 - 16 WARNA, Bułgaria = 20th IGWT Symposium "Commodity science in a changing world".
Informacje: <http://igwt2016.ue-varna.bg/>
- 18 - 20 **WARSZAWA = XXVI Zjazd Katedr Marketingu, Handlu i Konsumpcji nt. „Współczesne paradygmaty w marketingu, handlu i konsumpcji”**
Organizatorzy: Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji i Wydział Nauk Ekonomicznych, SGGW w Warszawie
Informacje: <http://zjazd2016.sggw.pl>
Kontakt: zjazd2016@sggw.pl
- 22 - 23 **KRAKÓW = XII Konferencja Naukowa z cyklu „Żywność XXI wieku“, nt. „Żywność a innowacje“**
Organizatorzy: Oddział Małopolski PTTŻ, Wydział Technologii Żywności UR w Krakowie
Informacje: <http://www.ptzm.org>
Kontakt: zywnoscxxi@ptzm.org

Październik / Listopad

- 30 - 1 AMSTERDAM, Holandia = The 1st Food Chemistry Conference "Shaping the Future of Food Quality, Health and Safety"
Informacje: <http://www.foodchemistryconference.com/>

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY POLSKIEGO TOWARZYSTWA
TECHNOLOGÓW ŻYWNOCI

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 6 (103)/2015 Biuletynu podano według stanu informacji do 15 grudnia 2015 r. Materiały do Nr 1 (104)/2016 prosimy nadsyłać do 1 lutego 2016 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>

SPIS TREŚCI
CZASOPISMA „ŻYWNOSĆ”
NR 98–103

Wykaz opublikowanych materiałów

Nr 98

Od Redakcji	3
<i>Ewa Majewska</i> : Ciecze jonowe w procesach ekstrakcji metali i związków organicznych z produktów spożywczych.....	5
<i>Jagoda Majcherczyk, Krzysztof Surówka</i> : Heterocykliczne aminy aromatyczne jako zagrożenie chemiczne w produktach mięsnych poddawanych obróbce termicznej	16
<i>Barbara Sionek, Wiesław Przybylski</i> : Wpływ czynników środowiskowych na poziom glikogenu w mięśniach zwierząt rzeźnych	35
<i>Kinga Kropiwniec, Marek Babicz, Ewa Skrzypczak</i> : Charakterystyka fizykochemiczna podrobów wieprzowych uzyskanych z tuczników o zróżnicowanym genotypie <i>RYR1</i>	49
<i>Dorota Kowalska, Andrzej Gugolek, Paweł Kobylarz</i> : Wpływ metody pakowania i przechowywania na właściwości fizykochemiczne mięsa królików żywionych mieszankami paszowymi wzbogaconymi olejem rybnym i witaminą E.....	58
<i>Piotr Skalecki, Mariusz Florek, Agnieszka Staszowska, Agnieszka Kaliniak</i> : Wartość użytkowa i jakość filetów ryb karpiovatych (<i>Cyprinidae</i>) utrzymywanych w polikulturze	75
<i>Justyna Żulewska, Aleksandra Morawska</i> : Właściwości pianotwórcze koncentratów białek serwatkowych o zmniejszonej zawartości tłuszczu	89
<i>Marzanna Hęś, Danuta Górecka, Krzysztof Dziedzic, Joanna Kobus-Cisowska, Józef Korczak</i> : Właściwości przeciwutleniające ekstraktów z ziarniaków gryki i produktów otrzymanych w procesie ich przerobu	102
<i>Bożena Kiczorowska, Dariusz Andrejko, Anna Winiarska-Mieczan, Wioletta Samolińska, Elżbieta Prystupa-Rusinek</i> : Wpływ procesów termicznych na zmiany podstawowego składu chemicznego ziarna pszenicy	116
<i>Rafał Ziobro, Dorota Litwinek, Barbara Mickowska</i> : Porównanie składu chemicznego i właściwości teksturalnych muffin z mieszanki bezglutenowej i mąk owsianych	131
<i>Aneta Ociczek, Jolanta Schur</i> : Ocena wpływu wybranych dodatków na właściwości sorpcyjne miękkiszu pieczywa pszennego	143
<i>Agnieszka Zawiślak, Magdalena Michalczyk</i> : Właściwości przeciwutleniające niskoprzetworzonych płatków róży pomarszczonej (<i>Rosa rugosa</i>).....	155
<i>Grażyna Gozdecka, Joanna Kaniewska, Marek Domoradzki, Katarzyna Jędryczka</i> : Ocena zawartości wybranych składników bioaktywnych w przetworach z borówki czernicy	170
<i>Ewa Piątkowska, Aneta Kopeć, Teresa Leszczyńska</i> : Podstawowy skład chemiczny, zawartość mikro-	

i makroelementów oraz właściwości przeciwutleniające liści różnych odmian czosnku polskiego pochodzenia	181
<i>Adrian Wiater, Roman Paduch, Katarzyna Próchniak, Małgorzata Pleszczyńska, Marek Siwulski, Wojciech Białas, Janusz Szczodrak</i> : Ocena aktywności biologicznej karboksymetylowanych pochodnych α -(1 \rightarrow 3)-glukanów wyizolowanych z owocników uprawnych gatunków bocznika (<i>Pleurotus</i>).....	193
<i>Mariola Friedrich, Grażyna Podlaszewska</i> : Ocena wpływu uzupełniania paszy wybranymi składnikami mineralnymi na ich metabolizm i dystrybucję w organizmie – badania modelowe.....	207
<i>Bartosz Fotschki, Adam Jurgoński, Jerzy Juśkiewicz, Zenon Zduńczyk</i> : Wpływ dodatku oleju z nasion jabłka do diety na metabolizm szczurów	220
<i>Henryk Kostyra, Elżbieta Kostyra</i> : Interakcje składników żywności	232
<i>Grażyna Morkis</i> : Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	235
<i>Magdalena Niewczas</i> : Nowe książki	238
Twórcy polskiej nauki o żywności	240
Technolog Żywności	246

Nr 99

Od Redakcji.....	3
<i>Anna Berthold-Pluta, Antoni Pluta, Michał Olkowski, Anna Ostrowska</i> : <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> – występowanie w mleku surowym i w produktach mlecznych.....	5
<i>Ewelina Siepka, Łukasz Bobak, Witold Gladkowski</i> : Charakterystyka aktywności biologicznej fosfolipidów żółtka	15
<i>Agnieszka Kaliniak, Mariusz Florek, Piotr Skalecki</i> : Profil kwasów tłuszczowych mięsa, ikry i wątroby ryb	29
<i>Piotr Karpiński, Marta Łątkowska, Bartosz Kruszewski, Paula Kuźma, Mieczysław W. Obiedziński</i> : Profil związków lotnych europejskich szynek surowo dojrzewających jako wskaźnik ich jakości i autentyczności	47
<i>Małgorzata Wroniak, Agnieszka Rękas, Ilona Piekarniak</i> : Wpływ rodzaju opakowania i warunków przechowywania na wybrane cechy jakości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno.....	62
<i>Karol Mińkowski, Artur Kalinowski, Anna Krupska</i> : Wpływ płatkowania nasion i niskotemperaturowej hydrotermicznej obróbki płatków na parametry procesu tłoczenia i cechy jakościowe oleju lnianego	79
<i>Magdalena Wirkowska-Wojdyła, Joanna Bryś, Agata Górska, Ewa Ostrowska-Ligęza</i> : Wpływ przeestryfikowania enzymatycznego na wartość żywnościową tłuszczu zastosowanego do wypieku ciastek dla dzieci.....	91
<i>Justyna Cybulska, Joanna Mierczyńska, Piotr Pieczywek, Mateusz Stasiak, Artur Zdunek</i> : Wpływ jonów metali dwuwartościowych na właściwości reologiczne matrycy polisacharydowej z wytloków jabłkowych.....	103
<i>Krzysztof Marszałek, Łukasz Woźniak, Sylwia Skąpska</i> : Wpływ ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym na wybrane wyróżniki jakości utrwalanego soku truskawkowego	114
<i>Artur Wiktor, Matthias Schulz, Erik Voigt, Dietrich Knorr, Dorota Witrowa-Rajchert</i> : Wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego na kinetykę zamrażania immersyjnego, rozmrażania oraz właściwości mechaniczne marchwi.....	124
<i>Aleksandra Fijałkowska, Małgorzata Nowacka, Dorota Witrowa-Rajchert</i> : Wpływ fal ultradźwiękowych na przebieg suszenia i wybrane właściwości tkanki buraka ćwikłowego	138
<i>Katarzyna Kotarska, Wojciech Dziemianowicz</i> : Wpływ różnych warunków fermentacji alkoholowej melasy na jej intensyfikację i jakość otrzymanego spirytusu	150
<i>Magdalena Matysiak, Katarzyna Gawel-Bęben, Kamila Rybczyńska, Jan Gmiński, Stanisław Surma</i> : Porównanie wybranych właściwości biologicznych czosnku (<i>Allium sativum</i> L.) pochodzącego z Polski i Chin.....	160
<i>Anna Trusek-Hołownia</i> : Aktywność i stabilność katalazy immobilizowanej w kapsułkach alginianowych w aplikacjach przemysłowych.....	170
<i>Urszula Balon, Joanna Dziadkowiec, Tadeusz Sikora</i> : Rzetelność narzędzia FRL (Food Related Lifestyles) w polskim środowisku kulturowym	182
<i>Małgorzata Wiśniewska, Anna Zamojska</i> : Ocena kultury bezpieczeństwa żywności na przykładzie dwóch zakładów	197
<i>Joanna Trafiałek, Ewa Czarniecka-Skubina, Danuta Kolożyn-Krajewska, Bartłomiej Palubicki, Kamila Makuszczyńska</i> : Higiena w zakładach gastronomicznych wytwarzających żywność w obecności konsumenta	208

<i>Henryk Kostyra, Elżbieta Kostyra</i> : Interakcje składników żywności	222
<i>Grażyna Morkis</i> : Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	225
<i>Magdalena Niewczas</i> : Nowe książki	228
Twórcy polskiej nauki o żywności	230
Technolog Żywności.....	235

Nr 100

Od Redakcji	3
<i>Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Magdalena Szejka, Anna Pawlak, Halina M. Żbikowska</i> : Właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego i jego pochodnych.....	5
<i>Anna Berthold-Pluta, Antoni Pluta, Michał Olkowski, Anna Ostrowska</i> : Ciepłooporność <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>	18
<i>Małgorzata Darewicz, Justyna Borawska, Piotr Minkiewicz, Anna Iwaniak, Piotr Starowicz</i> : Biologicznie aktywne peptydy uwalniane z białek żywności.....	26
<i>Anna Rzepkowska, Dorota Zielińska, Danuta Kolożyn-Krajewska</i> : Przeżywalność szczepów <i>Lactobacillus</i> wyizolowanych z żywności w warunkach modelowego przewodu pokarmowego.....	42
<i>Magdalena A. Olszewska, Aleksandra Kocot, Monika Gryn, Lucja Laniewska-Trokenheim</i> : Odpowiedź komórek <i>Lactobacillus brevis</i> na stres osmotyczny zbadana metodą cytometrii przepływowej.....	53
<i>Małgorzata Jalościńska</i> : Przeżywalność szczepu <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 w probiotycznym i synbiotycznym bananowo-mlecznym napoju fermentowanym podczas przechowywania	64
<i>Anna Grygier, Małgorzata Majcher, Kamila Mysza</i> : Analysis of the ability to form 2-phenylethyl alcohol by <i>Galactomyces geotrichum</i> MK017.....	74
<i>Elżbieta Hać-Szymańczuk, Aneta Cegielka</i> : Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwutleniającej szalwii lekarskiej w produkcie mięsnym	84
<i>Anna Mieczkowska, Dariusz Kokoszyński, Rafał Wasilewski, Zenon Bernacki</i> : Skład tuszki i jakość mięsa bażantów zwyczajnych (<i>Phasianus colchicus colchicus</i>) w zależności od płci ptaków	95
<i>Agnieszka Rękas, Katarzyna Wiśniewska, Małgorzata Wroniak</i> : Wpływ ogrzewania mikrofalowego nasion rzepaku na wydajność i jakość wyciśniętego oleju.....	107
<i>Karolina Siucińska, Barbara Dyki, Aleksandra Murgrabia, Piotr M. Pieczywek, Dorota Konopacka</i> : Ocena zmian struktury suszonej tkanki wiśni poddanej wstępnie obróbce osmotycznej wspomaganej ultradźwiękami.....	123
<i>Maciej Bilek, Kinga Stawarczyk, Łukasz Luczaj, Ewa Cieślak</i> : Zawartość wybranych składników mineralnych i anionów nieorganicznych w sokach drzewnych z terenu Podkarpacia	138
<i>Dorota Bonarska-Kujawa, Sylwia Cyboran, Jan Oszmiański, Halina Kleszczyńska</i> : Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów polifenolowych z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny w odniesieniu do błony erytrocytów	148
<i>Zuzanna Małyszczek, Agnieszka Makowska, Jędrzej Smentek, Piotr Kubiak, Joanna Le Thanh-Blicharz, Grażyna Lewandowicz</i> : Ocena czynników decydujących o prawidłowości pomiaru właściwości reologicznych skrobi modyfikowanych	160
<i>Anna Pęksa, Elżbieta Rytel, Agnieszka Tajner-Czopek, Agnieszka Kita, Honorata Danilcenko, Elyra Jarenie, Adam Figiel, Krzysztof Lech, Joanna Miedzianka, Wioletta Drożdż</i> : Wpływ surowca i parametrów procesu na cechy sensoryczne i fizyczne ekstrudowanych przekąsek	176
<i>Agata Górską, Ewa Ostrowska-Ligęza, Karolina Szulc, Magdalena Wirkowska-Wojdyła, Joanna Bryś</i> : Wpływ dodatku układu laktoza – maltodekstryna na właściwości termiczne i funkcjonalne kompleksów β -laktoglobuliny z palmitynianem retinolu	190
<i>Agnieszka I. Baruk, Sebastian Białoskurski</i> : Wybrane determinanty wizerunku produktu spożywczego	203
<i>Henryk Kostyra, Elżbieta Kostyra</i> : Interakcje składników żywności	215
<i>Grażyna Morkis</i> : Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	218
<i>Magdalena Niewczas</i> : Nowe książki	223
Twórcy polskiej nauki o żywności	225
<i>Monika Przeor i Maciej Kluz</i> : XX Krajowa Konferencja Młodej Kadry Naukowej	228
Technolog Żywności	231

Nr 101

Od Redakcji	3
<i>Dorota Kowalska, Eliza Gruczyńska, Małgorzata Kowalska, Mariola Kozłowska, Bolesław Kowalski:</i> Chloropropanole, chloropropanodiole i ich estry w żywności	5
<i>Hubert Antolak, Dorota Kręgiel:</i> Bakterie kwasu octowego – taksonomia, ekologia oraz wykorzystanie przemysłowe	21
<i>Alina Adamiak, Alina Górska, Barbara Mróz:</i> Bakterie psychrotrofowe w mleku surowym i jego przetworach	36
<i>Krzysztof Siemianowski, Elżbieta Tońska, Jerzy Szpendowski:</i> Zawartość wybranych makroelementów i mikroelementów w kazeinie kwasowej i kazeinianach	49
<i>Ewa Gornowicz, Tomasz Szwaczkowski, Marian Pietrzak, Magdalena Graczyk:</i> Wpływ masy tuszki na barwę mięsa kaczek typu pekin	60
<i>Małgorzata Natonek-Wisniewska, Piotr Krzyścin:</i> Opracowanie prostych i skutecznych testów Real-time PCR do identyfikacji komponentów bydłęcych, wieprzowych i owczych w żywności	73
<i>Karolina M. Wójciak, Katarzyna Neffe-Skocińska, Eugeniusz Grela, Zbigniew J. Dolatowski:</i> Zastosowanie mięsa wieprzowego pochodzącego z tuczników skarmianych mieszkanką paszową z dodatkiem preparatu białkowo-ksantofilowego z lucerny do produkcji potencjalnie probiotycznej kielbasy dojrzewającej	85
<i>Anna Sadowska, Franciszek Świdorski, Rita Rakowska, Eliza Kostyra, Anna Piotrowska:</i> Przydatność metody ilościowej analizy opisowej (QDA) i analizy składowych głównych (PCA) na przykładzie oceny sensorycznej grillowanych steków wołowych	99
<i>Justyna E. Bojarska, Katarzyna M. Majewska, Ryszard Zadernowski:</i> Tekstura owoców wybranych odmian truskawek	113
<i>Barbara Sionek, Danuta Kolożyn-Krajewska, Danuta Jaworska, Małgorzata Błażejczyk:</i> Zastosowanie bakterii kwasu mlekowego do produkcji probiotycznego soku warzywnego	125
<i>Alena Ticha, Anna M. Salejda, Radomir Hyšpler, Ales Matejíček, Frantisek Paprstein, Zdenek Zadak:</i> Skład cukrów w jabłkach różnych odmian i ich wpływ na cechy sensoryczne	137
<i>Maciej Bilek, Agnieszka Siembida, Kinga Stawarczyk, Ewa Cieślak:</i> Aktywność przeciwrodnikowa soków drzewnych z terenu Podkarpacia	151
<i>Beata Król, Anna Kiełyka-Dadasiewicz:</i> Wpływ metody suszenia na cechy sensoryczne oraz skład olejku eterycznego tymianku właściwego (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	162
<i>Robert Witkiewicz, Elżbieta Pisulewska, Teresa Leszczyńska, Ewa Piątkowska, Agnieszka Kidacka:</i> Podstawowy skład chemiczny oraz aktywność przeciwrodnikowa ziela wybranych genotypów owsa siewnego (<i>Avena sativa</i>)	176
<i>Justyna Kiewlicz, Henryk Szymusiak, Ryszard Zieliński:</i> Otrzymywanie, stabilność termiczna i właściwości przeciwutleniające długolańcuchowych estrów kwasu ferulowego	188
<i>Henryk Kostyra, Elżbieta Kostyra:</i> Interakcje składników żywności	201
<i>Grażyna Morkis:</i> Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym	205
<i>Magdalena Niewczas:</i> Nowe książki	210
XXV Lat Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności	212
XLII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN	218
Twórcy polskiej nauki o żywności	222
Technolog Żywności	225

Nr 102

<i>Piotr Minkiewicz, Małgorzata Darewicz, Anna Iwaniak, Justyna Borawska, Justyna Bucholska, Monika Hrynkiewicz:</i> Biologicznie aktywne peptydy pochodzące z białek żywności: Badania <i>in silico</i> , <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> , aspekty aplikacyjne oraz ocena bezpieczeństwa	5
<i>Krzysztof Siemianowski, Jerzy Szpendowski:</i> Metody włączania białek serwatkowych w technologii niedojrzewających kwasowych serów twarogowych	23
<i>Krystyna Pappelbaum, Jerzy Kasprzak, Katarzyna Czaczyk:</i> Występowanie	

werotoksycznych <i>Escherichia coli</i> w żywności, ze szczególnym uwzględnieniem serotypu O104:H4.....	33
<i>Izabela Dmytrów</i> : Wpływ probiotycznych bakterii kwasu mlekowego na stabilność przechowalniczą kwasowych serów twarogowych	49
<i>Katarzyna Skrzypczak, Waldemar Gustaw, Adam Waško</i> : Wybrane właściwości technologiczne i probiotyczne szczepów z gatunku <i>Lactobacillus helveticus</i>	61
<i>Genowefa Bonczar, Krzysztof Maciejowski, Jacek Domagała, Dorota Najgebauer-Lejko, Marek Sady, Maria Walczycka, Monika Wszolek</i> : Wpływ pasteryzacji i homogenizacji mleka na zawartość cholesterolu w miękkich serach podpuszczkowych typu bundz.....	73
<i>Anna Kamińska-Dwórznička, Katarzyna Samborska, Katarzyna Rybak</i> : Wpływ hydrolizatów kappa karagenu na ograniczenie nadmiernego wzrostu kryształów lodu w lodach mlecznych	87
<i>Wiesław Przybylski, Magdalena Sot, Elżbieta Olczak, Kinga Boruszewska</i> : Wpływ stężenia glukozy i triacylogliceroli w surowicy krwi na jakość tuszy i mięsa tuczników	99
<i>Piotr Janiszewski, Eugenia Grześkowiak, Karolina Szule, Karol Borzuta, Dariusz Lisiak</i> : Wpływ krzyżowania towarowego świń rasy złotnickiej pstrej ze świnią rasy Duroc i Wbp na jakość wybranych przetworów mięsnych	109
<i>Marta Chmiel, Krzysztof Dasiewicz, Mirosław Słowiński</i> : Wpływ rodzaju zastosowanych preparatów fosforanowych na jakość kielbas homogenizowanych	121
<i>Dominika Tolik, Mirosław Słowiński, Katarzyna Desperak</i> : Wpływ zastosowania drobiowego mięsa oddzielonego mechanicznie oraz mięsa odścięgniętego na jakość pasztetów sterylizowanych	132
<i>Dorota Kucharczak, Łukasz Masewicz, Joanna Le Thanh-Blicharz, Hanna M. Baranowska</i> : Właściwości molekularne wody hydratacyjnej w żelach acetylowanej skrobi ziemniaczanej	142
<i>Aldona Sobota, Zbigniew Rzedzicki, Piotr Zarzycki, Anna Wirkijowska, Emilia Sykut-Domańska</i> : Zmiany zawartości tłuszczu wolnego w czasie procesu produkcji makaronu jajecznego	152
<i>Radosław Dembczyński, Wojciech Białas, Anna Olejnik, Przemysław Kowalczewski, Agnieszka Drożdżyńska, Tomasz Jankowski</i> : Pozyskiwanie antocyjanów z owoców aronii, czarnego bzu, czarnej porzeczki i korzenia czarnej marchwi metodą ekstrakcji	165
<i>Elżbieta Wszelaczyńska, Jarosław Pobereżny, Anna J. Keutgen, Małgorzata Szczepanek, Natalia Idaszewska, Julian Brewka</i> : Zmiany jakościowe przetworów z marchwi w zależności od dolistnego nawożenia roślin magnezem oraz wybranych procesów technologicznych	182
<i>Anna Prusak, Magdalena Szumilo-Kulczycka, Tadeusz Sikora</i> : Żywność genetycznie zmodyfikowana (żywność GM) – analiza publikacji w <i>Gazecie Wyborczej</i> w latach 1995 ÷ 2012	198
<i>Henryk Kostyra, Elżbieta Kostyra</i> : Interakcje składników żywności	213
<i>Grażyna Morkis</i> : Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i innym	217
<i>Magdalena Niewczas</i> : Nowe książki	221
<i>Zbigniew Duda</i> : „Chemia Żywności” – Recenzja podręcznika	223
Twórcy polskiej nauki o żywności	226
Technolog Żywności	230

Nr 103

Od Redakcji	5
<i>Maciej Taczanowski</i> : definicje legalne prawa żywnościowego – przyczyny tworzenia i formy	7
<i>Natalia Skiepmo, Iwona Chwastowska-Siwiecka, Jacek Kondratowicz</i> : Właściwości likopenu i jego wykorzystanie do produkcji żywności funkcjonalnej.....	20
<i>Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Anna Stochmal</i> : Klowamid i jego pochodne jako bioaktywne roślinne związki fenolowe	33
<i>Radosław Dembczyński, Wojciech Białas, Anna Olejnik, Przemysław Kowalczewski, Agnieszka Drożdżyńska, Tomasz Jankowski</i> : Separacja antocyjanów z owoców aronii, czarnego bzu, czarnej porzeczki i korzenia czarnej marchwi za pomocą chromatografii preparatywnej	41
<i>Maciej Bilek, Kinga Stawarczyk, Agnieszka Siembida, Maciej Strzemski, Marcin Olszewski, Ewa Cieślak</i> : Zawartość cukrów w sokach drzewnych z terenu Podkarpacia	53

<i>Hanna M. Baranowska, Marek Sikora, Magdalena Krystyjan, Piotr Tomasiak, Anna Dobosz, Edyta M. Kutyla-Kupidura</i> : Zastosowanie metody NMR do analizy wiązania wody w kleikach skrobiowych.....	64
<i>Adam P. Kuczyński, Bohdan Achremowicz, Czesław Puchalski</i> : Porównanie lepkości pozornej kleików otrzymanych z błyskawicznych płatków zbożowych.....	75
<i>Anna Szosland-Fałtyń, Beata Bartodziejska, Joanna Królasik, Beata Paziak-Domańska</i> : Zastosowanie przyjaznych dla środowiska technik dezynfekcji do inaktywacji <i>Campylobacter</i> sp. w mięsie drobiowym ..	87
<i>Bożena Stodolak, Anna Starzyńska- Janiszewska, Agnieszka Wikiera</i> : Wpływ dodatku wytlóków lnianych na potencjał antyoksydacyjny tempe z nasion lędźzianu	96
<i>Zygmunt Litwińczuk, Alicja Matwijczuk, Aneta Brodziak</i> : Wartość energetyczna, właściwości fizyczne i przydatność technologiczna mleka krów rasy polskiej czerwonej, białogrzbiętej i simentalskiej utrzymywanych w systemie niskonakładowym	106
<i>Genowefa Bonczar, Krzysztof Maciejowski, Jacek Domagała, Dorota Najgebauer-Lejko, Marek Sady, Maria Walczycka, Monika Wszolek</i> : Wpływ probiotycznych kultur starterowych na zawartość cholesterolu w mlecznych napojach fermentowanych	118
<i>Waldemar Gustaw, Justyna Koziół, Adam Waśko, Katarzyna Skrzypczak, Monika Michalak-Majewska, Maciej Nastaj</i> : Właściwości fizykochemiczne i przeżywalność <i>Lactobacillus casei</i> w mlecznych napojach fermentowanych otrzymanych z dodatkiem wybranych preparatów białek mleka.....	129
<i>Anna Mituniewicz-Malek, Małgorzata Ziarno, Izabela Dmytrów</i> : Zastosowanie zamrażalniczo utrwalonego mleka koziego do wyrobu potencjalnie probiotycznego napoju fermentowanego	140
<i>Monika Garbowska, Ilona Stefańska, Marlena Młynek</i> : Aktywność peptydaz wybranych szczepów <i>Lactobacillus</i> poddanych obróbce termicznej	150
<i>Henryk Kostyra, Elżbieta Kostyra</i> : Interakcje składników żywności	165
<i>Grażyna Morkis</i> : Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	169
<i>Magdalena Niewczas</i> : Nowe książki	171
Twórcy polskiej nauki o żywności.....	173
<i>Ilona Kołodziejaska</i> : Jubileusz 85-lecia urodzin Profesora Zdzisława Edmunda Sikorskiego	176
Technolog Żywności	178
Spis treści czasopisma „Żywność” Nr 98–103	182
Wykaz nazwisk Autorów w 2015 roku.....	188
Wykaz nazwisk Recenzentów w 2015 roku	192

WYKAZ NAZWISK AUTORÓW W 2015 ROKU

- Achremowicz B.* 103/75
Adamiak A. 101/36
Andrejko D. 98/116
Antolak H. 101/21
Babicz M. 98/49
Balon U. 99/182
Baranowska H.M. 102/142, 103/64
Bartodziejska B. 103/87
Baruk A.I. 100/203
Bernacki Z. 100/95
Berthold-Pluta A. 99/5, 100/18
Białas W. 98/193, 102/165, 103/41
Białoskurski S. 100/203
Bilek M. 100/138, 101/151, 103/53
Błażejczyk M. 101/125
Bobak Ł. 99/15
Bojarska J.E. 101/113
Bonarska-Kujawa D. 100/148
Bonczar G. 102/73, 103/118
Borawska J. 100/26, 102/5
Boruszewska K. 102/99
Borzuta K. 102/109
Brewka J. 102/182
Brodziak A. 103/106
Bryś J. 99/91, 100/190
Bucholska J. 102/5
Cegielka A. 100/84
Chmiel M. 102/121
Chwastowska-Siwiecka I. 103/20
Cieślik E. 100/138, 101/151, 103/53
Cyboran S. 100/148
Cybulska J. 99/103
Czaczyk K. 102/33
Czarniecka-Skubina E. 99/208
Danilcenko H. 100/176
Darewicz M. 100/26, 102/5
Dasiewicz K. 102/121
Dembczyński R. 102/165, 103/41
Desperak K. 102/132
Dmytrów I. 102/49, 103/140
Dobosz A. 103/64
Dolatowski Z.J. 101/85
Domagała J. 102/73, 103/118
Domoradzki M. 98/170
Drożdż W. 100/176
Drożdżyńska A. 102/165, 103/41
Duda Z. 102/223
Dyki B. 100/123
Dziadkowiec J. 99/182
Dziedzic K. 98/102
Dziemianowicz W. 99/150
Figiel A. 100/176
Fijałkowska A. 99/138
Florek M. 98/75, 99/29
Fotschki B. 98/220
Friedrich M. 98/207
Garbowska M. 103/150
Gawel-Bęben K. 99/160
Gładkowski W. 99/15
Gmiński J. 99/160
Gornowicz E. 101/60
Gozdecka G. 98/170
Górecka D. 98/102
Górska A. 99/91, 100/190, 101/36
Graczyk M. 101/60
Grela E. 101/85
Gruczyńska E. 101/5
Grygier A. 100/74
Gryn M. 100/53
Grześkowiak E. 102/109
Gugolek A. 98/58
Gustaw W. 102/61, 103/129
Hać-Szymańczuk E. 100/84
Hęś M. 98/102
Hrynkiewicz M. 102/5
Hyšpler R. 101/137

- Idaszewska N.* 102/182
Iwaniak A. 100/26, 102/5
Jalosińska M. 100/64
Janiszewski P. 102/109
Jankowski T. 102/165, 103/41
Jarenie E. 100/176
Jaworska D. 101/125
Jędryczka K. 98/170
Jurgoński A. 98/220
Juśkiewicz J. 98/220
Kaliniak A. 98/75, 99/29
Kalinowski A. 99/79
Kamińska-Dwórznička A. 102/87
Kaniewska J. 98/170
Karpiński P. 99/47
Kasprzak J. 102/33
Keutgen A.J. 102/182
Kiczorowska B. 98/116
Kidačka A. 101/176
Kieltyka-Dadasiewicz A. 101/162
Kiewlicz J. 101/188
Kita A. 100/176
Kleszczyńska H. 100/148
Kluz M. 100/228
Knorr D. 99/124
Kobus-Cisowska J. 98/102
Kobylarz P. 98/58
Kocot A. 100/53
Kokoszyński D. 100/95
Kołodziejczyk-Czepas J. 100/5, 103/33
Kołodziejka I. 103/176
Kołożyn-Krajewska D. 99/208, 100/42, 101/125
Kondratowicz J. 103/20
Konopačka D. 100/123
Kopeć A. 98/181
Korczak J. 98/102
Kostyra E. 98/232, 99/222, 100/215, 101/201, 101/99, 102/213, 103/165
Kostyra H. 98/232, 99/222, 100/215, 101/201, 102/213, 103/165
Kotarska K. 99/150
Kowalczewski P. 102/165, 103/41
Kowalska D. 98/58, 101/5
Kowalska M. 101/5
Kowalski B. 101/5
Kozioł J. 103/129
Kozłowska M. 101/5
Kręgiel D. 101/21
Kropiwić K. 98/49
Król B. 101/162
Królasik J. 103/87
Krupska A. 99/79
Kruszewski B. 99/47
Krystyan M. 103/64
Krzyścin P. 101/73
Kubiak P. 100/160
Kucharczak D. 102/142
Kuczyński A.P. 103/75
Kutyla-Kupidura E.M. 103/64
Kuźma P. 99/47
Le Thanh-Blicharz J. 100/160, 102/142
Lech K. 100/176
Leszczyńska T. 98/181, 101/176
Lewandowicz G. 100/160
Lisiak D. 102/109
Litwinek D. 98/131
Litwińczuk Z. 103/106
Łaniewska-Trokenheim Ł. 100/53
Łątkowska M. 99/47
Łuczaj Ł. 100/138
Maciejowski K. 102/73, 103/118
Majcher M. 100/74
Majcherczyk J. 98/16
Majewska E. 98/5
Majewska K.M. 101/113, 103/173
Makowska A. 100/160
Makuszevska K. 99/208
Małysek Z. 100/160
Marszałek K. 99/114
Masewicz Ł. 102/142
Matejcek A. 101/137
Matwiczuk A. 103/106
Matysiak M. 99/160
Michalak-Majewska M. 103/129
Michalczyk M. 98/155
Mickowska B. 98/131
Mieczkowska A. 100/95
Miedzianka J. 100/176

- Mierczyńska J. 99/103
Minkiewicz P. 100/26, 102/5
Mińkowski K. 99/79
Mituniewicz-Malek A. 103/140
Młynek M. 103/150
Morawska A. 98/89
Morkis G. 98/235, 99/225, 100/218, 101/205,
102/217, 103/169
Mróz B. 101/36
Murgrabia A. 100/123
Myszka K. 100/74
Najgebauer-Lejko D. 102/73, 103/118
Nastaj M. 103/129
Natonek-Wiśniewska M. 101/73
Neffe-Skocińska K. 101/85
Niewczas M. 98/238, 99/228, 100/223, 101/210,
102/221, 103/171
Nowacka M. 99/138
Obiedziński M.W. 99/47
Ocieczek A. 98/143
Olczak E. 102/99
Olejnik A. 102/165, 103/41
Olkowski M. 99/5, 100/18
Olszewska M.A. 100/53
Olszewski M. 103/53
Ostrowska A. 99/5, 100/18
Ostrowska-Ligeza E. 99/91, 100/190
Oszmiański J. 100/148
Paduch R. 98/193
Pałubicki B. 99/208
Pappelbaum K. 102/33
Papstein F. 101/137
Pawlak A. 100/5
Paziak-Domańska B. 103/87
Pęksa A. 100/176
Piątkowska E. 98/181, 101/176
Pieczywek P. 99/103, 100/123
Piekarniak I. 99/62
Pietrzak M. 101/60
Piotrowska A. 101/99
Pisulewska E. 101/176
Pleszczyńska M. 98/193
Pluta A. 99/5, 100/18
Pobereźny J. 102/182
Podlaszewska G. 98/207
Próchniak K. 98/193
Prusak A. 102/198
Prystupa-Rusinek E. 98/116
Przeor M. 100/228
Przybylski W. 98/35, 102/99
Puchalski Cz. 103/75
Rakowska R. 101/99
Rękas A. 99/62, 100/107
Rybak K. 102/87
Rybczyńska K. 99/160
Rytel E. 100/176
Rzedzicki Z. 102/152
Rzepkowska A. 100/42
Sadowska A. 101/99
Sady M. 102/73, 103/118
Salejda A.M. 101/137
Samborska K. 102/87
Samolińska W. 98/116
Schulz M. 99/124
Schur J. 98/143
Siembida A. 101/151, 103/53
Siemianowski K. 101/49, 102/23
Sieпка E. 99/15
Sikora M. 103/64
Sikora T. 99/182, 102/198
Sionek B. 98/35, 101/125
Siucińska K. 100/123
Siwulski M. 98/193
Skalecki P. 98/75, 99/29
Skąpska S. 99/114
Skiepkó N. 103/20
Skrzypczak E. 98/49
Skrzypczak K. 102/61, 103/129
Słowiński M. 102/121, 102/132
Smentek J. 100/160
Sobota A. 102/152
Sot M. 102/99
Starowicz P. 100/26
Starzyńska-Janiszewska A. 103/96
Stasiak M. 99/103
Staszowska A. 98/75
Stawarczyk K. 100/138, 101/151, 103/53
Stefańska I. 103/150

- Stochmal A.* 103/33
Stodolak B. 103/96
Strzemiński M. 103/53
Surma S. 99/160
Surówka K. 98/16
Sykut-Domańska E. 102/152
Szczepanek M. 102/182
Szczodrak J. 98/193
Szejka M. 100/5
Szosland-Fałtyń A. 103/87
Szpendowski J. 101/49, 102/23
Szulc K. 100/190, 102/109
Szumilo-Kulczycka M. 102/198
Szwaczkowski T. 101/60
Szymusiak H. 101/188
Świdorski F. 101/99
Taczanowski M. 103/7
Tajner-Czopek A. 100/176
Ticha A. 101/137
Tolik D. 102/132
Tomasik P. 103/64
Tońska E. 101/49
Trafiałek J. 99/208
Trusek-Hołownia A. 99/170
Voigt E. 99/124
Walczycza M. 102/73, 103/118
Wasilewski R. 100/95
Waśko A. 102/61, 103/129
Wiater A. 98/193
Wikiera A. 103/96
Wiktor A. 99/124
Winiarska-Mieczan A. 98/116
Wirkijowska A. 102/152
Wirkowska-Wojdyła M. 99/91, 100/190
Wiśniewska K. 100/107
Wiśniewska M. 99/197
Witkiewicz R. 101/176
Witrowa-Rajchert D. 99/124, 99/138
Woźniak Ł. 99/114
Wójciak K.M. 101/85
Wroniak M. 99/62, 100/107
Wszelaczyńska E. 102/182
Wszolek M. 102/73, 103/118
Zadak Z. 101/137
Zadernowski R. 101/113
Zamojska A. 99/197
Zarzycki P. 102/152
Zawiślak A. 98/155
Zdunek A. 99/103
Zduńczyk Z. 98/220
Ziarno M. 103/140
Zielińska D. 100/42
Zieliński R. 101/188
Ziobro R. 98/131
Żbikowska H.M. 100/5
Żulewska J. 98/89

WYKAZ NAZWISK RECENZENTÓW W 2015 ROKU

Redakcja czasopisma „Żywność” przekazuje wyrazy wdzięczności P.T. Recenzentom za opiniotwórczą i społeczną pracę na rzecz naszego czasopisma. Dziękujemy Państwu za wspieranie naszych wysiłków nad doskonaleniem poziomu naukowego publikowanych prac.

1. Prof. dr hab. Ewa Babicz-Zielińska, Akademia Morska w Gdyni
2. Prof. dr hab. Barbara Baraniak, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
3. Prof. dr hab. Joanna Barłowska, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
4. Prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
5. Prof. dr hab. Paweł Bielański, Instytut Zootechniki – PIB w Krakowie
6. Prof. dr hab. Genowefa Bonczar, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
7. Prof. dr hab. Eulalia J. Borowska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
8. Prof. dr hab. Karol Borzuta, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Poznaniu
9. Prof. dr hab. Anna Brzozowska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
10. Dr hab. Krzysztof Buksa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
11. Prof. dr hab. Alicja Ceglińska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
12. Prof. dr hab. Józefa Chrzanowska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
13. Prof. dr hab. Marek Cierach, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
14. Prof. dr hab. Ewa Cieślik, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
15. Prof. dr hab. Katarzyna Czaczyk, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
16. Prof. dr hab. Janusz Czapski, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
17. Dr hab. Ewa Czarniecka-Skubina, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
18. Prof. dr hab. Eugenia Czernyszewicz, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
19. Dr hab. Anna Czubaszek, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
20. Prof. dr hab. Małgorzata Darewicz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
21. Dr hab. inż. Krzysztof Dasiewicz, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
22. Prof. dr hab. Tomasz Daszkiewicz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
23. Dr hab. inż. Anna Diowksza, Politechnika Łódzka w Łodzi
24. Dr inż. Przemysław Dmowski, Akademia Morska w Gdyni
25. Prof. dr hab. Zbigniew Dobrzański, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
26. Prof. dr hab. Zbigniew J. Dolatowski, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
27. Prof. dr hab. Jacek Domagała, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
28. Prof. dr hab. Dariusz Dziki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

29. Prof. dr hab. Ewa Flaczyk, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
30. Dr hab. inż. Mariusz Florek, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
31. Prof. dr hab. Mariola Friedrich, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
32. Prof. dr hab. Halina Gambuś, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
33. Dr hab. Urszula Gawlik-Dziki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
34. Prof. dr hab. Jan Gawęcki, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
35. Prof. dr hab. Piotr Gębczyński, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
36. Prof. dr hab. Danuta Górecka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
37. Prof. dr hab. Eugenia Grześkowiak, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Poznaniu
38. Prof. dr hab. Krystyna Gutkowska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
39. Prof. dr hab. Tadeusz Haber, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
40. Dr hab. inż. Monika Janowicz, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
41. Prof. dr hab. Małgorzata Jasińska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
42. Prof. dr hab. Henryk Jeleń, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
43. Prof. dr hab. Jan Jeszka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
44. Prof. dr hab. Marzena Jeżewska-Zychowicz, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
45. Dr inż. Stanisław Kalisz, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
46. Dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
47. Dr hab. Alicja Kawka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
48. Prof. dr hab. Agnieszka Kita, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
49. Dr hab. Elżbieta Klewicka, Politechnika Łódzka
50. Prof. dr hab. Maria Koćwin-Podsiadła, UHP w Siedlcach
51. Prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
52. Prof. dr hab. Jacek Kondratowicz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
53. Prof. dr hab. Wiesław Kopeć, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
54. Prof. dr hab. Józef Korczak, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
55. Dr hab. inż. Jarosław Korus, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
56. Dr hab. Iwona Kowalczyk, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
57. Prof. dr hab. Dorota Kowalska, Instytut Zootechniki – PIB w Krakowie
58. Dr hab. inż. Jolanta Król, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
59. Prof. dr hab. Kazimierz Lachowicz, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
60. Prof. dr hab. Andrzej Lenart, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

61. Prof. dr hab. Tomasz Lesiów, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
62. Dr hab. inż. Grzegorz Leśnierowski, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
63. Prof. dr hab. Teresa Leszczyńska, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
64. Prof. dr hab. Grażyna Lewandowicz, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
65. Prof. dr hab. Zdzisława Libudzisz, Politechnika Łódzka w Łodzi
66. Prof. dr hab. Zofia Lisiewska, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
67. Prof. dr hab. Anna Litwińczuk, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
68. Prof. dr hab. Ryszard Macura, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
69. Prof. dr hab. Jan Michniewicz, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
70. Prof. dr hab. Marta Mitek, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
71. Dr hab. inż. Agnieszka Nawirska-Olszańska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
72. Prof. dr hab. Roman Niedziółka, Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy w Siedlcach
73. Prof. dr hab. Małgorzata Nogala-Kałużka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
74. Prof. dr hab. Jacek Nowak, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
75. Prof. dr hab. Anna Nowotna, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
76. Prof. dr hab. Mieczysław Obiedziński, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
77. Prof. dr hab. Wiktor Obuchowski, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
78. Prof. dr hab. Jan Oszmiański, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
79. Prof. dr hab. Helena Panfil-Kuncewicz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
80. Prof. dr hab. Anna Pęksa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
81. Dr hab. inż. Sławomir Pietrzyk, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
82. Prof. dr hab. Andrzej Pisula, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
83. Prof. dr hab. Antoni Pluta, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
84. Prof. dr hab. Edward Pospiech, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
85. Prof. dr hab. Wiesław Przybylski, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
86. Prof. dr hab. Daniela Rotkiewicz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
87. Dr hab. inż. Magdalena Rudzińska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
88. Prof. dr hab. Jarosława Rutkowska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
89. Prof. dr hab. Małgorzata Schlegel-Zawadzka, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
90. Prof. dr hab. Marek Sikora, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
91. Prof. dr hab. Tadeusz Sikora, Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie
92. Prof. dr hab. Marek Siwulski, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
93. Dr hab. Piotr Skąlecki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

94. Dr Sylwia Skąpska, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie
95. Prof. dr hab. Stefan Smoczyński, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
96. Dr hab. Małgorzata Sobczak, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
97. Prof. dr hab. Bogusław Staniewski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
98. Prof. dr hab. Izabela Steinka, Akademia Morska w Gdyni
99. Prof. dr hab. Krzysztof Surówka, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
100. Prof. dr hab. Krzysztof Szkucik, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
101. Prof. dr hab. Tadeusz Szymańko, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
102. Prof. dr hab. Dariusz Szwejgier, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
103. Prof. dr hab. Jerzy Szpendowski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
104. Prof. dr hab. Barbara Szteke, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie
105. Prof. dr hab. Maria Śmiechowska, Akademia Morska w Gdyni
106. Dr hab. Anna S. Tarczyńska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
107. Prof. dr hab. Zdzisław Targoński, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
108. Prof. dr hab. Tomasz Twardowski, Politechnika Łódzka w Łodzi
109. Prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
110. Prof. dr hab. Roman Urban, IERiGŻ PIB w Warszawie
111. Prof. dr hab. Zygmunt Usydus, Morski Instytut Rybacki w Gdyni
112. Dr hab. Artur Wiater, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
113. Prof. dr hab. Danuta Witkowska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
114. Prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
115. Prof. dr hab. Maria Wojtatowicz, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
116. Prof. dr hab. Janina Wołoszyn, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
117. Dr hab. inż. Małgorzata Wroniak, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
118. Prof. dr hab. Monika Wszolek, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
119. Prof. dr hab. Lidia Zander, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
120. Prof. dr hab. inż. Małgorzata Ziarno, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
121. Prof. dr hab. Henryk Zieliński, IRZiBŻ, Oddział Nauki o Żywności, PAN w Olsztynie
122. Prof. dr hab. Tomasz Ziemba, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
123. Prof. dr hab. Zofia Żakowska, Politechnika Łódzka w Łodzi
124. Dr hab. Anna Żbikowska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**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 Tel.: 61 848 73 47; e-mail: dorotapk@up.poznan.pl
Dr hab. inż. Aleksandra Wilczyńska, prof. AM Oddział Gdański	AM, ul. Morska 81-87, 81-225 GDYNIA Tel.: 58 690 15 62; e-mail: a.wilczynska@wpit.am.gdynia.pl
Dr hab. inż. Małgorzata Karwowska Oddział Lubelski	UP, ul. Skromna 8, 20-704 LUBLIN Tel.: 81 462 33 41; e-mail: pttz@up.lublin.pl
Dr hab. inż. Joanna Leszczyńska Oddział Łódzki	PŁ, 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 hab. Izabela Dmytrów Oddział Szczeciński	ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 3, 71-550 SZCZECIN Tel.: 91 449 65 00 e-mail: izabela.dmytrow@gmail.com
Dr hab. inż. Ewa Jakubczyk Oddział Warszawski	SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA Tel.: 22 593 75 63; e-mail: ewa_jakubczyk@sggw.pl
Dr hab. Dorota Piasecka-Kwiatkowska Oddział Wielkopolski	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: 61 848 73 47; e-mail: dorotapk@up.poznan.pl
Dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska Oddział Wrocławski	UP, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCLAW Tel.: 71 320 77 64; e-mail: pttz_ow@wnoz.up.wroc.pl
SEKCJE	
Dr Karol Krajewski Ekonomiczna	Politechnika Koszalińska, ul. Kwiatkowskiego 6e, 75-343 KOSZALIN Tel.: 609 807 618; e-mail: janjasienczyk@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 WROCLAW Tel.: 71 320 77 68; e-mail: antoni.golachowski@up.wroc.pl
Prof. dr hab. Piotr Gębczyński Chemii i 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