



ŻYWNOŚĆ

Nauka Technologia Jakość

FOOD

Science Technology Quality

Nr 4 (125)

Kraków 2020

Rok 27

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Lesław Juszczyk; e-mail: rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl; tel. 12 662-47-78
Zastępca redaktora naczelnego: dr hab. inż. Mariusz Witczak, prof. UR
Sekretarz redakcji (kontakt z autorami): mgr inż. Jadwiga Ślawska; e-mail: redakcja@pttz.org; tel. 12 662-48-30; 609-800-458

Redaktorzy tematyczni: prof. dr hab. Grażyna Jaworska (żywność pochodzenia roślinnego), prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska (mikrobiologia, bezpieczeństwo i higiena żywności), prof. dr hab. Krzysztof Krygier (technologia tłuszczów, żywność funkcjonalna), prof. dr hab. Irena Ozimek (zachowania konsumentów na rynku żywności), prof. dr hab. Edward Pospiech (nauka o mięsie), dr hab. Anna S. Tarczyńska (mleczarstwo, zarządzanie jakością)

Redaktor językowy (język polski): dr hab. Anna Piechnik

Native speaker: Stanley Holt (Bolton, UK)

Redaktor statystyczny: dr hab. Mariusz Witczak

Stali współpracownicy: dr Grażyna Morkis (Kraków)

Rada Naukowa: prof. dr hab. Tadeusz Sikora (przewodniczący), prof. dr hab. Barbara Baraniak, prof. dr Henryk Daun (USA), prof. dr hab. Teresa Fortuna, prof. dr hab. Mariola Friedrich, prof. dr Jozef Golian (Słowacja), prof. dr hab. Anna Gramza-Michałowska, prof. dr hab. Waldemar Gustaw, prof. dr Jerzy Jankun (USA), prof. dr hab. Henryk Jeleń, prof. dr Miroslava Kačániová (Słowacja), prof. dr hab. Agnieszka Kita, prof. dr Józef Korolczuk (Francja), prof. dr hab. Andrzej Lenart, prof. dr hab. Zdzisława Libudzisz, prof. dr hab. Katarzyna Majewska, prof. dr hab. Jan Oszmiański, prof. dr hab. Mariusz Piskuła, prof. dr Jan Pokorný (Czechy), prof. dr Roman Przybylski (Kanada), prof. dr hab. Piotr Przybyłowski, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, dr Andrzej Sośnicki (USA), prof. dr hab. Krzysztof Surówka, prof. dr hab. Tadeusz Trziszka, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz, prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, dr John Wojciak (Kanada).

WYDAWCA: POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994-1999 wydawcą czasopisma był Oddział Małopolski PTTŻ

© *Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2020*
Printed in Poland

e-ISSN 2451-0777 ISSN 2451-0769

Czasopismo w postaci elektronicznej jest wersją główną (pierwotną)

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

Projekt okładki: Jolanta Czarnecka

Zdjęcie na okładce: mikelaptev-Fotolia.com

SKŁAD I DRUK:



Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków

Tel. 608 024 572

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

ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 4 (125)

Kraków 2020

Rok 27

SPIS TREŚCI

| | |
|--|------------|
| Od Redakcji | 3 |
| MAGDALENA MIKUS, SABINA GALUS: Powlekanie żywności – materiały, metody i zastosowanie w przemyśle spożywczym | 5 |
| MAŁGORZATA ROBAK, KLAUDIA SZCZEPAŃSKA, MAGDALENA RAKICKA-PUSTUŁKA, MAŁGORZATA SEROWIK, ADAM FIGIEL: Biosynteza i suszenie rozpyłowe inwertazy z drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i> | 25 |
| KATARZYNA MODRZEJEWSKA, ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS: Porównanie wybranych parametrów mikrobiologicznych i biochemicznych napojów kombucha | 39 |
| KATARZYNA KOTARSKA, WOJCIECH DZIEMIANOWICZ, ANNA ŚWIERCZYŃSKA: Identyfikacja chemicznych zanieczyszczeń etanolu uzyskanego z ziarna różnych odmian kukurydzy | 52 |
| MARTYNA WOŹNIAK, PAWEŁ SIUDEM, KATARZYNA PARADOWSKA: Właściwości przeciwutleniające oraz zawartość kapsaicynoidów w wybranych przyprawach z dodatkiem ostrej papryki, dostępnych na polskim rynku | 64 |
| KAROLINA DOBA, MARTA CIEŚLAK, WOJCIECH ZMUDZIŃSKI: Ocena zawartości wybranych makro- i mikroelementów w miodach komercyjnych oraz w miodach pochodzących bezpośrednio z pasieki | 78 |
| MAGDALENA PALACZ: Zastosowanie spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (TXRF) do oznaczania zawartości krzemu w materiale roślinnym | 90 |
| IZA BAJERLEIN, PATRYK BIELECKI: Określenie profilu kwasów tłuszczowych w wyciągach uzyskanych za pomocą ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym z liści pokrzywy zwyczajnej (<i>Urtica dioica</i> L.) | 103 |
| EGLI C. GEORGIADOU, GEORGE A. MANGANARIS, VASILEIOS FOTOPOULOS: Zróżnicowane znaczenie witaminy E, jej występowanie oraz funkcje regulacyjne w różnych tkankach roślinnych .. | 113 |
| MACIEJ J. RYBICKI: Kokcydiostatyki w leczeniu kokcydiozy | 127 |
| GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym | 138 |
| Setna rocznica urodzin prof. dr dr h.c. mult. Antoniego Rutkowskiego | 141 |
| Technolog Żywności | 150 |
| Spis treści czasopisma „Żywność” Nr 122 - 125 | 154 |
| Wykaz nazwisk Autorów w 2020 roku | 158 |
| Wykaz nazwisk Recenzentów w 2020 roku | 160 |

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) – quarterly

No 4 (125)

Kraków 2020

Vol. 27

CONTENTS

| | |
|--|------------|
| From the Editor | 3 |
| MAGDALENA MIKUS, SABINA GALUS: Food coating – materials, methods and applications in food industry | 5 |
| MAŁGORZATA ROBAK, KLAUDIA SZCZEPAŃSKA, MAGDALENA RAKICKA-PUSTUŁKA, MAŁGORZATA SEROWIK, ADAM FIGIEL: Biosynthesis and spray-drying of invertase from <i>Yarrowia lipolytica</i> | 25 |
| KATARZYNA MODRZEJEWSKA, ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS: Comparison of selected microbiological and biochemical parameters of kombucha drinks | 39 |
| KATARZYNA KOTARSKA, WOJCIECH DZIEMIANOWICZ, ANNA ŚWIERCZYŃSKA: Identification of chemical impurities in ethanol produced from grain of various maize varieties | 52 |
| MARTYNA WOŹNIAK, PAWEŁ SIUDEM, KATARZYNA PARADOWSKA: Antioxidant properties and the content of capsaicinoids in selected spices with the addition of hot chilli pepper (<i>Capsicum</i> sp.) available on Polish market | 64 |
| KAROLINA DOBA, MARTA CIEŚLAK, WOJCIECH ZMUDZIŃSKI: Assessing content of selected macro- and microelements in commercial honeys and in honeys derived directly from apiary | 78 |
| MAGDALENA PALACZ: Application of total reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRF) in determining content of silicon in plant material | 90 |
| IZA BAJERLEIN, PATRYK BIELECKI: Determination of the profile of fatty acids in extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction from stinging nettle leaves (<i>Urtica dioica</i> L.) | 103 |
| EGLI C. GEORGIADOU, GEORGE A. MANGANARIS, VASILEIOS FOTOPOULOS: The diverse roles of vitamin E, its occurrence and regulation in different plant tissues | 113 |
| MACIEJ J. RYBICKI: Coccidiostats in treating coccidiosis | 127 |
| GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish and EU legislation | 138 |
| 100 th anniversary of the birth of Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Antoni Rutkowski..... | 141 |
| The Food Technologist..... | 150 |
| Annual contents..... | 154 |
| Index of Authors | 158 |
| Index of Reviewers..... | 160 |

Only reviewed papers are published

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

OD REDAKCJI

Szanowni Czytelnicy,

przekazujemy Państwu nr 4 (125) czasopisma *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, w którym publikujemy artykuły naukowe o zróżnicowanej tematyce z zakresu nauk o żywności i żywieniu. Na końcu zeszytu zamieściliśmy spis artykułów opublikowanych w roku 2020 oraz wykazy Autorów i Recenzentów.

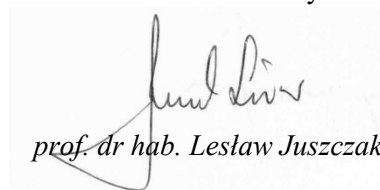
W Technologi Żywności podajemy informacje o wybranych konferencjach współorganizowanych przez PTTŻ. Prosimy jednak o sprawdzanie aktualnych informacji na stronach odpowiednich konferencji lub kontakt z organizatorami, gdyż sytuacja pandemiczna wymusza niekiedy zmiany terminów bądź sposobów odbywania konferencji.

W ramach zapewniania otwartego dostępu do publikacji z czasopisma *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* na stronie internetowej Wydawnictwa (<http://wydawnictwo.pttz.org>) w archiwum wydań dostępne są dla Czytelników wszystkie artykuły z lat 1994 - 2020. Do Państwa dyspozycji jest także wyszukiwarka umożliwiająca odszukiwanie interesujących artykułów według różnych kryteriów. Program udostępniania artykułów prowadziliśmy od roku 2016, a jego realizacja była możliwa dzięki corocznemu finansowemu wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego środkami przeznaczonymi na działalność upowszechniającą naukę. Lata 2019 - 2020 były ostatnimi, w których mogliśmy korzystać z tego wsparcia.

Życzymy Państwu zdrowia i wielu sukcesów w roku 2021.

Kraków, grudzień 2020 r.

Redaktor Naczelny



prof. dr hab. Lesław Juszcak

KOMUNIKAT

W latach 2019 – 2020 Wydawnictwo Naukowe PTTŻ realizuje zadanie z zakresu upowszechniania publikacji naukowych, które ukazały się na łamach czasopisma Żywność. Nauka. Technologia. Jakość:

„Digitalizacja publikacji naukowych wydanych w czasopiśmie Żywność. Nauka. Technologia. Jakość w latach 2019-2020 w celu zapewnienia otwartego dostępu do nich przez sieć Internet”.



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Zadanie finansowane jest w ramach umowy nr 900/P-DUN/2019 ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na działalność upowszechniającą naukę.

MAGDALENA MIKUS, SABINA GALUS

POWLEKANIE ŻYWNOSCI – MATERIAŁY, METODY I ZASTOSOWANIE W PRZEMYSŁE SPOŻYWCZYM

Streszczenie

Powlekanie żywności stosowane jest w celu przedłużenia okresu przydatności do spożycia wielu nietrwałych, łatwo psujących się surowców i produktów spożywczych. Powłoki jadalne mogą zapobiegać zmianom barwy, tekstury, rozwojowi niepożądanych mikroorganizmów oraz utracie witamin bądź składników mineralnych. Powinny minimalizować niekorzystny wpływ działania promieniowania słonecznego oraz wilgoci. Tym samym powłoki i filmy jadalne mogą przyczyniać się do podwyższenia jakości i bezpieczeństwa żywności. Rozwój opakowań jadalnych może stanowić korzystną, a z czasem konieczną alternatywę dla opakowań syntetycznych, m.in. ze względów ekonomicznych oraz zdrowotnych. Coraz częstsze stosowanie biodegradowalnych powłok jadalnych w wielu branżach przemysłu spożywczego ma na celu ograniczenie zarówno liczby opakowań jednostkowych, jak i zwiększającej się ilości odpadów zanieczyszczających środowisko. W powlekanii żywności nadal poszukiwane są rozwiązania pozwalające na uzyskanie powłok o zakładanych właściwościach użytkowych. Wprowadzanie substancji przeciwdrobnoustrojowych lub nanomateriałów może wpływać na zwiększanie zakresu stosowania powłok jadalnych oraz decydować o akceptacji takich produktów przez konsumentów. Obecnie prowadzone są intensywne badania naukowe w kierunku opracowania efektywnych metod wytwarzania powłok i folii jadalnych oraz modyfikacji ich właściwości funkcjonalnych. W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę materiałów dotychczas stosowanych, jak również nowych – o właściwościach powłokotwórczych. Scharakteryzowano metody ich wytwarzania i zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Słowa kluczowe: powlekanie żywności, powłoki jadalne, folie jadalne, jakość żywności

Wprowadzenie

Nieustający wzrost wymagań konsumentów w stosunku do wprowadzanej na rynek żywności powoduje ciągle doskonalenie produktów spożywczych przez producentów [26]. W ostatnim czasie coraz większe zainteresowanie producentów żywności oraz konsumentów wzbudza powlekanie żywności, a jadalne folie i powłoki umożli-

Mgr inż. M. Mikus, dr inż. S. Galus, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Instytut Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa. Kontakt: sabina_galus@sggw.edu.pl

wiają wydłużanie okresu przydatności do spożycia wielu produktów spożywczych. Powlekanie żywności jest technologią, w której stosuje się powłoki ochronne z odnawialnych, biodegradowalnych i jadalnych składników, dlatego oczekuje się, że wpłyną na zmniejszenie zanieczyszczenia środowiska, nawet przy założeniu, że nie zostaną ponownie użyte. Coraz częściej materiałami stosowanymi do otrzymywania powłok jadalnych są pozostałości przemysłu spożywczego [6].

Powłokę jadalną stanowi cienka warstwa materiału, który zostaje nałożony bezpośrednio na powierzchnię produktu spożywczego. Funkcjonalność powłok zależy głównie od materiałów powłokotwórczych oraz warunków, w jakich powstają. Składa się na to m.in. zastosowany rozpuszczalnik, pH, temperatura, a także stężenie stosowanych składników [60]. Filmy jadalne to ukształtowane cienkie warstwy materiału poza produktem spożywczym, które nadają się do spożycia i są stosowane na produkty bądź umieszczane pomiędzy nimi. Zastosowanie powłok jadalnych na produktach żywnościowych pozwala na zmniejszanie występowania na nich uszkodzeń mechanicznych, oddziaływań fizycznych, chemicznych i mikrobiologicznych. Prowadzone badania naukowe mają na celu wytworzenie materiałów biodegradowalnych i ograniczenie zużycia opakowań wytwarzanych z materiałów syntetycznych [22].

Główną funkcją powłok jadalnych jest selektywna barierowość wobec pary wodnej, tlenu, dwutlenku węgla, substancji aromatycznych oraz olejów. Powłoki jadalne umieszczane na produkcie przez jego zanurzenie lub poprzez spryskiwanie roztworem powlekającym mogą wpływać na podwyższanie jakości, np. owoców. Istotna jest również możliwość modyfikowania atmosfery, np. występującej wokół owocu, co może mieć wpływ na poprawę ogólnego wyglądu zewnętrznego powlekanego produktu. Odpowiedni dobór powłoki umożliwi również ograniczenie aktywności oksydazy polifenolowej, wpływającej na brązowienie i odbarwianie się owoców [39].

Zastosowanie powłok jadalnych jest dość tanią metodą stosowaną zazwyczaj jako dodatkowa operacja w procesie produkcyjnym, pozwalająca na utrzymanie jakości oraz świeżości produktów. Powłoki jadalne zwiększają również atrakcyjność produktu, np. poprzez jego nablyszczanie, lecz nie powinny wpływać na zmianę smaku powleczanego produktu. Zapewni to tym samym oczekiwaną akceptowalność sensoryczną [45]. Produkty spożywcze, które są podatne na reakcje utleniania i enzymatyczne brązowienie w trakcie przechowywania, mogą charakteryzować się widocznymi wadami, takimi jak zmiana barwy lub utrata wilgoci. Zastosowanie powłok umożliwia ograniczenie występowania tych zmian, jak również wpływa na poprawienie atrakcyjności wizualnej produktów. Powłoki jadalne umożliwiają utrzymanie odpowiedniej tekstury produktów spożywczych dzięki zastosowaniu dodatków, takich jak jony wapnia. Utrata wilgoci produktu przyczynia się do występowania strat ekonomicznych, dlatego jako jeden ze składników powłok stosuje się nierozpuszczalne lub słabo rozpuszczalne substancje wpływające na zmniejszanie ich przepuszczalności [5].

Biodegradowalne powłoki jadalne są stosowane również do ochrony produktów żywnościowych przed niekorzystną działalnością drobnoustrojów, a także stanowią ochronę produktu przed uszkodzeniami mechanicznymi, fizycznymi i chemicznymi. Mogą również stanowić nośnik substancji dodatkowych, np. przeciwdrobnoustrojowych, przeciwutleniających, zapobiegających brązowieniu, wpływających tym samym na zachowanie odpowiedniej jakości i bezpieczeństwa żywności. Powłoki jadalne oprócz pełnienia funkcji barierowych zwiększających stabilność żywności, mogą również w pożądanym sposób oddziaływać z powlekanymi produktami żywnościowymi i otaczającym je środowiskiem, tworząc aktywną powłokę. Aktywne właściwości powłoki umożliwiają powolne uwalnianie np. substancji przeciwdrobnoustrojowych, wpływając na spowolnienie procesów degradacji żywności lub usunięcie niepożądanych związków, które przyczyniają się do jej rozkładu [14].

Celem niniejszej pracy była charakterystyka technologii powlekania żywności, materiałów powłokotwórczych oraz metod ich wytwarzania wraz z przedstawieniem przykładów zastosowań powłok jadalnych w przemyśle spożywczym.

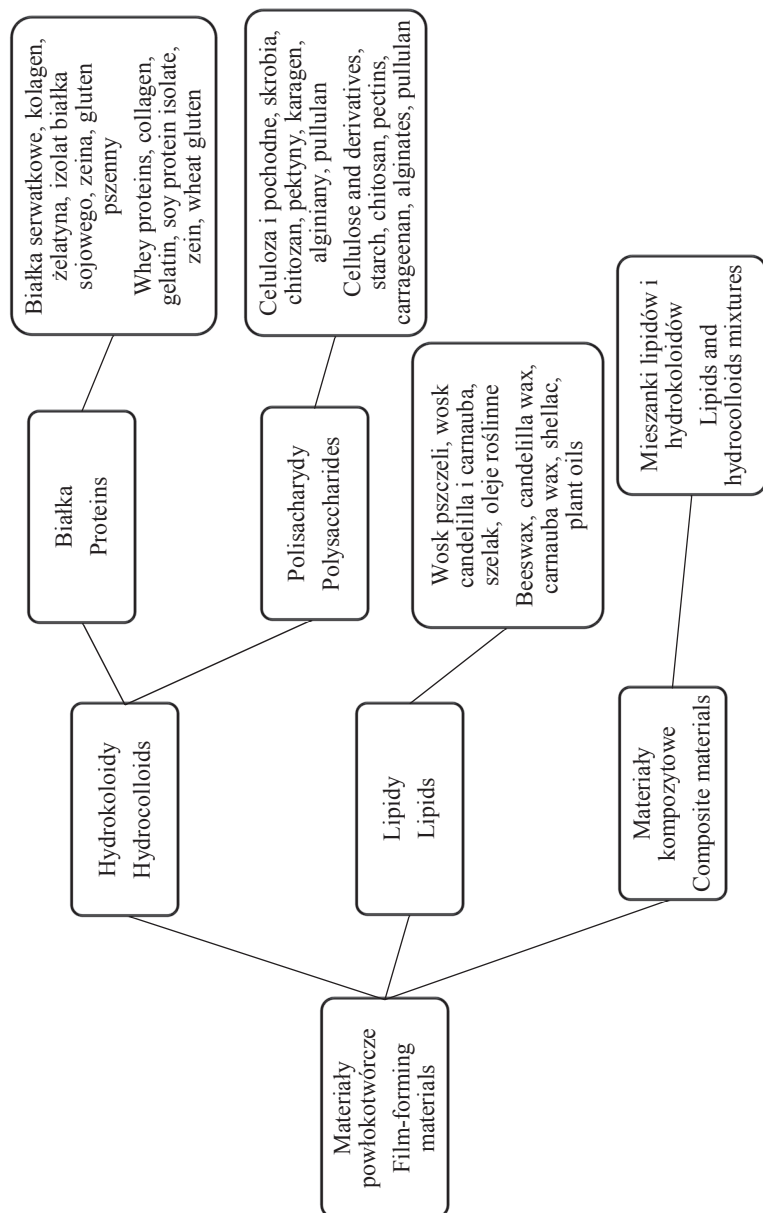
Materiały powłokotwórcze

Wśród materiałów stosowanych do tworzenia powłok jadalnych wyróżnia się polisacharydy, białka i tłuszcze, jak również ich połączenia dwu- lub wieloskładnikowe. Podział materiałów powłokotwórczych przedstawiono na rys. 1. Obecnie poszukuje się również nowych materiałów o właściwościach powłokotwórczych z przeznaczeniem na ochronne powłoki jadalne bądź folie biodegradowalne.

Polisacharydy

Jadalne powłoki polisacharydowe charakteryzują się niską przenikalnością tlenu, co korzystnie wpływa na ograniczenie reakcji utleniania w produktach żywnościowych. Ze względu na hydrofilowe właściwości powłoki te są słabą barierą dla wody, a nierozpuszczalność powłok można uzyskać za pomocą reakcji sieciowania. Powłoki otrzymane na bazie polisacharydów zazwyczaj są bezbarwne, charakteryzują się dobrą stabilnością i biodegradowalnością. Do głównych polisacharydów powłokotwórczych zalicza się celulozę, skrobię, pektyny, karagen, alginiany i pullulan [51].

Celuloza stanowiąca surowiec powszechnie dostępny, odnawialny oraz biokompatybilny znalazła zastosowanie w powlekananiu produktów żywnościowych. Jedną z pochodnych celulozy jest karboksymetyloceluloza, której wodny roztwór wykazuje korzystne właściwości powłokotwórcze i stanowi na powierzchni owoców oraz warzyw barierę dla światła. Zastosowanie karboksymetylocelulozy przy wytwarzaniu powłok jadalnych korzystnie wpływa także na spowolnienie procesów oddychania komórkowego owoców i warzyw, co powoduje wydłużenie trwałości powlekanego



Rys. 1. Podział materiałów powłokotwórczych
Fig. 1. Classification of film-forming materials

produktu [65]. Biodegradowalnym polimerem pochodzącym z celulozy jest także hydroksypropylometyloceluloza, którą stosuje się do otrzymywania przezroczystych i bezwonnych powłok. Stanowią one barierę dla olejów. W celu wzmocnienia właściwości hydrofilowych i ograniczenia przenikania pary wodnej dodatkowo stosowane są nanowłókna celulozowe [36].

Skrobia jest jednym z najbardziej dostępnych surowców pochodzenia roślinnego, który stanowi materiał zapasowy roślin i jest akumulowany w bulwach, korzeniach oraz nasionach. Jest naturalnym biopolimerem odgrywającym kluczową rolę w technologii żywności, zwłaszcza przy określaniu właściwości reologicznych żywności. Może być również stosowana jako element materiału opakowaniowego, ponieważ odznacza się korzystnymi właściwościami funkcjonalnymi, jest tańsza od polietylenu, biodegradowalna i łatwo ulega obróbce technologicznej [9]. Powłoki jadalne wytworzone wyłącznie ze skrobi są kruche, dlatego stosuje się dodatek lipidów i gum, które wpływają na modyfikację właściwości mechanicznych. Ponadto ich mieszanki nadają żywności nowe właściwości teksturalne, m.in. zwiększają zdolność do zatrzymywania wody [16].

Pektyny są polisacharydami pochodzenia roślinnego. Znajdują coraz szersze zastosowanie w sektorze spożywczym ze względu na doskonałą barierowość wobec tlenu, lipidów oraz związków zapachowych. Valdés i wsp. [63] zaobserwowali, że powłoki mogą być odpowiednimi nośnikami związków aktywnych, do których zalicza się substancje wpływające na wzmocnienie struktury (np. nanocząsteczki tlenu cynku), substancje ograniczające rozwój drobnoustrojów (np. chitozan), a także przeciwutleniające (np. olejki eteryczne). Poprzez połączenie z innymi polimerami (np. chitozan, alginian) powłoki charakteryzują się większą stabilnością, jednak nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań dotyczących opracowania efektywniejszych błon pektynowych do pakowania żywności w skali laboratoryjnej, jak również w skali przemysłowej. Pektyny mogą równoważyć także niekorzystne skutki wynikające z zastosowania plastyfikatorów. Dzięki tworzeniu wiązań wodorowych między pektynami i łańcuchami skrobiowymi można zaobserwować korzystne zmiany właściwości mechanicznych. W przypadku występowania większej zawartości skrobi w przygotowanym roztworze powłokotwórczym obserwuje się wyższą odporność mechaniczną [29].

Karagen jest polisacharydem pozyskiwanym na drodze ekstrakcji z czerwonych wodorostów. Jest również określany jako złożona mieszanina zawierająca kilka polimerów galaktozy, które ulegają rozpuszczeniu w wodzie [35]. Unikatowe właściwości karagenu, do których zalicza się jego bioaktywność, biokompatybilność oraz biodegradowalność, powodują, że biopolimer ten jest stosowany w przemyśle spożywczym jako substancja żelująca, stabilizująca lub emulgująca, a także jako środek wchodzący w skład folii i powłok jadalnych. Konieczne są jednak dalsze badania karagenu w celu wzmocnienia jego właściwości mechanicznych oraz barierowych w stosunku do pary

wodnej, aby mógł być powszechnie stosowany jako materiał opakowaniowy. W tym celu zalecany jest dodatek związków o charakterze hydrofobowym oraz środków sieciujących [48].

Alginiany pozyskiwane z wodorostów i rozpuszczalne w wodzie są polisacharydami powszechnie stosowanymi podczas wytwarzania materiałów błonotwórczych. Stanowią ekologiczną alternatywę w stosunku do syntetycznych polimerów. Powłoki zawierające alginiany, oprócz dobrych właściwości powłokotwórczych, charakteryzują się wysoką odpornością na migrację tłuszczów [56]. Mała przepuszczalność powłok jadalnych może mieć wpływ na spowolnienie procesu utleniania lipidów, np. w warzywach oraz owocach, co powoduje ograniczenie wzrostu mikroflory oraz zmniejszenie ubytku masy. Zastosowanie powłok na bazie alginianu pozwala na podwyższenie jakości nietrwałych owoców oraz warzyw poprzez ograniczenie strat wilgoci, smaku, barwy, a także poprzez zminimalizowanie występujących procesów kurczenia się, wchłaniania oleju oraz jęlczenia oksydacyjnego [44].

Pullulan jest polisacharydem wytwarzanym przez gatunki grzybów *Aureobasidium*, zwłaszcza *Aureobasidium pullulans*. Szerokie zastosowanie pullulanu jest znacznie ograniczone ze względu na jego cenę. Filmy stworzone na bazie pullulanu łatwo ulegają rozpuszczeniu w wodzie, charakteryzują się barierowością wobec tlenu, a także wpływają na ochronę występujących w żywności witamin. Folie jadalne z pullulanu mogą być stosowane jako materiał opakowaniowy do takich produktów, jak: orzechy, makaron, wyroby cukiernicze, a także warzywa i mięso. Ponadto pullulan może być używany do zastępowania skrobi w preparatach spożywczych określanych jako niskokaloryczne [2].

Białka

W celu uzyskania odpowiednich właściwości filmów jadalnych do określonych zastosowań struktura białek, będących makrocząsteczkami o konkretnych sekwencjach aminokwasów, może zostać dostosowana poprzez modyfikacje enzymatyczne, chemiczne lub fizyczne. Uzyskiwane folie są niestety znacznie słabsze niż materiały syntetyczne. Filmy białkowe stosowane do powlekania lub pakowania żywności stanowią doskonałą barierę wobec tlenu, dwutlenku węgla i lipidów, lecz charakteryzują się wrażliwością na parę wodną i wodę [13].

Białka mleka stosowane w przemyśle spożywczym to białka serwatki, które charakteryzują się wieloma cennymi cechami, m.in. są bezbarwne, bezwonne i nie mają smaku. Powłoki jadalne zawierające białka mleka są elastyczne oraz stanowią dobrą barierę wobec aromatów [42]. Ponadto powłoki i filmy jadalne zawierające białka mleka charakteryzują się barierowością w stosunku do gazów. Obecność laktozy wpływa na występowanie krystalizacji podczas procesu tworzenia filmów jadalnych, przez co uzyskiwane filmy są niejednorodne i charakteryzują się osłabieniem przy-

czepności do powierzchni. Zapobiega się temu, stosując dodatek sorbinianu potasu [59].

Kolagen, czyli białko pochodzenia zwierzęcego występujące głównie w tkankach łącznych (np. w ścięgnach, chrząstkach, błonach łącznotkankowych), odznacza się dużą wytrzymałością na rozciąganie oraz stabilnością. Ostatnio szerokie zastosowanie w produkcji żywności zyskał kolagen pochodzący z ryb, gąbek oraz meduz. Folii kolagenowych powszechnie używa się jako osłonek do produkcji różnego rodzaju kiełbas. Po zastosowaniu obróbki cieplnej możliwe jest łatwiejsze usuwanie elastycznej warstwy. Osłonka kolagenowa zwiększa soczystość produktu. Kawalki mięsa wołowego zapakowane w osłonki kolagenowe i poddane mrożeniu przez 20 tygodni porównano z kawalkami mięsa zapakowanymi w folię z tworzywa sztucznego i przechowywanymi w takich samych warunkach. W odniesieniu do próbek kontrolnych nie zaobserwowano różnic pod względem barwy, wzrostu drobnoustrojów oraz cech sensorycznych [25].

Żelatyna składa się z aminokwasów występujących w odpowiedniej sekwencji, wśród których największy udział mają glicyna, prolina oraz hydroksyprolina. Ze względu na dużą biokompatybilność, plastyczność oraz zdolności do biodegradacji, żelatyna znajduje zastosowanie jako składnik folii biopolimerowych [27]. Ze względu jednak na hydrofilowy charakter powłoki żelatynowe stanowią słabą barierę dla wody. W celu poprawy właściwości tych powłok stosuje się dodatek olejków o charakterze hydrofobowym, np. z trawy cytrynowej, bazylii oraz mięty [57].

Izolat białka sojowego, pozyskiwany z odpadów powstających podczas wytwarzania oleju sojowego, charakteryzuje się dobrymi właściwościami funkcjonalnymi. Ze względu na zdolność do żelowania i emulgowania jest on określany jako potencjalny surowiec, który może być wykorzystywany do wytwarzania folii jadalnych. Folie wykonane na bazie izolatu białka sojowego mają żółte zabarwienie, są elastyczne i charakteryzują się znaczną barierowością wobec tlenu, natomiast niską – wobec pary wodnej. Ponadto mogą stanowić matrycę umożliwiającą dodatek związków bioaktywnych [50].

Zeina to białko otrzymywane z bielma kukurydzy. Stosowane do powlekania produktów żywnościowych wykazuje korzystny wpływ na utrzymanie barwy przy jednoczesnym zachowaniu jędrności świeżego produktu. Ze względu na hydrofobowy charakter stanowi dobrą barierę dla wody. Powłoki jadalne wykonywane na bazie zeiny i charakteryzujące się znacznym połyskiem umożliwiają uzyskanie oczekiwanej odporności na działanie tłuszczów. Powłoki te, stosowane na produktach spożywczych, zapewniają zachowanie odpowiedniej jakości produktu, działając jako dobra bariera w stosunku do tlenu. Zeina może stanowić perspektywiczny biopolimer stosowany w przemyśle spożywczym i żywieniowym ze względu na dostępność biodegradowalność oraz właściwości błonotwórcze [31].

Tłuszcze

Filmy oraz powłoki jadalne otrzymywane na bazie lipidów w porównaniu z filmami i powłokami otrzymywanymi na bazie białek charakteryzują się doskonałymi właściwościami barierowymi w stosunku do wilgoci. Folie lipidowe są jednak wyjątkowo kruche, a ze względu na ich hydrofobowość charakteryzują się także większą grubością [28]. Lipidowe filmy i powłoki jadalne tworzy się z wosku pszczelego, wosku candelilla, wosku carnauba, szelaku bądź olejów roślinnych.

Wosk pszczeli stosuje się najczęściej do powlekania owoców i warzyw. Ma na celu ochronę przed utratą wody i przenikaniem drobnoustrojów, a tym samym zachowanie wysokiej jakości produktu przez jak najdłuższy czas. Woskowanie zapobiega utracie masy nawet o 50 %. Równocześnie powłoka z wosku pszczelego wpływa korzystnie na wygląd produktu poprzez zwiększenie jego połysku [32]. Ze względu na właściwości hydrofobowe wosk pszczeli stanowi doskonałą barierę dla wilgoci w wytwarzanych powłokach jadalnych [18].

Wosk candelilla jest jadalnym biodegradowalnym biopolimerem stosowanym do otrzymywania powłok jadalnych. Pozyskuje się go z rośliny *Euphorbia antisyphilitica* Zucc. Wosk candelilla charakteryzuje się twardością pośrednią między woskiem carnauba a woskiem pszczelim i stanowi jedną z najlepszych barier dla wilgoci i gazów. Dodatek wosku candelilla stosuje się w celu zmniejszenia kruchości powłok i zwiększenia ich elastyczności poprzez zmniejszenie sił wewnątrzcząsteczkowych występujących w łańcuchach polimeru [3].

Wosk carnauba pozyskiwany z liści *Copernicia prunifera* jest najtwardszy z wosków. Jego dodatek do roztworu powłokotwórczego powoduje, że zmniejszona zostaje przepuszczalność pary wodnej oraz rozpuszczalność folii. Ponadto zastosowanie wosku carnauba do filmów z dodatkiem białek serwatkowych powoduje lepsze krycie folii, a także zmniejsza wytrzymałość folii na rozciąganie [19].

Szelak należy do polimerów lipidowych i charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami barierowymi w stosunku do wilgoci, wynikającymi z wosku stanowiącego jego znaczny składnik. Produkty pokryte powłoką zawierającą szelak charakteryzują się błyszczącą powierzchnią, zwiększającą ich atrakcyjność. Wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji produktu na promieniowanie UV tendencja do zmniejszania połysku jest nieznaczna. Powłoki szelakowe są często stosowane do powlekania różnego rodzaju produktów także dlatego, że umożliwiają uzyskanie znacznej przyczepności powłoki do produktu. Omawiane powłoki przejawiają również pewne wady. Charakteryzują się małą wytrzymałością mechaniczną, czego skutkiem może być tendencja do pęknięcia powłoki. Ponadto wraz ze wzrostem ilości zastosowanej powłoki smak produktu może ulec niekorzystnej zmianie. Obecność grup karboksylowych w strukturze szelaku wpływa na jego rozpuszczalność, która zachodzi już przy pH wynoszącym ok. 7 i może zwiększać się wraz ze wzrostem pH [37].

Oleje roślinne mogą być stosowane do wytwarzania emulsyjnych powłok jadalnych (np. w połączeniu z polisacharydami) i umożliwiają otrzymanie przezroczystych materiałów powłokotwórczych. Wyjątkiem jest stosowanie oleju z owoców olejowca gwinejskiego (*Elaeis guineensis*), który nadaje powłoce charakterystyczną pomarańczowo-czerwoną barwę, wynikającą z dużej zawartości karotenoidów. Korzystny wpływ na tworzenie powłok z olejami roślinnymi ma jednorodne rozproszenie mniejszych kropelek lipidów w emulsji, ponieważ zwiększona zostaje odporność powłoki na oddziaływanie pary wodnej [55].

Powłoki wieloskładnikowe

Materiałami powłokotwórczymi są również połączenia wieloskładnikowe węglowodanów, białek i tłuszczów. Do tworzenia powłok jadalnych spośród białek najczęściej stosuje się białka sojowe, albuminy, kolagen i białka mleka. Składnikami węglowodanowymi mogą być: skrobia wraz z produktami powstającymi podczas jej hydrolizy, metyloceluloza, hydroksypropyloceluloza, karboksymetyloceluloza lub metyloceluloza. Do lipidowych składników powłok jadalnych można zaliczyć wyższe kwasy tłuszczowe, mono-, di-, triacyloglicerole i oleje jadalne [20]. Wieloskładnikowe warstwy ochronne na warzywa i owoce powinny zawierać związki przypominające woski naturalne [34]. Taka wieloskładnikowa budowa powłok umożliwia uzyskanie warstw o oczekiwanych właściwościach użytkowych, a odpowiednio dobrany skład powłoki jadalnej wpływa na zmniejszenie ubytków wilgoci, powstawanie w naturalny sposób oczekiwanego składu atmosfery, a także zachowanie wartości odżywczej i prozdrowotnej produktu [33]. W celu zwiększenia funkcjonalności powłok stosuje się niewielkie dodatki jadalnych składników chemicznych (m.in. plastyfikatorów, emulgatorów, ekstraktów roślinnych, związków zapachowych) do błony lub matrycy powlekającej. Mogą one wpływać zarówno na wzmacnianie cech mechanicznych, zwiększanie przyczepności i stabilności, jak również na poprawę bezpieczeństwa i jakości żywności [30, 40]. Bezpieczeństwo żywności jest bowiem określane jako: ogół warunków, które muszą być spełnione, dotyczących w szczególności: stosowanych substancji dodatkowych i aromatów, poziomów substancji zanieczyszczających, pozostałości pestycydów, warunków napromieniania żywności, cech organoleptycznych i działań, które muszą być podejmowane na wszystkich etapach produkcji lub obrotu żywności – w celu zapewnienia zdrowia i życia człowieka. Przykładowe składniki występujące w powłokach jadalnych i ich funkcje przedstawiono w tab. 1.

Nowe źródła materiałów powłokotwórczych

Rozwój wiedzy w dziedzinie materiałoznawstwa umożliwia tworzenie nowych powłok opakowaniowych, które nie wywierają szkodliwego wpływu na środowisko.

Tabela 1. Przykładowe składniki występujące w powłokach jadalnych i ich funkcje
 Table 1. Examples of ingredients incorporated in edible coatings and their functions

| Składnik powłoki Coating ingredient | Funkcja / Function | Lit. Ref. |
|---|--|--------------|
| Chitozan / Chitosan | Efekt przeciwwgrzybiczny / Antifungal effect | [61] |
| Nanocząsteczki tlenku cynku (ZnO) Zinc oxide nanoparticles (ZnO) | Wzmocnienie właściwości mechanicznych, strukturalnych oraz barierowych; działanie bakteriobójcze Strengthening mechanical, structural and barrier properties; bactericidal effect | [27] |
| Ekstrakt z zielonej herbaty Green tea extract | Efekt przeciwutleniający / Antioxidant effect | [58] |
| Alginian sodu Sodium alginate | Efekt bakteriobójczy oraz barierowy dla olejów Bactericidal and barrier effect to oils | [58] |
| Miód / Honey | Efekt przeciwbakteryjny / Antibacterial effect | [38] |
| Gluten pszeniczny / Wheat gluten | Efekt barierowy dla wody i tlenu Barrier effect to water and oxygen | [56] |
| Pullulan | Efekt barierowy dla tlenu / Barrier effect to oxygen | [2] |
| Alginiany / Alginates | Efekt barierowy dla olejów i tłuszczów Barrier effect to oils and lipids | [59] |
| Hydroksypropylometyloceluloza Hydroxypropyl methylcellulose | Efekt barierowy dla olejów / Barrier effect to oils | [35] |
| Białka mleka / Milk proteins | Efekt barierowy dla gazów / Barrier effect to gases | [64] |
| Wosk candelilla / Candlilla wax | Efekt barierowy dla wilgoci i gazów Barrier effect to moisture and gases | [3] |
| Szelak / Shellac | Efekt barierowy dla wilgoci / Barrier effect to moisture | [36] |

Źródłem takich materiałów mogą być np. odpady pochodzące z przemysłu spożywczego, które do tej pory przysparzały wiele problemów związanych z utylizacją. Ich użycie ma na celu zastąpienie materiałów pochodzących z paliw kopalnych oraz źródeł określanych jako nieodnawialne [47].

Jako nowy materiał powłokotwórczy można zastosować mąki wytwarzane z roślin strączkowych. Charakteryzują się one nie tylko dobrymi właściwościami powłokotwórczymi, ale stanowią także cenne źródło białek, witamin oraz związków mineralnych. Przykładem wykorzystania takich surowców są jadalne powłoki wytworzone z mąki z zielonego groszku przez Giosafatto i wsp. [22], natomiast Díaz i wsp. [15] przygotowali powłoki bazujące na mące z ciecierzycy, określanej jako dobre źródło białek i węglowodanów, a także zawierającej znaczne ilości błonnika pokarmowego. Ciecierzycę, mimo że nie jest sklasyfikowana jako roślina oleista, zawiera więcej lipidów niż inne rośliny strączkowe. Z kolei do wytworzenia powłok jadalnych Ochoa-Yepes i wsp. [49] wykorzystali skrobię z manioku. Badacze zastosowali także dodatek mąki z soczewicy, jako produktu uzyskanego z pozostałości pochodzących z produkcji

białka z ziarna soczewicy, która charakteryzowała się znaczną zawartością błonnika pokarmowego (6,3 %). Jej dodatek spowodował, że uzyskane powłoki jadalne charakteryzowały się większą wytrzymałością na zerwanie, większą sprężystością oraz elastycznością. Wszystkie uzyskane powłoki uległy biodegradacji w ciągu 3 tygodni.

Do nowych źródeł materiałów błonotwórczych można zaliczyć mąkę bakłażanową, której Nouraddini i wsp. [47] użyli do tworzenia powłok jadalnych. Do części wytwarzanych powłok wymienił autorzy wykorzystali również dodatek skrobi kukurydzianej. Otrzymane powłoki z mąki bakłażanowej wykazywały zdolności błonotwórcze, lecz charakteryzowały się słabszymi właściwościami mechanicznymi i mniejszą przepuszczalnością pary wodnej w porównaniu z powłokami wytworzonymi z dodatkiem skrobi kukurydzianej. Przygotowane powłoki uległy całkowitej biodegradacji po upływie 14 dni. Ze względu na dużą zawartość przeciwutleniaczy mąka bakłażanowa może stać się w przyszłości poszukiwanym materiałem powłokotwórczym, zabezpieczającym produkty żywnościowe przed procesami utleniania.

Jak już nadmieniono, szczególne zainteresowanie wytwarzaniem powłok jadalnych wiąże się z pozostałościami pochodzącymi z przetwórstwa branży owocowo-warzywnej. Wynoszą one ok. 0,5 miliarda ton rocznie i są coraz częściej wykorzystywane do produkcji mąk. Można stwierdzić, że stanowią perspektywiczny surowiec do wytwarzania materiałów powłokotwórczych [54].

Andrade i wsp. [4] opracowali jadalne filmy, które zawierały mąkę wytworzoną z pozostałości owoców i warzyw. Filmy charakteryzowały się jednorodnością oraz cechowały się elastycznością, mimo że nie zawierały plastyfikatorów. Gutiérrez i wsp. [24] wykazali natomiast, że do wytwarzania materiałów powłokotwórczych można używać także odpadów powstających przy produkcji wina. Pozostałości, takie jak skórki i nasiona winogron, charakteryzujące się dużą zawartością składników odżywczych, wpływają na modyfikację właściwości strukturalnych i mechanicznych powłok jadalnych tworzonych na bazie skrobi. Występujący w odpadach winogron kwas cytrynowy charakteryzuje się zdolnością generowania reakcji sieciowania, które mogą zachodzić pomiędzy łańcuchami skrobiowymi a polifenolami i cukrami w tworzonych filmach jadalnych i działać jako środki plastyfikujące.

Jedną z najbardziej znanych naturalnych substancji dodatkowych do żywności jest guma arabska, charakteryzująca się właściwościami stabilizującymi, emulgującymi oraz wiążącymi. Z tego względu często jest stosowana jako dodatek do lodów, galaretek, syropów oraz gum do żucia. W ostatnich latach guma arabska była analizowana jako środek błonotwórczy w polewach cukierniczych [53]. Bnuyan i wsp. [11] dowiedli, że guma arabska zapobiega rozwojowi bakterii i grzybów, m.in.: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* i *Candida albicans*.

W porównaniu z gumą arabską skuteczniejszymi właściwościami emulgującymi odznacza się guma migdałowa, zawierająca przy tym dużo pierwiastków, m.in. sodu, potasu, magnezu, wapnia oraz żelaza. Guma migdałowa jest także dobrym źródłem przeciwutleniaczy i środków przeciwdrobnoustrojowych, które wpływają na zwiększenie aktywności biologicznej oraz właściwości funkcjonalnych żywności [8]. Guma migdałowa w przyszłości może stać się skutecznym substytutem gumy arabskiej i być powszechnie stosowana do powlekania owoców oraz warzyw podczas ich przechowywania po zbiorze [38].

Plastyfikatory i dodatki funkcjonalne

Do modyfikowania elastyczności powłok jadalnych często stosowane są plastyfikatory, czyli nielotne związki o małej masie cząsteczkowej dodawane bezpośrednio do mieszanin powłokotwórczych. Należą do nich m.in. glicerol, sorbitol, sacharoza, glikol polietylenowy, kwasy tłuszczowe oraz monoacyloglicerole charakteryzujące się małą masą cząsteczkową. W zależności od rodzaju powłoki zawartość plastyfikatora wynosi 10 ÷ 60 % [58]. Dodatek plastyfikatorów powoduje zmniejszenie sił międzycząsteczkowych występujących wzdłuż łańcuchów polimerowych, a uzyskane powłoki są bardziej elastyczne i rozciągliwe. Ograniczona zostaje możliwość kurczenia się podczas przenoszenia i przechowywania oraz pękanie powłok, lecz włączenie zbyt dużej ilości tych substancji do struktury może prowadzić do rozdziału fazowego oraz ich krystalizacji na powierzchni produktu końcowego [64].

Oprócz właściwości barierowych wobec gazów i wilgoci powłoki jadalne mogą być nośnikami substancji przeciwdrobnoustrojowych, zapobiegających rozwojowi bakterii patogennych, a także nośnikami przeciwutleniaczy, aromatów, barwników, enzymów i składników odżywczych, co według konsumentów zwiększa atrakcyjność produktu [7]. Zazwyczaj substancje o charakterze przeciwdrobnoustrojowym dodawane są bezpośrednio do żywności, przez co może nastąpić ograniczenie aktywności funkcjonalnej dodawanej substancji. Zatem zastosowanie powłoki może okazać się bardziej skuteczne niż bezpośredni dodatek takiej substancji do produktu, ponieważ substancje te mogą migrować selektywnie na powierzchnię żywności [26]. Wszystkie stosowane składniki niezbędne do przygotowania roztworów powłokotwórczych powinny mieć jak najmniejszy wpływ na jakość sensoryczną produktów. Istotne jest, aby zachowana została odpowiednia barwa powlekanego produktu, ponieważ jej zmiana może sugerować, że produkt utracił swoją świeżość lub jest niedojrzały [46].

Metody powlekania

Dobór techniki wytwarzania jest ważnym czynnikiem wpływającym na uzyskanie odpowiedniej przyczepności, trwałości i spójności stosowanych powłok jadalnych. Powłoki składające się z kilku warstw zwykle charakteryzują się większą wytrzymało-

ścią na rozciąganie od złożonych z jednej warstwy. W przypadku powłok wielowarstwowych mogą występować duże różnice energii powierzchniowej na granicy między warstwami, co skutkuje ich rozdzielaniem. Do metod wytwarzania powłok zalicza się wylewanie, powlekanie, ekstruzję i natryskiwanie [41].

Najczęściej stosowaną metodą otrzymywania powłok jadalnych w skali laboratoryjnej jest wylewanie, zwane również metodą na mokro. Polega ono na wylaniu przygotowanej wcześniej zawiesiny na płytce. Technika ta jest preferowana z tego względu, że umożliwia kontrolę grubości powłok poprzez odmierzenie pożądanej ilości zawiesiny umieszczanej na płytce. Nie jest jednak odpowiednią metodą do tworzenia błon o długości przekraczającej 25 - 30 cm, ponieważ wtedy trudniej kontrolować i uzyskać identyczną grubość powłok. Znacznemu wydłużeniu ulega także czas schnięcia powłok. W tej metodzie ważną rolę odgrywają warunki suszenia. Suszenie jest przeprowadzane w temperaturze pokojowej lub w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza, w której temperatura zazwyczaj osiąga poziom 30 - 40 °C, a czas suszenia wynosi 10 ÷ 24 h. Uniemożliwia to stosowanie tej techniki na skalę przemysłową. Istotne znaczenie w metodzie na mokro ma również dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, plastyfikatora lub innych stosowanych dodatków [43]. Prowadzone są badania w kierunku skrócenia czasu suszenia materiałów powłokotwórczych poprzez zastosowanie wyższych temperatur i niższych wilgotności względnych środowiska w celu szerszego zastosowania powlekania w przemyśle spożywczym.

Podczas przeprowadzania procesu powlekania można zaobserwować występowanie dwóch zjawisk fizycznych – kohezji oraz adhezji. Kohezja jest zjawiskiem fizycznym występującym w strukturze powłoki, natomiast adhezja występuje pomiędzy powłoką i powierzchnią powlekanego produktu. Proces powlekania prowadzony jest przy użyciu powlekarek (proszkowe, strumieniowe oraz ślimakowe), a także innych urządzeń, m.in. wirówek, mieszalników i suszarek rozpyłowych [21].

Inną techniką stosowaną do utworzenia powłoki jest metoda natryskiwania, polegająca na rozprowadzaniu roztworu za pomocą dysz na powierzchni produktu żywnościowego. Metoda ta pozwala na uzyskiwanie jednolitych, jednowarstwowych lub wielowarstwowych powłok o dużych powierzchniach [52]. Dodatkowo, systemy natryskowe dzięki automatyzacji umożliwiają wykonywanie pracy w trybie ciągłym, nie powodują powstawania zanieczyszczeń w przygotowanych roztworach do powlekania i ułatwiają kontrolę ich temperatury. Na prawidłowy przebieg procesu istotny wpływ ma odpowiedni dobór dysz i właściwości stosowanej cieczy (lepkość, gęstość, napięcie powierzchniowe) [4].

Metodą produkcji folii jadalnych jest również proces ekstruzji, który może być prowadzony w ekstruderze. Stosuje się różne warunki oraz ślimaki o różnej prędkości, długości i średnicy. Różnice w parametrach procesu ekstruzji wynikają głównie z charakteru zastosowanych substancji, m.in. denaturacja termiczna białek jest różna. Białka

serwatkowe zaczynają denaturować w temp. 70 °C, podczas gdy gluten pszeniczny czy białka sojowe wymagają temp. 90 °C. Parametry uzależnione są jednak ściśle od składu surowcowego roztworów powłokotwórczych, w tym stężenia biopolimeru lub właściwości rozpuszczalnika. Istotny wpływ na przebieg procesu ma zastosowanie odpowiedniej temperatury oraz szybkości dodawania składników, takich jak np. stabilizatory, na początku i w trakcie przeprowadzania procesu wytwarzania powłok [66]. Proces ten umożliwia również przeprowadzenie procesu w sposób ciągły i jest odpowiedni do przetwarzania płynów charakteryzujących się znaczną lepkością. Różnice wynikające z zastosowania różnych prędkości ślimaka wpływają na możliwość kontrolowania czasu przebywania substancji w ekstruderze [12].

Zastosowanie powlekania w przemyśle spożywczym

Po raz pierwszy powłoki jadalne znalazły zastosowanie w XII wieku w Chinach, gdzie odgrywały ważną rolę w ochronie powierzchni owoców cytrusowych i ograniczały ubytki masy. Pierwsze opakowanie jadalne wyprodukowane przy użyciu białek mleka sojowego miało miejsce na początku XV wieku w Japonii, natomiast w XIX wieku w Anglii powłoki zastosowano do ochrony produktów mięsnych. W branży owocowo-warzywnej powłoki wprowadzono w latach 30. XX w. Umożliwiały one naturalne oddychanie oraz zmniejszanie ubytku wody podczas transportu [17].

W przechowywalnictwie owoców i warzyw powłoki jadalne znalazły zastosowanie do modyfikacji atmosfery gazowej, ponieważ wpływają one m.in. na zmianę zawartości tlenu, a także na ograniczenie wytwarzania etylenu. Dzięki nim dochodzi również do zmniejszenia strat związków bioaktywnych w czasie przechowywania surowców [61]. Korzystnym efektem powlekania produktów jest także ochrona przed zmianą barwy czy występowaniem szkodliwej mikroflory na powierzchni oraz zapobieganie zmianom w naturalnym stanie owoców i warzyw [28]. Stwierdzono, że zastosowanie powłok jadalnych do nietrwałych i łatwo psujących się owoców i warzyw jest skuteczną i wydajną metodą z uwagi na niewielkie ilości roztworu powłokotwórczego w stosunku do masy powlekanych surowców. Metoda ta pozwala na zmniejszenie kosztów konserwowania produktów w porównaniu ze stosowaniem niskich temperatur oraz innych metod ochrony przed psuciem surowców podczas przechowywania i transportu [1].

W przemyśle mięsnym powłoki jadalne stosuje się do produktów świeżych i mrożonych, pochodzących z mięsa, drobiu i ryb. Mają one postać osłonek umieszczanych m.in. na powierzchni kabanosów czy kiełbas. Stanowią równocześnie alternatywę dla ich konwencjonalnych odpowiedników i chemicznych konserwantów. Powłoki jadalne stosowane do mięs są nośnikami środków przeciwdrobnoustrojowych, zapobiegają utracie wilgoci w czasie przechowywania, a także umożliwiają zachowanie soczystości po zapakowaniu i absorpcję obcych zapachów [10].

Wraz z postępowaniem technologii dąży się do ulepszania materiałów i składników powłok, aby zwiększyć ich skuteczność, dlatego też stosowane są kombinacje jadalnej powłoki połączonej z oddziaływaniem promieniowania w celu przedłużenia okresu przydatności do spożycia owoców. Obecnie w powlekaniu żywności coraz częściej stosowane są również dodatki olejków eterycznych do roztworów błonotwórczych, m.in. tymianku i trawy cytrynowej. Ich dodatek wzbogaca produkt o właściwości przeciwwgrzybowe oraz przeciwbakteryjne. Olejki eteryczne charakteryzują się jednak silnym aromatem i dużą lotnością, co może mieć wpływ na zmianę właściwości sensorycznych świeżych produktów. Zastosowanie znajduje tu np. nanotlenek krzemu w celu przedłużenia trwałości produktów.

Większość przedstawionych innowacyjnych metod powlekania żywności nie jest obecnie stosowana w skali przemysłowej ze względu na nieopłacalność ekonomiczną bądź wstępny etap ich rozwoju. Oczekuje się zatem dalszego postępu, który będzie obejmował stosowanie nowych materiałów powłokotwórczych oraz optymalizację kosztów przy osiągnięciu pożądanego efektu zapewniającego utrzymanie jakości powlekanych produktów żywnościowych [39].

Funkcjonalizacja nanostruktur umożliwia m.in. poprawę kompatybilności składników wchodzących w skład powłok jadalnych z powierzchnią produktów żywnościowych. Oprócz tego możliwe jest stopniowe uwalnianie składników z nanostruktury podczas przechowywania i dystrybucji żywności. Przewidywany jest rozwój kompozytowych powłok jadalnych, które będą zawierały co najmniej dwie nanostruktury. Dzięki temu możliwe będzie otrzymywanie modyfikowanych właściwości barierowych określonych produktów, walorów smakowo-zapachowych, a także zwiększenie ich wartości odżywczej. Obecnie brakuje przepisów, które jednoznacznie określą ryzyko związane ze stosowaniem nanomateriałów, lecz uznaje się, że wszystkie występujące skutki toksykologiczne zależą od parametrów fizykochemicznych stosowanych nanomateriałów [23].

Podsumowanie

Najczęściej stosowanymi materiałami do otrzymywania powłok jadalnych są białka, tłuszcze oraz węglowodany, a wykonane z nich opakowania jadalne zapewniają odpowiedni wygląd i bezpieczeństwo żywności. Znajdują zastosowanie w wielu branżach przemysłu spożywczego, m.in. mięsnej, owocowo-warzywnej lub cukierniczej. Powłoki jadalne mogą być wzbogacane w substancje wpływające na ograniczenie rozwoju drobnoustrojów, substancje przeciwutleniające, enzymy oraz składniki odżywcze. Dodatek witamin oraz probiotyków powoduje zwiększenie wartości odżywczej powlekanego produktu żywnościowego. Przy wytwarzaniu powłok jadalnych niezbędna jest znajomość składu chemicznego stosowanych materiałów powłokotwórczych oraz

techniki ich otrzymywania. Brak doboru odpowiednich właściwości może wpływać w sposób niekorzystny na akceptację konsumentów.

Literatura

- [1] Akhtar J., Omre P.K., Azad Z.R.A.A.: Edible coating for preservation of perishable foods: A review. *J. Ready Eat Food*, 2015, 2 (3), 81-88.
- [2] Alizadeh-Sani M., Ehsani A., Kia E.M., Khezerlou A.: Microbial gums: Introducing a novel functional component of edible coatings and packaging. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103 (17), 6853-6866.
- [3] Alvarez-Perez O.B., León-Zapata M.A., Molina R.R., Ventura-Sobrevilla J., Aguilar-González M.A., Aguilar C.N.: Functionality features of candelilla wax in edible coatings. In: *Handbook of Research on Food Science and Technology*. Ed. M.L. Chávez-González, J.J. Buenrostro-Figueroa, C.N. Aguilar. Apple Academic Press, Oakville, Canada, 2019, pp. 227-240.
- [4] Andrade R.M.S., Ferreira S.L., Gonçalves É.B.A.: Development and characterization of edible films based on fruit and vegetable residues. *J. Food Sci.*, 2016, 81, 412-418.
- [5] Arnon-Rips H., Poverenov E.: Improving food products' quality and storability by using layer by layer edible coatings. *Trends Food Sci. Technol.*, 2018, 75, 81-92.
- [6] Avramescu S.M., Butean C., Popa C.V., Ortan A., Moraru I., Temocico G.: Edible and functionalized films/coatings – performances and perspectives. *Coatings*, 2020, 10 (7), 1-45.
- [7] Bakhy E.A., Zidan N.S., Aboul-Anean H.E.D.: Effect of nano materials on edible coating and films' improvement. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.*, 2018, 7(3), 20-41.
- [8] Bashir M., HariPriya S.: Assessment of physical and structural characteristics of almond gum. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, 93, 476-482.
- [9] Basiak E., Lenart A.: Powłoki skrobiowe stosowane w opakownictwie żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, 1 (86), 21-31.
- [10] Bhagath Y.B., Manjula K.: Influence of composite edible coating systems on preservation of fresh meat cuts and products: A brief review on their trends and applications. *Int. Food Res. J.*, 2019, 26 (2), 377-392.
- [11] Bnuyan I.A., Hindi N.K.K., Mayshadijebur, Mahdi M.A.: *In vitro* antimicrobial activity of gum arabic (Al. Manna and Tayebat) prebiotics against infectious pathogens. *Int. J. Pharm. Pharmac. Res.*, 2015, 3 (3), 77-85.
- [12] Calderon-Castro A., Vega-Garcia M., Zazueta-Morales J.J., Fitch-Vargas P.R., Carrillo-Lopez A., Gutierrez-Dorado R., Limon-Valenzuela V., Aguilar-Palazuelos E.: Effect of extrusion process on the functional properties of high amylose corn starch edible films and its application in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *J. Food Sci. Technol.*, 2018, 3 (55), 905-914.
- [13] Chiralt A., González-Martínez C., Vargas M., Atarés L.: Edible films and coatings from proteins. *Proteins Food Process.*, 2018, 477-500.
- [14] Dehghani S., Hosseini S.V., Regenstein J.M.: Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chem.*, 2018, 240, 505-513.
- [15] Díaz O., Ferreira T., Rodríguez-Otero J.L., Cobos A.: Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour films: Effects of pH and plasticizer concentration. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20, 1246-1262.
- [16] Eom H., Chang Y., Lee E., Choi H.D.: Development of a starch/gum based edible coating for rice cakes to retard retrogradation during storage. *Food Sci. Technol.*, 2018, 97, 516-522.
- [17] Erkmen O., Barazi A.O.: General characteristics of edible films. *J. Food Biotechnol. Res.*, 2018, 2, 1-4.

- [18] Foo S.Y., Hanani Z.A.N., Rozzamri A., Ibadullah W.Z.W., Ismail-Fitry M.R.: Effect of chitosan-beeswax edible coatings on the shelf-life of sapodilla (*Achras zapota*) fruit. *J. Packaging Technol. Res.*, 2019, 3, 27-34.
- [19] Freitas C.A.S., Sousa P.H.M., Soares D.J., Silva J.Y.G., Benjamin S.R., Guedes M.I.F.: Carnauba wax uses in food – A review. *Food Chem.*, 2019, 291, 38-48.
- [20] Galus S., Kadzińska J.: Food application of emulsion-based edible films and coatings. *Trends Food Sci. Technol.*, 2015, 45 (2), 273-283.
- [21] Galus S., Lenart A.: Wpływ powlekania na stabilność żywności. *Post. Techn. Przetw. Spoż.*, 2019, 2, 106-114.
- [22] Giosafatto C.V.L., Al-Asmar A., D'Angelo A., Roviello V., Esposito M., Mariniello L.: Preparation and characterization of bioplastics from grass pea flour cast in the presence of microbial transglutaminase. *Coatings*, 2018, 8 (12), 435-447.
- [23] González-Reza R.M., García-Betanzos C.I., Sánchez-Valdes L.I., Quintanar-Guerrero D., Cornejo-Villegas M.A., Zambrano-Zaragoza M.L.: The functionalization of nanostructures and their potential applications in edible coatings. *Coatings*, 2018, 8 (5), 1-24.
- [24] Gutiérrez T.J., Herniou-Julien C., Álvarez K., Alvarez V.A.: Structural properties and *in vitro* digestibility of edible and pH-sensitive films made from guinea arrowroot starch and wastes from wine manufacture. *Carbohyd. Polym.*, 2018, 184, 135-143.
- [25] Hashim P., Ridzwan M.M.S., Bakar J., Hashim D.M.: Collagen in food and beverage industries. *Int. Food Res. J.*, 2015, 22 (1), 1-8.
- [26] Hassan B., Chatha S.A.S., Hussain A.I., Zia K.M., Akhtar N.: Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 109, 1095-1107.
- [27] Jamróz E.: Charakterystyka folii otrzymanych z biopolimerów z dodatkiem olejków eterycznych. *Polimery*, 2017, 62 (2), 428-433.
- [28] Kadzińska J., Janowicz M., Kalisz S., Bryś J., Lenart A.: An overview of fruit and vegetable edible packaging materials. *Packag. Technol. Sci.*, 2019, 32, 483-495.
- [29] Kadzińska J., Janowicz M., Kalisz S., Sitkiewicz I., Mika M.: Wpływ obecności powłok jadalnych na zmiany właściwości owoców dyni w czasie przechowywania. *Post. Techn. Przetw. Spoż.*, 2017, 2, 37-45.
- [30] Kamboj S., Gupta N., Bandral J.D., Gandotra G., Anjum N.: Food safety and hygiene: A review. *Int. J. Chem. Stud.*, 2020, 8 (2), 358-368.
- [31] Kasai M.R.: Zein and zein-based nano materials for food and nutrition applications: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2018, 79, 184-197.
- [32] Khedr E.H.: Maintaining Valencia orange quality during shelf life using different waxes. *J. Postharvest Technol.*, 2018, 6 (3), 31-43.
- [33] Kowalczyk D.: Wpływ jadalnej powłoki białkowo-woskowej na trwałość pozbiorną kapusty brukselskiej przechowywanej w symulowanych warunkach obrotu towarowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 6 (79), 177-191.
- [34] Kozłowicz K., Sułkowska M., Kluza F.: Powłoki jadalne i ich wpływ na jakość i trwałość owoców i warzyw. *Acta Sci. Pol., Technica Agraria*, 2011, 10 (3-4), 35-45.
- [35] Lin M.G., Lasekan O., Saari N., Khairunniza-Bejo S.: Effect of chitosan and carrageenan-based edible coatings on post-harvested longan (*Dimocarpus longan*) fruits. *CyTA – J. Food*, 2018, 16 (1), 490-497.
- [36] Lopez-Polo J., Silva-Weiss A., Zamorano M., Osorio F.A.: Humectability and physical properties of hydroxypropyl methylcellulose coatings with liposome-cellulose nanofibers: Food application. *Carbohyd. Polym.*, 2019, 231, 1-37.

- [37] Luangtana-anan M., Limmatvapirat S.: Shellac-based coating polymer for agricultural applications. *Polymers for Agri-Food Applications*, 2019, 487-524.
- [38] Mahfoudhi N., Hamdi S.: Use of almond gum and gum arabic as novel edible coating to delay post-harvest ripening and to maintain sweet cherry (*Prunus avium*) quality during storage. *J. Food Process Pres.*, 2015, 39, 1499-1508.
- [39] Maringgal B., Hashim N., Tawakkal I.S.M.A., Mohamed M.T.M.: Recent advance in edible coating and its effect on fresh/fresh-cut fruits quality. *Trends Food Sci. Technol.*, 2020, 96, 253-267.
- [40] McHugh T.H., Avena-Bustillos R.J.: Novel food processing innovations to improve food safety and health. *Prog. Nutr.*, 2011, 13 (3), 146-154.
- [41] Mellinas C., Valdes A., Ramos M., Burgos N., Garrigos M.: Active edible films: Current state and future trends. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2015, 133 (2), 1-15.
- [42] Minh N.P., Vo T.T., Dung H.T.B., Ngoe T.T.B., Duong L.C., Nghi T.T.: Preservation of jackfruit bulb by transglutaminase crosslinked whey protein/pectin as edible film coating. *J. Pharm. Sci. Res.*, 2019, 11 (4), 1401-1405.
- [43] Moraes J.O., Scheibe A.S., Sereno A., Laurindo J.B.: Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *J. Food Eng.*, 2013, 119, 800-808.
- [44] Nair M.S., Tomar M., Punia S., Kukula-Koch W., Kumar M.: Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 164, 304-320.
- [45] Ncama K., Magwaza L.S., Mditshwa A., Tesfay S.Z.: Plant-based edible coatings for managing postharvest quality of fresh horticultural produce: A review. *Food Packaging Shelf Life*, 2018, 16, 157-167.
- [46] Nor S.M., Ding P.: Trends and advances in edible biopolymer coating for tropical fruit: A review. *Food Res. Int.*, 2020, 134, 1-17.
- [47] Nouraddini M., Esmaili M., Mohtarami F.: Development and characterization of edible films based on eggplant flour and corn starch. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 120, 1639-1645.
- [48] Nouri A., Yarak M.T., Lajevardi A., Rahimi T., Tanzifi M., Ghorbanpour M.: An investigation of the role of fabrication process in the physicochemical properties of κ -carrageenan-based films incorporated with *Zataria multiflora* extract and nanoclay. *Food Packaging Shelf Life*, 2020, 23, 1-9.
- [49] Ochoa-Yepes O., Medina-Jaramillo C., Guz L., Famá L.: Biodegradable and edible starch composites with fiber-rich lentil flour to use as food packaging. *Starch/Straerke*, 2018, 70 (7-8), 1-34.
- [50] Paglione I.S., Galindo M.V., Souza K.C., Yamashita F., Grosso C.R.F., Sakanaka L.S., Shirai M.A.: Optimization of the conditions for producing soy protein isolate films. *Emir. J. Food Agric.*, 2019, 31 (4), 297-303.
- [51] Panahirad S., Naghshiband-Hassani R., Bergin S., Katam R., Mahna N.: Improvement of postharvest quality of plum (*Prunus domestica* L.) using polysaccharide-based edible coatings. *Preprints*, 2020, 1-31.
- [52] Parreidt T.S., Müller K., Schmid M.: Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. *Foods*, 2018, 7, 1-38.
- [53] Patel S., Goyal A.: Applications of natural polymer gum arabic: A review. *Int. J. Food Prop.*, 2015, 18, 986-998.
- [54] Roberta M.S.A., Ferreira M.S.L., Goncalves E.C.B.A.: Development and characterization of edible films based on fruit and vegetable residues. *J. Food Sci.*, 2016, 81 (2), 1-7.
- [55] Rodrigues D.C., Cunha A.P., Brito E.S., Azeredo H.M.C., Gallão M.I.: Mesquite seed gum and palm fruit oil emulsion edible films: Influence of oil content and sonication. *Food Hydrocolloids*, 2016, 56, 227-235.

- [56] Salama H.E., Abdel Aziz M.S., Alsehli M.: Carboxymethyl cellulose/sodium alginate/chitosan biguanidine hydrochloride ternary system for edible coatings. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 139, 614-620.
- [57] Scartazzini L., Tosati J.V., Cortez D.H.C., Rossi M.J., Flores S.H., Hubinger M.D., Di Luccio M., Monteiro A.R.: Gelatin edible coatings with mint essential oil (*Mentha arvensis*): Film characterization and antifungal properties. *J. Food Sci. Technol.*, 2019, 56 (9), 4045-4056.
- [58] Sharma P., Kehinde B.A., Kaur S., Vyas P.: Application of edible coatings on fresh and minimally processed fruits: A review. *Nutr. Food Sci.*, 2019, 49 (4), 713-738.
- [59] Shendurse A.M., Gopikrishna G., Patel A.C., Pandya A.J.: Milk protein based edible films and coatings – preparation, properties and food applications. *J. Nutr. Health Food Eng.*, 2018, 8 (2), 219-226.
- [60] Siracusa V., Romani S., Gigli M., Mannozi C., Cecchini J.P., Tylewicz U., Lotti N.: Characterization of active edible films based on citral essential oil, alginate and pectin. *Materials*, 2018, 11 (10), 1-14.
- [61] Sucheta K., Chaturvedi K., Sharma N., Kumar Yadav S.: Composite edible coatings from commercial pectin, corn flour and beetroot powder minimize post-harvest decay, reduces ripening and improves sensory liking of romatoes. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 133, 284-293.
- [62] Suki F.M.M., Ismail H., Hamid Z.A.A.: Preparation and properties of polyvinyl alcohol/banana frond flour biodegradable film. *Progress Rubber, Plastics Recycl. Technol.*, 2013, 2 (30), 103-114.
- [63] Valdés A., Burgos N., Jiménez A., Garrigós M.C.: Natural pectin polysaccharides as edible coatings. *Coatings*, 2015, 5, 865-886.
- [64] Vieira M.G.A., Silva M.A., Santos L.O., Beppu M.M.: Natural based plasticizers and biopolymer films. *Eur. Polym. J.*, 2011, 47, 254-263.
- [65] Zhang X., Zhang X., Liu X., Du M., Tian Y.: Effect of polysaccharide derived from *Osmunda japonica* Thunb-incorporated carboxymethyl cellulose coatings on preservation of tomatoes. *J. Food Process Pres.*, 2019, 43 (12), 1-8.
- [66] Zink J., Wyrobnik T., Prinz T., Schmid M.: Physical, chemical and biochemical modifications of protein-based films and coatings. An extensive review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17, 1-45.

FOOD COATING – MATERIALS, METHODS AND APPLICATIONS IN FOOD INDUSTRY

S u m m a r y

Food coating is used to extend the shelf life of many non-durable, perishable raw materials and food products. Edible coatings can prevent changes in colour or texture, growth of undesirable microorganisms and loss of vitamins or minerals. They should minimize negative effects of solar radiation and moisture. Thus, edible coatings and films may contribute to the increasing of the quality and safety of food. The development of edible packaging may be a beneficial and over time, an indispensable alternative to synthetic packaging for inter alia economic and health reasons. Biodegradable edible coatings are more and more often used in many sectors of the food industry in order to reduce both the number of unit packaging and the growing amounts of environment polluting waste. As regards food coatings, new solutions are still sought that would make it possible to produce coatings with the expected functional properties. Antimicrobial substances or nanomaterials included in edible coatings might increase the area of applications thereof and determine the acceptance of such products by consumers. Currently intensive scientific studies are carried out in order to develop effective methods of producing edible coatings and films and to modify their functional properties. In the paper, there were presented profiles of the hitherto used and novel film-

forming materials. The methods of their production were characterised as were their applications in the food industry.

Key words: food coating, edible coatings, edible films, food quality ☒



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU



Polskie Towarzystwo Technologów Żywności
Oddział Wrocławski

zaprasza na

**XXV Jubileuszową
Sesję Naukową Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ
„Przyszłość w żywności – żywność w przyszłości”**

oraz

**VIII International Session of Young Scientific Staff
„The future in food - food in the future”**

Wrocław, 20-21 maja 2021 r.

Informacje: <https://smkn2020.wordpress.com>
Kontakt: dr inż. Anna Kancelista
tel. (71) 320-77-73 / (71) 320-51-83
e-mail: xxvsmknwroclaw@gmail.com

MAŁGORZATA ROBAK, KLAUDIA SZCZEPAŃSKA,
MAGDALENA RAKICKA-PUSTUŁKA, MAŁGORZATA SEROWIK,
ADAM FIGIEL

BIOSYNTETA I SUSZENIE ROZPYŁOWE INWERTAZY Z DROŻDZY *YARROWIA LIPOLYTICA*

Streszczenie

Inwertaza jest ważnym enzymem powszechnie stosowanym w przemyśle spożywczym, zwłaszcza w cukiernictwie. Dostępne na rynku preparaty inwertazy zawierają enzym uzyskany z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci płynnej. Poszukiwanie nowych źródeł inwertazy oraz uzyskanie bardziej stabilnych preparatów (proszków) może korzystnie zwiększyć ofertę dla przemysłu spożywczego. Do otrzymania sproszkowanych preparatów enzymatycznych stosuje się liofilizację, suszenie fluidyzacyjne, a nawet suszenie rozpyłowe.

Celem pracy była ocena procesu biosyntezy inwertazy z glicerolu przez genetycznie zmodyfikowany polski szczep *Yarrowia lipolytica* oraz otrzymanie suszonego rozpyłowo preparatu tego enzymu. Biosyntezę enzymu wydzielanego przez drożdże prowadzono w trzech niezależnych procesach bioreaktorowych (H1, H2 i H3) z glicerolem jako głównym źródłem węgla. Z jednego bioreaktora uzyskano od 15926 do 40710 jednostek inwertazy (U) o aktywności właściwej $96,8 \div 645,6$ U/mg białka. Do suszenia rozpyłowego przeznaczono 3690 ml zmieszanego płynu pohodowlanego o aktywności właściwej wynoszącej 263,4 U/mg białka. W procesie suszenia rozpyłowego z dodatkiem 1 % metylocelulozy otrzymano 198,12 g proszku o aktywności właściwej 113,4 U/mg białka. Inwertaza z *Y. lipolytica* w postaci proszku wykazywała niższe optimum pH i temperatury niż enzym natywny oraz była bardziej termostabilna. W zastosowanych warunkach suszenia rozpyłowego inwertaza utraciła 67 % aktywności i dlatego w dalszym postępowaniu należy przeprowadzić badania nad optymalizacją parametrów suszenia.

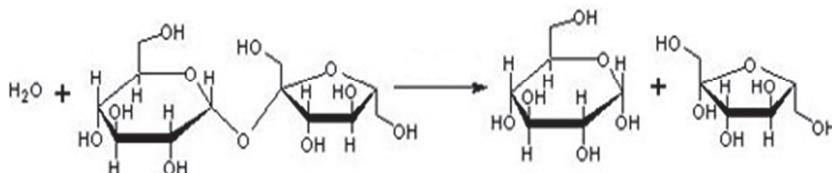
Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, inwertaza, suszenie rozpyłowe, biosynteza

Wprowadzenie

Inwertaza według międzynarodowej klasyfikacji enzymów jest β -fruktofuranozydazą (nazywaną także sacharazą, fruktohydrolazą czy beta-sukrazą) o nume-

Prof. dr hab. M. Robak, mgr inż. K. Szczepańska, dr inż. M. Rakicka-Pustułka, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, dr inż. M. Serowik, prof. dr. hab. inż. A. Figiel, Instytut Inżynierii Rolniczej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław. Kontakt: malgorzata.robak@upwr.edu.pl

rze EC 3.2.1.26. Hydrolizuje sacharozę – podstawowy energetyczny zapasowy materiał roślin – do fruktozy i glukozy (rys. 1), a w odpowiednich warunkach prowadzi także syntezę polimerów fruktozowych (fruktanów), przyłączając kolejne cząsteczki fruktozy do powstającego łańcucha sacharydowego [1].



Rys. 1. Hydroliza sacharozy do glukozy i fruktozy przez invertazę

Fig.1. Hydrolysis of sucrose to glucose and fructose by invertase

Enzym ten jest szeroko rozpowszechniony w świecie, a jego fizjologiczne znaczenie wciąż jest badane [5]. Za najlepiej poznaną invertazę, zarówno pod względem budowy białka, jak i ekspresji kodujących ją genów, uważa się tę pochodzącą z drożdży *Sacharomyces cerevisiae*. Drożdże te wyposażone są w geny kodujące invertazę, znane pod ogólną nazwą SUC, tworzące rozproszoną rodzinę sześciu reprezentantów: SUC1-SUC5 oraz SUC-7. Najważniejszy z nich to gen SUC2, a efektem jego ekspresji są dwie formy białka: wewnętrzna invertaza glikozylowana zawieszona w cytozolu oraz zewnętrzna nieglikozylowana umieszczona w przestrzeni periplazmatycznej i wydzielana do środowiska. Obie formy enzymu są kodowane przez ten sam gen (SUC2), ale proces translacji rozpoczyna się z dwóch różnych kodonów starterowych [3]. Zewnętrzna invertaza otrzymuje dodatkowe dwa aminokwasy pełniące funkcję sekwencji sygnałowej, które wspomagają przedostanie się białka do przestrzeni periplazmatycznej, gdzie ulega agregacji do tetrameru, heksameru lub oktameru, wszystkie o tej samej aktywności enzymatycznej [21]. Gen SUC2 z *S. cerevisiae* wklonowano do genomu innych drobnoustrojów, w tym niekonwencjonalnych drożdży *Yarrowia lipolytica* [13, 26]. Taki zabieg umożliwia uzyskanie preparatu invertazy z tańszych substratów, np. glicerolu.

Inwertaza jest ważnym enzymem powszechnie stosowanym w przemyśle spożywczym, zwłaszcza w cukiernictwie. Używana jest do produkcji nadziewanych pomadek (likierowych, kremowych, śmietanowych), sztucznego miodu oraz syropu glukozowo-fruktozowego [6]. Dostępne na rynku preparaty invertazy zawierają enzym z drożdży *S. cerevisiae* w postaci płynnej, jednak możliwe jest stosowanie tych preparatów w postaci proszku. Sproszkowane preparaty enzymatyczne do celów spożywczych otrzymuje się m.in. w procesach liofilizacji, suszenia fluidyzacyjnego czy suszenia rozpyłowego.

Suszenie rozpyłowe, zwane inaczej suszeniem rozpryskowym, stosuje się do utrwalania żywności, w produkcji polimerów, proszków metali, farmaceutyków oraz preparatów enzymatycznych [16, 19, 28]. Ta metoda suszenia zmniejsza ilość wody zawartej w produkcie poprzez czynnik suszący, jakim jest gorące powietrze ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Suszenie rozpyłowe było stosowane już w 1920 r. do suszenia mleka, a w latach 1938 - 1944 opracowano proces otrzymywania tą metodą kawy rozpuszczalnej [23, 24]. Gotowy susz może być przechowywany nawet do kilku lat.

Celem niniejszej pracy było uzyskanie suchego preparatu inwertazy z drożdży *Yarrowia lipolytica* jako alternatywnego enzymu na potrzeby przemysłu spożywczego.

Materiał i metody badań

W badaniach używano szczepu drożdży *Yarrowia lipolytica* A-101-B56-5, otrzymanego na drodze genetycznej transformacji polskiego szczepu dzikiego *Y. lipolytica* A-101 ekspresyjną kasetą drożdżową zawierającą gen SUC2 pod kontrolą promotora XPR2 [26]. W szczepie tym znajdują się dwa tandemowo powtórzone geny SUC2 [8].

Drożdże przeznaczone do zaszczepiania bioreaktora namnażano w podłożu inokulacyjnym zawierającym w 1 l: 50 g źródła węgla (glukozy lub glicerolu), 1,5 g NH_4Cl , 1 g YE, 1 g peptonu oraz 0,03 g tiaminy. Hodowle inokulacyjne prowadzono w 50 ml podłoża w kolbach o pojemności 250 ml w temp. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, przez 48 h, przy 170 rpm w wytrząsarce G10 Gyrotary Shaker (Gyrotary, USA). Hodowle produkcyjne prowadzono w bioreaktorze Biostat B Plus (o objętości 5 l, Sartorius, Niemcy) w 2 l podłoża, przy czym w 1 l podłoża znajdowało się: 100 g glicerolu, 1,5 g NH_4Cl , 1 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g KH_2PO_4 , 0,3 g YE oraz 0,03 g tiaminy. Proces przebiegał w temp. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 48 h, przy obrotach 800 rpm i napowietrzaniu – 0,36 vvm. Inokulum stanowiło 10 %.

Podczas prowadzenia tych procesów pobierano próbki i oznaczano zawartość glicerolu, kwasu cytrynowego, arabitolu i mannitolu oraz oznaczano aktywność inwertazy i zawartość białka zgodnie z metodyką opisaną niżej. Hodowle prowadzono do wyczerpania glicerolu (źródła węgla). Próbki do badań pobierano co 10 h – szczegółowy czas ich pobierania podano na wykresach. Analizom poddawano płyn pochodzący otrzymany po odwirowaniu komórek drożdżowych przy 4000 rpm przez 15 min w wirówce z chłodzeniem Sigma 3-16K (Polygen, Niemcy).

Dla porównania aktywności inwertazy produkowanej przez niekonwencjonalne drożdże *Y. lipolytica* stosowano także enzym z *S. cerevisiae*. Materiałem wyjściowym był handlowy preparat drożdży piekarskich, którego 100 g rozpuszczano w 1 l 0,1 M roztworu sody oczyszczonej i inkubowano: w temp. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h, a następnie przez kolejne 24 h w temp. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po inkubacji próbkę odwirowywano w wirówce z chłodzeniem Sigma 3-16K (Polygen, Niemcy) przy 5500 rpm przez 30 min i zagęsz-

czano przy użyciu membrany o punkcie odcięcia $50 \cdot 10^3$ Da (Milipore Labscale TM TFF System, Niemcy).

Płyn pochodzący z trzech procesów bioreaktorowych (H1, H2 i H3) o objętości 3690 ml poddano suszeniu. Do płynu zawierającego inwertazę jako nośnik dodano 1 % metylocelulozy w odniesieniu do suchej substancji. Proces suszenia rozpyłowego prowadzono w suszarce Anhydro Lab 1 (Anhydro, Søborg, Dania) w temp. wlotowej 125°C i wylotowej -75°C , przy szybkości podawania preparatu wynoszącej 35 ml/min, czyli 2100 ml/h i ciśnieniu w dyszy – 1,5 atm.

Białko oznaczano kolorymetryczną metodą Lowry'ego [10]. Oznaczanie aktywności inwertazy polegało na pomiarze uwolnionych cukrów redukujących z użyciem odczynnika DNS [17]. Jednostkę enzymatyczną inwertazy wyrażano jako ilość enzymu uwalniającego 1 μmol cukru redukującego w ciągu 1 min, w określonych warunkach reakcji. Substratem była sacharoza (0,1 M roztwór w wodzie destylowanej), reakcję prowadzono w 0,1 M buforze octanowym o pH 4,5. Do wyznaczenia optimum pH zastosowano 0,1 M bufor octanowy (zakres kwaśny) oraz 0,1 M bufor Tris-HCl (zakres zasadowy).

Zawartość glicerolu, kwasu cytrynowego oraz arabitolu i mannitolu (jako śladowych metabolitów) oznaczano metodą HPLC przy użyciu chromatografu (Beckman Gold System, USA) z kolumną Aminex HPX87H podłączoną do detektora UV (210 nm) oraz refraktometru (RI). Rozdział prowadzono w temp. $20 \pm 1^\circ\text{C}$ z 20 mM H_2SO_4 jako eluentem podawanym z szybkością 0,6 ml/min [8, 9].

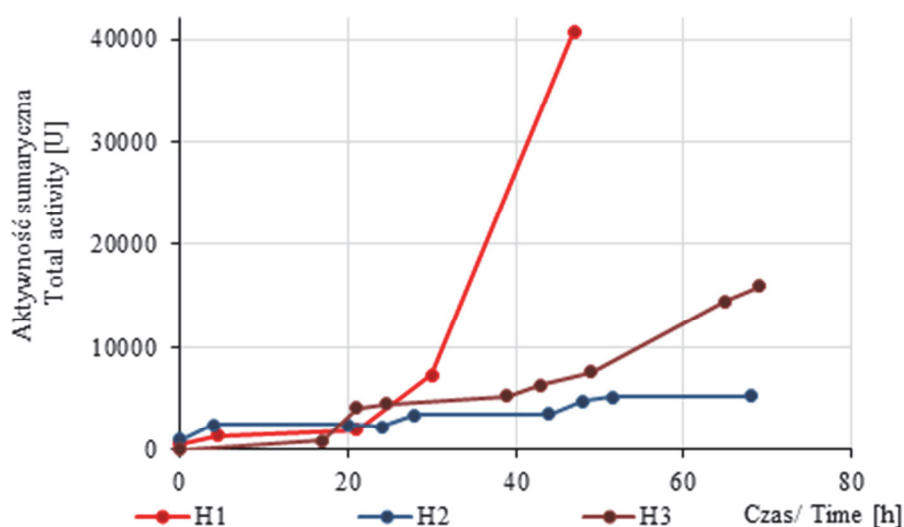
Wyniki i dyskusja

Proces biosyntezy inwertazy

Biosynteza inwertazy przez *Y. lipolytica* A-101-B56-5 w trzech hodowlach bioreaktorowych (H1, H2 i H3) przebiegała z podobną dynamiką do 30. godziny procesu, pomimo że w procesie H1 oraz H3 zastosowano inokulum przygotowane w podłożu z glicerolem, a w H2 – w podłożu z glukozą. Po tym czasie w procesie H1 nastąpił gwałtowny przyrost aktywności, czego nie obserwowano w dwóch pozostałych procesach (rys. 2). Aktywność całkowita inwertazy płynu pochodzącego H1 wynosiła 40709,9 U i była prawie siedmiokrotnie wyższa niż w procesie H2 (5216,1 U) oraz ponad dwukrotnie wyższa niż w procesie H3 (15 925,9 U). Wydajność biosyntezy inwertazy w odniesieniu do zastosowanego substratu wynosiła: 428,5 U/g (H1), 69,5 U/g (H2) i 177 U/g (H3), a w odniesieniu do biomasy: 1929,4 U/g (H1), 427,5 U/g (H2) i 1197,4 U/g (H3).

Całkowita zawartość białka w płynie pochodzącym z tych procesów była największa w 20. godzinie i wynosiła $80 \div 140$ mg. Po zakończeniu procesów całkowita zawartość białka w płynach pochodzących była mniejsza, wynosiła $56 \div 62$ mg. Na

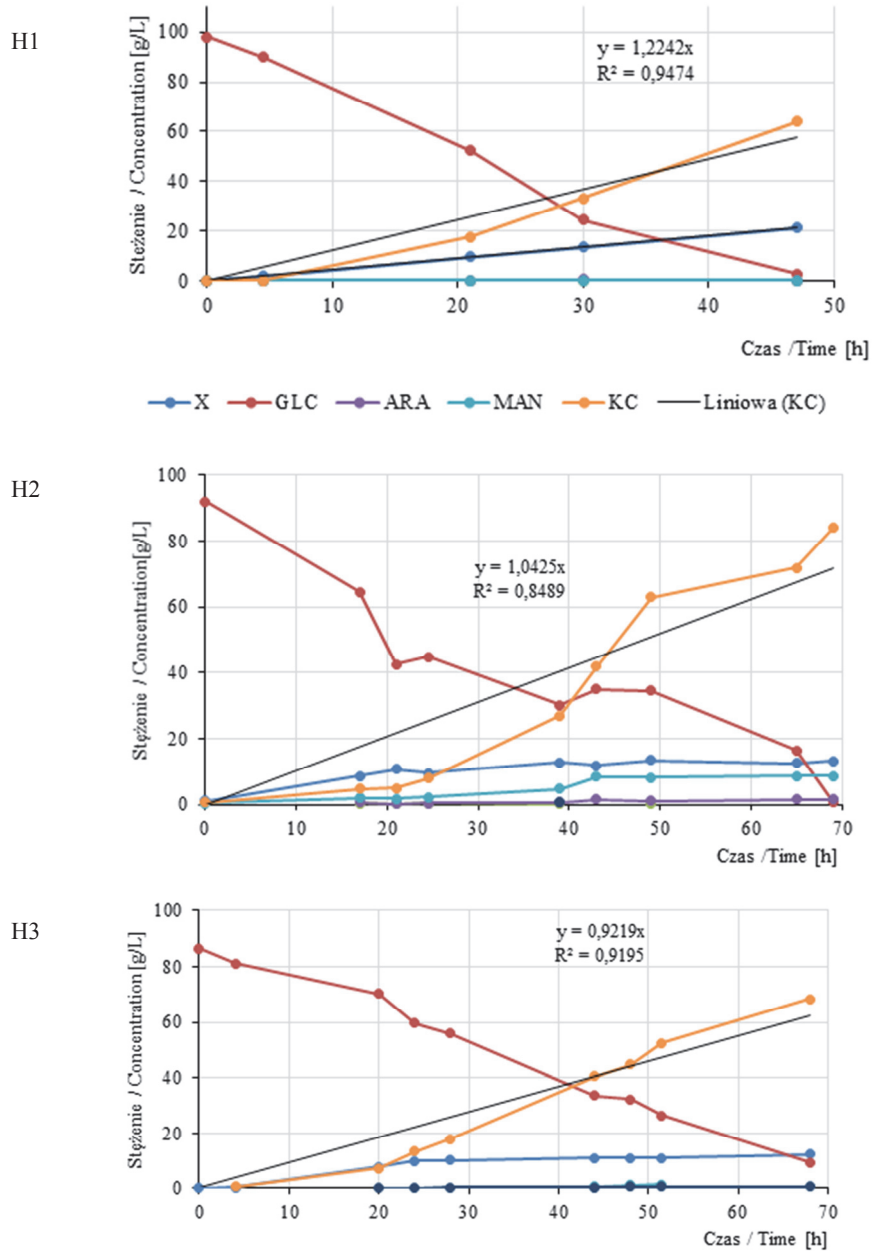
podstawie wartości aktywności oraz zawartości białka obliczono aktywność właściwą poszczególnych prób w czasie procesów. Najwyższą aktywność właściwą inwertazy stwierdzono w płynie pochodzącym z hodowli H1 (645,62 U/mg białka), ponad dwukrotnie wyższą niż w procesie H3 (243,97 U/mg białka) i ponad sześciokrotnie wyższą niż w H2 (96,79 U/mg białka). Jednocześnie w płynach pochodzących z hodowli otrzymano kwas cytrynowy. Przebieg biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5 śledzono na podstawie przyrostu stężenia metabolitów i biomasy oraz ubytku substratu (rys. 3).



Rys. 2. Aktywność inwertazy w płynie po hodowlach: H1, H2 i H3

Fig. 2. Activity of invertase in post-culture liquids in: H1, H2 and H3

Zaobserwowana różnica szybkości wykorzystania glicerolu mogła być związana z tym, że inokula były przygotowywane w oddzielnych partiach i różniły się źródłem węgla. W procesie H1 oraz H3 zastosowano inokulum przygotowane w podłożu z glicerolem, a w H2 – w podłożu z glukozą. Przyrost biomasy w procesie H1 był bardziej dynamiczny szczególnie po 30 h i ostatecznie doprowadził do uzyskania prawie dwa razy większego plonu biomasy niż w H2 i H3. Pomimo różnic pod względem zawartości biomasy i szybkości wykorzystania glicerolu w hodowlach H1 i H2 uzyskano podobne stężenie kwasu cytrynowego i pozostałych metabolitów. W procesie H3 uzyskano najwyższe stężenie kwasu cytrynowego (84 g/l), prawie o 27 % wyższe niż w pozostałych dwóch hodowlach. Tak dużej różnicy nie obserwowano podczas porównania równań opisujących proces biosyntezy cytrynianu (rys. 3). Równania opisujące przyrost kwasu w czasie są bardzo podobne i w warunkach jego biosyntezy



Objaśnienia / Explanatory notes:

X – biomasa / biomass, GLC – glicerol / glycerol, ARA – arabitol / arabitol, MAN – mannitol / mannitol, KC – cytrynian / citrate.

Rys. 3. Stężenie glicerolu i metabolitów, w tym kwasu cytrynowego, podczas procesów H1, H2 i H3

Fig. 3. Concentration of glycerol and metabolites including citric acid during H1, H2 and H3 processes

z glicerolu przez szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5 można przyjąć, że przyrost jest liniowy zgodny z równaniem $y = 1,095x$, gdzie: y – stężenie cytrynianu, x – czas. Zanieczyszczenie pozostałymi metabolitami było małe i sumarycznie nie przekraczało 20 g/l w każdym z procesów. Płyny pochodzące z procesów H1 (1 l), H2 (1 l) i H3 (2,2 l) zmieszano i otrzymano 4200 ml preparatu zawierającego inwertazę, białko i kwas cytrynowy. Sumaryczna zawartość inwertazy wynosiła 35196 U, białka – 133,6 mg, a kwasu cytrynowego – 294 g. Zmieszany płyn pochodzący cechowała aktywność właściwa inwertazy wynosząca 263,44 U/mg białka.

Proces suszenia rozpyłowego

Do suszenia rozpyłowego pobrano 3690 ml zmieszanego płynu pochodzącego zawierającego 30922,2 U inwertazy, 117,38 mg białka oraz 277 g cytrynianu. W procesie suszenia, do którego dodano metylocelulozę w ilości 36,9 g, otrzymano 198,12 g proszku. Około 161 g proszku pochodziło z zawartych w płynie metabolitów (kwasu cytrynowego i innych substancji oraz wydzielonych białek). Na podstawie ilości otrzymanego proszku i ilości kwasu cytrynowego zawartego w zmieszonym płynie należy zwrócić uwagę na utratę podczas suszenia prawie 50 % kwasu.

W otrzymanym proszku oznaczono aktywność inwertazy. W tym celu naważono 5 próbek o masie 50 mg każda, a następnie rozpuszczono w 1 ml wody i przeprowadzono analizę. Otrzymane wyniki przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Aktywność inwertazy w próbkach suszonego preparatu inwertazy
Table 1. Activity of invertase in samples of spray-dried invertase preparation

| Nr próbki Sample No. | Aktywność inwertazy / Activity of invertase | | |
|-------------------------|---|------------------------------------|----------------------------------|
| | [U] | [U/mg białka] [U/mg of protein] | [U/g proszku] [U/g of powder] |
| 1 | 8 052,98 | 78,68 | 40,647 |
| 2 | 13 690,46 | 133,76 | 69,10 |
| 3 | 13 287,25 | 129,82 | 67,07 |
| 4 | 13 518,94 | 132,09 | 68,24 |
| 5 | 9 457,94 | 92,41 | 47,74 |
| $\bar{X} \pm SD$ | 11 601,51 \pm 2 649,00 | 113,35 \pm 25,88 | 58,56 \pm 13,37 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

\bar{X} – wartość średnia / mean value, SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

Odchylenie standardowe pomiarów było bliskie 23 %, ale odzyskana aktywność inwertazy wynosiła 11601,51 U, czyli 33 %. Aktywność właściwa połączonych płynów pochodzących wyniosła 263,44 U/mg białka, a preparatu suszonego – 113,35 U/mg białka. Wartości te są zatem wzajemnie zgodne, gdyż w przeliczeniu

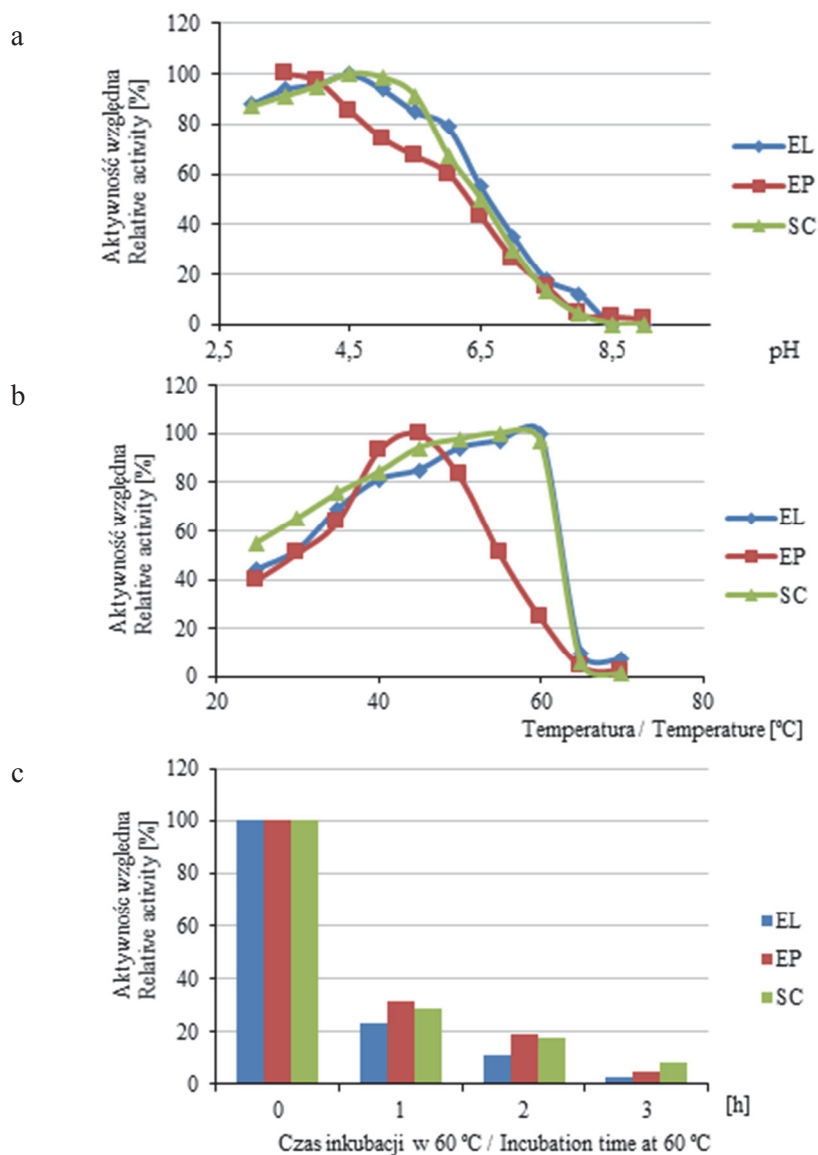
odzyskano 87,3 % wprowadzonej ilości białka. Zawartość białka w suszonym preparacie wynosiła 0,517 mg/g proszku, co sumarycznie stanowi 102,43 mg ze 117,38 mg poddanych suszeniu. Świadczy to jednoznacznie o utracie aktywności inwertazy podczas suszenia rozpyłowego.

Charakterystyka suszonego preparatu inwertazy

Optimum pH enzymu w płynie (EL) oraz enzymu w proszku (EP) zawierało się w zakresie pH kwaśnego, chociaż wartości nieznacznie się różniły. Optymalne dla EP było pH 3,5 a dla EL – pH 4,5 (rys. 4a). Jeszcze większą różnicę zaobserwowano pod względem optymalnej temperatury hydrolizy sacharozy przez preparaty inwertazy. Optimum temperatury EL wynosiło 60 °C, a EP – 45 °C, czyli było zdecydowanie niższe (rys. 4b). W obu przypadkach w temp. 65 °C obserwowano niską aktywność inwertazy, poniżej 10 % wartości optymalnej. Termostabilność inwertazy w obu preparatach była podobna w temp. 20 oraz 40 °C. Inwertaza nie traciła aktywności podczas 3-godzinnego przetrzymywania w tych warunkach. Natomiast w temp. 60 °C enzym w proszku był bardziej stabilny. Po 2 h inkubacji jego aktywność była dwa razy wyższa niż w preparacie płynnym.

Trzy procesy (H1, H2 i H3) biosyntezy inwertazy przez szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5 przeprowadzono w dwóch wariantach różniących się inokulum. We wszystkich wariantach w bioreaktorze użytym źródłem węgla był glicerol, podczas gdy w hodowli inokularnej wykorzystano glicerol (H1 oraz H3) lub glukozę (H2). Glukoza zastosowana w hodowli inokularnej procesu H2 (i obecna jeszcze na początku kultury w bioreaktorze) mogła być przyczyną uzyskania najmniejszej aktywności inwertazy (2,61 U/ml). Niską aktywność inwertazy obserwowali także Żubrowski i wsp. [29] po użyciu sacharozy do biosyntezy inwertazy. Pomimo zastosowania tego samego szczepu drożdży *Y. lipolytica* uzyskana aktywność płynów pohodowlanych była kilkakrotnie niższa (0,063 U/ml). Po zastosowaniu optymalizowanych podłoży z sacharozą aktywność inwertazy była natomiast kilkakrotnie większa, wynosiła od 1,75 do 14 U/ml [9]. W procesach badanych w niniejszej pracy i prowadzonych wyłącznie w obecności glicerolu uzyskano podobną aktywność inwertazy wynoszącą 8,0 U/ml (H3) i 20,35 U/ml (H1), a w przeliczeniu na 1 l – 8 ÷ 20 tysięcy U. Zatem glicerol jako tanie i odpadowe źródło węgla może również być wykorzystany do biosyntezy zewnątrzkomórkowej inwertazy wydzielanej przez genetycznie zmodyfikowany szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5. Uzyskana ilość enzymu jest porównywalna do ilości enzymu otrzymywanego z innych źródeł. Oyedeji i wsp. [14] w hodowli ze skórką z ananasa jako tanim substratem i przy użyciu grzybów *Aspergillus niger* IBK1 uzyskali zbliżoną zawartość inwertazy. Prawie 10 razy wyższą aktywność inwertazy wykazali natomiast Qureshi i wsp. [15] w doświadczeniu z drożdżami *S. cerevisiae* Angel. W hodowli wytrząsanej w medium z syropem daktylowym szczep wydzielił inwertazę

w ilości 190000 U/l. Jest to najwyższa wartość odnotowana podczas biosyntezy zewnętrzkomórkowej inwertazy.



Rys. 4. Optimum pH (a), optimum temperature (b) i termostabilność w temp. 60 °C (c) inwertazy z *Y. lipolytica* w płynie (EL), w proszku (EP) oraz inwertazy z *S. cerevisiae* (SC)

Fig. 4. pH optimum (a), temperature optimum (b) and thermo-stability at 60 °C (c) of invertase from *Y. lipolytica* in form of liquid (EL), powder (EP) and invertase from *S. cerevisiae* (SC)

Dodatkowym atutem prowadzonych procesów z udziałem *Y. lipolytica* jest jednoczesna biosynteza kwasu cytrynowego. We wszystkich trzech procesach uzyskano cytrynian w znacznych ilościach – $64 \div 84$ g/l. Szybkość biosyntezy tego kwasu też była duża, w zakresie $1 \div 1,3$ g/l/h, a szybkość właściwa – $0,064 \div 0,091$ g/g/h (w przeliczeniu na biomase). Duża też była wydajność z substratu, wynosiła 93 %. Podobne wyniki dotyczące gromadzenia kwasu cytrynowego w podłożu z glicerolem lub sacharozą otrzymali Lazar i wsp. [8, 9], Rymowicz i wsp. [20] oraz Morgunov i wsp. [12]. Największe stężenie cytrynianu nagromadzanego przez ten gatunek drożdży uzyskali Rakicka i wsp. [18].

Po porównaniu wyników uzyskanych w badaniach własnych z wynikami innych naukowców można wnioskować o celowości wykorzystania glicerolu jako źródło węgla w hodowli drożdży *Y. lipolytica* A-101-B56-5 ukierunkowanej na jednoczesną produkcję kwasu cytrynowego i inwertazy. Dodatkowym atutem hodowli na glicerolu jest brak pozostałości cukrów redukujących, istotnie interferujących z pomiarem aktywności enzymu oraz z suszeniem.

Kolejnym etapem pracy było suszenie rozpyłowe płynu zawierającego inwertazę z użyciem nośnika w postaci metylocelulozy. Wykazano zmniejszenie aktywności enzymu sięgające 67 % wobec płynu pochodzącego z jednoczesnym odzyskiem białka na poziomie 87,3 %. Obniżenie aktywności enzymu odnotowali również Yoshii i wsp. [27], którzy w badaniach prowadzonych nad suszeniem rozpyłowym dehydrogenazy alkoholowej uznali wartość temperatury wlotowej i wylotowej za ważny czynnik zachowania aktywności enzymu. Podczas podwyższania temperatury powietrza wlotowego z 70 do 83 °C odnotowali 40-procentowe obniżenie aktywności enzymatycznej. Samborska i wsp. [22] podczas suszenia α -amylazy otrzymanej z grzybów *Aspergillus oryzae* przy zastosowaniu przepływu 0,8 i 1,2 ml/s oraz temp. 200 °C uzyskali wzrost aktywności enzymu. Po zastosowaniu tej samej temperatury, ale przy zmniejszeniu szybkości podawania płynu uzyskano preparat o niższej aktywności. Najprawdopodobniej było to spowodowane dłuższym czasem oddziaływania wysokiej temperatury na enzym, przy zwiększonej szybkości czas ten był krótszy. Inaczej do badań nad suszeniem rozpyłowym enzymów podeszli Miliqvist-Fureby i wsp. [11], którzy jako główną zmienną wybrali nośnik enzymu. Zmieszali trypsynę z różnymi węglowodanami: laktozą, sacharozą, mannitolem, α -cyklodekstryną i dekstryną, a następnie poddali mieszaniny suszeniu rozpyłowemu. Sacharoza i mannitol okazały się mniej wydajne niż pozostałe węglowodany, jednak nawet w najmniej korzystnym przypadku aktywność resztkowa trypsyny wynosiła ponad 80 %. Ponadto stwierdzono silną akumulację białka na powierzchni węglowodanów, którą można kontrolować poprzez dodatek niejonowego środka powierzchniowo czynnego. Jak wynika z powyższych badań, jest wiele czynników mających wpływ na utrzymanie bądź zwiększenie aktywności enzymatycznej wysuszonych preparatów. Powodem utraty aktywności

inwertazy w badaniach własnych może być źle dobrana temperatura procesu lub użycie nieodpowiedniego nośnika. Może to być też specyfika enzymu. Lipaza z drożdży *Y. lipolytica* nie traciła aktywności enzymatycznej podczas suszenia rozpyłowego w identycznych warunkach (dane niepublikowane). Parametry procesu, takie jak: temperatura powietrza wlatującego i wylatującego, intensywność podawania surowca do rozpylacza oraz ciśnienie powietrza w rozpylaczu mają wpływ na jakość końcowego produktu. W celu uzyskania bardziej korzystnych właściwości suszonych proszków, proces można poddawać modyfikacji, np. zmieniać temperaturę suszenia bądź prędkość podawania surowca do komory suszącej [24].

Suszony preparat inwertazy zbadano w celu wyznaczenia optimum pH, temperatury oraz stabilności białka. Najwyższą aktywność enzymatyczną suchego preparatu wykazano w pH 3,5, a płynnego – w pH 4,5. Enzym badany w niniejszej pracy zaliczany jest do kwaśnych inwertaz o optimum pH w zakresie 3,5 ÷ 5. Odrębną grupą są inwertazy zasadowe bądź neutralne. Badacze obecnie poszukują zupełnie innych źródeł inwertazy. Ciekawym przykładem jest inwertaza, którą uzyskali Guo i wsp. [7] z jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*). Maksymalną aktywność inwertazy o nazwie Bmsuc1 obserwowano w pH 7 i pH 8, przy czym zauważono wyższą wrażliwość enzymu na wzrost pH powyżej wartości optymalnej niż przy przejściu do bardziej kwaśnego środowiska.

Optymalna temperatura aktywności inwertazy zawartej w suszonym preparacie wyniosła 45 °C, a płynnego enzymu – 55 °C. Odwrotne wyniki otrzymali Danisman i wsp. [4] podczas badań nad kowalencyjnie unieruchomioną na membranie (pHEMA-GMA) inwertazą pozyskaną z grzybów *Aspergillus niger*. Badacze określili optimum temperatury aktywności inwertazy immobilizowanej na poziomie 55 °C, a w przypadku wolnego enzymu – 45 °C. W przypadku rozpyłowo suszonego preparatu inwertazy w niniejszej pracy uzyskano podobne wyniki do tych, które wykazali Bayramoglu i wsp. [2] w badaniach nad enzymem immobilizowanym na nanocząstkach magnetycznych. Unieruchomiona forma enzymu okazała się również bardziej stabilna w wyższej temperaturze niż jej wolny odpowiednik. Aktywność inwertazy zawartej w proszku (otrzymanym w wyniku suszenia rozpyłowego) i przetrzymywanej przez 2 h w temp. 65 °C wynosiła prawie 20 %, a wolnej inwertazy – niecałe 10 % wyjściowej aktywności. Badania enzymu immobilizowanego na montmorylonicie K-10 podjęli Sanjay i Sugunan [25]. Unieruchomienie enzymu poprzez wiązania kowalencyjne na nośniku poprawiło jego stabilność termiczną. Tak związana inwertaza wykazywała aktywność na poziomie 70 %, podczas gdy wolny enzym po półtorej godziny wykazywał jedynie 10 % początkowej aktywności. Niestety takiej poprawy termostabilności inwertazy nie obserwowano w badaniach własnych w odniesieniu do suszonego rozpyłowo preparatu enzymu z *Y. lipolytica*. Zwiększenie termostabilności enzymu wymaga

dalszych badań nad optymalizacją parametrów suszenia. Badania te mogłyby też przyczynić się do zwiększenia wydajności suszenia.

Wnioski

1. Glicerol jako tanie i odpadowe źródło węgla może być użyty do biosyntezy zewnątrzkomórkowej inwertazy wydzielanej przez genetycznie zmodyfikowany szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5.
2. Po zastosowaniu suszenia rozpyłowego uzyskano inwertazę wykazującą podwyższoną termostabilność, niższe optimum temperatury i pH.
3. W celu otrzymania preparatu sproszkowanej inwertazy o wyższej aktywności należy zoptymalizować parametry procesu suszenia rozpyłowego.

Literatura

- [1] Barbosa P.M.G., de Morais A.P., de Andrade Silva C.A., da Silva Santos F.R., Garcia N.F.L., Foneseca G.C., Leite R.S.R, da Paz M.F.: Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* for the production of fructooligosaccharides. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2018, 48 (6), 506-513.
- [2] Bayramoglu G., Doz T., Ozalp V.C., Arica M.Y.: Improvement stability and performance of invertase via immobilization on to silanized and polymer brush grafted magnetic nanoparticles. *Food Chem.*, 2017, 221, 1442-1450.
- [3] Carlson M., Botstein D.: Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, 1982, 28 (1), 145-154.
- [4] Danisman T., Tan S., Kacar Y., Ergene A.: Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA-GMA membranę. *Food Chem.*, 2004, 85 (3), 461-466.
- [5] Deng S., Mai Y., Niu J.: Fruit characteristics, soluble sugar compositions and transcriptome analysis during the development of *Citrus maxima* "seedless", and identification of SUS and INV genes involved in sucrose degradation. *Gene*, 2019, 689, 131-140.
- [6] Enzyme Development Corporation: Enzeco invertase use in confections. [on line]. Dostęp w Internecie [06.12.2020]: <http://www.enzymedevelopment.com/wp-content/uploads/2011/10/Invertase-use-in-Confections-first-rev-01-05-04.pdf>
- [7] Guo. P.C., Wang Q., Wang Z., Dong Z., He H., Zhao P.: Biochemical characterization and functional analysis of invertase Bmsuc1 from silkworm, *Bombyx mori*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 107(B), 2334-2341.
- [8] Lazar Z., Walczak E., Robak M.: Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Biores. Technol.*, 2011, 102 (13), 6982-6989.
- [9] Lazar Z., Żubrowski D., Korzun-Chłopicka U., Robak M.: Recombinant strain of *Yarrowia lipolytica* in simultaneous biosynthesis of citrate and invertase from sucrose. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia*, 2016, 15(3), 25-35.
- [10] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193 (1), 265-275.
- [11] Millqvist A., Malmsten M., Bergenstahl B.: Spray-drying of trypsin – surface characterisation and activity preservation. *Int. J. Pharm.*, 1999, 188 (2), 243-253.

- [12] Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N.: Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast on different renewable raw materials. *Fermentation*, 2018, 4 (2), #36.
- [13] Nicaud J.-M., Fabre E., Gaillardin C.: Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.*, 1989, 16, 253-260.
- [14] Oyedeji O., Bakare M.K., Adewale I.O., Olutiola P.O., Omoboye O.: Optimized production and characterization of thermostable invertase from *Aspergillus niger* IBK1, using pineapple peel as alternate substrate. *Biocat. Agric. Biotechnol.*, 2017, 9, 218-223.
- [15] Qureshi A.S., Khushk I., Ali A.H., Majeed H., Ahmad A.: Production of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* Angel using date syrup as a cost effective carbon source. *Afr. J. Biotechnol.*, 2017, 16 (15), 777-781.
- [16] Parikh D.: Advances in spray drying technology: New applications for a proven process. *Am. Pharm. Rev.*, 2008, 11(1).
- [17] Piegza M., Jurkiewicz M., Kancelista A., Łaba W., Witkowska D.: Moulds lytic enzymes in the production of *Yarrowia* high-protein feed additives. *EJPAU*, 2015, 18(4), #04.
- [18] Rakicka M., Wolniak J., Lazar Z., Rymowicz W.: Production of high titer of citric acid from inulin. *BMC Biotechnology*, 2019, 19, #11.
- [19] Rosiński M., Piasecka-Kwiatkowska D., Warchalewski J.R.: Przegląd metod separacji i oczyszczania białek przydatnych w badaniach i analizie żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, 3 (44), 5-22.
- [20] Rymowicz W., Rywińska A., Żarowska B., Juszczyk P.: Citric acid production from crude glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.*, 2006, 60, 391-394.
- [21] Sainz-Polo M.A., Ramirez-Escudero M., Lafraya A., Gonzalez B., Marin-Navarro J., Polaina J., Sanz-Aparicio J.: Three-dimensional structure of *Saccharomyces* invertase, role of a non-catalytical domain in oligomerization and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288 (14), 9755-9766.
- [22] Samborska K., Witrowa-Rajchert D., Goncalves A.: Spray-drying of α -amylase – the effect of process variables on the enzyme inactivation. *Drying Technology*, 2007, 4 (23), 941-953.
- [23] Samborska K.: Suszenie rozpyłowe w przemyśle spożywczym. *Post. Techn. Przetw. Spoż.*, 2008, 1, 63-69.
- [24] Samborska K.: Suszenie rozpyłowe enzymów – przyczyny inaktywacji oraz metody i mechanizmy ich stabilizacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 6 (73), 7-17.
- [25] Sanjay G., Sugunan S.: Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chem.*, 2004, 9 (4), 573-579.
- [26] Walczak E., Robak M., Mauesberger S.: Gene disruption, transformants selection and physiological properties of *Yarrowia lipolytica* A-101 clones. *BIOTRANS*, Oviedo, Spain, 8-13 July 2007, poster.
- [27] Yoshii H., Buche F., Tekeuchi N., Terrol C., Ohgawara M., Furuta T.: Effects of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying. *J. Food Eng.*, 2007, 87 (1), 34-39.
- [28] Zhang S., Lei H., Gao X., Xiong X., Wu W.D., Wu Z., Chen X.D.: Fabrication of uniform enzyme-immobilized carbohydrate microparticles with high enzymatic activity and stability via spray drying and spray freeze drying. *Powder Technology*, 2018, 330, 40-49.
- [29] Żubrowski D., Lazar Z., Robak M.: Optymalizacja składu podłoża z sacharozą do biosyntezy cytrynianu oraz inwertazy przez *Yarrowia lipolytica* A-101-B56-5 w warunkach hodowli stacjonarnych w mikroanalizatorze Bioscreen C. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia*, 2013, 12 (3), 31-40.

BIOSYNTHESIS AND SPRAY-DRYING OF INVERTASE FROM *YARROWIA LIPOLYTICA*

S u m m a r y

Invertase is an important enzyme commonly used in the food industry, especially in the confectioners' trade. Invertase preparations available on the market contain the enzyme from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in a liquid form. The search for new sources of invertase and the obtainment of more stable preparations (powders) may favourably increase the offer for the food industry. Lyophilisation, fluid bed drying and even spray-drying are used to obtain powdered enzyme preparations.

The objective of the research study was to evaluate the process of invertase biosynthesis by a genetically modified Polish *Yarrowia lipolytica* strain from glycerol and to produce a powder of this enzyme by spray-drying. The biosynthesis of the enzyme secreted by yeast was conducted in three independent bioreactor cultures (H1, H2 and H3) with glycerol as the main carbon source. In one bioreactor culture there were obtained 15926 to 40710 invertase units (U) of a specific activity ranging 96.8 ÷ 645.6 U/mg of protein. For spray-drying 3690 ml of mixed post-culture liquid was used; its specific activity was 263.4 U/mg of protein. During spray-drying with 1 % of methylcellulose added 198.12 g of powder was collected and its specific activity was 113.4 U/mg of protein. The powdered invertase from *Y. lipolytica* had lower pH and temperature optima than the native enzyme and was more thermostable. Under the applied conditions of spray-drying the invertase lost 67 % of the activity, thus further research should be conducted into the optimisation of spray-drying parameters.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, invertase, spray-drying, biosynthesis ☒

KATARZYNA MODRZEJEWSKA, ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS

PORÓWNANIE WYBRANYCH PARAMETRÓW MIKROBIOLOGICZNYCH I BIOCHEMICZNYCH NAPOJÓW KOMBUCHA

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie poziomu wybranych mikroorganizmów, porównanie zawartości polifenoli i antocyjanów oraz zdolności przeciwutleniającej napojów kombucha dostępnych w handlu detalicznym z napojem wytworzonym doświadczalnie metodą tradycyjną. Badania objęły 12 napojów komercyjnych oraz jeden uzyskany doświadczalnie, którego bazą była zielona herbata z 10-procentowym dodatkiem sacharozy. W badanych produktach oznaczono: liczbę bakterii *Acetobacter* sp., *Gluconobacter* sp., LAB i drożdży, pH, ogólną zawartość antocyjanów, ogólną zawartość polifenoli oraz aktywność przeciwutleniającą. Aktywność przeciwdrobnoustrojową napojów kombucha oceniono metodą dyfuzyjną, z zastosowaniem kolumnienek, w stosunku do szczepów wzorcowych: *Escherichia coli* ATCC 35218, *Listeria monocytogenes* serotyp 1/2a (KMSiFZC), *Yersinia enterocolitica* (PCM 1919), *Salmonella enteritidis* (ATCC 130764), *Bacillus cereus* (PCM 2019), *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Saccharomyces cerevisiae* (ŁOCK 14), *Candida albicans* (KMSiFZC). Stwierdzono, że napoje deklarowane jako pasteryzowane (K7 - K12) były pozbawione mikroorganizmów z analizowanych grup. W pozostałych produktach komercyjnych dominującym mikroorganizmem były bakterie *Acetobacter* sp., których liczba zawierała się w przedziale $6 \times 10^6 \div 1,1 \times 10^7$ jtk/ml. W napoju doświadczalnym wykazano drożdże w ilości $6,5 \times 10^5$ jtk/ml. Odczyn pH produktów był charakterystyczny i nie przekraczał 4,3. Zawartość antocyjanów we wszystkich napojach pochodzących z handlu wahała się między $0,2 \div 0,3$ mg/dl, natomiast w próbie doświadczalnej było ich ponad dwa razy więcej. Zawartość polifenoli oraz zdolność przeciwutleniająca prób były zróżnicowane i nie stwierdzono ich korelacji z pochodzeniem produktu. Głównym czynnikiem warunkującym zdolność napojów kombucha do inhibicji bakterii potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka jest obecność kwasów organicznych. Żaden z badanych napojów nie wykazywał antagonizmu w stosunku do testowanych drożdży.

Słowa kluczowe: kombucha, fermentacja, kultura SCOBY, właściwości przeciwutleniające

Mgr inż. K. Modrzejewska, dr hab. E. Bogusławska-Wąs, prof. ZUT, Katedra Mikrobiologii Stosowanej i Fizjologii Żywienia Człowieka, Wydz. Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin.

Kontakt: katarzyna_modrzejewska@zut.edu.pl

Wprowadzenie

Tradycyjna kombucha jest przefermentowanym przez SCOBY (ang. *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) napojem powstałym na bazie słodzonej czarnej lub zielonej herbaty. Znana jest od dawna, ale dopiero w 2016 r. na rynku detalicznym pojawił się pierwszy napój – KeVita, wyprodukowany przez PepsiCo, Inc. [13]. We wrześniu 2018 r. Coca-Cola wykupiła firmę Mojo i poszerzyła swój asortyment o produkty wytwarzane przy udziale grzyba herbacianego. Wzrasta zainteresowanie fermentowaną herbatą. Szacuje się, że w 2020 r. na produkty powstałe na bazie SCOBY konsumenci wydadzą ponad 1,8 miliarda dolarów [1]. Ze względu na specyficzne walory produkty te na rynku spożywczym zaczynają konkurować z piwami bezalkoholowymi. Kombucha jako finalny produkt charakteryzuje się smakiem porównywalnym z cydrem, lekkim nagazowaniem i pH mieszczącym się w zakresie 2 ÷ 5. Jej naturalny smak często jest regulowany przez wprowadzenie octu jabłkowego, fruktozy lub koncentratów smakowych [10].

W mikrobiologicznym składzie SCOBY znajdują się przede wszystkim bakterie kwasu octowego (w tym przede wszystkim *Acetobacter* sp., *Komagataeibacter* sp. i *Gluconobacter* sp.), bakterie fermentacji mlekowej (*Lactobacillus* sp. i *Lactococcus* sp.) oraz drożdże (*Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp., *Kloeckera* sp., *Candida* sp., *Leucosporidiell* sp. i *Torulopsis* sp.). Właściwy skład kombuchy nie jest stały i zależy od wielu czynników, w tym przede wszystkim od struktury mikrobiologicznej SCOBY, substratów czy jakości wody [6, 7, 18, 19].

Kombucha jest cenionym produktem bogatym w kwasy organiczne (przede wszystkim octowy, glukuronowy, glukonowy, mlekowy), witaminy (B₁, B₂, B₆, B₁₂ i C), związki mineralne (Cu, Fr, Mn, Ni i Zn), substancje biologicznie aktywne pochodzące z herbaty, enzymy hydrolityczne i związki polifenolowe. Z tego też względu przypisuje się jej wiele prozdrowotnych cech, takich jak: obniżanie ciśnienia krwi, redukcję poziomu cholesterolu LDL, właściwości bioimmunostymulacyjne czy hepatochronne [11].

Celem pracy było określenie poziomu wybranych mikroorganizmów, porównanie zawartości polifenoli i antocyjanów oraz zdolności przeciwutleniającej napojów kombucha dostępnych w handlu detalicznym z napojem wytworzonym doświadczalnie metodą tradycyjną.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym było 12 napojów kombucha zakupionych w handlu detalicznym oraz jeden wytworzony w warunkach laboratoryjnych (tab. 1). Według deklaracji producentów napoje K1 - K6 zawierały żywe kultury SCOBY, natomiast napoje K7 - K12 zostały poddane pasteryzacji. Surowcem do produkcji napoju

Tabela 1. Charakterystyka badanych napojów kombucha

Table 1. Profile of kombucha drinks studied

| Próba Sample | Pasteryzacja Pasteurisation | Rodzaj herbaty Type of tea | Status EKO ECO status | Dodatki smakowe Flavoring additives | Środek słodzący Sweetener |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--|---|
| K1 | - | zielona green | + | naturalny aromat z ananasa natural pineapple flavour | cukier, stevia, erytrytol / sugar, stevia, erythritol |
| K2 | - | zielona green | + | naturalny aromat z wiśni, hibiskus natural aroma of cherry, hibiscus | cukier, stevia, erytrytol / sugar, stevia, erythritol |
| K3 | - | zielona green | + | brak / absent | cukier, stevia, erytrytol / sugar, stevia, erythritol |
| K4 | - | czarna black | + | brak / absent | cukier trzcinowy cane sugar |
| K5 | - | Bencha | + | brak / absent | cukier trzcinowy cane sugar |
| K6 | - | zielona green | + | brak / absent | cukier trzcinowy cane sugar |
| K7 | + | zielona green | + | pokrzywa / nettle | cukier trzcinowy cane sugar |
| K8 | + | zielona green | + | mięta / mint | cukier trzcinowy cane sugar |
| K9 | + | zielona green | + | chmiel / hop | cukier trzcinowy cane sugar |
| K10 | + | czarna black | - | kwas organiczny / organic acid | cukier / sugar |
| K11 | + | ziołowa herbal | - | ocet jabłkowy, koncentraty krokosza barwierskiego i soku czarnej marchwi, dodatek witamin B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₁₂ apple cider vinegar, concentrates of safflower and black carrot juice, the addition of vitamins B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₁₂ | fruktoza fructose |
| K12 | + | ziołowa herbal | - | ekstrakt owocowy, ocet jabłkowy, kwas mlekowy, karmel, estry glicerolu, dodatek witamin B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₁₂ fruit extract, apple cider vinegar, lactic acid, caramel, glycerol esters, the addition of vitamins B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₁₂ | fruktoza fructose |
| D | - | zielona green | - | brak / absent | sacharoza saccharose |

Objaśnienia / Explanatory notes:

K1 - K12 – symbole badanych prób / symbols of samples analysed; (+) – tak / yes; (-) – nie / no; D – kombucha doświadczalna / experimental kombucha.

doświadczalnego (D) był napar z zielonej herbaty (Ahmad Green Tea) z 10-procentowym dodatkiem sacharozy, zaszczerpiony kulturą SCOBY uzyskaną z małej manufaktury. Zgodnie z metodą Ayeda i wsp. [1] fermentację prowadzono przez 12 dni w temp. 23 °C.

Jakość mikrobiologiczną badanych napojów oznaczano metodą standardową w dwóch powtórzeniach, z użyciem podłoża mikrobiologicznych modyfikujących metodę Cailego i wsp. [5] – tab. 2. Inkubację posiewów prowadzono w temp. 30 °C przez 48 h.

Tabela 2. Podłoża mikrobiologiczne zastosowane do oznaczania mikroorganizmów w napojach kombucha

Table 2. Used culture media for the determination of microorganisms in kombucha beverages

| Podłoże Culture medium | Producent/skład Manufacturer/composition | Oznaczana grupa mikroorganizmów / Group of microorganisms being determined |
|---|--|--|
| Sabuardo Agar z chloramfenikolem / Sabuardo Agar with chloramphenicol | BTL, Polska | drożdże i pleśnie yeast and molds |
| Acetobacter Agar | ekstrakt drożdżowy – 10 g, glukoza – 10 g, etanol 96 % – 30 ml, CaCO ₃ – 20 g, agar – 15 g, actidion 0,1 % – 10 ml, woda dejonizowana – 1000 ml yeast extract – 10 g, glucose – 10 g, ethanol 96 % – 30 ml, CaCO ₃ – 20 g, agar – 15 g, actidion 0.1 % – 10 ml, deionized water – 1000 ml | <i>Acetobacter</i> spp. AAB (Acetic Acid Bacteria) |
| Gluconobacter Agar | ekstrakt drożdżowy – 5 g, trypton – 10 g, CaCO ₃ – 1 g, glukoza – 20 g, K ₂ HPO ₄ – 1 g, agar – 15 g, actidion 0,1 % – 10 ml, woda dejonizowana – 1000 ml / yeast extract – 5 g, tryptone – 10 g, CaCO ₃ – 1 g, glucose – 20 g, K ₂ HPO ₄ – 1 g, agar – 15 g, actidion 0.1 % – 10 ml, deionized water – 1000 ml | <i>Gluconobacter</i> spp. |
| MRS Agar | DeMan, Rogosa and Sharpe, Merck, Niemcy | Bakterie fermentacji mlekowej LAB (Lactic Acid Bacteria) |

Kwasowość czynną napojów oznaczano metodą potencjometryczną za pomocą pH-metru (Adwa AD 1000, Polska).

Całkowitą zawartość polifenoli oznaczano metodą Singletona i wsp. [20] z modyfikacją własną – stosowano kwas galusowy (GEA) jako standard. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną (0,1 ml każdego z napojów, 6 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a), którą pozostawiano na 1 min w temp. 20 ± 2 °C. Następnie dodawano po 1,5 ml 20-procentowego roztworu Na_2CO_3 i 1,9 ml wody destylowanej. Próbkę mieszano, a następnie ogrzewano w temp. 25 °C przez 30 min (do uzyskania trwałej, niebieskiej barwy). Absorbancję mierzono w spektrofotometrze Lambda 25 (Perkinelmer, Wielka Brytania) przy długości fali $\lambda = 760$ nm w trzech powtórzeniach. Całkowitą zawartość polifenoli wyrażano w mg/dl próbki w przeliczeniu na kwas galusowy.

Całkowitą zawartość antocyjanów oznaczano metodą spektrofotometryczną z różnicy absorbancji (metoda Fuleki i Francis, zgodnie z Walkowiak-Tomczak [29]). Pomiaru absorbancji dokonywano w 1 ml badanej próbki wobec 4 ml buforu HCl o pH 1 (jako próby odniesienia) oraz 4 ml buforu HCl o pH 4,5 w trzech powtórzeniach. Wartość absorbancji (A) przy długości fali $\lambda = 526$ nm oraz $\lambda = 700$ nm odczytywano w spektrofotometrze Lambda 25 (Perkinelmer, Wielka Brytania). Zawartość antocyjanów wyrażano w mg cyjanidyno-3-glukozydu, zgodnie z równaniem:

$$C = (A/EL) \times MW \times N$$

gdzie : $A = (A_{\lambda = 526 \text{ pH } 1,0} - A_{\lambda = 700 \text{ pH } 1,0}) - (A_{\lambda = 526 \text{ pH } 4,5} - A_{\lambda = 700 \text{ pH } 4,5})$,

E – absorbancja molarna (29 600 dla cyjanidyno-3glukozydu),

L – grubość kuwety (1 cm),

MW – masa molekularna (445,2 dla cyjanidyno-3glukozydu),

N – współczynnik rozcieńczenia.

Aktywność przeciwutleniającą oznaczano na podstawie redukcji 1,1-diphenylo-2-picrylhydazyli (DPPH^{*}) metodą, którą opisali Zafra-Rojas i wsp. [31]. Przygotowano etanolowy roztwór stabilnego DPPH^{*} (7,4 mg/100 ml) i mieszaninę reakcyjną badanej próbki z wodą dejonizowaną w proporcji 1 : 50. Do 500 µl alkoholowego roztworu DPPH^{*} dodawano 100 µl mieszaniny, a następnie pozostawiano bez dostępu światła w temp. 20 ± 2 °C na 1 h. Próbkę odwirowywano (3000 rpm/10 min), po czym mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 520$ nm w trzech powtórzeniach. Wynik podawano jako % aktywności przeciwutleniającej.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową napojów kombucha oznaczano metodą dyfuzyjno-cylinderkowo-płytkową [1] w stosunku do szczepów wzorcowych: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Listeria monocytogenes* serotyp 1/2a (KMSiFŻC), *Yersinia enterocolitica* (PCM 1919), *Salmonella enteritidis* (ATCC 130764), *Bacillus cereus* (PCM 2019), *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Saccharomyces cerevisiae* (ŁOCK 14), *Candida albicans* (KMSiFŻC). Z 24-godzinnych hodowli szczepów wzorcowych wykonywano zawiesiny o gęstości 1

w skali McFarlanda. Z każdej z nich pobierano po 100 μ l i wykonywano posiew mura-
rowy na podłoże z agaru odżywczego (Oxoid Ltd. Wielka Brytania) oraz Sabourau-
da (BTL, Polska) w przypadku odpowiednio: bakterii i drożdży. Do cylinderków
wprowadzano po 100 μ l jednego z dwóch wariantów uprzednio przygotowanych pró-
bek kombuchy – nieneutralizowanej oraz neutralizowanej do pH 7 (0,1 M NaOH).
Przygotowywano również próby referencyjne (R), aby określić podatność badanych
szczepów na wybrane antybiotyki (w cylinderkach znajdowało się 100 μ l 0,003-
procentowego chloramfenikolu lub 0,001-procentowego actidionu). Płytki inkubowano
przez 48 h w temp. 37 °C (bakterie) oraz 30 °C (drożdże i *Bacillus* sp.), a następnie
mierzone strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów.

Statystyczne opracowanie wyników wykonano w programie StatSoft – Statistica
v 12. W celu sprawdzenia wpływu czasu przechowywania na badane parametry prze-
prowadzono analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic między wartościami śred-
nimi weryfikowano testem Duncana ($p \leq 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Kompozycja mikrobiologiczna napoju kombucha jest jednym z kluczowych
czynników wpływających na jej skład chemiczny, a ten warunkuje właściwości poten-
cjalnie prozdrowotne. Zróznicowanie mikrobiologiczne zależy od wielu czynników,
w tym od rodzaju wykorzystanego substratu [5, 6]. Wyniki oceny mikrobiologicznej
napojów komercyjnych przedstawiono w tab. 3. Liczba drobnoustrojów w próbach
K7 - K12 (deklarowanych przez producentów jako pasteryzowane) była poniżej progu
wykrywalności ($< 10^1$ jtk/ml), co świadczy o poprawnie wykonanym utrwaleniu napo-
jów.

W produktach handlowych niepoddanych obróbce termicznej (K1 - K6 i D) do-
minowały bakterie *Acetobacter* sp. (AAB) w liczbie $4,5 \times 10^5 \div 1,1 \times 10^6$ jtk/ml.
W produktach tych stwierdzono również bakterie fermentacji mlekowej. Jak podają
Santos i wsp. [17] oraz Vohra i wsp. [28], stanowią one ok. 30 % populacji mikrobi-
ologicznej napojów kombucha. Oznaczona ogólna liczba mikroorganizmów w napojach
kombucha jest zbieżna z wynikami Cailego i wsp. [5]. W odróżnieniu od napojów
pochodzących z handlu detalicznego kombucha doświadczalna po 12 dniach fermenta-
cji zawierała tylko drożdże w liczbie 7×10^5 jtk/ml. Może to świadczyć o całkowitym
zużyciu tlenu niezbędnego do rozwoju AAB podczas fermentacji. Mogło też być spo-
wodowane nadmiernym rozwojem w napoju D naturalnie występujących drożdży kwa-
szących, np. *Bretanomyces* spp., które w warunkach dużej zawartości cukrów w śro-
dowisku, w pierwszej kolejności produkują etanol, chroniąc się przed wzrostem
konkurencyjnych mikroorganizmów, a następnie z powstałych biokomponentów
w warunkach beztlenowych syntetyzują kwas octowy i jego estry [25].

Tabela 3. Charakterystyka badanych napojów kombucha pod względem liczby mikroorganizmów
 Table 3. Profile of kombucha drinks analysed in terms of count of microorganisms

| Próba Sample | Drożdże Yeast [jtk/g] | <i>Acetobacter</i> sp. [jtk/g] | <i>Gluconobacter</i> sp. [jtk/g] | LAB [jtk/g] |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| K1 | $2,40 \times 10^3$ | 1×10^6 | $1,3 \times 10^5$ | 6×10^2 |
| K2 | 3×10^3 | 1×10^6 | $< 10^1$ | 2×10^3 |
| K3 | $2,50 \times 10^4$ | $1,1 \times 10^6$ | $1,65 \times 10^4$ | 3×10^4 |
| K4 | $1,64 \times 10^5$ | $8,7 \times 10^5$ | $< 10^1$ | 3×10^5 |
| K5 | 2×10^3 | $7,7 \times 10^5$ | $4,6 \times 10^4$ | 2×10^4 |
| K6 | $6,5 \times 10^3$ | 6×10^5 | $4,5 \times 10^5$ | $2,7 \times 10^6$ |
| K7 | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ |
| K8 | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ |
| K9 | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ |
| K10 | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ |
| K11 | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ |
| K12 | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ |
| D | $6,5 \times 10^5$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ | $< 10^1$ |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1. / Meanings of symbols as in Tab. 1. W tabeli przedstawiono wartości średnie / Table shows mean values.

Podstawowym parametrem określającym jakość napoju kombucha jest jego pH. Korzystne dla zdrowia właściwości wynikające z jej spożywania przypisuje się dużej zawartości kwasów organicznych. Niskie pH zapobiega degradacji polifenoli oraz wpływa korzystnie na stabilność chemiczną antocyjanów. Wszystkie badane próby charakteryzowały się pH w zakresie $1,95 \div 4,3$ (tab. 4).

Zawartość polifenoli w napojach jest zależna głównie od jakości i rodzaju herbaty, której użyto do ich przygotowania. Wyniki były zróżnicowane, w napojach rynkowych zawartość polifenoli zawierała się w przedziale $11,36 \div 107$ mg GEA/dl, a w napoju doświadczalnym wynosiła 78 mg GEA/dl. Otrzymane rezultaty były charakterystyczne dla fermentowanej herbaty [15, 16, 26].

Antocyjany zaliczane do flawonoidów również wykazują zdolność neutralizowania wolnych rodników. Największą ich zawartość oznaczono w napoju wyprodukowanym metodą tradycyjną. Ich ilość w tym produkcie była ponad dwa razy większa niż w napojach rynkowych i wynosiła 0,78 mg/dl. Zawartość antocyjanów w produktach komercyjnych była zbliżona i oscylowała między 0,2 a 0,3 mg/dl. Dla porównania – zawartość antocyjanów w naparze z zielonej herbaty niepoddanej fermentacji wynosi 0,4 mg/dl [14].

Tabela 4. Wartość pH, zawartość polifenoli i antocyjanów oraz aktywność przeciwutleniająca napojów kombucha
 Table 4. pH value, contents of polyphenols and anthocyanins in, and antioxidant activity of kombucha drinks

| Parametr Parameter | K1 | K2 | K3 | K4 | K5 | K6 | K7 | K8 | K9 | K10 | K11 | K12 | D |
|---|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| pH | 3,05 ^a ± 0,02 | 1,95 ^a ± 0,01 | 3,43 ^a ± 0,02 | 3,45 ^a ± 0,00 | 3,38 ^a ± 0,02 | 4 ^a ± 0,01 | 3,9 ^b ± 0,04 | 4,39 ^b ± 0,01 | 2,88 ^a ± 0,02 | 3,0 ^a ± 0,02 | 3,1 ^a ± 0,04 | 2,92 ^b ± 0,01 | 2,94 ^b ± 0,0 |
| Zawartość polifenoli Content of polyphenols [mg GEA/dl] | 19,8 ^a ± 0,34 | 107 ^a ± 1,65 | 12,47 ^b ± 0,72 | 11,36 ^b ± 0,82 | 18,03 ^a ± 0,42 | 107 ^a ± 1,36 | 55,10 ^a ± 0,28 | 99,58 ^b ± 0,67 | 19,51 ^a ± 1,34 | 19,88 ^a ± 1,42 | 40,2 ^a ± 0,32 | 20,25 ^a ± 0,76 | 78,7 ^a ± 1,65 |
| Zawartość antocyjanów Content of anthocyanins [mg/dl] | 0,21 ^b ± 0,01 | 0,22 ^a ± 0,02 | 0,3 ^a ± 0,01 | 0,32 ^a ± 0,04 | 0,25 ^a ± 0,01 | 0,3 ^a ± 0,01 | 0,26 ^a ± 0,03 | 0,29 ^a ± 0,02 | 0,25 ^a ± 0,04 | 0,19 ^b ± 0,01 | 0,3 ^a ± 0,01 | 0,2 ^b ± 0,05 | 0,78 ^a ± 0,02 |
| Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity [% inhibicji / of inhibitor] | 65 ^a ± 0,42 | 65 ^a ± 1,13 | 76 ^a ± 2,48 | 58 ^b ± 0,5 | 72 ^a ± 1,74 | 62 ^a ± 1,19 | 73 ^a ± 2,61 | 22 ^b ± 2,44 | 65 ^b ± 3,12 | 70 ^a ± 0,98 | 73 ^b ± 1,1 | 70 ^a ± 2,12 | 78 ^b ± 1,27 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1. / Meanings of symbols as in Tab 1. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviation; a, b – wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy p < 0,05 / mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at p < 0.05.

Przeciwutleniacze są związkami chemicznymi chroniącymi organizm przed wolnymi rodnikami. Wraz z pożywieniem dostarczane są przeciwutleniacze egzogenne, do których zalicza się polifenole. Najmniejszą efektywność neutralizacji wolnych rodników stwierdzono w próbie K8 (22 %). W pozostałych napojach wartość aktywności przeciwutleniającej wahała się w przedziale 58,33 ÷ 76,4 % w stosunku do DPPH'. Napojem najbardziej efektywnym w inhibitowaniu wolnych rodników była kombucha doświadczalna (78,7 %). Oznaczona zdolność utleniająca napojów komercyjnych (poza K8) była porównywalna z wynikami opublikowanymi przez Cailego i wsp. [5].

Tabela 5. Antagonistyczne działanie napojów kombucha na wybrane patogeny
Table 5. Antagonistic activity of kombucha drinks against selected pathogens

| Mikroorganizm Microorganism | | K1 | K2 | K3 | K4 | K5 | K6 | K7 | K8 | K9 | K10 | K11 | K12 | D | W |
|--------------------------------------|----|--|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|
| | | Strefa zahamowania wzrostu / Growth inhibition zone [mm] | | | | | | | | | | | | | |
| <i>B. cereus</i> PCM 2019 | NN | 10 | 10 | 10 | 10 | 14 | 16 | 10 | 10 | 10 | 14 | 10 | 10 | 10 | 30 |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>E. faecalis</i> ATTC 29212 | NN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>L. monocytogenes</i> KMSiFZC | NN | 10 | 10 | 13 | 0 | 12 | 15 | 11 | 17 | 10 | 16 | 22 | 20 | 20 | 30 |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>S. aureus</i> ATTC 25923 | NN | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 16 | 10 | 15 | 10 | 11 | 25 |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>S. enteritidis</i> ATCC 130764 | NN | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 20 | 23 |
| | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | |
| <i>Y. enterocolitica</i> PCM 1919 | NN | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 0 | 0 | 16 | 0 | 10 | 0 | 25 | 23 |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 25 | |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 | NN | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 17 | 21 | 17 | 27 | 10 | 10 | 10 | 20 | 24 |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 0 | 11 | |
| <i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 14 | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 27 |
| | NN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>C. albicans</i> KMSiFZC | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | NN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Objaśnienia symboli jak pod tab. 1. / Meanings of symbols as in Tab 1. NN – próba nieneutralizowana / non-neutralised sample; N – próba neutralizowana / neutralised sample; W – wzorzec z antybiotyku / antibiotic pattern.

W badaniach użyto dziewięciu mikroorganizmów, aby określić ich wrażliwość na składniki zawarte w napojach kombucha powstałych na bazie przefermentowanej herbaty. Badane napoje hamowały wzrost zarówno bakterii Gram-dodatnich (z wyjątkiem *E. faecalis*), jak i Gram-ujemnych (tab. 5). Czynnikiem determinującym antagonizm

kombuchy wobec wybranych patogenów przewodu człowieka są obecne w nich kwasy organiczne. Pełnią one kluczową funkcję w hamowaniu rozwoju bakterii Gram-dodatnich. Zasadniczymi czynnikami determinującymi antagonizm przefermentowanych napojów jest ilość i jakość herbaty użytej do jego produkcji, czas trwania fermentacji czy rodzaj użytego substratu [23, 28].

Po neutralizacji (pH 7) wszystkie próby (z wyjątkiem K9) utraciły zdolność do hamowania wzrostu bakterii Gram-dodatnich, natomiast w przypadku bakterii Gram-ujemnych część napojów zachowało swój biobójczy charakter. Uzyskane wyniki mogą być związane z występowaniem bakteriocyn stabilnych w środowisku neutralnym (np. bakteriocyna SL610 produkowana przez *L. plantarum*) w testowanych napojach [3, 12]. Podobnie Greenwalt i wsp. [7] stwierdzili, że żaden z testowanych napojów nie hamował wzrostu drożdży. Przeciwwgrzybicze właściwości napoju kombucha są kwestią sporną, a uzyskiwane wyniki są skrajne [3, 9]. Można stwierdzić, że czynnikiem warunkującym przeciwdrobnoustrojowe właściwości kombuchy jest jej niskie pH związane z występowaniem kwasów organicznych, mające znaczący wpływ na stabilność bakteriocyn. Tradycyjna kombucha doświadczalna hamowała wzrost 7 z 9 testowanych mikroorganizmów. W części przypadków zahamowanie wzrostu przy użyciu napoju doświadczalnego było nawet porównywalne z wielkością stref otrzymanych przy użyciu antybiotyków, co świadczy o dobrej skuteczności jego działania.

Wnioski

1. Zawartość wybranych, potencjalnie prozdrowotnych frakcji (polifenoli i antocyjanów) w napojach kombucha dostępnych w handlu detalicznym była zróżnicowana. Nie stwierdzono powiązania między procesem pasteryzacji a zmianami aktywności przeciwutleniającej tych napojów.
2. Większość handlowych napojów kombucha charakteryzowała się mniejszą zawartością polifenoli niż kombucha doświadczalna. Produkt tradycyjny wyróżniał się najwyższą inhibicją wolnych rodników ze wszystkich przebadanych produktów.
3. Zawartość antocyjanów w napojach komercyjnych była porównywalna z ich ilością w zielonej herbacie. Zawartość tych związków była ponad dwa razy większa w napoju doświadczalnym niż w produktach dostępnych w handlu detalicznym.
4. Czynnikiem warunkującym działanie przeciwdrobnoustrojowe napojów kombucha wobec innych mikroorganizmów było niskie pH. Jedynie nieliczne produkty zahamowały wzrost drobnoustrojów po poddaniu ich procesowi neutralizacji. Napoje kombucha poddane badaniom nie wykazywały antagonizmu w stosunku do grzybów drożdżowych.
5. Większy potencjał prozdrowotny przejawiała kombucha doświadczalna niż napoje tego typu dostępne w handlu detalicznym.

Literatura

- [1] Rohan: Kombucha Market Worth USD 1.8 Billion by 2020. [on line]. Markets and Markets. Dostęp w Internecie [06.02.2020]: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/kombucha.asp>
- [2] Ayed L., Ben Abid S., Hamdi M.: Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Ann. Microbiol.*, 2017, 67, 111-121.
- [3] Battikh H., Chaieb K., Bakhrouf A., Ammar E.: Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *J. Food Biochem.*, 2013, 37, 231-236.
- [4] Bogacz A.: Napoje funkcjonalne. *Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw.*, 2020, 1-2, 43.
- [5] Caili F., Fen Y., Zeli C., Fanying X., Juan L.: Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Sci. Technol.*, 2014, 34 (1), 123-126.
- [6] Coton M., Pawtowski A., Taminiau B., Burgaud G., Deniel F., Coulloumme-Labarthe L., Fall A., Daube G., Coton E.: Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2017, 93 (5), #fix048.
- [7] De Roos J., De Vuyst L.: Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2018, 49, 115-119.
- [8] Greenwalt C.J., Ledford R.A., Steinkraus K.H.: Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1998, 31, 291-296.
- [9] Guttapadu S., Yang Z., Wiegner K.: Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 2589-2594.
- [10] Jakubowski R.: Kombucha – aspekty praktyczne i rynkowe. *Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw.*, 2019, 1-2, 33-34.
- [11] Jayabalan R., Subathradevi P., Marimuthu S., Sathishkumar M., Swaminathan K.: Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem.*, 2008, 109 (1), 227-234.
- [12] Jinjin P., Wengang J., Abd El-Aty D., Xiaoying G., Hongxia Z., Jingzhang G., Lei J., Dejing C., Tianli Y.: Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. *Food Control*, 2020, 110, #106923.
- [13] Kapp M., Walton S.: Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, 2019, 30, 66-70.
- [14] Kerio L.C., Wachira F.N., Wanyoko J., Rotich M.: Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. *Food Chem.*, 2013, 136 (3-4), 1405-1413.
- [15] Khosravi S., Safari M., Zahra E., Golmakani M.: Development of fermented date syrup using Kombucha starter culture. *J. Food Proc. Preserv.*, 2019, 43, #13872.
- [16] Lobo R.O., Dias F.O., Shenoy C.K.: Kombucha for healthy living: Evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. *Int. Food Res. J.*, 2017, 24 (2), 541-546.
- [17] Malbaša R., Lončar E., Vitas J.S., Čanadanović-Brunet J.: Influence of starter cultures on the antioxidant activity of Kombucha beverage. *Food Chem.*, 2011, 127, 1727-1731.
- [18] Marsh A., O'Sullivan O., Hill C., Ross P., Cotter D.: Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 2014, 38, 171-178.
- [19] Santos R.J., Batista R.A., Rodrigues S.A.: Antimicrobial activity of broth fermented with Kombucha colonies. *J. Microbial Biochem. Technol.*, 2009, 1(1), 072-078.
- [20] Saxe L.: Fermented Foods Are Up 149% - As Long As They're Unfamiliar. [on line]. *Forbes*, 2019. Dostęp w Internecie [06.02.2020]: <https://www.forbes.com/sites/lizzysaxe/2019/02/06/fermented-foods-are-up-149-percent-as-long-as-theyre-unfamiliar>

- [21] Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, 299, 152-178.
- [22] Steensels J., Daenen L., Malcorps P., Derdelinckx H., Verachtert H., Verstrepen K.: *Brettanomyces* yeasts – from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 2015, 206, 24-38.
- [23] Talawat S., Ahantharik P., Laohawiwattanukul S., Preamsuk A., Ratanapo S.: Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Kasetsart J. Nat. Sci.*, 2006, 40, 925-933.
- [24] Teoh A.L., Heard G., Cox J.: Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 95 (2), 119-126.
- [25] Troitino C.: Kombucha 101: Demystifying the past, present and future of the fermented tea drink. [on line]. Forbes, 2017. Dostęp w Internecie [06.02.2020]: <https://www.forbes.com/sites/christinatroitino/2017/02/01/kombucha-101-demystifying-the-past-present-and-future-of-the-fermented-tea-drink/?sh=1247b07c4ae2>
- [26] Utoiu E., Matei F., Toma A., Diguta C., Ștefan L.M., Manoiu S., Vrajmasu V.V., Moraru I., Oancea A., Israel-Roming F., Cornea C.P., Constantinescu-Aruxandei D., Moraru A., Oancea F.: Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a kombucha consortium. *Nutrients*, 2018, 10 (10), #1365.
- [27] Villarreal-Soto S., Beaufort S., Bouajila J., Souchard J., Taillandier P.: Understanding Kombucha tea fermentation: A review. *J. Food Sci*, 2018, 83 (3), 580-588.
- [28] Vohra B., Fazry S., Sairi F., Babul-Airianah O.: Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. *Malaysian J. Fundam. Appl. Sci.*, 2019, 298-302.
- [29] Walkowiak-Tomczak D.: Wpływ dostępności tlenu i światła na stabilność antocyjanów w modelowych napojach aroniowych. *Nauka Przyr. Technol.* 2012, 6, 1-7.
- [30] Yongsheng C., Xiang M., Xiong F., Rian Y.: Phytochemical content, cellular antioxidant activity and antiproliferative activity of *Adinandra nitida* tea (Shiyacha) infusion subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. *RSC Adv.*, 2017, 7, 50430-50440.
- [31] Zafra-Rojas Q., Cruz-Cansino N., Ramírez-Moreno E., Delgado-Olivares L., Villanueva-Sánchez J., Alanís-García E.: Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20 (5), 1283-1288.

COMPARISON OF SELECTED MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF KOMBUCHA DRINKS

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the level of some selected microorganisms in kombucha drinks available in retail trade and to compare the contents of polyphenols and anthocyanins in those drinks and their antioxidant potentials with a drink produced experimentally with the use of a traditional method. The research included 12 commercial drinks and one drink produced experimentally on the basis of green tea with 10 % of sucrose added. In the products studied, the following was determined: number of *Acetobacter* sp. bacteria, *Gluconobacter* sp., LAB and yeast, pH, total content of anthocyanins, total content of polyphenols and antioxidant activity. A diffusion method with small columns was applied to assess the antimicrobial activity of kombucha drinks in comparison to the reference strains: *E. coli* ATCC 35218, *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a (KMSiFŻC), *Yersinia enterocolitica* (PCM 1919),

Salmonella enteritidis (ATCC 130764), *Bacillus cereus* (PCM 2019), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Saccharomyces cerevisiae* (LOCK 14) and *Candida albicans* (KMSiFŽC). It was found that the beverages declared to be pasteurized (K7 - K12) were free of the microorganisms from the groups under analysis. In other commercial products the predominant microorganism was *Acetobacter* sp. bacteria and its number ranged $6 \times 10^6 \div 1.1 \times 10^7$ cfu/ml. In the experimentally produced drink the reported count of yeast cells was 6.5×10^5 cfu/g. The pH value of the products was specific and did not exceed 4.3. The content of anthocyanins in all the commercial drinks ranged $0.2 \div 0.3$ mg/dl, while in the experimental sample this value was more than twice as high. The content of polyphenols in and the antioxidant capacity of the samples varied and no correlation was found between them and the origin of the product. The presence of organic acids is the main factor to determine the capability of kombucha beverages to inhibit bacteria potentially pathogenic to humans. None of the tested beverages showed antagonism against the tested yeast.

Key words: kombucha, fermentation, SCOBY, antioxidant properties ☒

KATARZYNA KOTARSKA, WOJCIECH DZIEMIANOWICZ,
ANNA ŚWIERCZYŃSKA

IDENTYFIKACJA CHEMICZNYCH ZANIECZYSZCZEŃ ETANOLU UZYSKANEGO Z ZIARNA RÓŻNYCH ODMIAN KUKURYDZY

Streszczenie

Celem pracy była identyfikacja związków chemicznych stanowiących zanieczyszczenia etanolu uzyskanego w procesie fermentacji alkoholowej różnych odmian kukurydzy. Opisano przyczyny powstawania w procesie fermentacji kukurydzy takich związków, które obniżają jakość wytwarzanego etanolu. Przeprowadzono identyfikację jakościową i ilościową produktów ubocznych w spirytusach po zakończonym procesie fermentacji. Obejmowała ona grupy związków: estry, aldehydy, alkohole wyższe oraz metanol. Badania jakości etanolu wykonano metodą chromatografii gazowej.

Zawartość związków karbonylowych w etanolu przeznaczonym na cele spożywcze jest normowana i nie może przekraczać wartości $0,1 \text{ g/dm}^3 A_{100}$. W badanych próbkach zawierała się w zakresie $0,022 \div 0,087 \text{ g/dm}^3 A_{100}$. Największą ilość związków karbonylowych stwierdzono w pierwszym etapie fermentacji, w czasie powstawania największych ilości etanolu. W ciągu następnych godzin fermentacji etanolowej ilość aldehydów sukcesywnie malała, przy czym największy ich ubytek obserwowano między 16. a 48. godziną. W żadnym z uzyskanych spirytusów nie stwierdzono obecności akroleiny, która ma właściwości kancerogenne. Ilość alkoholi wyższych zawierała się w dość szerokich granicach, tj. $0,855 \div 3,553 \text{ g/dm}^3 A_{100}$. Na ich poziom wpływ miała ilość n-propanolu, izobutanolu, n-butanolu oraz 2-metylo-1-butanolu. Wydajność alkoholu ze 100 kg ziarna różnych odmian kukurydzy kształtowała się w zakresie $37,5 \div 43,3 \text{ dm}^3$. Największą wydajność spirytusu uzyskano z ziarna kukurydzy odmian Euralis ES Runway oraz Euralis ES Hattric.

Słowa kluczowe: kukurydza, skrobia, fermentacja alkoholowa, produkty uboczne fermentacji, zanieczyszczenia chemiczne etanolu

Wprowadzenie

Kukurydza jest jednym z najważniejszych surowców roślinnych w przemyśle spożywczym (w tym młynarskim i gorzelnicznym) oraz paszowym, jak również

Dr inż. K. Kotarska, mgr inż. W. Dziemianowicz, mgr inż. A. Świerczyńska, Zakład Technologii Gorzelnictwa i Odnawialnych Źródeł Energii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Powstańców Wielkopolskich 17, 85-090 Bydgoszcz. Kontakt: katarzyna.kotarska@ibprps.pl

w przemyśle papierniczym czy chemicznym [9]. W gorzelnictwie najważniejsza jest zawartość węglowodanów w ziarnie kukurydzy, która w największym stopniu zależy od genotypu rośliny. Decyduje ona o wydajności alkoholu etylowego w procesie fermentacji ziarna. Skrobia zawarta w ziarnie jest rozkładana w procesie hydrolizy enzymatycznej do węglowodanów ulegających bezpośrednio fermentacji etanolowej.

Ziarno kukurydzy uznawane jest za najbardziej efektywny pod względem energetycznym i ekonomicznym surowiec do przerobu na etanol. Argumenty potwierdzające powyższe stwierdzenie to: najwyższa wydajność alkoholu z 1 tony surowca spośród gatunków uprawianych w Polsce – ok. $36 \div 43 \text{ dm}^3/100 \text{ kg}$ ziarna, duża zawartość skrobi podlegającej rozkładowi do glukozy i fermentacji – ok. $55 \div 70 \%$, ponadto niskie koszty przerobu surowca, możliwość uprawy w monokulturze, możliwość uprawy kukurydzy na różnych kompleksach glebowych, wysoki potencjał plonotwórczy [8, 18].

Odmiany kukurydzy różnią się między sobą z uwagi na: długość okresu wegetacji (wczesne, średnio wczesne, średnio późne i późne), kształt ziarniaka (kulisty, owalny, kanciasty, klinowaty), barwę, budowę wewnętrzną ziarniaka (pastewne, zwykłe, cukrowe, skrobiowe, pękające, woskowe, oplewione, skrobiowo-cukrowe), zawartość skrobi oraz jej skład. Większość odmian kukurydzy zawiera w ziarnie skrobię, która składa się z amylopektyny ($65 \div 85 \%$) i amylozy ($15 \div 35 \%$) [15].

Obecnie uprawiane odmiany kukurydzy wywodzą się głównie od dwóch typów – kukurydzy szklistej (flint) oraz końskiego zęba (dent). Ziarno typu dent jest wydłużone i spłaszczone, z zagłębieniem na szczycie. Charakteryzuje się dużą zawartością mączystego bielma. Taki typ ziarna jest szczególnie przydatny dla przemysłu skrobiowego i gorzelniczego. W ziarnie kukurydzy typu flint dominuje natomiast bielmo szkliste, dlatego przydatne jest ono do produkcji kasz i mąki oraz jako pasza treściwa w żywieniu bydła mlecznego [16].

Ocenę możliwości wykorzystania danej odmiany kukurydzy w produkcji etanolu przeprowadza się poprzez wykonanie prób fermentacyjnych, a następnie obliczenie wydajności etanolu z surowca. Jak podają Kawa-Rygielska [5] i Liszewski [6], najefektywniejsze pod tym względem są późniejsze odmiany kukurydzy, które charakteryzują się nie tylko wysokim poziomem wydajności etanolu w procesie fermentacji, ale także dużym potencjałem plonowania.

Podczas procesu fermentacji oprócz etanolu powstaje szereg związków lotnych, przechodzących w trakcie destylacji do spirytusu i powodujących jego zanieczyszczenie. Związki te tworzą się podczas procesów biochemicznych lub są wynikiem aktywności metabolicznej niepożądanego mikroflory. Wyróżnia się wśród nich: metanol, estry, aldehydy, wyższe alkohole oraz kwasy organiczne [3, 7, 11]. Poszczególne substancje należące do wymienionych grup zanieczyszczeń różnią się w sposób istotny progiem wyczuwalności sensorycznej. Niektóre z nich w niewielkich ilościach wpływają na

zmianę cech sensorycznych spirytusów. Inne nawet w ilościach śladowych mogą zdecydowanie negatywnie zmieniać smak i zapach spirytusów [1].

Celem pracy była identyfikacja związków chemicznych stanowiących zanieczyszczenia etanolu uzyskanego w procesie fermentacji alkoholowej ziarna różnych odmian kukurydzy dostępnych na polskim rynku.

Materiał i metody badań

Do badań użyto ziarna 8 odmian kukurydzy:

- SY Talisman (ziarno typu flint), SY Pandoras (ziarno typu flint) – Syngenta, Szwajcaria,
- P8329 (ziarno o typie pośrednim zbliżonym do dent), P8821 (ziarno o typie pośrednim flint/dent) i P8307 (ziarno o typie pośrednim flint/dent) – Pioneer, USA,
- ES Palladium (ziarno typu flint), ES Runway (ziarno typu dent) oraz ES Hatrick (ziarno typu dent) – Euralis, Francja.

Ziarno wymienionych odmian kukurydzy rozdrabniano w młynie tarczowym, typ SEMg 71-2B (ZBPP, Bydgoszcz), do uzyskania jednorodnych próbek o wielkości cząstek $< 0,25$ mm.

W próbkach rozdrobnionego surowca oznaczano wilgotność metodą wagową według PN-ISO 6496:2002 [19] oraz zawartość skrobi polarymetryczną metodą Ewersa według PN-EN ISO 10520:2002 [20].

Z rozdrobnionego surowca sporządzano zacierę metodą BUS w warunkach laboratoryjnych i każdorazowo w dniu rozpoczęcia fermentacji.

Wydajność etanolu określano na podstawie prób fermentacyjnych zgodnie z procedurą określania wydajności etanolu z surowców gorzelnicznych [13]. Stężenie etanolu oznaczano za pomocą refraktometru zanurzeniowego (Carl Zeiss Jena VEB, Niemcy), a wynik [% (v/v)] odczytywano z tablic Wagnera. Uzyskany wynik wskazuje na maksymalną możliwą do uzyskania w warunkach przemysłowych wydajność etanolu ze 100 kg surowca.

Jakość etanolu badano po przeprowadzeniu prób fermentacyjnych. Stosowano w nich proporcje ziarna do wody zgodne z zaleceniami obowiązującymi w gorzelniach przy przerobieniu surowców skrobiowych metodą BUS, na poziomie gęstości ok. 17,5 °Błg, tzn. na każde 100 g ziarna używano ok. 400 cm³ wody.

Uwodnioną masę zawierającą skrobię poddawano hydrolizie przy użyciu preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego firmy Novozymes. Były to: Termamyl 120L[®] (α -amylaza) – enzym upłynniający skrobię, w dawce standardowej, tj. 140 ml/t skrobi, przy której aktywność preparatu wynosi 120 KNU/g oraz SAN Extra[®] L (glukoamylaza) – enzym hydrolizujący wiązania 1-4 i 1-6 glukozydowe w upłynnionej skrobi i dekstrynach, w dawkach zalecanych przez producenta, tj. 600 ml/t skrobi. Enzymy dodawano w warunkach zalecanych przez producenta, tj.

α -amylazę – temp. aktywacji enzymu 85 °C, czas aktywności 20 min; glukoamylazę – temp. aktywacji enzymu 65 °C, pH 5,4, czas aktywności 20 min. Podczas hydrolizy mieszano i podgrzewano substraty zgodnie z wymienionymi zaleceniami producenta preparatów enzymatycznych w celu przeprowadzenia głębokiej hydrolizy oraz stosowano regulację pH stężonym kwasem siarkowym. W wyniku hydrolizy uzyskiwano zacier, w którym oznaczano zawartość ekstraktu [°Blg] areometrycznie.

Do zacierów sporządzanych z ziarna badanych odmian kukurydzy dodawano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (szcep D-2), które pochodziły z kolekcji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Charakterystyczne cechy szczepu *S. cerevisiae* D-2 to: acidofilność (zdolność przystosowania się do silnie ukwaszonego środowiska, pH 3), termofilność (38 ÷ 39 °C), osmoofilność (do 24 °Blg) oraz alkoholoodporność (do 14 % v/v alkoholu). Szczep D-2 stosowano w postaci mlecza drożdżowego, które przygotowywano z suchego preparatu. Odważano 5 g drożdży i poddawano rehydratacji z jednoczesnym odkażaniem, mającym na celu eliminację uszkodzonych komórek drożdży (10 ÷ 20 %) powstałych w wyniku suszenia oraz ewentualnej mikroflory bakteryjnej. Do odkażania stosowano 50 cm³ wodnego roztworu stężonego kwasu siarkowego (proporcja kwasu do wody 1 : 200) do pH ok. 2, w temp. 30 °C. Mleczko drożdżowe mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego Electromagnetic Stirrer, typ ES 21H (WIGO, Polska), przy prędkości 500 obr./min przez 10 min. Drożdże stosowano do zacierów w temp. 30 °C, przy pH 5,4 (poziom uzyskany po procesie upłynnienia i scukrzenia zacierów). W teście z błękitem metylenowym potwierdzono, że komórki drożdży cechowały się dobrą żywotnością i aktywnością fermentacyjną.

Zaciera kukurydziane szczepiono mleczkiem drożdżowym w ilości 30 ml na 1500 ml nastawu, kolby zamykano korkami gumowymi zakończonymi rurkami fermentacyjnymi wypełnionymi gliceryną i umieszczano w termostacie w temp. 38 °C na trzydobową fermentację. Dane termiczne i inne parametry fermentacji etanolowej odzwierciedlały technologiczne warunki stosowane w gorzelniach rolniczych, dzięki czemu uzyskane wyniki można odnosić do warunków przemysłowych, zarówno w zakresie wydajności etanolu, jak i jego jakości.

Po zakończeniu fermentacji prowadzono destylację odfermentowanych zacierów w specjalnie skonstruowanym szklanym zestawie. W jego skład wchodziły: szklana kolumna destylacyjna wyposażona w 25 półek przelewowych typu kapslowego, kolba destylacyjna o pojemności 2 dm³, deflegmator z płaszczem wodnym wyposażonym w termometr kontaktowy do pomiaru temperatury par spirytusowych, chłodnica prosta Liebiga z płaszczem wodnym oraz elektryczny płaszcz grzejny zasilany przez elektroniczny regulator mocy. W deflegmatorze utrzymywano temperaturę na stałym poziomie 80 ÷ 81 °C. Uzyskiwano destylaty o mocy 88 ÷ 92 % v/v etanolu.

W celu określenia dynamiki zmian tworzenia związków karbonylowych próbki destylatu pobierano po 16, 24, 36, 48, 65 i 72 h fermentacji etanolowej i oznaczano w nich zawartość aldehydów.

Analizę destylatów wykonywano przy użyciu chromatografu gazowego HP6890 serii GC System (Hewlett Packard, USA) z detektorem płomieniowo-jonizacyjny FID, zoptymalizowanym dla kolumn kapilarnych z układem EPC. Port nastrzykowy pracował w temp. 210 °C, ze stosunkiem podziału – 1 : 25, przy stałym przepływie gazu nośnego (hel o ciśnieniu 0,98 bara) wynoszącym 2,1 ml·min⁻¹. Do rozdzielania analizowanych składników stanowiących zanieczyszczenia etanolu używano kolumny Varian Capillary Kolumn typu – CP-WAX 57CB ze związaną fazą stacjonarną typu PEG (*high polarity polyethylene glycol*) o wymiarach 50 m × 0,32 mm × 0,20 μm (Agilent Technologies, USA). Program temperaturowy kolumny chromatograficznej przedstawiał się następująco: temp. 40 °C przez 2 min → wzrost temp. do 80 °C z prędkością 7 °C·min⁻¹ → temp. 80 °C przez 3 min → wzrost temp. do 160 °C z prędkością 10 °C·min⁻¹ → temp. 160 °C przez 4 min. Warunki pracy detektora FID były następujące: temp. – 240 °C, przepływ wodoru – 25 ml·min⁻¹, przepływ powietrza 280 ml·min⁻¹ oraz przepływ gazu nośnego w trybie ciągłym – 30,0 ml·min⁻¹. Parametry integracji sygnału i raportowania danych zostały zoptymalizowane przez komputerową stację analityczną wyposażoną w oprogramowanie ChemStation (G2070AA rev. A.05.02).

Kwasowość spirytusów oznaczano metodą miareczkową zgodnie z PN-A-79528-7:2001 [21].

Wszystkie analizy wykonywano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Obliczano wartości średnie i odchylenia standardowe. Do szacowania różnic między wartościami średnimi w grupach zastosowano test Tukeya ($p \leq 0,05$). Obliczenia wykonano za pomocą pakietu statystycznego Statistica 12,0 (StatSoft).

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono charakterystykę ziarna różnych odmian kukurydzy, pozyskanego od różnych producentów.

Wilgotność surowca kształtowała się na poziomie 9,44 ÷ 12,21 %. Najmniejszą wilgotność stwierdzono w ziarnach kukurydzy odmian typu dent, tj. ES Runway – 9,45 %, ES Hattrick – 9,56 % i odmian typu pośredniego flint/dent, tj. P8329 – 9,44 %, P8821 – 9,58 % (tab. 1). Odmiany typu flint są wcześniejsze, o grubej warstwie bielma szklatego, ale trudniej oddają wodę z ziarna. Wilgotność ziarna tego typu jest na ogół o 2 ÷ 3 % większa w porównaniu z ziarnem typu dent [16]. Największą wilgotność zaobserwowano jednak w ziarnie odmiany P8307 (12,21 %) typu pośredniego flint/dent.

Tabela 1. Charakterystyka fizykochemiczna ziarna badanych odmian kukurydzy

Table 1. Physical-chemical profile of grain of maize varieties

| Producent Producer | Odmiana kukurydzy Maize variety | Wilgotność Moisture [%] | Zawartość skrobi Content of starch [%] | Wydajność etanolu Ethanol yield [dm ³ /100 kg surowca / raw material] |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------|--|---|
| Syngenta | SY Talisman (flint) | 10,42 ^d ± 0,02 | 57,70 ^a ± 0,62 | 37,48 ^a ± 0,23 |
| | SY Pandoras (flint) | 10,40 ^d ± 0,01 | 56,15 ^a ± 0,51 | 36,49 ^a ± 0,19 |
| Pioneer | P8329 (~dent) | 9,44 ^a ± 0,01 | 61,69 ^b ± 0,72 | 40,14 ^b ± 0,34 |
| | P8821 (flint/dent) | 9,58 ^b ± 0,01 | 64,46 ^{cd} ± 0,97 | 41,92 ^{cd} ± 0,47 |
| | P8307 (flint/dent) | 12,21 ^e ± 0,03 | 62,46 ^c ± 0,44 | 40,62 ^c ± 0,17 |
| Euralis | ES Palladium (flint) | 9,78 ^c ± 0,02 | 65,08 ^d ± 0,60 | 42,33 ^d ± 0,22 |
| | ES Runway (dent) | 9,45 ^a ± 0,01 | 66,62 ^d ± 0,78 | 43,25 ^e ± 0,36 |
| | ES Hattrick (dent) | 9,56 ^b ± 0,01 | 66,62 ^d ± 0,81 | 43,30 ^e ± 0,39 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; a - e – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly ($p \leq 0,05$); n = 3.

W przebadanej grupie odmian kukurydzy największą zawartość skrobi odnotowano w ziarnie pochodzącym od producenta Euralis, tj. ES Palladium, ES Runway oraz ES Hattrick – 65,08 ÷ 66,62 % (tab. 1). Duża zawartość skrobi, która na drodze dwustopniowej hydrolizy enzymatycznej została rozłożona do cukrów redukujących, miała wpływ na wyniki wydajności etanolu. W przypadku odmian Euralis – ES Runway oraz ES Hattrick – wydajność etanolu ze 100 kg surowca była największa i wynosiła 43,3 dm³. Na równie wysokim poziomie plasowały się odmiany ES Palladium (42,3 dm³) oraz Pioneer P8821 (41,9 dm³). W przypadku pozostałych odmian kukurydzy wydajność etanolu ze 100 kg ziarna zawierała się w granicach 36,5 ÷ 40,6 dm³ (tab. 1).

W spirytusach otrzymanych w wyniku destylacji zacierów odfermentowanych oznaczono alkohole wyższe, metanol, estry, aldehydy, w tym akroleinę oraz kwasowość i moc. Większość produktów ubocznych fermentacji alkoholowej tworzy z wodą mieszaniny azeotropowe, których temperatury wrzenia są niższe niż temperatury wrzenia czystych składników, dlatego podczas procesu destylacji do spirytusu dostawały się także produkty należące do wysokowrzących substancji chemicznych [10].

W spirytusach zawartość związków karbonylowych wynosiła od 0,022 g/dm³ A₁₀₀ (Pioneer 8307) do 0,087 g/dm³ A₁₀₀ (Syngenta SY Talisman) – tab. 2, czyli była dużo poniżej wartości normatywnej. Zgodnie z Polską Normą [12] dopuszczalna zawartość

aldehydów w spirytusach zbożowych przeznaczonych na cele spożywcze wynosi bowiem $0,1 \text{ g/dm}^3 \text{ A}_{100}$. Na ogólną sumę aldehydów składały się: aldehyd octowy i aldehyd propionowy.

Tabela 2. Zawartość aldehydów, estrów oraz kwasowość w spirytusach uzyskanych z ziarna różnych odmian kukurydzy po 72 h fermentacji etanolowej

Table 2. Content of aldehydes in, esters in and acidity of spirits produced from grain of different maize varieties after 72 h of ethanol fermentation

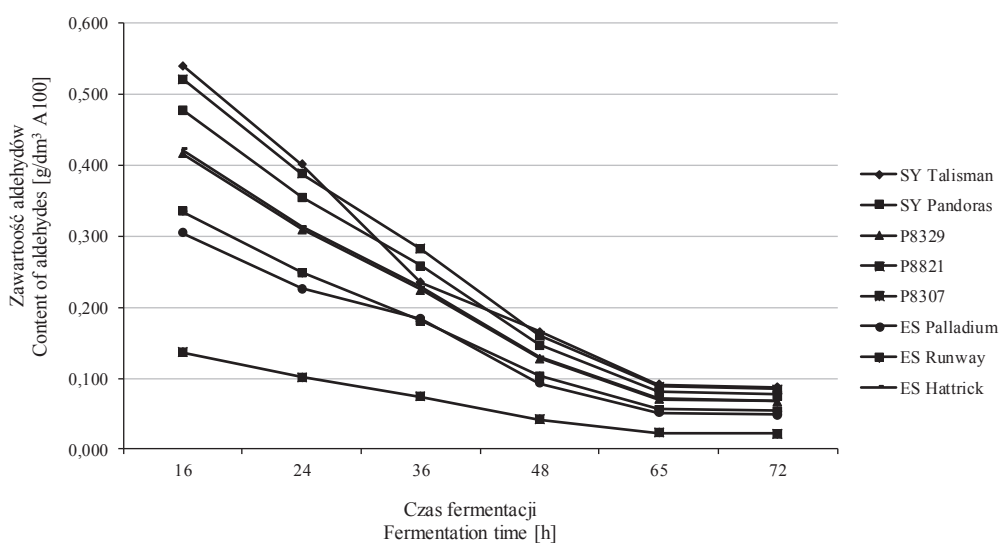
| Producent Producer | Odmiana kukurydzy Maize variety | Aldehydy [g/dm ³ A ₁₀₀] Aldehydes [g/dm ³ EtOH] | Estry [g/dm ³ A ₁₀₀] Esters [g/dm ³ EtOH] | Kwasowość [g/dm ³ A ₁₀₀] Acidity [g/dm ³ EtOH] |
|-----------------------|------------------------------------|--|--|---|
| Syngenta | SY Talisman (flint) | 0,087 ^b ± 0,013 | 0,015 ^d ± 0,001 | 0,020 ^a ± 0,003 |
| | SY Pandoras (flint) | 0,077 ^b ± 0,011 | 0,008 ^c ± 0,001 | 0,056 ^{ab} ± 0,009 |
| Pioneer | P8329 (~dent) | 0,067 ^{ab} ± 0,014 | 0,043 ^c ± 0,003 | 0,059 ^b ± 0,012 |
| | P8821 (flint/dent) | 0,084 ^b ± 0,180 | 0,012 ^{cd} ± 0,001 | 0,036 ^{ab} ± 0,080 |
| | P8307 (flint/dent) | 0,022 ^a ± 0,008 | 0,004 ^{ab} ± 0,000 | 0,033 ^{ab} ± 0,011 |
| Euralis | ES Palladium (flint) | 0,049 ^{ab} ± 0,004 | 0,005 ^b ± 0,000 | 0,047 ^b ± 0,014 |
| | ES Runway (dent) | 0,054 ^{ab} ± 0,011 | 0,001 ^a ± 0,000 | 0,020 ^a ± 0,005 |
| | ES Hatrick (dent) | 0,068 ^{ab} ± 0,017 | 0,003 ^{ab} ± 0,000 | 0,036 ^{ab} ± 0,004 |

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

Przemiany biochemiczne podczas fermentacji alkoholowej zachodzą bardzo dynamicznie, m.in. kwas pirogronowy podlega nieoksydacyjnej dekarboksylacji, polegającej na odszczepieniu CO₂ przy udziale enzymu dekarboksylazy pirogronowej współdziałającej z pirofosforanem tiaminy DPT i jonami magnezu. Powstały aldehyd octowy staje się akceptorem atomów wodoru z uwodorowanego NAD⁺, w wyniku czego przy udziale dehydrogenazy alkoholowej następuje przeniesienie tych atomów i utworzenie alkoholu etylowego [2, 4, 17]. Najwięcej tworzącego się aldehydu octowego, który jest dominującym alifatycznym związkiem karbonylowym [1], zaobserwowano w pierwszym etapie fermentacji. Redukcja aldehydu octowego w szlaku metabolicznym do alkoholu etylowego przy udziale dehydrogenazy alkoholowej nie nadążała początkowo za jego produkcją. Dopiero w kolejnych godzinach fermentacji nagromadzony aldehyd octowy był wykorzystywany jako akceptor wodoru i redukowany sukcesywnie do alkoholu etylowego, co skutkowało stopniowym zmniejszaniem jego stężenia w środowisku fermentacyjnym i przyrostem ilości etanolu. Tak więc największa ilość aldehydu octowego, jak również aldehydu propionowego, wytwarzana była w pierwszych 16 h fermentacji (rys. 1). W tym okresie stężenie związków karbonylowych w destylatach w zależności od odmiany kukurydzy zawierało się w zakresie $0,137 \div 0,540 \text{ g/dm}^3 \text{ A}_{100}$. W ciągu następnych godzin fermentacji etanolowej (16 ÷ 65 h) ilość aldehydów sukce-

sywnie malała, jednak największy ich ubytek obserwowano między 16. a 48. godziną. W końcowym okresie po dofermentowaniu (72 h) osiągnano minimalny poziom aldehydów, charakterystyczny dla danego surowca i odmiany. Ubytek związków karbonylowych między 16. a 72. godziną fermentacji wynosił ok. 82 ÷ 85 %.

W żadnym z przebadanych spirytusów nie stwierdzono obecności akroleiny, która ma właściwości kancerogenne. Akroleina to aldehyd akrylowy, którego niewielka ilość w spirytusie powoduje wyczuwalne pogorszenie jego walorów zapachowych – próg wyczuwalności sensorycznej wynosi 10 mg/dm³.



Rys. 1. Zawartość aldehydów w spirytusach uzyskanych z ziarna różnych odmian kukurydzy w zależności od czasu fermentacji etanolowej

Fig. 1. Content of aldehydes in spirits produced from grain of different maize varieties depending on ethanol fermentation duration

Związki, które mają decydujący wpływ na zapach spirytusu, to estry. Ich obecność jest częściowo spowodowana aktywnością esterazy drożdżowej, która w znacznym stopniu zależy od stężenia glukozy i fazy wzrostu drożdży. Niewielką ilość tych związków odnotowano w spirytusach z ziarna kukurydzy producenta Euralis, tj. ES Runway – 0,001 g/dm³ A₁₀₀ oraz ES Hattrick – 0,003 g/dm³ A₁₀₀. Większą (choć nieznaczącą) ilość estrów stwierdzono w spirytusie z ziarna P8329 producenta Pioneer – 0,043 g/dm³ A₁₀₀, (tab. 2).

Produktami ubocznymi, które występują w zacierach, są także kwas octowy oraz kwasy nieorganiczne zastosowane do regulacji pH zacieru podczas hydrolizy skrobi oraz podłoża hodowlanego dla drożdży. Kwasowość wszystkich analizowanych spirytusów była niewielka i zawierała się w granicach 0,020 ÷ 0,059 g/dm³ A₁₀₀, przy czym

według Polskiej Normy [12] kwasowość spirytusu zbożowego nie może przekroczyć $0,08 \text{ g/dm}^3 A_{100}$.

Tabela 3. Zawartość alkoholi wyższych w spirytusach uzyskanych z ziarna różnych odmian kukurydzy po 72 h fermentacji etanolowej

Table 3. Content of higher alcohols in spirits produced from grain of different maize varieties after 72 h of ethanol fermentation

| Producent Producer | Odmiana kukurydzy Maize variety | Alkohole wyższe [$\text{g/dm}^3 A_{100}$] Higher alcohols [$\text{g/dm}^3 \text{EtOH}$] | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|
| | | n-propanol | izo-butanol isobutanol | n-butanol | 2-metylo- 1-butanol 2-methyl- 1-butanol | Suma Total |
| Syngenta | SY Talisman (flint) | 0,854 ^c ± 0,021 | 1,614 ^d ± 0,087 | 0,010 ^d ± 0,000 | 0,708 ^c ± 0,023 | 3,186 ^d ± 0,041 |
| | SY Pandoras (flint) | 0,909 ^c ± 0,027 | 1,609 ^d ± 0,094 | 0,009 ^{cd} ± 0,000 | 0,746 ^d ± 0,030 | 3,273 ^d ± 0,021 |
| Pioneer | P8329 (~dent) | 1,335 ^d ± 0,015 | 0,808 ^b ± 0,028 | 0,017 ^e ± 0,001 | 0,246 ^a ± 0,009 | 2,406 ^c ± 0,040 |
| | P8821 (flint/dent) | 0,836 ^c ± 0,017 | 1,746 ^d ± 0,046 | 0,010 ^d ± 0,000 | 0,844 ^{de} ± 0,049 | 3,436 ^e ± 0,013 |
| | P8307 (flint/dent) | 0,821 ^c ± 0,080 | 1,785 ^d ± 0,055 | 0,008 ^c ± 0,000 | 0,872 ^e ± 0,042 | 3,486 ^e ± 0,044 |
| Euralis | ES Palladium (flint) | 0,849 ^c ± 0,069 | 1,768 ^d ± 0,047 | 0,010 ^d ± 0,001 | 0,926 ^e ± 0,031 | 3,553 ^e ± 0,024 |
| | ES Runway (dent) | 0,379 ^b ± 0,021 | 1,134 ^c ± 0,038 | 0,006 ^b ± 0,000 | 0,479 ^b ± 0,024 | 1,998 ^b ± 0,021 |
| | ES Hattrick (dent) | 0,216 ^a ± 0,011 | 0,418 ^a ± 0,017 | 0,002 ^a ± 0,000 | 0,219 ^a ± 0,015 | 0,855 ^a ± 0,019 |

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

Metanol występował we wszystkich badanych spirytusach w niewielkiej ilości $0,001 \text{ g/100 cm}^3 A_{100}$. W procesie fermentacji alkoholowej oprócz metanolu i etanolu tworzą się również alkohole wyższe, tzw. oleje fuzlowe. Dowiedziono kilku dróg powstawania alkoholi wyższych. Związki te powstają w wyniku dezaminacji aminokwasów, głównie izoleucyny, leucyny i waliny. Drożdże, wykorzystując odszczepiony z aminokwasów amoniak, syntetyzują własne białko. Aminokwasy ulegają przy tym dezaminacji i dekarboksylacji, a powstałe alkohole wyższe wydzielane są z komórki. Tworzy się w ten sposób izobutanol z waliny, 3-metylobutanol z leucyny, 2-metylobutanol z izoleucyny itd. [14]. Ilość alkoholi wyższych w otrzymanych spirytusach zawierała się w dość szerokich granicach $0,855 \div 3,553 \text{ g/dm}^3 A_{100}$, przy czym najniższe ich stężenie odnotowano w spirytusie wytworzonym z ziarna Euralis ES

Hattrick (tab. 3). Na poziom fuzli wpływ miała ilość n-propanolu, izobutanolu, n-butanolu oraz 2-metylo-1-butanolu.

Wnioski

1. Wydajność etanolu możliwa do uzyskania ze 100 kg surowca powinna decydować o wyborze ziarna kukurydzy przeznaczonego do produkcji spirytusu. W przeprowadzonych badaniach największą wydajność etanolu uzyskano z ziarna odmian Euralis: ES Runway oraz ES Hattrick – 43,3 dm³/100 kg surowca.
2. Zawartość związków karbonylowych (tj. aldehydu octowego i propionowego) w destylatach uzyskanych z ziarna różnych odmian kukurydzy zawierała się w przedziale 0,022 ÷ 0,087 g/dm³·A₁₀₀ i nie przekraczała dopuszczalnej ilości aldehydów w spirytusach zbożowych przeznaczonych na cele spożywcze.
3. Największą zawartość związków karbonylowych w destylatach stwierdzono w pierwszych godzinach fermentacji. W kolejnych godzinach aldehydy były redukowane do etanolu, co skutkowało stopniowym zmniejszaniem ich stężenia w środowisku fermentacyjnym. Wartości minimalne odnotowano między 65. a 72. godziną procesu.
4. Stwierdzono, że na ogólną sumę alkoholi wyższych składały się: n-propanol, izobutanol, n-butanol oraz 2-metylo-1-butanol. Najwyższe stężenie fuzli (3,553 g/dm³·A₁₀₀) odnotowano w spirytusie uzyskanym z ziarna odmiany Euralis ES Palladium, a najniższe (0,855 g/dm³·A₁₀₀) – Euralis ES Hattrick.

Literatura

- [1] Balcerek M., Pielech-Przybylska K., Strąg E., Patelski P., Dziekońska U.: Comparison of fermentation results and quality of the agricultural distillates obtained by application of commercial amylolytic preparations and cereal malts. *Eur. Food Res. Technol.*, 2016, 242, 321-335.
- [2] Cheraiti N., Guezenc S., Salmon J.M.: Very early acetaldehyde production by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains: A new intrinsic character. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 86, 693-700.
- [3] Dragone G., Mussatto S.I., Oliveira J.M., Teixeira J.A.: Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.*, 2009, 4 (112), 929-935.
- [4] Jamróz J., Jankowski D.: Characteristic of producing ethyl alcohol. *Technical Transactions*, 2018, 3 (115), 53-66.
- [5] Kawa-Rygielska J.: Bioetanol z kukurydzy – czy warto produkować? *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 2007, 5 (51), 38-39.
- [6] Liszewski M.: Kukurydza: kierunek użytkowania a cechy odmian. [on line]. Dostęp w Internecie [05.02.2020]: <https://www.agropolska.pl/uprawa/kukurydza/kukurydza-kierunek-uzytkowania-a-cechy-odmian,66.html>
- [7] Kłosowski G., Mikulski D., Macko D., Mikłaszewska B., Kotarska K., Czupryński B.: Influence of various yeast strains and selected starchy raw materials on production of higher alcohols during the alcoholic fermentation process. *Eur. Food Res. Technol.*, 2014, 240 (1), 233-242.

- [8] Michalski T.: Z pola dla przemysłu. W: Kukurydza rośliną przyszłości. Wyd. III. Specjalny dodatek do dwutygodnika "Agro Serwis", Warszawa 2005.
- [9] Niedziółka I., Szymanek M.: Przemysłowe i energetyczne wykorzystanie ziarna kukurydzy. Motrol. Motoryzacja i Energetyka Rolnictwa, 2003, 05, 115-121.
- [10] Onuki S., Koziel J.A., Jenks W., Cai L., Grewell D., van Leeuwen J.H.: Taking ethanol quality beyond fuel grade: A review. J. Inst. Brew., 2016, 122, 588-598.
- [11] Pielech-Przybylska K., Balcerek M., Ciepeliowski G., Pacholczyk-Sienicka B., Albrecht Ł., Dziekońska-Kubczak U., Bonikowski R., Patelski P.: Effect of co-inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria on the content of propan-2-ol, acetaldehyde and weak acids in fermented distillery mashes. Int. J. Mol. Sci., 2019, 20 (7), #1659.
- [12] PN-A-79523:2002. Destylat rolniczy.
- [13] PB-ZG/09. Wyd. II z dn. 08.12.2014 r.: Wydajność alkoholu z węglowodanów zawartych w surowcach gorzelnicznych po hydrolizie enzymatycznej.
- [14] Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A.: Handbook of Enology. Vol. 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd ed. John Wiley and Sons Ltd, Chichester 2006.
- [15] Strąk-Graczyk E., Balcerek M., Przybylska K., Żyżelewicz D.: Simultaneous saccharification and fermentation of native rye, wheat and triticale starch. J. Sci. Food Agric., 2019, 99, 4904-4912.
- [16] Waligóra H., Skrzypczak W.: Kukurydza flint i dent – różnice i wykorzystanie. Hodowca Bydła, 2015, 7-8.
- [17] Zhou M., Zhou J., Tan M., Du J., Yan B., Wong J.W.C., Zhang Y.: Enhanced carboxylic acids production by decreasing hydrogen partial pressure during acidogenic fermentation of glucose. Biore-sour. Technol., 2017, 245, 44-51.
- [18] Zielonka R., Jarosławski L., Słomińska L., Radke J.: Wpływ fizycznej i amylolicznej modyfikacji ziarna kukurydzy i produktów przemiału na zawartość wybranych składników. Acta Agrophysica, 2012, 19 (1), 215-225.
- [19] PN-ISO 6496:2002. Pasze. Oznaczanie wilgotności i zawartości innych substancji lotnych.
- [20] PN-EN ISO 10520:2002. Skrobia naturalna. Oznaczanie zawartości skrobi. Metoda polarymetryczna Ewersa.
- [21] PN-A-79528-7:2001. Spirytus (alkohol etylowy). Metody badań. Oznaczanie kwasowości.


IDENTIFICATION OF CHEMICAL IMPURITIES IN ETHANOL PRODUCED FROM GRAIN OF VARIOUS MAIZE VARIETIES

S u m m a r y

The objective of the research study was to identify chemical compounds that are impurities in ethanol obtained in the process of alcoholic fermentation of various maize varieties. There were described reasons for the formation of such compounds in the fermentation process of maize, which reduce the quality of ethanol produced. There was carried out a qualitative and quantitative identification of by-products in the spirits after the completed fermentation process was carried out. It included the following groups of compounds: esters, aldehydes, higher alcohols and methanol. The quality analysis of ethanol was performed using a gas chromatography method.

The content of carbonyl compounds in the ethanol intended for food purposes is regulated by standards and cannot exceed the value of 0.1 g/dm³ of EtOH. In the samples analysed it ranged 0.022 ÷ 0.087 g/dm³ of EtOH. The highest amount of carbonyl compounds was found during the first stage of fermentation, when the highest quantities of ethanol were formed. During the subsequent hours of ethanol

fermentation the amount of aldehydes gradually decreased, with the highest decrease observed between the 16th and 48th hour. In any of the spirits produced there was not found acrolein, which has carcinogenic properties. The amount of higher alcohols was within the fairly wide limits, i.e. $0.855 \div 3.553 \text{ g/dm}^3$ of EtOH. Their level was impacted by the amount of n-propanol, isobutanol, n-butanol and 2-methyl-1-butanol. The yield of alcohol produced from 100 kg of grain of various maize varieties ranged $37.5 \div 43.3 \text{ dm}^3$. The highest yield of spirit was reported in the case of the Euralis ES Runway and Euralis ES Hattric varieties.

Key words: maize, starch, alcoholic fermentation, by-products of fermentation, chemical impurities of ethanol 

MARTYNA WOŹNIAK, PAWEŁ SIUDEM, KATARZYNA PARADOWSKA

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE ORAZ ZAWARTOŚĆ KAPSAICYNOIDÓW W WYBRANYCH PRZYPRAWACH Z DODATKIEM OSTREJ PAPRYKI, DOSTĘPNYCH NA POLSKIM RYNKU

Streszczenie

Przyprawy stanowią istotny składnik diety. Ostra papryka jest powszechnie używana jako przyprawa kuchenna. Korzyści z jej stosowania wiążą się nie tylko z walorami smakowymi, ale także z pozytywnym wpływem prozdrowotnym. Jest to związane ze związkami polifenolowymi oraz innymi związkami o właściwościach przeciwutleniających zawartymi w owocach ostrej papryki, na przykład z kapsaicyną. Celem pracy było określenie zawartości związków polifenolowych, w tym flawonoidów, kapsaicynoidów oraz właściwości przeciwutleniających i zdolności redukowania jonów żelaza w przyprawach zawierających paprykę ostrą, dostępnych na polskim rynku. Z 7 różnych przypraw oznaczonych przez producentów jako „papryka ostra”, „chili” lub „pieprz cayenne” oraz z papryki jalapeño z uprawy w warunkach domowych przygotowano ekstrakty wodno-etanolowe. Oznaczono w nich całkowitą zawartość związków polifenolowych (metodą Folina-Ciocalteu’a) oraz flawonoidów. Wykonano również testy przeciwutleniające FRAP i DPPH^{*} oraz oznaczono spektrofotometrycznie zawartość kapsaicynoidów w przeliczeniu na kapsaicynę. Przyprawy dostępne na polskim rynku nie różniły się między sobą znacząco pod względem właściwości przeciwutleniających, jednak znacznie odbiegały od uzyskanej i wysuszonej w warunkach domowych papryki jalapeño, która wyróżniała się największą zawartością kapsaicyny oraz najwyższymi wartościami aktywności przeciwutleniającej. Prawdopodobnie miały na to wpływ parametry suszenia i przechowywania papryki. Ponadto przyprawy wytwarzane przemysłowo mogą zawierać dodatek innych substancji, które zwiększają objętość produktu, a jednocześnie obniżają jakość końcowego wyrobu. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że przyprawy zawierające ostrą paprykę mogą być dobrym źródłem związków przeciwutleniających w diecie.

Słowa kluczowe: papryka ostra, polifenole, kapsaicyna, kapsaicynoidy, właściwości przeciwutleniające, SHU

Wprowadzenie

Od dłuższego czasu obserwuje się propagowanie zdrowego stylu życia przejawiającego się nie tylko aktywnością fizyczną, ale także spożywaniem żywności naturalnej

Mgr farm. M. Woźniak, Koło Naukowe Free Radicals, dr P. Siudem, dr hab. K. Paradowska, Katedra Farmacji Fizycznej i Bioanalizy, Wydz. Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa. Kontakt: pawel.siudem@wum.edu.pl

o właściwościach odżywczych i prozdrowotnych. Działania takie wpisują się w profilaktykę zdrowia. Produktami pochodzenia naturalnego, które mogą wspomagać działanie prozdrowotne żywności, są przyprawy.

Przyprawy to naturalne lub przetworzone części roślin zielarskich używane w kuchni jako dodatki do żywności. Ze względu na swoją różnorodność, możliwości wykorzystania oraz skład chemiczny nie zostały jednoznacznie zdefiniowane. Często są to mieszanki wieloskładnikowe zawierające obok przypraw roślinnych substancje smakowo-zapachowe (inne niż przyprawy roślinne), substancje wzmacniające smak, produkty przyprawowe, dodatki funkcjonalne [5]. Surowcami przyprawowymi mogą być różne części anatomiczne roślin: owoce, nasiona, liście, a także kwiaty, korzenie i kłącza. Ze względu na pochodzenie wyróżnia się przyprawy rodzime (cebula, czosnek, gorczyca czy majeranek) i importowane (kardamon, pieprz czarny czy goździkowiec korzenny [16]).

W przetwórstwie rolno-spożywczym przyprawy odgrywają ważną rolę, gdyż nadają potrawom barwę i aromat, a także przedłużają ich trwałość oraz wzbogacają walory smakowe. Wynika to z obecności w nich związków należących do różnych grup chemicznych (np. alkaloidów czy terpenów wchodzących w skład olejków eterycznych). Niektóre przyprawy pobudzają apetyt, nasilają czynności wydzielnicze przewodu pokarmowego. Inne regulują perystaltykę jelit i przyspieszają wydalanie niestrawionego pokarmu. Mogą działać pobudzająco czy uspokajająco, jak również bakteriostatycznie lub bakteriobójczo [30]. Działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwutleniające przypraw często skorelowane jest z występującymi w nich fitozwiązkami [26]. W celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności stosuje się je jako dodatki o charakterze hamującym namnażanie mikroorganizmów [9].

Papryka ostra, pieprzowiec (*Capsicum* ssp.), zwana też chili jest powszechnie stosowana w kuchni [2]. Pochodzi z Ameryki Łacińskiej, a pierwsze informacje na jej temat wywodzą się z czasów prekolumbijskich. Obecnie jako główne źródło papryki uznaje się 5 gatunków: *C. annum*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* [7]. Gatunki te ceni się za intensywny ostry smak i wyrazisty aromat owoców. Mogą one również wykazywać właściwości prozdrowotne.

Owoc pieprzowca (*Capsici fructus*) został zdefiniowany w Farmakopei Polskiej XI [25] jako: wysuszone i dojrzałe owoce *Capsicum annum* L. var *minimum* (Miller) Heiser i *Capsicum frutescens* L., w których zawartość sumy kapsaicynoidów w przeliczeniu na kapsaicynę jest nie mniejsza niż 0,4 %. W FP XI wymienione są też produkty z owoców pieprzowca: oleożywica oczyszczona i standaryzowana (*Capsici oleoresina rafinata et normata*), nalewka standaryzowana (*Capsici tinctura normata*) i gęsty wyciąg standaryzowany (*Capsici extractum spissum normatum*).

Właściwości prozdrowotne *Capsici fructus* determinują związki: kapsaicynoidy (dominuje kapsaicyna), związki polifenolowe, w tym flawonoidy (np. 7-glukozyd luteoliny), karotenoidy (kapsantyna, β -karoten) i witamina C [1].

Kapsaicyna jest głównym związkiem alkaloidowym zawartym w owocach pieprzowca. Alkaloidy produkowane przez rośliny jako metabolity wtórne często wykazują różnokierunkową aktywność biologiczną. Kapsaicyna jest znana głównie jako związek odpowiedzialny za pikantny smak potraw [22], może jednak być również stosowana w farmacji [7]. Związek ten jest odpowiedzialny za działanie przeciwbólowe i przeciwbakteryjne, obniżanie ciśnienia krwi, nasilenie spalania tkanki tłuszczowej, działanie gastroprotekcyjne, a także przeciwutleniające [13]. Działanie przeciwutleniające wykazują też zawarte w papryce polifenole, w tym flawonoidy i witamina C. Zarówno zawartość tych związków, jak i właściwości przeciwutleniające różnicują gatunki papryki [5].

Ze względu na wzrost spożywania pikantnych potraw i szeroki asortyment przypraw zawierających paprykę ostrą celowe jest badanie jakości i składu przypraw obecnych na rynku.

Celem pracy było określenie zawartości związków polifenolowych, w tym flawonoidów, kapsaicynoidów oraz właściwości przeciwutleniających i zdolności redukcji jonów żelaza w przyprawach zawierających paprykę ostrą, dostępnych na polskim rynku.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym były przyprawy zawierające *Capsicum* spp.: pieprz cayenne, chili jalapeño, chili peperoncini – marki Kotanyi (Kotanyi, Austria), papryka ostra i chili – marki Kamis (Mc Cormik, Polska), papryka ostra marki Prymat (Prymat Sp. z o.o., Polska) i papryka ostra marki Herbes (ZPH Herbes Wiesław Sikorski, Polska). Zakupione przyprawy były oznakowane aktualnym terminem przydatności do spożycia. Ostatnią próbę stanowiła papryka *Capsicum annuum* var. jalapeño z uprawy domowej. Zakupione nasiona odmiany jalapeño wysiewano w marcu (w temperaturze pokojowej). Uprawę prowadzono w glebie ogrodniczej uniwersalnej, wewnątrz budynku (okno wschodnie), a po wykiełkowaniu i przepikowaniu roślin dalszą uprawę prowadzono na zewnątrz budynku w warunkach wilgotności i temperatury typowych dla klimatu umiarkowanego. Owoce zbierano w sierpniu, a następnie suszono w temp. 20 ± 2 °C. Charakterystykę przypraw przedstawiono w tab. 1.

Przed przystąpieniem do badań przyprawy P5, P6 i P8 rozcierano w moździerzu do postaci proszku. W celu doboru odpowiedniego rozpuszczalnika początkowo wykonywano ekstrakcje z użyciem metanolu, acetonu i etanolu o stężeniu 70 i 98 %. Na podstawie zawartości związków polifenolowych w tych ekstraktach jako najefektywniejszy rozpuszczalnik do przygotowania docelowych ekstraktów wybrano 70-

procentowy etanol. Do wykonania każdego ekstraktu odważano 3,000 g przyprawy i rozpuszczano w 20 ml 70-procentowego etanolu. Ekstrakty umieszczano na 10 min w myjce ultradźwiękowej Sonic-2 (Polsonic, Polska) o parametrach: moc układu grzania – 150 W, moc ultradźwiękowa – 2×100 W, częstotliwość generatora – 40 KHz, a następnie wytrząsano je przez 2 h w temp. 20 ± 2 °C (250 obr./min) w wytrząsarce SK-O330-Pro (DragonLab, Polska). Następnie przesączało przez sączi bibułowe i otrzymywano klarowne roztwory. Każdy ekstrakt wykonano w dwóch powtórzeniach.

Tabela 1. Charakterystyka badanych przypraw zawierających *Capsicum* spp.
Table 1. Characteristics of analysed spices containing *Capsicum* spp.

| Próba Sample | Nazwa produktu Name of product | Marka produktu Product brand | Opis producenta Description by manufacturer | Postać Form |
|-----------------|--|---|---|--|
| P1 | Pieprz cayenne mielony Ground cayenne pepper | Kotanyi | Dojrzałe pomarańczowo-czerwone papryczki chili w postaci zmielonego proszku / Ripe orange-red chili peppers in the form of ground powder | Proszek Powder |
| P2 | Papryka ostra mielona Ground hot pepper | Kamis | Papryka ostra – 65 %, odtuszczona Hot pepper – 65 %, degreased | Proszek Powder |
| P3 | Chili pieprz cayenne Chili cayenne pepper | Kamis | Ostra mieszanka chili z tłuczonymi owocami papryki gałęzistej Spicy mix of chilli and mashed fruits of <i>Capsicum frutescens</i> | Proszek Powder |
| P4 | Papryka ostra mielona Ground hot pepper | Prymat | Papryka ostra mielona pochodząca z Hiszpanii / Ground hot pepper originating from Spain | Proszek Powder |
| P5 | Chili jalapeño kruszone Crushed chilli jalapeño | Kotanyi | Papryczka chili jalapeño pochodząca z Meksyku. Stopień ostrości w skali Scoville'a 6 400 ÷ 12 000 / Jalapeño chili pepper originating from Mexico. Scoville Heat Units 6 400 ÷ 12 000 | Części owoców Pieces of fruit |
| P6 | Chili peperoncini całe / Whole chilli peperoncini | Kotanyi | Chili peperoncini. Stopień ostrości w skali Scoville'a 100 000 ÷ 192 000 Chili peperoncini. Scoville Heat Units 100 000 ÷ 192 000 | Całe owoce Whole fruits |
| P7 | Papryka ostra Hot pepper | Herbes | Papryka ostra w postaci sproszkowanej pochodząca z Hiszpanii / Hot powdered pepper originating from Spain | Proszek Powder |
| P8 | <i>Capsicum annuum</i> var. jalapeño | Uprawa domowa Indoor cultivation | Wysuszone owoce papryki Dried pepper fruits | Całe owoce Whole fruits |

W ekstraktach etanolowych oznaczano całkowitą zawartość polifenoli (TP), całkowitą zawartość flawonoidów (TF) oraz wykonywano dwa testy na oznaczanie właściwości przeciwutleniających: FRAP i z użyciem rodnika DPPH'. Wykonywano także spektrofotometryczne oznaczanie sumy kapsaicynoidów w przeliczeniu na kapsaicynę. Oznaczenia spektrofotometryczne wykonywano przy użyciu spektrofotometru UV-VIS Evolution 60S (Thermo Scientific, USA) w temp. 20 ± 2 °C. Wyniki analiz przeliczano na gram suchej masy przyprawy. Wszystkie oznaczenia wykonano w 3 powtórzeniach.

Oznaczanie całkowitej zawartości polifenoli (TP) wykonywano spektrofotometrycznie metodą Folina-Ciocalteu'a [18]. Pobierano 20 μ l odpowiednio rozcieńczonej próbki do kuwety, dodawano kolejno 1,58 ml wody dejonizowanej, 100 μ l odczynnika Folina-Ciocalteu'a i po wymieszaniu dodawano 200 μ l 20-procentowego roztworu wodorowęglanu sodu. Próbkę wstawiano do termostatu (40 °C). Po upływie 20 min mierzono jej absorbancję przy długości fali $\lambda = 765$ nm wobec próby zerowej. Wyniki wyrażano jako ekwiwalent kwasu galusowego (GAE) na podstawie krzywej wzorcowej: $y = 1,059x + 0,004$ ($R^2 = 0,998$), gdzie: y – wartość absorbancji, x – stężenie kwasu galusowego [mg/g].

Oznaczanie całkowitej zawartości flawonoidów (TF) wykonywano metodą, którą opracowali Kim i wsp. [14]. Do kuwety pomiarowej dodawano 1,4 ml dejonizowanej wody, 100 μ l próbki/wzorca/dejonizowanej wody, 60 μ l 5-procentowego NaNO₃, 60 μ l 10-procentowego AlCl₃, inkubowano w temp. 25 °C przez 5 min, a następnie dodawano 0,4 ml 1M NaOH. Pomiar absorbancji wykonywano wobec próby zerowej przy długości fali $\lambda = 510$ nm.

Zawartość flawonoidów obliczano na podstawie krzywej wzorcowej: $y = 1,408x - 0,003$ ($R^2 = 0,989$), gdzie: y – wartość absorbancji, x – stężenie katechiny [mg/ml] i wyrażano jako ekwiwalent katechiny (CE) w ekstrakcie [mg/g].

Właściwości przeciwutleniające oznaczano spektrofotometrycznie według procedury, którą opracowali Sanny i wsp. [27]. W oznaczeniu zastosowano trwały rodnik DPPH' (1,1-difenylo-2-pikrylohydrylowy). Do 100 μ l odpowiednio rozcieńczonego ekstraktu dodawano 1900 μ l rozcieńczonego roztworu DPPH'. Odstawiano do inkubacji w temp. 20 ± 2 °C na 20 min, po czym mierzono absorbancję (długość fali $\lambda = 515$ nm) próbek zawierających ekstrakty względem próbki bez dodatku ekstraktu. Wyniki wyrażano jako ilość zneutralizowanego rodnika przez ekstrakt w mg/g s.m.

Zdolność redukcji 1 mola żelaza z III stopnia utlenienia na II – FRAP (*Ferric Reducing Ability*) wykonywano zgodnie z procedurą, którą opracowali Benzie i Strain [3]. Do 1 ml reagenta FRAP dodawano 0,05 ml odpowiednio rozcieńczonego ekstraktu i inkubowano przez 4 min w temp. 37 °C. Absorbancję mierzono wobec próby zerowej przy długości fali $\lambda = 593$ nm. Wyniki wyrażano jako ilość zredukowanych jonów żelaza przez ekstrakt w Fe²⁺ mmol/g s.m.

Zawartość kapsaicynoidów w przeliczeniu na kapsaicynę oznaczano spektrofotometrycznie [24]. Na podstawie widma absorpcyjnego wzorca kapsaicyny ustalono maksimum absorbancji przy długości fali $\lambda = 280$ nm. Zawartość kapsaicyny obliczano na podstawie krzywej wzorcowej: $y = 0,0097x + 0,0149$ ($R^2 = 0,998$). Wyniki wyrażano w mg sumy kapsaicynoidów w przeliczeniu na kapsaicynę/g s.m.

Do statystycznego opracowania wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem Tukeya ($p < 0,05$). Obliczenia wykonano przy użyciu programu Microsoft Excel™ 2010 oraz Statistica 13.

Wyniki i dyskusja

Całkowita zawartość polifenoli w suchej masie prób P1 - P7 zawierała się w przedziale $9,17 \div 11,17$ GAE/g s.m., natomiast w papryce P8, pochodzącej z uprawy w warunkach domowych, stwierdzono większą zawartość polifenoli ogółem, tj. średnio $17,49$ mg GAE/g s.m. papryki (tab. 2). Całkowita zawartość flawonoidów w ekstraktach z przypraw komercyjnych wynosiła $1,33 \div 2,13$ ekwiwalentu CE/g s.m. Ekstrakt z papryki P8 ponownie charakteryzował się najwyższą wartością – $2,75$ ekwiwalentu CE/g s.m. W teście DPPH[•] oznaczano ilość rodnika zneutralizowanego przez ekstrakt. Efektem działania przypraw P1 - P7 było $14,9 \div 22,2$ mg zneutralizowanego rodnika/g s.m. W przypadku papryki z uprawy domowej wynik ten był wyższy średnio o $140 \div 260$ % i wyniósł aż $53,62$ mg zneutralizowanego rodnika/g s.m. W teście FRAP wykazano zdolność redukcji 1 mola żelaza z III stopnia utlenienia na II na poziomie $0,175 \div 0,439$ mmol Fe²⁺/g s.m. – ekstrakty z przypraw P1 - P7 i $0,588$ mmol Fe²⁺/g s.m. – P8.

Na wartości TP, TF, DPPH[•] i FRAP wpływa wiele czynników. Moo-Huchin i wsp. [21], Conforti i wsp. [10], Shaimaa i wsp. [28] potwierdzają, że podczas dojrzewania owoców (w tym chili) zwiększa się zawartość polifenoli i flawonoidów. Wyższe wyniki w teście DPPH[•] osiągają jednak owoce zielone niż te o pomarańczowej barwie [7]. Również w badaniach własnych przyprawa P5 (o zielonej barwie) wykazywała wyższe wartości w teście DPPH[•] oraz FRAP w porównaniu z pozostałymi przyprawami przemysłowymi. Może to być związane z większą zawartością chlorofilu w zielonych owocach i wskazuje, że zdolność do neutralizowania wolnych rodników zależy nie tylko od całkowitej zawartości polifenoli i flawonoidów, ale również od innych związków obecnych w owocach.

Gatunek roślin, z jakich pozyskuje się owoce do sporządzenia przypraw ma także wpływ na zawartość TP i TF oraz wynik testu DPPH[•]. Olatunij i wsp. [23] odnotowali największe różnice pod względem zawartości flawonoidów, a dotyczyły one ekstraktów etanolowych z papryki odmiany *C. annuum* var. *grossum* – średnio $1630,53$ ekwiwalentu QE (ekwiwalentu kwercetyny)/g s. m.) i *C. frutescens* var. *baccatum* – średnio $867,241$ ekwiwalentu QE/g s.m.).

Tabela 2. Wyniki całkowitej zawartości polifenoli, całkowitej zawartości flawonoidów, testu DPPH[•] i testu FRAP w badanych przyprawach zawierających *Capsicum* spp.Table 2. Results of total contents of polyphenols and flavonoids in and of DPPH[•] and FRAP tests in analysed spices containing *Capsicum* spp.

| Próba Sample | TP | TF | DPPH [•] | FRAP |
|-----------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--|
| | [mg GAE/g s.m.] [mg GAE/g d.m.] | [mg CE/g s.m.] [mg CE/g d.m.] | [mg/g s.m.] [mg/g d.m.] | [Fe ²⁺ mmol/g s.m.] [Fe ²⁺ mmol/g d.m.] |
| P1 | 9,51 ^a ± 0,46 | 1,42 ^{a,b} ± 0,01 | 15,9 ^{a,b} ± 0,2 | 0,175 ^d ± 0,017 |
| P2 | 10,42 ^{a,b} ± 0,29 | 2,07 ^c ± 0,07 | 22,2 ^c ± 0,2 | 0,249 ^{a,b} ± 0,008 |
| P3 | 10,34 ^{a,b} ± 0,45 | 1,47 ^b ± 0,03 | 16,4 ^b ± 0,5 | 0,297 ^c ± 0,006 |
| P4 | 9,83 ^{a,b} ± 0,43 | 1,33 ^a ± 0,01 | 15,7 ^{a,b} ± 0,9 | 0,217 ^b ± 0,003 |
| P5 | 11,17 ^b ± 0,79 | 1,78 ^d ± 0,03 | 20,1 ^d ± 0,4 | 0,349 ^e ± 0,020 |
| P6 | 11,00 ^b ± 0,41 | 2,13 ^c ± 0,05 | 14,9 ^a ± 0,3 | 0,439 ^f ± 0,008 |
| P7 | 9,17 ^a ± 0,13 | 1,43 ^{a,b} ± 0,06 | 17,8 ^e ± 0,5 | 0,278 ^{a,c} ± 0,014 |
| P8 | 17,49 ^e ± 0,91 | 2,75 ^d ± 0,03 | 53,6 ^f ± 0,0 | 0,588 ^g ± 0,013 |
| MS | 0,280 | 0,019 | 0,210 | 0,0001 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

TP – całkowita zawartość polifenoli / total content of polyphenols; TF – całkowita zawartość flawonoidów / total content of flavonoids. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; n = 3; a - g – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0,05$; MS – średni kwadrat odchyłań między grupami / mean square of deviations among groups.

W badaniach różnych odmian *C. annuum* zauważono, że papryka Caribe zawierała najwięcej polifenoli, a papryka jalapeño – najmniej. Medina-Juárez i wsp. [19] wykazali, że papryka Caribe charakteryzowała się również największą zawartością flawonoidów (60,36 ekwiwalentu QE/100 g s.m.). Podobnie w przypadku testu DPPH[•] wartości pomiarów (wyrażone jako % inhibicji DPPH[•]) wahały się od 8,45 % – papryka jalapeño do 83,44 % – papryka Caribe. Producenci przypraw nie podają gatunku i odmiany papryki, z jakiej produkowane są przyprawy. Często ograniczają się do sformułowania „sproszkowany owoc chili”. Utrudnia to porównanie przypraw pod względem pochodzenia. Można jednak zauważyć, że w badaniach własnych próby P5 i P8 były przyprawami o dużej zawartości TP, TF oraz wysokiej aktywności przeciwutleniającej (DPPH[•] i FRAP) w porównaniu z pozostałymi przyprawami (tab. 2). Obie przyprawy zostały uzyskane z *Capsicum annuum* var jalapeño. W przytoczonych powyżej badaniach [19] odmiana jalapeño osiągała jednak niższe wartości właściwości przeciwutleniających w porównaniu z innymi próbami. Była jednak porównywalna z odmianą Caribe, która może być nawet sześć razy ostrzejsza niż jalapeño. Większa zawartość kapsaicynoidów determinujących ostry smak może wpływać również na zawartość polifenoli. W badaniach własnych ekstrakty z przypraw zawierających pa-

przykę jalapeño były porównywalne pod względem właściwości przeciwutleniających z przyprawami o podobnej ostrości.

Czynnikiem, który powinien wpływać na zawartość związków polifenolowych (TP) jest sposób uprawy. Chassy i wsp. [8] przeprowadzili badania, w których porównali uprawy klasyczną oraz ekologiczną i nie wykazali, żeby rodzaj uprawy miał wpływ na zawartość polifenoli w owocach papryki. Czynnikiem w znacznym stopniu determinującym zawartość TP w tych badaniach okazał się ponownie gatunek papryki.

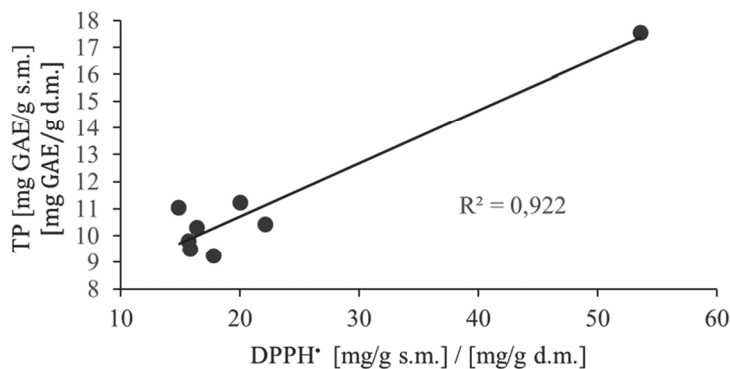
Część związków polifenolowych jest nietrwała i podczas procesu suszenia surowca roślinnego ich zawartość może się zmniejszać. Vega-Gálvez i wsp. [31] podają, że początkowa zawartość polifenoli w owocach chili wynosiła 1359 GAE/g świeżej próbki, a podczas suszenia zmniejszyła się poniżej 400 mg GAE/g świeżej próbki. Potwierdzili także, że suszenie zmniejsza zdolności przeciwutleniające określane za pomocą testu DPPH'. Może to być przyczyną zaobserwowanych różnic między próbkami P1 - P7 a P8 w badaniach własnych. W warunkach przemysłowych czas suszenia ma znaczenie ekonomiczne, dlatego jest skracany przez zastosowanie wyższej temperatury (standardowo ok. 70 °C) [4]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że suszona dłużej, ale w temp. 20 ± 2 °C papryka wyróżniała się wyższymi wartościami zarówno pod względem całkowitej zawartości polifenoli, jak i flawonoidów oraz wykazywała większą aktywność przeciwutleniającą.

Duży wpływ na zawartość TP oraz na właściwości przeciwutleniające przypraw ma przechowywanie. Kozłowska i wsp. [15] dowiedli, że podczas przechowywania przypraw w temp. -18 °C następuje zmniejszenie zawartości polifenoli ogółem oraz obniżenie pojemności przeciwutleniającej w badanych ekstraktach. Nie bez znaczenia może być też forma, w jakiej przechowuje się przyprawy. W badaniach własnych wszystkie przyprawy były przechowywane w szczelnie zamkniętych opakowaniach, jednak tylko próbki P6 i P8 jako całe, niesproszkowane owoce (tab. 1). Przyprawy P6 i P8 wyróżniały się dużą zawartością związków polifenolowych i flawonoidów, co wskazuje, że przechowywanie suszonych owoców w całości może korzystnie wpływać na trwałość tych związków.

Zarówno proces suszenia, jak i przechowywanie przypraw wpływają na mniejszą zawartość TP i TF w przyprawach w porównaniu ze świeżymi owocami pieprzowca [5, 10, 19]. Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy (wartość średnia przypraw rynkowych to 10,20 ekwiwalentu GAE/g s.m.) korespondują z wynikami, które uzyskali Lu i wsp. [17]. Stwierdzili oni bowiem, że zawartość TP w suszonej papryce wynosiła 9,30 ekwiwalentu GAE/g s.m.

Polifenole wykazują działanie przeciwutleniające [33], dlatego ogólna zawartość tych związków w danej próbce powinna wpływać na wyniki testów przeciwutleniających. Potwierdza to współczynnik determinacji $R^2 = 0,92$, odnoszący się do zależności zawartości TP od wartości testu DPPH' (rys. 1). Sricharoen i wsp. [29] podają wysoką

determinację tych zmiennych ($R^2 = 0,96$), podczas gdy Bogusz i wsp. [5] oraz Moo-Huchin i wsp. [21] uzyskali niższe wartości R^2 , odpowiednio: 0,73 i 0,77.



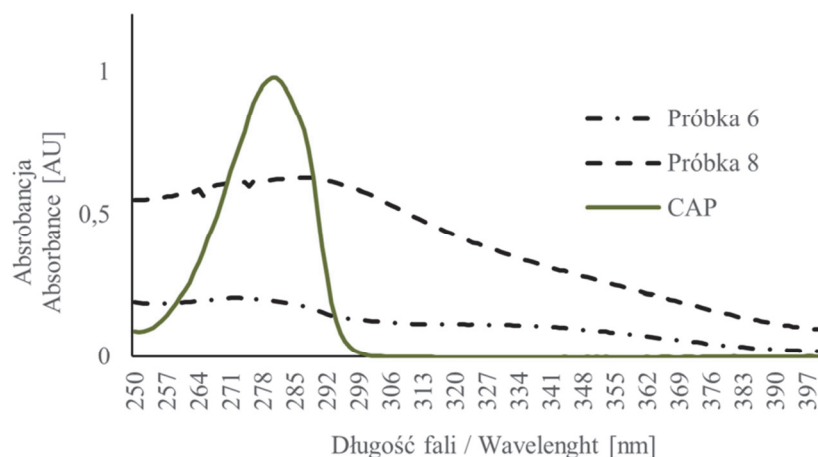
Rys. 1. Zależność pomiędzy wartościami testu DPPH* a całkowitą zawartością polifenoli (TP) w badanych przyprawach zawierających *Capsicum* spp.

Fig. 1. Relationship between DPPH* test values and total content of polyphenols (TP) in analysed spices containing *Capsicum* spp.

Zależność zawartości TP od wartości testu FRAP w badaniach własnych charakteryzowała się współczynnikiem determinacji $R^2 = 0,90$. Bogusz i wsp. [5], Moo-Huchin i wsp. [21], Lu i wsp. [17] oraz Sricharoen i wsp. [29] podają, że R^2 takiej zależności wynosi odpowiednio: 0,92; 0,96; 0,93; 0,83. Z kolei współczynnik determinacji pomiędzy zawartością całkowitą flawonoidów (TF) a wartościami testu DPPH* w niniejszych badaniach wyniósł 0,88.

Zależność całkowitej zawartości TF od wartości testu FRAP skutkowałą współczynnikiem determinacji $R^2 = 0,73$. Firuzi i wsp. [12] otrzymali wynik $R^2 = 0,82$ przy oznaczeniu TF metodą woltamperometryczną.

Zarejestrowano widmo absorpcyjne UV-VIS kapsaicyny i wyznaczono maksimum jej absorbancji. Zarejestrowano też widma ekstraktów. Na rys. 2. przedstawiono przykładowe widma absorpcyjne kapsaicyny i ekstraktów P6 i P8. Wyniki oznaczania całkowitej zawartości kapsaicynoidów w przeliczeniu na kapsaicynę przedstawiono w tab. 3. Kapsaicyna wpływa na ostrość danej przyprawy. Stopień ostrości przypraw określa skala SHU. Czysta kapsaicyna charakteryzuje się najwyższą wartością SHU wynoszącą 16 000 000 [7].



Objaśnienia / Explanatory notes:

CAP – kapsaicyna / capsaicin; maksimum absorpcji kapsaicyny – $\lambda = 280$ nm / maximum absorption for capsaicin – $\lambda = 280$ nm.

Rys. 2. Przykładowe widma absorpcyjne ekstraktów z prób przypraw P6, P8 i wzorca kapsaicyny

Fig. 2. Examples of UV-VIS spectra of extracts made of P6 and P8 spice samples and of model capsaicin

Tabela 3. Całkowita zawartość kapsaicynoidów i wartość SHU badanych przypraw zawierających *Capsicum* spp.

Table 3. Total amount of capsaicinoids and SHU value of analysed spices containing *Capsicum* spp.

| Próba Sample | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Kapsaicynoidy [mg/g s.m.] | 5,64 ^a | 6,77 ^b | 7,19 ^b | 5,27 ^a | 5,48 ^a | 3,92 ^c | 5,73 ^a | 14,97 ^d |
| Capsaicinoids [mg/g d.m.] | ± 0,14 | ± 0,26 | ± 0,18 | ± 0,24 | ± 0,14 | ± 0,06 | ± 0,17 | ± 0,58 |
| Wartość SHU SHU value | 90293 | 108326 | 115039 | 84266 | 87690 | 62726 | 91683 | 239480 |
| MS 0,0698 | | | | | | | | |

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; n = 3; a, b – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$; MS – średni kwadrat odchyłeń między grupami / mean square between groups.

Na podstawie całkowitej zawartości kapsaicynoidów wyliczono wartość SHU przypraw (tab. 3). Wykazano, że zarówno próba P6, jak i P8 różniły się statystycznie

istotnie od wszystkich pozostałych prób. Stwierdzono, że najostrejszym smakiem cechowała się papryka uzyskana w warunkach domowych.

Na zawartość kapsaicyny i kapsacynoidów w owocach papryki wpływa wiele czynników. Aza-González i wsp. [1] potwierdzają, że *C. frutescens* i *C. chinense* zawierają więcej kapsacynoidów niż gatunek *C. annuum*. W skład przypraw komercyjnych mogą wchodzić różne odmiany papryki, co może mieć wpływ na „siłę ostrości”. Fayos i wsp. [11] badali też wpływ czasu dojrzewania owoców na całkowitą zawartość kapsacynoidów. Stwierdzili, że całkowita zawartość kapsaicynoidów w papryce Málagueta wzrasta w ciągu 75 dni do 2,568 mg/g świeżych owoców, co odpowiada wzrostowi o ponad 300 % w porównaniu z początkową zawartością kapsaicynoidów. Zawartość kapsaicyny nie jest równomiernie rozmieszczona w owocu. Mokhart i wsp. [20] potwierdzają, że największa zawartość kapsaicyny występuje w łożysku zalążni, następnie w nasionach, a najmniej jest jej w owocni. Wyjaśnia to, dlaczego najostrejsza była próba P8. Została ona bowiem przygotowana z całego owocu, razem z nasionami. Podczas przemysłowej produkcji przypraw może następować oddzielanie owocni od nasion i rozdrabnianie samej owocni [32]. Wszystkie te czynniki mogą wpływać na różnice zawartości kapsaicyny w dostępnych na rynku przyprawach i decydować o poziomie ich ostrości.

Wnioski

1. Pod względem całkowitej zawartości polifenoli, flawonoidów i kapsaicynoidów oraz determinowanych przez te związki właściwości przeciwutleniających przyprawy pochodzące od różnych producentów nie różniły się od siebie w sposób znaczący.
2. Owoce papryki z uprawy domowej po wysuszeniu w dużym stopniu przewyższały próby przypraw dostępnych na rynku pod względem wszystkich oznaczonych parametrów. Stwierdzono również, że o poziomie badanych parametrów mogła decydować forma, w jakiej przyprawa była przechowywana (proszek po zmieleniu owoców vs całe owoce).
3. Obecność nasion papryki *Capsicum* spp. w przyprawie powoduje zwiększenie jej ostrego smaku.
4. Wyliczona wartość SHU przypraw potwierdziła, że papryka z uprawy domowej wyróżniała się istotnie pod względem ostrości spośród badanych prób.

Literatura

- [1] Aza-González C., Núñez-Paleniús H.G., Ochoa-Alejo N.: Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell. Rep.*, 2011, 30 (5), 695-706.

- [2] Baenas N., Belović M., Ilic N., Moreno D.A., García-Viguera C.: Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food Chem.*, 2019, 274, 872-885.
- [3] Benzie I.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 1996, 239 (1), 70-76.
- [4] Bianchi G., Lo Scalzo R.: Characterization of hot pepper spice phytochemicals, taste compounds content and volatile profiles in relation to the drying temperature. *J. Food Biochem.*, 2018, 42 (6), #12675.
- [5] Bogusz S. Jr., Libardi S.H., Dias F.G., Coutinho J.P., Bochi V.C., Rodrigues D., Melo A., Godoy H.T.: Brazilian *Capsicum* peppers: Capsaicinoid content and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.*, 2018, 98 (1), 217-224.
- [6] Bortnowska G., Kałużna-Zajaczkowska J.: Preferencje wyboru przypraw sypkich do potraw przez osoby pracujące zawodowo z uwzględnieniem innowacyjnych zmian w ich produkcji. *Rocz. PZH*, 2011, 62 (4), 445-452.
- [7] Chapa-Oliver A.M., Mejía-Teniente L.: Capsaicin: From plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules*, 2016, 21 (8), 931-945.
- [8] Chassy A.W., Bui L., Renaud E.N.C., van Horn M., Mitchell A.E.: Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54 (21), 8244-8252.
- [9] Chattopadhyay R.R., Bhattacharyya S.K.: Herbal spices as alternative antimicrobial food preservatives: An update. *Pharmacognosy Rev.*, 2007, 1 (2), 239-247.
- [10] Conforti F., Statti G.A., Menichini F.: Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chem.*, 2007, 102 (4), 1096-1104.
- [11] Fayos O., De Aguiar A.C., Jiménez-Cantizano A., Ferreiro-González M., Garcés-Claver A., Martínez J., Mallor C., Ruiz-Rodríguez A., Palma M., Barroso C.G., Barbero G.F.: Ontogenetic variation of individual and total capsaicinoids in Malagueta peppers (*Capsicum frutescens*) during fruit maturation. *Molecules*, 2017, 22 (5), 736-748.
- [12] Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L.: Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1721 (1-3), 174-184.
- [13] Ilie M.A., Caruntu C., Tampa M., Georgescu S.R., Matei C., Negrei C., Rodica-Mariana I., Constantin C., Neagu M., Boda D.: Capsaicin: Physicochemical properties, cutaneous reactions and potential applications in painful and inflammatory conditions. *Experim. Therap. Med.*, 2019, 18 (2), 916-925.
- [14] Kim D.O., Jeong S.W., Lee C.Y.: Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 2003, 81 (3), 321-326.
- [15] Kozłowska M., Ścibisz I.: Badanie zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z roślin przyprawowych podczas ich przechowywania. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2012, XLV (3), 358-360.
- [16] Livarda A.: Spicing up life in northwestern Europe: Exotic food plant imports in the Roman and medieval world. *Vegetation History and Archaeobotany*, 2001, 20 (2), 143-164.
- [17] Lu M., Yuan B., Zeng M., Chen J.: Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Res. Int.*, 2011, 44 (2), 530-536.
- [18] Meda A., Lamien C.A., Romito M., Millogo J.F., Nacoulma O.G.: Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.*, 2005, 91 (3), 571-577.

- [19] Medina-Juárez L.Á., Molina-Quijada D.M.A., Toro-Sanchez C.L., Gonzalez-Aguilar G.A., Gamez-Meza N.: Antioxidant activity of peppers (*Capsicum annuum* L.) extracts and characterization of their phenolic constituents. *Interciencia*, 2012, 37 (8), 588-593.
- [20] Mokhtar M., Russo M., Cacciola F., Donato P., Giuffrida D., Riazzi A., Farnetti S., Dugo P., Mondello L.: Capsaicinoids and carotenoids in *Capsicum annuum* L.: Optimization of the extraction method, analytical characterization, and evaluation of its biological properties. *Food Anal. Meth.*, 2016, 9 (5), 1381-1390.
- [21] Moo-Huchin V.M., de Lourdes Vargas y Vargas M., Tamayo-Cortez J.A., Lopez-Sauri S.A., Sauri-Duch E., Ortiz Fernandez A.: Solvent extraction and measurement of antioxidant activity and total phenolic content from *Capsicum chinense* Jacq. Cv *Habanero* at different maturity stages. *Chiang Mai J. Sci.*, 2019, 46 (4), 661-671.
- [22] Naves E.R., de Ávila Silva L., Sulpice R., Araújo W.L., Nunes-Nesi A., Peres L.E.P., Zsögön A.: Capsaicinoids: pungency beyond capsicum. *Trend. Plant Sci.*, 2019, 24 (2), 109-120.
- [23] Olatunji T.L., Afolayan A.J.: Comparative quantitative study on phytochemical contents and antioxidant activities of *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* L. *Sci. World J.*, 2019, #4705140.
- [24] Perucka I., Oleszek W.: Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chem.*, 2000, 71 (2), 287-291.
- [25] Farmakopea Polska XI. T. 1. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Warszawa 2017, s. 1447.
- [26] Sadowska A., Skarzyńska E., Rakowska R., Batogowska J., Waszkiewicz-Robak B.: Substancje bioaktywne w surowcach pochodzenia roślinnego i roślinach zielarskich. *Post. Technol. Przetw. Spoż.*, 2014, 2, 131-135.
- [27] Sanna D., Delogu G., Mulas M., Schirra M., Fadda A.: Determination of free radical scavenging activity of plant extracts through DPPH assay: An EPR and UV-VIS study. *Food Anal. Method.*, 2012, 5 (4), 759-766.
- [28] Shaimaa G., Mahmoud M.S., Mohamed M.R.: Effect of heat treatment on phenolic and flavonoid compounds and antioxidant activities of some Egyptian sweet and chilli pepper. *Nat. Prod. Chem. Res.*, 2016, 4 (3), 1-6.
- [29] Sricharoen P., Lamaiphan N., Patthawaro P., Limchoowong N., Techawonstein S., Chanthai S.: Phytochemicals in *Capsicum oleoresin* from different varieties of hot chilli peppers with their antidiabetic and antioxidant activities due to some phenolic compounds. *Ultrason. Sonochem.*, 2017, 38, 629-639.
- [30] Tapsell L.C., Hemphill I., Cobiac L., Sullivan D.R., Fenech M., Patch C.S., Roodenrys S., Keogh J.B., Clifton P.M., Williams P.G., Fazio V.A., Inge K.E.: Health benefits of herbs and spices: The past, the present, the future. *Med. J. Aust.*, 2006, 185 (4), 1-24.
- [31] Vega-Gálvez A., Di Scala K., Rodriguez K., Lemus-Mondaca R., Miranda M., López J., Peraz-Won M.: Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. *Hungarian*). *Food Chem.*, 2009, 117 (4), 647-653.
- [32] Wang Y., Liu B., Wen X., Li M., Wang K., Ni Y.: Quality analysis and microencapsulation of chili seed oil by spray drying with starch sodium octenylsuccinate and maltodextrin. *Powder Technology*, 2017, 312, 294-298.
- [33] Zhang H., Tsao R.: Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opinion Food Sci.*, 2016, 8, 33-42.

ANTIOXIDANT PROPERTIES AND THE CONTENT OF CAPSAICINOIDS IN SELECTED SPICES WITH THE ADDITION OF HOT CHILLI PEPPER (*CAPSICUM* SP.) AVAILABLE ON POLISH MARKET**S u m m a r y**

Spices constitute an essential dietary ingredient. Hot peppers are commonly used as a culinary spice. The benefits of using them are not only related to taste, but also to their positive health-promoting effect. This is associated with polyphenolic compounds and other compounds showing antioxidant properties contained in the fruit of hot peppers, such as capsaicin. The objective of the research study was to determine the content of polyphenolic compounds, including flavonoids and capsaicinoids, the antioxidant properties and the ability to reduce iron ions in spices containing hot pepper and available on the Polish market. Aqueous-ethanolic extracts were prepared of 7 different spices labelled by the manufacturers as "hot pepper", "chilli" or "cayenne pepper", and of the home grown jalapeño chilli. In those extracts the total content of polyphenolic compounds (using the Folin-Ciocalteu method) and flavonoids were determined. Also FRAP and DPPH^{*} antioxidant tests were performed; the content of capsaicinoids was spectrophotometrically determined and calculated as capsaicin. The spices available on the Polish market did not differ significantly as regards their antioxidant properties, however they differed very much from the home grown and home dried jalapeño chilli that was distinguished by the highest content of capsaicin and the highest antioxidant activity values. Most likely it was the effect of the drying and storing parameters of jalapeño chilli. Moreover, the industrially produced spices may contain other substances added, which increase the volume of the product and at the same time decrease the quality of the final product. Based on the research carried out, it was concluded that the spices with chilli pepper could be a good source of antioxidant compounds in diet.

Key words: hot pepper, polyphenols, capsaicin, capsaicinoids, antioxidant properties, SHU ☒

KAROLINA DOBA, MARTA CIEŚLAK, WOJCIECH ZMUDZIŃSKI

OCENA ZAWARTOŚCI WYBRANYCH MAKRO- I MIKROELEMENTÓW W MIODACH KOMERCYJNYCH ORAZ W MIODACH POCHODZĄCYCH BEZPOŚREDNIO Z PASIEKI

Streszczenie

Miód charakteryzuje się unikatowymi właściwościami sensorycznymi i prozdrowotnymi. W skład miodu wchodzi między innymi przeciwutleniacze, enzymy, witaminy, makro- i mikroelementy, które kształtują jego aktywność biologiczną i odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Miody stanowią źródło potasu, magnezu, wapnia, sodu, siarki, manganu, żelaza, wanadu, chromu, fosforu, srebra, boru i miedzi. Celem pracy było określenie składu mineralnego miodów odmianowych dostępnych na polskim rynku. W badaniach użyto polskich miodów różnych odmian: akacjowego, wielokwiatowego, lipowego i rzepakowego. Ocenie poddano miody zakupione w supermarkecie i pochodzące bezpośrednio z pasieki. Średnia zawartość Ca, K, Na, Mg, Mn, Zn, Cu i Fe w miodach wynosiła odpowiednio [mg/100 g]: 7,42, 59,66, 1,57, 1,44, 0,11, 0,46, 0,02 i 0,12. Największą zawartością makro- i mikroelementów charakteryzował się miód wielokwiatowy pochodzący bezpośrednio z pasieki – 133,77 mg/100 g. Najmniejszą zawartość składników mineralnych wykazano w miodzie akacjowym zakupionym w supermarkecie – 27,23 mg/100 g. Dodatkowo przeanalizowano wpływ położenia prywatnej pasieki w okolicach Huty Miedzi Głogów na zawartość miedzi w próbach miodów różnych odmian. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy ($p \geq 0,05$) pomiędzy średnią zawartością miedzi w miodach komercyjnych i w miodach z prywatnej pasieki, co wskazuje na brak wpływu pochodzenia geograficznego na zawartość tego pierwiastka.

Słowa kluczowe: miód, jakość miodu, makroelementy, mikroelementy

Wprowadzenie

Do produktów pszczelich zalicza się: miód, mleczko, pierzgę, pyłek oraz wosk. Zgodnie z definicją zawartą w Rozporządzeniu Rady (WE) nr 1234/2007 z dnia 22 października 2007 r. [27] „miód to naturalna słodka substancja wytwarzana przez pszczoły *Apis mellifera* z nektaru roślin lub wydzielin żywych części lub wydalin owa-

Mgr inż. K. Doba, mgr inż. M. Cieślak, dr hab. inż. W. Zmudziński, prof. UEP, Katedra Jakości i Bezpieczeństwa Żywności, Instytut Nauk o Jakości, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, Al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań. Kontakt: karolina.doba@ue.poznan.pl

dów wysysających żywe części roślin, zbieranych przez pszczoły, a następnie przetwarzanych przez łączenie specyficznych substancji pochodzących z organizmów pszczół, składanych, odwodnionych, gromadzonych i pozostawionych w plastrach do dojrzewania”. Ze względu na swoje unikatowe właściwości sensoryczne i odżywcze miód jest wykorzystywany głównie jako produkt do bezpośredniego spożycia, ale znajduje także zastosowanie w przemyśle spożywczym, np. w cukierniczym czy piekarniczym, ponadto w farmacji, medycynie, kosmetologii [7, 21]. Światowa produkcja miodu wynosi ok. 1,2 mln ton rocznie. Miody cechują się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, przeciwzapalnymi, enzymatycznymi i prebiotycznymi [1, 19, 24]. Stosowane są w leczeniu ran i oparzeń oraz wspomagająco w chorobach układu krążenia, pokarmowego i oddechowego. Miody charakteryzują się dużym zróżnicowaniem ze względu na właściwości i skład chemiczny, co jest związane przede wszystkim z rodzajem surowca, jego pochodzeniem botanicznym i geograficznym, czynnikami środowiskowymi i klimatycznymi oraz przebiegiem procesu pozyskiwania i dojrzewania. Wyróżnia się miody nektarowe, spadziowe i nektarowo-spadziowe [7, 21, 25, 26].

Węglowodany stanowią ok. 80 % wszystkich związków chemicznych obecnych w miodach. Do monosacharydów zalicza się glukozę (ok. 30 %) i fruktozę (ok. 35 %) [26]. W skład miodów wchodzi także disacharydy, trisacharydy oraz oligosacharydy, które charakteryzują się właściwościami prebiotycznymi i zdolnością do stymulacji rozwoju pałeczek mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* [19]. W wyniku przemiany cukrów prostych na skutek dehydratacji zachodzącej w środowisku kwasowym lub w czasie reakcji Maillarda powstaje 5-hydroksymetylofurfural, który cechuje się mutagennością i genotoksycznością. Właściwości sensoryczne miodów są związane z obecnością kwasów organicznych, których zawartość jest zmienna w czasie dojrzewania [2, 16, 17, 19]. Na aromat miodu wpływają olejki eteryczne pochodzące przede wszystkim z nektaru [11]. Czynniki w dużej mierze kształtującymi bioaktywność miodu są mikro- i makroelementy, witaminy, hormony pszczele, enzymy oraz związki polifenolowe [1, 8, 19, 23]. Do przeciwutleniaczy występujących w miodach zalicza się: flawony, flawonoidy, izoflawony, fenolokwasy, karotenoidy, katechiny, antocyjany, kwas askorbinowy, przeciwutleniacze enzymatyczne i tokoferol [1, 8, 19]. Stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy zawartością przeciwutleniaczy w badanych próbkach miodów a ich właściwościami przeciwbakteryjnymi w stosunku do wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [8, 23, 24]. Największą zawartością przeciwutleniaczy charakteryzują się miody ciemne [13, 16]. Niewielka zawartość witamin C, A, B₁, B₂, B₆, K i E występujących w miodach nie odgrywa istotnej roli w diecie człowieka z uwagi na średnie roczne spożycie miodu w Polsce wynoszące ok. 0,26 kg. Dla porównania Niemcy spożywają ok. 1,2 kg miodu rocznie [5, 6, 10].

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu ludzkiego wymaga dostarczania wraz z dietą niezbędnych składników mineralnych. Składniki te pełnią kluczową funkcję

w aktywności enzymów o działaniu przeciwutleniającym, które stanowią mechanizm obronny przed uszkodzeniem komórek spowodowanym wolnymi rodnikami. Niedostateczna podaż mikro- i makroelementów wiąże się z zaburzeniami w funkcjonowaniu organizmu i może prowadzić do wielu chorób. Zawartość składników mineralnych w miodach kształtuje się na poziomie $0,02 \div 0,4$ %. Miody stanowią źródło magnezu, wapnia, potasu, sodu, manganu, żelaza, wanadu, chromu, fosforu, srebra, boru i miedzi [7, 21, 25]. Sód m.in. odgrywa rolę w utrzymaniu potencjału czynnościowego błon komórkowych. Potas odpowiada za regulację gospodarki kwasowo-zasadowej. Magnez bierze udział w aktywacji wielu enzymów, a z wapniem przeciwdziałają skurczowi mięśni. Wapń dodatkowo uczestniczy w procesie krzepnięcia krwi. Mangan pełni funkcję kofaktora enzymów i wpływa na stabilizację poziomu cukru we krwi. Cynk bierze udział w procesie gojenia się ran, jest składnikiem wielu enzymów oraz reguluje wydzielanie insuliny. Regularne spożywanie miodu może przyczyniać się do uzupełniania niedoborów niektórych pierwiastków w diecie, w szczególności manganu i żelaza [12]. Pierwiastki, takie jak chrom, żelazo czy miedź wchodzą w skład enzymów i odpowiadają za metabolizm tłuszczów oraz węglowodanów, jak również za utrzymywanie odporności komórkowej. Ich nadmierne spożycie wiąże się jednak z działaniem toksycznym. Najchętniej spożywanymi odmianami są miody rzepakowe, akacjowe, lipowe, gryczane, spadziowe i wielokwiatowe. Około 70 % polskich konsumentów najchętniej wybiera miody nektarowe jednokwiatowe [10]. Miody wielokwiatowe i akacjowe charakteryzują się dużą zawartością żelaza, chloru, wapnia, sodu, potasu, jodu i magnezu. Miód rzepakowy ma jasną barwę i zawiera stosunkowo mało składników mineralnych. Miody gryczane charakteryzują się intensywnym smakiem oraz zapachem i stanowią źródło miedzi, krzemu, cynku, żelaza, boru i fosforu. Miód spadziowy jest produktem powstającym z wydaliny owadów, które wysysają żywe części roślin lub z wydzieliny żywych części roślin, które są zbierane przez pszczoły, zawiera dużo mikro- i makroelementów oraz cechuje się ciemną barwą i silnymi właściwościami przeciwutleniającymi [13, 16]. Intensywna barwa miodu może być także wynikiem celowego lub przypadkowego podgrzania lub starzenia się produktu. Do najważniejszych czynników kształtujących jakość miodów zalicza się: pochodzenie botaniczne i geograficzne oraz praktykę pszczelarską [7, 21, 25, 26]. Pszczoły i miód można traktować jako wskaźniki stanu zanieczyszczenia środowiska, np. metalami ciężkimi. Wskazuje się na dodatnią korelację pomiędzy zawartością metali ciężkich w miodach a poziomem zanieczyszczenia środowiska [18, 21, 25.]. W niektórych publikacjach podaje się w wątpliwość istnienie takiej tendencji. Zwraca się uwagę, że położenie pasiek w okolicach kopalń, czyli na terenach zanieczyszczonych, nie wpływa na zwiększenie zawartości metali ciężkich w produktach pszczelich, tj. w miodzie i pyłku pszczelim [4].

Celem pracy było określenie zawartości wybranych mikro- i makroelementów w polskich miodach różnych odmian, dostępnych w sieci sklepów spożywczych i pochodzących bezpośrednio z pasieki. Dodatkowo ocenie poddano wpływ położenia pasieki w okolicy Huty Miedzi Głogów na zawartość miedzi w miodach.

Material i metody badań

Przedmiotem badań było 8 miodów pszczelich zróżnicowanych ze względu na pochodzenie botaniczne i geograficzne. Cztery próbki miodów zakupiono w supermarkecie na terenie Poznania, a cztery kolejne pozyskano bezpośrednio z pasieki prywatnej położonej w gminie Grębocice (powiat głogowski, województwo dolnośląskie). Miody pochodziły z województw małopolskiego (RS, WS) i śląskiego (AS, LS, RP, LP, WP) – tab. 1. Analizie poddano miody wielokwiatowe, akacjowe, rzepakowe i lipowe. Do chwili przeprowadzenia badań miody przechowywano w szczelnych, szklanych opakowaniach w warunkach chłodniczych, bez dostępu powietrza i światła.

Tabela 1. Charakterystyka badanych miodów

Table 1. Characteristics of analysed honeys

| Miód / Honey | Symbol próby Symbol of sample | Pochodzenie / Origin |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Akacjowy / Acacia | AS | Supermarket |
| Rzepakowy / Rapeseed | RS | Supermarket |
| Lipowy / Lime | LS | Supermarket |
| Wielokwiatowy / Multifloral | WS | Supermarket |
| Akacjowy / Acacia | AP | Pasieka prywatna / Private apiary |
| Rzepakowy / Rapeseed | RP | Pasieka prywatna / Private apiary |
| Lipowy / Lime | LP | Pasieka prywatna / Private apiary |
| Wielokwiatowy / Multifloral | WP | Pasieka prywatna / Private apiary |

W miodach oznaczano makro- i mikroelementy z zastosowaniem atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą mikrofalową (Agilent 4210, Agilent Technologies, USA).

Próbki badanych miodów ($2,5 \pm 0,0001$ g) odważano do szklanych zlewek i dodawano 5 cm^3 gorącej wody redestylowanej, następnie dokładnie mieszano aż do całkowitego rozpuszczenia się miodu i przenoszono ilościowo do probówek przeznaczonych do mineralizacji „na mokro”. Próbki poddawano mineralizacji z dodatkiem 20 cm^3 65-procentowego kwasu azotowego(V) (cz.d.a) i 1 cm^3 nadtlenku wodoru (33 %). Mineralizację prowadzono w mineralizatorze SpeedDigester K-425 (Büchi, Szwajcaria) w temp. $240 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 90 min. Jednocześnie przygotowywano i analizowano próby zerowe. Zmineralizowane próbki rozcieńczano wodą redestylowaną w kolbach miarowych o pojemności 50 cm^3 z tworzywa sztucznego, a następnie oznaczano

pierwiastki. Współczynniki korelacji liniowej (r) krzywych wzorcowych przygotowanych dla poszczególnych pierwiastków wynosiły 0,999.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem pakietu Microsoft Excel. W celu zweryfikowania istotności różnic pomiędzy średnimi zawartościami miodu w miódach odmianowych zakupionych w supermarkecie oraz pochodzących z prywatnej pasieki wykonano test t-Studenta. Wyniki badań stanowią średnią z co najmniej trzech przeprowadzonych oznaczeń.

Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczania zawartości makro- i mikroelementów w badanych miódach przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2. Zawartość makro- i mikroelementów w badanych miódach

Table 2. Content of macro- and microelements in analysed honeys

| Symbol próby Symbol of sample | Pierwiastek Element | Zawartość pierwiastka Content of element [mg/100 g] | Względne odchylenie standardowe Relative standard deviation [%] |
|--|------------------------|--|--|
| Miody z supermarketu / Honeys from supermarket | | | |
| AS | K | 12,03 ± 0,34 | 2,87 |
| | Na | 8,15 ± 0,12 | 1,46 |
| | Mg | 2,01 ± 0,04 | 2,10 |
| | Ca | 4,49 ± 0,24 | 0,41 |
| | Mn | 0,02 ± 0,00 | 1,99 |
| | Fe | 0,12 ± 0,02 | 5,45 |
| | Cu | 0,01 ± 0,00 | 3,62 |
| | Zn | 0,40 ± 0,01 | 2,95 |
| RS | K | 34,07 ± 0,58 | 1,71 |
| | Na | 0,90 ± 0,04 | 1,70 |
| | Mg | 0,83 ± 0,03 | 4,12 |
| | Ca | 7,30 ± 0,32 | 4,33 |
| | Mn | 0,07 ± 0,00 | 1,64 |
| | Fe | < LOD | - |
| | Cu | 0,02 ± 0,00 | 5,96 |
| | Zn | 0,43 ± 0,03 | 7,82 |
| LS | K | 97,54 ± 5,18 | 5,31 |
| | Na | 0,55 ± 0,01 | 2,13 |
| | Mg | 1,22 ± 0,03 | 2,45 |
| | Ca | 9,17 ± 0,40 | 4,34 |
| | Mn | 0,08 ± 0,00 | 4,12 |
| | Fe | < LOD | - |
| | Cu | 0,02 ± 0,00 | 4,37 |
| | Zn | 0,45 ± 0,01 | 2,06 |

| | | | |
|--|----|---------------|------|
| WS | K | 46,66 ± 0,30 | 0,65 |
| | Na | 0,42 ± 0,03 | 5,91 |
| | Mg | 1,77 ± 0,05 | 2,87 |
| | Ca | 10,07 ± 0,56 | 5,60 |
| | Mn | 0,05 ± 0,00 | 5,56 |
| | Fe | < LOD | - |
| | Cu | 0,02 ± 0,00 | 2,85 |
| | Zn | 0,40 ± 0,02 | 5,13 |
| Miody z prywatnej pasieki / Honeys from private apiary | | | |
| AP | K | 33,79 ± 0,90 | 2,66 |
| | Na | 0,34 ± 0,02 | 4,48 |
| | Mg | 0,61 ± 0,03 | 5,44 |
| | Ca | 4,48 ± 0,02 | 0,41 |
| | Mn | 0,03 ± 0,00 | 2,59 |
| | Fe | < LOD | - |
| | Cu | 0,02 ± 0,00 | 5,76 |
| | Zn | 0,54 ± 0,05 | 5,95 |
| RP | K | 40,67 ± 0,14 | 0,34 |
| | Na | 0,44 ± 0,03 | 6,08 |
| | Mg | 1,01 ± 0,06 | 5,77 |
| | Ca | 6,31 ± 0,21 | 3,36 |
| | Mn | 0,02 ± 0,00 | 3,65 |
| | Fe | < LOD | - |
| | Cu | 0,02 ± 0,00 | 7,06 |
| | Zn | 0,57 ± 0,05 | 8,15 |
| LP | K | 93,86 ± 0,97 | 1,03 |
| | Na | 0,84 ± 0,05 | 5,61 |
| | Mg | 1,46 ± 0,07 | 4,79 |
| | Ca | 6,44 ± 0,30 | 4,68 |
| | Mn | 0,31 ± 0,01 | 4,76 |
| | Fe | < LOD | - |
| | Cu | 0,02 ± 0,00 | 5,31 |
| | Zn | 0,54 ± 0,03 | 5,95 |
| WP | K | 118,64 ± 5,82 | 4,91 |
| | Na | 0,90 ± 0,02 | 4,40 |
| | Mg | 2,38 ± 0,10 | 4,18 |
| | Ca | 11,07 ± 0,17 | 1,52 |
| | Mn | 0,34 ± 0,00 | 0,39 |
| | Fe | < LOD | - |
| | Cu | 0,04 ± 0,00 | 3,09 |
| | Zn | 0,38 ± 0,01 | 3,55 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Symbole miodów jak w tab. 1. / Symbols of honeys as in Tab. 1. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations.

Polskie miody odmianowe są zróżnicowane ze względu na zawartość mikro- i makroelementów. Najwyższym poziomem wapnia charakteryzowały się miody wielokwiatowe zarówno z prywatnej pasieki, jak i pochodzące z supermarketu. Zawartość tego pierwiastka wynosiła odpowiednio: 11,07 i 10,7 mg/100 g. Średnia zawartość Ca w badanych próbach wynosiła 7,42 mg/100 g. Najniższy poziom wapnia stwierdzono w miodach akacjowych (ok. 4,5 mg/100 g). Podobną średnią zawartością wapnia charakteryzowały się miody włoskie z regionu Lacjum (ok. 4,77 mg/100 g) [5, 6]. W przypadku miodów pochodzących z terenu Węgier średnia zawartość wapnia kształtowała się na poziomie 4,15 mg/100 g [4].

Najwyższym poziomem magnezu charakteryzowała się próbka miodu wielokwiatowego z prywatnej pasieki (2,38 mg/100g). Średnia zawartość Mg w miodach będących przedmiotem badań wynosiła 1,41 mg/100 g. Według Kędzierskiej-Matysek i wsp. [12] średnia zawartość tego pierwiastka w polskich miodach wielokwiatowych to 6,16 mg/100 g. Najniższy poziom Mg autorzy odnotowali w polskich miodach akacjowych – 0,88 mg/100 g. W badaniach przeprowadzonych przez Stecką i wsp. [22] średnia zawartość magnezu w komercyjnych miodach spadziowych i nektarowych zakupionych na terenie Polski wynosiła 2,29 mg/100 g [22], a najwyższy poziom tego pierwiastka wykazano w miodzie ze spadzi liściastej (13,85 mg/100 g) [22].

Pierwiastkiem występującym w największej ilości w badanych polskich miodach był potas. Stanowił on 44 ÷ 91 % wszystkich mikro- i makroelementów w analizowanych próbach. Najwyższym poziomem potasu charakteryzował się miód wielokwiatowy pozyskany z prywatnej pasieki – 118,64 mg/100 g. Spośród przebadanych prób najmniejszą zawartością potasu cechował się miód akacjowy z supermarketu. Średnia zawartość potasu wynosiła w nim 12,03 mg/100 g. Odmienne wyniki uzyskali Kędzierska-Matysek i wsp. [12]. Stwierdzona przez nich średnia zawartość potasu w polskich miodach wielokwiatowych wynosiła 43,23 mg/100 g, natomiast w miodach akacjowych 24,22 mg/100 g. W badaniach przeprowadzonych przez Madejczyk i Barańkiewicz [14] średnią zawartość potasu w polskich miodach spadziowych i rzepakowych określono na poziomie 123,3 mg/100 g [14]. W przypadku miodów pochodzących z Węgier Bodó i wsp. [4] odnotowali średnią zawartość tego pierwiastka w odmianie wielokwiatowej na poziomie 46 mg/100 g [4]. Według analiz przeprowadzonych przez Bilandžića i wsp. [3] miody nektarowe z Chorwacji zawierały potas na poziomie 23,0 ÷ 46,4 mg/100 g.

Największą zawartością sodu charakteryzował się miód akacjowy dostępny w supermarkecie (8,15 mg/100 g). Średnia zawartość tego pierwiastka w badanych miodach wynosiła 1,57 mg/100 g. Podobną średnią zawartość sodu w miodach wielokwiatowych stwierdzili wcześniej Bodó i wsp. [4] w miodach pochodzących z Węgier (1,3 mg sodu w 100 g). Najniższy poziom sodu oznaczono w miodzie akacjowym pochodzącym z prywatnej pasieki (0,34 mg/100 g). Serbskie miody akacjowe charaktery-

zowały się średnią zawartością sodu na poziomie 0,5 mg/100 g [20]. Podobny wynik otrzymano w przypadku miodu lipowego z supermarketu.

Zawartość cynku w badanych miodach wynosiła od 0,38 mg/100 g (miód wielokwiatowy z prywatnej pasieki) do 0,57 mg/100 g w miodzie rzepakowym (RP) z województwa śląskiego. Zalecane dzienne spożycie cynku wynosi od 8 do 11 mg. Źródłem występowania cynku w środowisku naturalnym jest przede wszystkim działalność człowieka. Obecność tego pierwiastka w miodzie jest spowodowana jego transferem z gleby poprzez system korzeniowy, łądygi i kwiaty. Proces ten jest zależny od kwasowości gleby, zawartości w niej substancji organicznych oraz stadium rozwojowego rośliny [18]. Popek [18] odnotował średnią zawartość cynku w analizowanych próbach na poziomie od 0,8 mg/100 g w miodzie akacjowym do 1,8 mg/100 g – w miodzie wrzosowym, przy czym średnią zawartość cynku w badanych miodach określił jako 1,23 mg/100 g. Najmniejszą zawartością tego pierwiastka charakteryzowały się miody lipowe i akacjowe. Nie stwierdzono zależności pomiędzy zawartością cynku w miodach a ich pochodzeniem geograficznym. Wysoki poziom cynku w miodzie może być związany z jego nieprawidłowym przechowywaniem lub przypadkowym zanieczyszczeniem np. w wyniku stosowania do magazynowania produktu naczyń ocynkowanych. Nieodpowiednie przechowywanie może powodować migrację tego pierwiastka i wpływać na jego zwiększone stężenie w produkcie, w szczególności w przypadku miodów, które charakteryzują się wysoką kwasowością [18].

Zawartość manganu w badanych miodach wynosiła $0,02 \div 0,34$ mg/100 g, przy czym tę górną granicę wykazano w miodzie wielokwiatowym pochodzącym z prywatnej pasieki. Średnia zawartość manganu w badanych próbach to 0,12 mg/100 g. Węgierskie miody wielokwiatowe zawierały średnio 0,037 mg Mn w 100 g, a rzepakowe – na poziomie 0,02 mg/100 g [4]. Kędziarska-Matysek i wsp. [12] określili mangan na poziomie 0,21 mg w 100 g miodu.

W badaniach własnych największą zawartość miedzi stwierdzono w miodzie wielokwiatowym z prywatnej pasieki (0,04 mg/100), a średnia zawartość Cu w badanych próbach wynosiła 0,02 mg/100 g. Zawartość miedzi w chorwackich miodach nektarowych, oznaczona przez Bilandžića i wsp. [3], była bardzo zróżnicowana i wynosiła $0,007 \div 0,12$ mg/100 g w zależności od ich pochodzenia botanicznego i geograficznego [3]. Conti i wsp. [5] średnią zawartość miedzi w miodach odmianowych pochodzących z północy Włoch określili na poziomie 0,031 mg/100 g.

Miód stanowi produkt bioakumulacji składników toksycznych i może być źródłem informacji o stanie ekosystemu, w którym bytują owady. Analiza poziomu metali ciężkich, w tym miedzi, pozwala na ocenę stopnia zanieczyszczenia terenu, z którego pozyskano produkt. Nie stwierdzono jednak istotnej zależności pomiędzy średnią zawartością miedzi w miodach odmianowych pochodzących z prywatnej pasieki oraz zakupionych w supermarkecie ($p \geq 0,05$). Zalecane dzienne spożycie miedzi kształtuje

się na poziomie 0,9 mg. Poziom miedzi w polskich miodach mieścił się w zakresie $0,01 \div 0,04$ mg/100 g. W tab. 3. przedstawiono wyniki analiz średniej zawartości miedzi w badanych próbach miodów płynnych.

Tabela 3. Zawartość miedzi w badanych miodach
Table 3. Content of copper in analysed honeys

| Symbol próby / Symbol of sample | Zawartość Cu / Content of Cu [mg/100 g] |
|---------------------------------|---|
| AS | $0,01 \pm 0,00$ |
| RS | $0,02 \pm 0,00$ |
| LS | $0,02 \pm 0,00$ |
| WS | $0,02 \pm 0,00$ |
| AP | $0,02 \pm 0,00$ |
| RP | $0,02 \pm 0,00$ |
| LP | $0,02 \pm 0,00$ |
| WP | $0,04 \pm 0,00$ |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Symbole miodów jak w tab. 1. / Symbols of honeys as in Tab. 1. W tabeli przedstawiono wartości średnie \pm odchylenia standardowe / Table shows mean values \pm standard deviations. Wartości średnie nie różnią się statystycznie istotnie ($p \geq 0,05$) / mean values do not differ statistically significantly at $p \geq 0.05$.

Spośród wszystkich przebadanych prób zawartość żelaza na poziomie 0,12 mg/100 g stwierdzono jedynie w miodzie akacjowym pochodzącym z supermarketu. Wartość ta była znacznie niższa od średniej zawartości Fe (0,36 mg/100 g) w polskich miodach badanych przez Kędzierską-Matysek i wsp. [12]. Według Formickiego i wsp. [9] zawartość żelaza w miodach pochodzących z województwa małopolskiego wynosiła $0,8 \div 2,4$ mg/100 g. Biorąc pod uwagę zalecane dzienne spożycie Fe (10 \div 18 mg), konsumpcja miodu nie przyczynia się w znaczący sposób do pokrycia dziennego zapotrzebowania organizmu na ten pierwiastek. Żelazo zawarte w miodzie charakteryzuje się jednak dużą biodostępnością [22].

Wnioski

1. Największą ogólną zawartość mikro- i makroelementów stwierdzono w miodzie wielokwiatowym pochodzącym bezpośrednio z pasieki – 133,77 mg/100 g, najmniejszą – 27,32 g/100 g w miodzie akacjowym zakupionym w supermarkecie.
2. Pomimo zróżnicowanej zawartości mikro- i makroelementów w badanych miodach nie można jednoznacznie określić ich pochodzenia botanicznego i geograficznego na podstawie składu mineralnego.
3. Nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy średnimi zawartościami miedzi w miodach odmianowych zakupionych w supermarkecie i pochodzących z prywatnej pa-

sieki położonej w okolicy Huty Miedzi Głogów, co wskazuje na brak wpływu pochodzenia geograficznego na zawartość tego pierwiastka.

Badania sfinansowano ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego otrzymanych w ramach dotacji na utrzymanie potencjału badawczego Instytutu Nauk o Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.

Literatura

- [1] Alves A., Ramos A., Goncalves M., Bernardo M., Mendes B.: Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *J. Food Comp. Anal.*, 2013, 30, 130-138.
- [2] Ana N., Cai W.-J., Zhu Q.-F., Wang W., Hussain D., Feng Y.-Q.: Metabolic profiling of organic acids in honey by stable isotope labelling assisted liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Food Comp. Anal.*, 2020, 87, #103423.
- [3] Bilandžić N., Sedak M., Dokić M., Gross Bošković A., Florijančić T., Bošković I., Kovačić M., Puškadija Z., Hruškar M.: Element content in ten Croatian honey types from different geographical regions during three seasons. *J. Food Comp. Anal.*, 2019, 84, #103305.
- [4] Bodó A., Radvány L., Kőszegi T., Csepregi R., Nagya D., Farkas A., Kocsis M.: Melissopalynology, antioxidant activity and multielement analysis of two types of early spring honeys from Hungary. *Food Bioscience*, 2020, 35, #100587.
- [5] Conti M.E., Saccares S., Cubadda F., Cavallina R., Tenoglio C.A., Ciprotti L.: Miele nel Lazio: Indagine sul contenuto in metallic in tracce e radionuclide. *Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, 1998, 192, 107-109.
- [6] Conti M.E.: Lazio region (central Italy) honeys: A survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Control*, 2000, 11, 459-463.
- [7] Džugan M., Ruszel A., Tomczyk M.: Jakość miodów importowanych dostępnych na rynku podkarpackim. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2018, 4 (117), 127-139.
- [8] Fernandes L., Ribeiro H., Oliveira A., Sanches Silva A., Freitas A., Henriques M., Rodrigues M.: Portuguese honeys as antimicrobial agents against *Candida* species. *J. Trad. Complem. Med.*, 2020, 9 (2), 130-136.
- [9] Formicki G., Greń A., Stawarz R., Zyśk B., Gał A.: Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2013, 22 (1), 99-106.
- [10] Gontarz A., Błońska I., Socha S.: Analiza preferencji konsumenckich studentów dotycząca miodów pszczelich. *Wiadomości Zootechniczne*, 2016, 4, 61-76.
- [11] Jasicka-Misiak I., Kafarski P.: Chemiczne markery miodów odmianowych. *Chemik*, 2014, 68 (4), 335-340.
- [12] Kędzierska-Matysek M., Litwińczuk Z., Koperska N., Barłowska J.: Zawartość makro- i mikroelementów w miodach pszczelich z uwzględnieniem odmiany oraz kraju pochodzenia. *Nauka Przyr. Technol.*, 2013, 7 (3), 1-10.
- [13] Kędzierska-Matysek M., Florek M., Wolanciuk A., Barłowska J.: Współzależności pomiędzy parametrami barwy w systemie CIE i zawartością składników mineralnych w miodach pszczelich, *Annales UMCS sectio EE Zootechnica*, 2017, XXXV (4), 17-26.
- [14] Madejczyk M., Barańkiewicz D.: Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 617, 11-17.
- [15] Majewska E.: Porównanie wybranych właściwości miodów pszczelich jasnych i ciemnych. *Nauka Przyr. Technol.*, 2009, 3 (4), 1-9.


- [16] Majewska E., Kowalska J., Jeżowska A.: Charakterystyka jakości miodów wielokwiatowych z różnych regionów polski. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010, 3, 391-397.
- [17] Popek S.: Badanie kwasowości pszczelich miodów odmianowych. *Zesz. Nauk. AE w Krakowie*, 2003, 623, 29-33.
- [18] Popek S.: Badanie zawartości cynku w pszczelich miodach odmianowych. *Zesz. Nauk. AE w Krakowie*, 2006, 705, 51-56.
- [19] Rosiak E., Jaworska D.: Właściwości probiotyczne i prebiotyczne miodów pszczelich w aspekcie ich jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2019, 3 (120), 36-48.
- [20] Sakač M., Jovanov P., Marić A., Pezo L., Kevrešan Ž., Novaković A., Nedeljković N.: Physico-chemical properties and mineral content of honey samples from Vojvodina (Republic of Serbia). *Food Chem.*, 2019, 276, 15-21.
- [21] Sixto A., Mollo A., Knochen M.: Fast and simple method using DLLME and FAAS for the determination of trace cadmium in honey. *J. Food Comp. Anal.*, 2019, 82, 1-6.
- [22] Stecka H., Gręda K., Pohl P.: Zawartość i biodostępność wapnia, miedzi, żelaza, magnezu, manganu i cynku w komercyjnie dostępnych krajowych miodach pszczelich. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, 2, 111-116.
- [23] Wantusiak P.M., Piszcz P., Skwarek M., Głód B.K.: Właściwości antyoksydacyjne miodów wyznaczone metodami chromatograficznymi. *Camera Separatoria*, 2011, 3 (2), 297-317.
- [24] Wilczyńska A.: Metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009, 3, 870-874.
- [25] Zamanian M., Azizi-Soleiman F.: Honey and glycemic control: A systematic review. *Pharma Nutrition*, 2020, 11, #100180.
- [26] Zielińska S., Wesołowska M., Bilek M., Kaniuczak J., Dżugan M.: The saccharide profile of Polish honeys depending on their botanical origin. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, 2014, 3 (5), 387-390.
- [27] Rozporządzenie Rady (WE) nr 1234/2007 z dnia 22 października 2007 r. ustanawiające wspólną organizację rynków rolnych oraz przepisy szczegółowe dotyczące niektórych produktów rolnych (rozporządzenie o jednolitej wspólnej organizacji rynku). *Dz. U. L 299*, s. 1-149, z 16.11.2007.

ASSESSING CONTENT OF SELECTED MACRO- AND MICROELEMENTS IN COMMERCIAL HONEYS AND IN HONEYS DERIVED DIRECTLY FROM APIARY

S u m m a r y

Honey is characterised by unique sensory and health-promoting properties. It contains inter alia antioxidants, enzymes, vitamins and macro- and microelements that shape its biological activity and play an important role in the proper functioning of human body. Honeys are a source of potassium, magnesium, calcium, sodium, sulphur, manganese, iron, vanadium, chromium, phosphorus, silver, boron and copper. The objective of the research study was to determine the mineral composition of varietal honeys available on the Polish market. In the research study there were analysed Polish honeys of various varieties: acacia, multiflora, lime and rapeseed. Assessed were honeys purchased in a supermarket and derived directly from an apiary. The average content of Ca, K, Na, Mg, Mn, Zn, Cu and Fe in honeys was, respectively [mg/100 g]: 7.42, 59.66, 1.57, 1.44, 0.11, 0.46, 0.02 and 0.12. The highest content of macro- and micronutrients was found in the multiflora honey derived directly from the apiary – 133.77 mg/100 g. The lowest content of mineral components was determined in the acacia honey purchased in the supermarket – 27.32 mg/100 g. Additionally, there was studied the effect of location of a private apiary situated near the Głogów Copper Smelter on the content of copper in the samples of honeys of different varieties. No sig-

nificant relationship was found ($p \geq 0.05$) between the average content of copper in the commercial honeys and those from the private apiary, which indicates no influence of geographical origin on the content of this element.

Key words: honey, honey quality, macroelements, microelements 

MAGDALENA PALACZ

ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII FLUORESCENCJI RENTGENOWSKIEJ CAŁKOWITEGO ODBICIA (TXRF) DO OZNACZANIA ZAWARTOŚCI KRZEMU W MATERIALE ROŚLINNYM

Streszczenie

Liczne opracowania naukowe, w których wykazano dobroczynne działanie krzemu na rośliny, świadczą o wzrastającym zainteresowaniu rolą krzemu w kontekście wpływu na wzrost i prawidłowy rozwój roślin. Wskazują również na potrzebę uzupełniania tego pierwiastka w podłożu podczas produkcji roślinnej.

Celem badań było dopracowanie metody przygotowania próbek materiału roślinnego i oznaczenie w nich zawartości krzemu z zastosowaniem spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia. próbki materiału roślinnego, w skład którego wchodziły liofilizowane i suszone liście szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*), suszone liście skrzypu polnego (*Equisetum arvense*) i suszone liście pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), poddano analizie pierwiastkowej. próbki suszu roślinnego roztwarzano z wykorzystaniem mieszaniny stężonego kwasu azotowego(V) oraz nadtlenu wodoru w mineralizatorze mikrofalowym. Analizę zawartości krzemu w próbkach przeprowadzono przy użyciu spektrometru fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (TXRF). Zawartość krzemu w próbkach szalwii lekarskiej wynosiła 0,2 %, w próbkach pokrzywy zwyczajnej – ponad 0,5 %, a w próbkach skrzypu polnego – ok. 1,4 %. W celu potwierdzenia i uzupełnienia otrzymanych informacji zgromadzony materiał roślinny poddano także analizie mikroskopowej z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego, umożliwiającego również określenie składu pierwiastkowego w mikroobszarze dzięki spektrometrii dyspersji energii wtórnego promieniowania rentgenowskiego. Wykonano fotografie mikroskopowe oraz analizę składu pierwiastkowego próbek materiału roślinnego w mikroobszarze, a przeprowadzone analizy pozwoliły na wykazanie obecności krzemu w trzech próbkach badanego materiału roślinnego: szalwii uprawianej w sposób konwencjonalny, pokrzywy i skrzypu polnego.

Słowa kluczowe: szalwia lekarska, skrzyp polny, pokrzywa zwyczajna, krzem, liofilizacja, TXRF, SEM

Wprowadzenie

Dotychczas w publikacjach naukowych dużo uwagi poświęcano roślinom bogatym w krzem, takim jak pokrzywa, rdest ptasi, podbiał czy skrzyp polny ze względu na

możliwość wykorzystania ich jako źródła tego pierwiastka w prawidłowej i zbilansowanej diecie człowieka. Liczne opracowania naukowe wykazujące dobroczynne działanie krzemu na rośliny dowodzą wzrastającego zainteresowania zarówno rolą krzemu w kontekście wpływu na wzrost i prawidłowy rozwój rośliny, jak również suplementacją tego pierwiastka podczas produkcji roślinnej.

Dodatek krzemu był pomijany podczas nawożenia roślin, ponieważ powszechnie uważano, że w przeciwieństwie do makro- i mikroelementów nie jest pierwiastkiem niezbędnym do wzrostu roślin. Makroelementy, m.in. azot, potas, wapń, magnez, fosfor i siarka, to pierwiastki, których zawartość w suchej masie przewyższa 0,1 %. Do mikroelementów zalicza się pierwiastki występującego w ilości poniżej 0,1 % suchej masy, tj. chlor, żelazo, miedź, cynk, bor, mangan oraz nikiel [9].

Najwięcej krzemu, ok. 3 %, kumulują rośliny zbożowe (np. pszenica), natomiast w roślinach dwuliściennych zawartość tego pierwiastka wynosi poniżej 0,5 % suchej masy. Krzem, mimo że nie jest jednoznacznie zaliczany ani do mikroelementów ani do makroelementów, korzystnie wpływa na rozwój układu korzeniowego roślin uprawnych. Wysycenie tkanek roślin krzemionką zwiększa ich wytrzymałość na uszkodzenia mechaniczne powodowane warunkami atmosferycznymi. Dzięki usztywnieniu liści i łodyg wzrasta też odporność na porażenia wywołane przez patogeny chorobotwórcze i inwazje szkodników. Dodatkowo wzmacnia syntezę barwników asymilacyjnych, co znajduje potwierdzenie w wyższej wydajności fotosyntezy i wpływa na szybszy i bujniejszy rozwój rośliny. Sztywniejsze łodygi podnoszą również odporność rośliny na stres spowodowany niedostatkim wody oraz wywołany gwałtownymi wahaniami temperatur w okresie wczesnowiosennym [4].

Zawartość krzemu w skorupie ziemskiej wynosi ok. 26 % [2]. Pierwiastek ten w glebie występuje przede wszystkim w postaci krzemionki i różnego rodzaju krzemianów, praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie, co utrudnia pobieranie go przez roślinę bezpośrednio z podłoża. Przystawalność tego pierwiastka z gleby wzrasta wraz z wilgotnością podłoża i aktywnością mikroorganizmów glebowych oraz w dużej mierze zależy od jego formy dostępnej dla rośliny [3]. Krzem w wodzie występuje w bardzo małym stężeniu, ze względu na słabą rozpuszczalność związków krzemu. Jedynie wody termalne można uznać za bogate w ten składnik, ponieważ stężenie tego pierwiastka może sięgać tam nawet 600 mg/l [2].

Wyjątkiem, który decyduje o konieczności suplementacji związkami krzemu, jest uprawa hydroponiczna roślin. Jest to rodzaj uprawy w kulturze wodnej, gdzie tradycyjne podłoże glebowe zastępuje się materiałem mineralnym, obojętnym chemicznie i niemającym wpływu na rozwój roślin, służącym tylko do utwierdzenia korzeni. Rośliny pobierają składniki odżywcze oraz sole mineralne rozpuszczone w wodzie z tzw. pożywki [8].

Borkowski i wsp. [1] dowiedli zależności pomiędzy stosowaniem w uprawie roślin związków krzemu a aktywnością naturalnych systemów obronnych roślin, stymu-

lacją ich wzrostu i rozwoju oraz wzmocnieniem tkanek. W celu potwierdzenia i uzupełnienia wyników badań polowych przeprowadza się ilościową analizę zawartości krzemu w roślinach suplementowanych krzemem oraz w roślinach kontrolnych, którym nie były podawane nawozy na bazie związków krzemu. Ilościowe oznaczanie tego pierwiastka w roślinach stało się przedmiotem zainteresowania naukowców w ciągu kilku ostatnich lat. Zagadnienie to jest istotne dla wielu różnych dyscyplin i dziedzin, w tym nie tylko dla rolnictwa, ogrodnictwa czy botaniki, ale także dla biochemii, agronomii czy biotechnologii.

Próbki materiału roślinnego do analizy pierwiastkowej przygotowuje się w określony sposób, zgodnie z jedną z powszechnie stosowanych metod, takich jak: suche spopielenie [7], trawienie na mokro z wykorzystaniem stężonych kwasów [5], roztwarzanie kwasami wspomagane mikrofalami [7]. Najczęściej stosowane techniki analityczne umożliwiające oznaczanie stężenia pierwiastków w materiale roślinnym to m.in. optyczna spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-OES, ang. *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*), atomowa spektrometria absorpcyjna (AAS, ang. *atomic absorption spectrometry*) [6], rentgenowska spektrometria fluorescencyjna (XRF, ang. *X-ray fluorescence*) [5] oraz spektrometria fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (TXRF, ang. *total reflection X-Ray fluorescence*) [6]. Analiza pierwiastkowa suszu roślinnego może być przeprowadzana z użyciem uzupełniających się wzajemnie aparatów pomiarowych. ICP-OES znajduje zastosowanie przede wszystkim w analizie składu pierwiastkowego wody, klarownych próbek ciekłych oraz stałych po mineralizacji. Próbki zawiesin bądź nieklarowne roztwory próbek stałych po mineralizacji analizowane są przy użyciu spektrometru fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (TXRF). Wybór metody analitycznej warunkuje sposób przygotowania próbki do badań. Najczęściej i najpowszechniej stosowaną metodą jest technika mineralizacji próbki stałej, z wykorzystaniem odpowiedniej ilości stężonych kwasów w warunkach podwyższonej temperatury i ciśnienia, z zastosowaniem mikrofal. Roztworzenie próbek stałych, których matrycą jest krzemionka, glinokrzemiany bądź inne minerały zawierające związki krzemu, wspomagane jest dodatkiem stężonego kwasu fluorowodorowego. Postępowanie to umożliwia rozpuszczenie związków krzemu trudno rozpuszczalnych w kwasach, co niestety wiąże się ze znacznymi stratami i ubytkiem tego pierwiastka z próbki podczas mineralizacji, nawet przeprowadzanej w układzie zamkniętym. Z uwagi na ten problem przygotowanie próbki materiału roślinnego do oznaczania zawartości krzemu musiało zostać zmodyfikowane i udoskonalone.

Celem przeprowadzonych badań było dopracowanie metody przygotowania próbek materiału roślinnego i oznaczenie w nich zawartości krzemu z zastosowaniem spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia.

Material i metody badań

Oznaczanie zawartości krzemu wykonywano w próbkach ziół: szaławii lekarskiej (*Salvia officinalis*) pochodzącej z uprawy hydroponicznej, szaławii lekarskiej (*Salvia officinalis*) uprawianej w sposób tradycyjny, a także suszu pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*) – Dary Natury, Polska – oraz suszu skrzypu polnego (*Equisetum arvense*) – Dary Natury, Polska – użytych jako próby kontrolne, w których zgodnie z danymi literaturowymi spodziewano się znacznej zawartości tego pierwiastka. Próbki szaławii z uprawy hydroponicznej oraz próbki szaławii z uprawy konwencjonalnej poddawano procesowi suszenia sublimacyjnego z użyciem liofilizatora Beta 2-8 LSCplus.

Proces liofilizacji, polegający na usunięciu wody z zamrożonego wcześniej materiału na drodze sublimacji, prowadzono w warunkach obniżonego ciśnienia (0,09 mbar) i obniżonej temperatury (-80 °C). Procedurę rozpoczynano od wstępnego, głębokiego zamrożenia materiału pod ciśnieniem atmosferycznym, następnie prowadzono próżniową sublimację lodu oraz dosuszanie materiału do żądanej wilgotności (poniżej 10 %). Końcowy etap procesu to tzw. suszenie desorpcyjne polegające na ogrzaniu produktu w celu usunięcia wody związanej chemicznie, która nie uległa zamrożeniu. Otrzymany produkt, tzw. liofilizat charakteryzował się optymalną jakością, bowiem w warunkach technologicznych procesu zminimalizowane było ryzyko utraty właściwości materiału czy rozkładu substancji aktywnych. Dodatkowo produkt zachował swój kształt, zapach i barwę (fot. 1). Konwencjonalna metoda suszenia polega natomiast na zastosowaniu wysokich temperatur – 70 ÷ 105 °C, co wiąże się często z obniżeniem jakości produktu i zmianą jego wyglądu, pozbawieniem składników lotnych i wrażliwych na działanie wysokich temperatur.

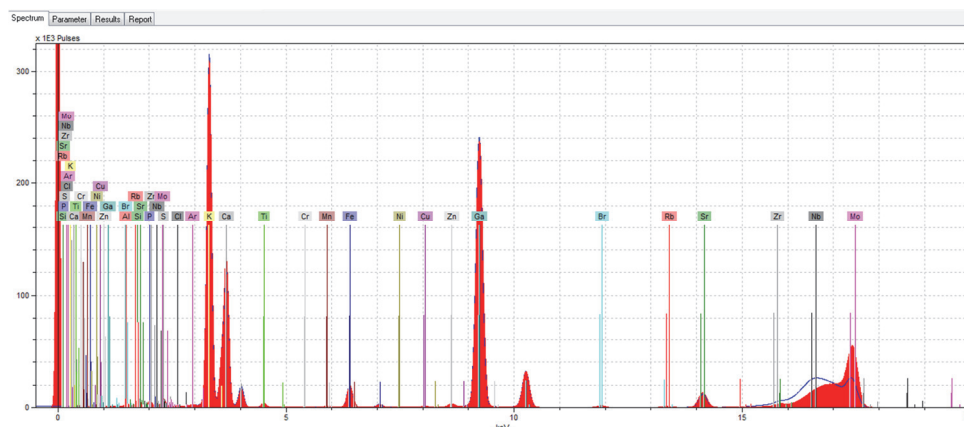


Fot. 1. Wygląd materiału roślinnego po suszeniu konwencjonalnym i po liofilizacji
Photo 1. Appearance of plant material after conventional drying and lyophilisation

Liofilizowane i wysuszone konwencjonalnie zioła poddawano procesowi mineralizacji w układzie zamkniętym w mineralizatorze mikrofalowym Ertec MW Magnum II (Ertec-Poland) oraz przy użyciu kwasu azotowego(V) o stężeniu 65 %, (Emsure ISO, Merck, Polska) i niewielkiej ilości roztworu 30-procentowej wody utlenionej (cz.d.a., Chempur, Polska). Zastosowanie wysokiej temperatury reakcji roztwarzania, podwyższonego ciśnienia oraz dodatek czynnika stabilizującego pozwolił na uzyskanie jednorodnej i stabilnej zawiesiny.

Do każdej z trzech przygotowanych probówek typu eppendorf pobierano 0,5 ml otrzymanej zawiesiny i dodawano 60 μ l roztworu wzorca wewnętrznego galu (1000 ug/ml, Plasma HIQU, Merck, Polska). Następnie mieszaninę poddawano trzykrotnej 30-sekundowej homogenizacji przy użyciu wytrząsarki laboratoryjnej punktowej typu vortex, model PV-1 (Grant-Bio, Wielka Brytania). Przygotowaną w ten sposób próbkę w postaci cienkiej warstwy nanoszono na nośnik – dysk szafirowy o średnicy 20 mm, który umieszczano w automatycznym podajniku próbek, a następnie w aparaturze analitycznej – spektrometrze fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (TXRF), model PICOFOX S2 (Bruker Inc., USA). Główną zaletą tego spektrometru jest jednoczesna analiza wielopierwiastkowa z zachowaniem niskiej granicy wykrywalności. Aparat ten pozwala na analizę próbek ciekłych, zawiesin i ciał stałych oraz próbek zanieczyszczeń.

Zasada pomiaru polega na generowaniu przez lampę molibdenową wiązki promieniowania z zakresu $10^{-3} \div 10^0$ nm, kierowaniu jej na próbkę pod niewielkim kątem, a następnie rejestracji emitowanego promieniowania wtórnego, charakterystycznego dla każdego atomu pierwiastka wchodzącego w skład badanej próbki. W wyniku analizy otrzymuje się widmo promieniowania rentgenowskiego (rys. 1), na podstawie którego dokonuje się oznaczenia zawartości danych pierwiastków w próbce.



Rys. 1. Przykładowe widmo promieniowania rentgenowskiego próbki badanych ziół

Fig 1. Example of X-ray spectrum of sample of analysed herbs

Wyniki i ich omówienie

Uzyskane wyniki zawartości krzemu w próbkach materiału roślinnego (wybranych ziół) przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Zawartość krzemu w badanych ziołach

Table 1. Content of silicon in analysed herbs

| Próba / Sample | Zawartość krzemu Content of silicon [g/kg] | SD |
|---|---|--------|
| Szałwia lekarska (<i>Salvia officinalis</i>) z uprawy hydroponicznej, liofilizowana / Common sage (<i>Salvia officinalis</i>) from hydroponic cultivation, lyophilised | < LOD | - |
| Szałwia lekarska (<i>Salvia officinalis</i>) z uprawy hydroponicznej, suszona konwencjonalnie / Common sage (<i>Salvia officinalis</i>) from hydroponic cultivation, conventionally dried | < LOD | - |
| Szałwia lekarska (<i>Salvia officinalis</i>) z uprawy w glebie, liofilizowana / Common sage (<i>Salvia officinalis</i>) grown in soil, lyophilised | 1,973 | 0,2845 |
| Pokrzywa zwyczajna (<i>Urtica dioica</i>) suszona konwencjonalnie / Stinging nettle (<i>Urtica dioica</i>) conventionally dried | 5,250 | 0,7175 |
| Skrzyp polny (<i>Equisetum arvense</i>) suszony konwencjonalnie / Field horsetail (<i>Equisetum arvense</i>) conventionally dried | 13,990 | 0,4340 |

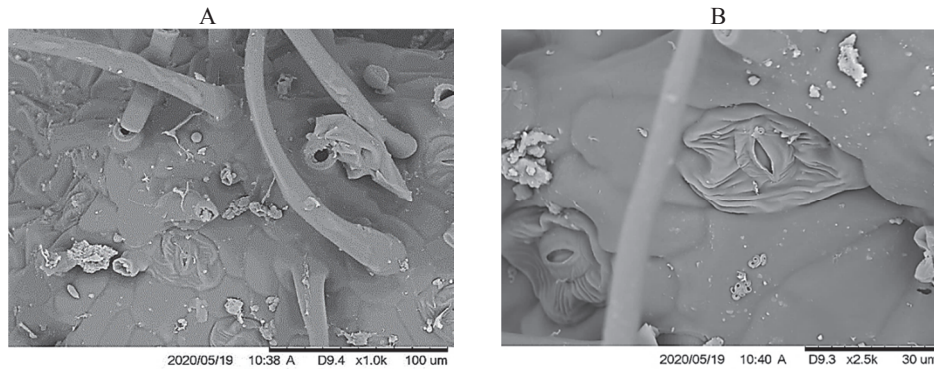
Objaśnienia / Explanatory notes:

LOD – limit detekcji urządzenia / limit of detection of device; SD – odchylenie standardowe / standard deviation; LOQ – limit oznaczalności (135,0 mg/kg) / limit of quantification (135.0 mg/kg).

Zawartość krzemu w próbkach szalwii pochodzącej z uprawy hydroponicznej wynosiła poniżej 46,56 mg/kg (poniżej limitu detekcji urządzenia), natomiast w próbkach szalwii uprawianej w warunkach konwencjonalnych osiągnęła ok. 1,9 g/kg. W próbkach pokrzywy zawartość krzemu wynosiła ponad 5,2 g/kg, a w próbkach skrzypu polnego – ok. 14,0 g/kg.

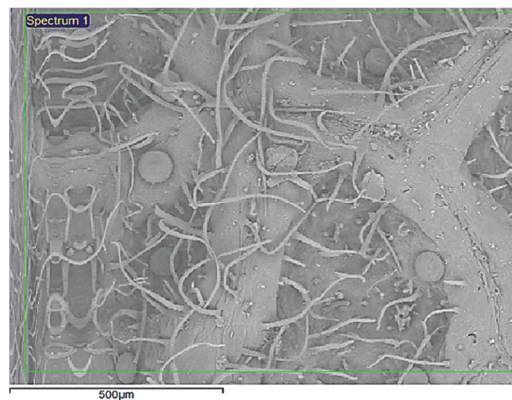
W celu potwierdzenia i uzupełnienia otrzymanych wyników próbki szalwii, pokrzywy i skrzypu polnego poddano analizie mikroskopowej przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, ang. *scanning electron microscope*), model TM3000 (Hitachi, Japonia), umożliwiającego określenie składu pierwiastkowego w badanych mikroobszarze dzięki spektrometrowi dyspersji energii wtórnego promieniowania rentgenowskiego (EDS, ang. *energy dispersive X-Ray spectroscopy*). Wyniki obserwacji mikroskopowych przedstawiono na fot. 2 - 9.

Wyniki analizy pierwiastkowej szalwii lekarskiej (fot. 2) z powierzchni zaznaczonej na fot. 3. przedstawiono w tab. 2.



Fot. 2. Obraz mikroskopowy próbki liofilizowanej szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*) uprawianej w warunkach konwencjonalnych, w powiększeniu: (A) – 1000-krotnym, (B) – 2500-krotnym

Photo 2. Microscopic image of lyophilised common sage (*Salvia officinalis*) sample grown under conventional conditions, with magnification: (A) – 1000×, (B) – 2500×



Fot. 3. Powierzchnia próbki liofilizowanej szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*) uprawianej konwencjonalnie z zaznaczonym mikroobszarem poddanym analizie pierwiastkowej

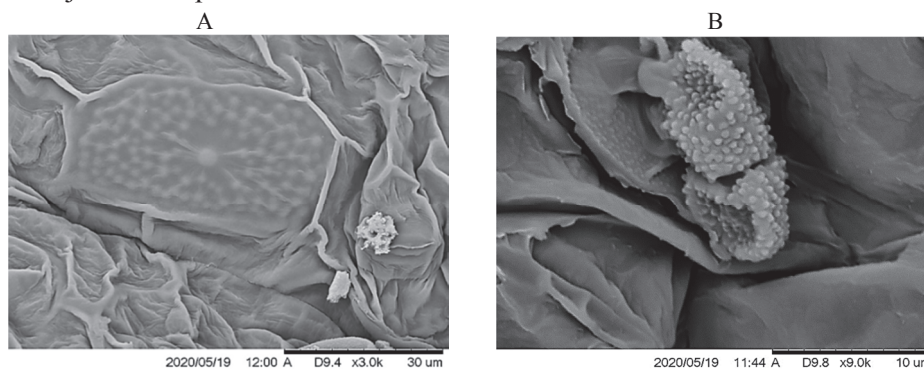
Photo 3. Surface of the lyophilised common sage (*Salvia officinalis*) sample grown under conventional conditions with marked micro-area that underwent elemental analysis

Tabela 2. Wyniki analizy pierwiastkowej w mikroobszarze próbki liofilizowanej szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*) uprawianej konwencjonalnie

Table 2. Results of elemental analysis in micro-area of the lyophilised common sage (*Salvia officinalis*) sample grown under conventional conditions

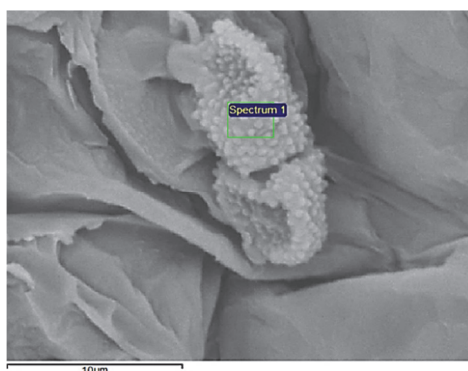
| Pierwiastek / Element | Zawartość / Content [g/kg] |
|-----------------------|----------------------------|
| Węgiel / Carbon (C) | 455,90 |
| Tlen / Oxygen (O) | 424,90 |
| Krzem / Silicon (Si) | 1,70 |
| Potas / Potassium (K) | 117,00 |

Wyniki analizy pierwiastkowej pokrzywy zwyczajnej (fot. 4) z powierzchni zaznaczonej na fot. 5. przedstawiono w tab. 3.



Fot. 4. Obraz mikroskopowy próbki suszonej pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), w powiększeniu: (A) – 3000-krotnym, (B) – 9000-krotnym

Photo 4. Microscopic image of dried stinging nettle (*Urtica dioica*) sample, with magnification: (A) – 3000 \times , (B) – 9000 \times



Fot. 5. Powierzchnia próbki suszonej pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*) z zaznaczonym mikroobszarem poddanym analizie pierwiastkowej

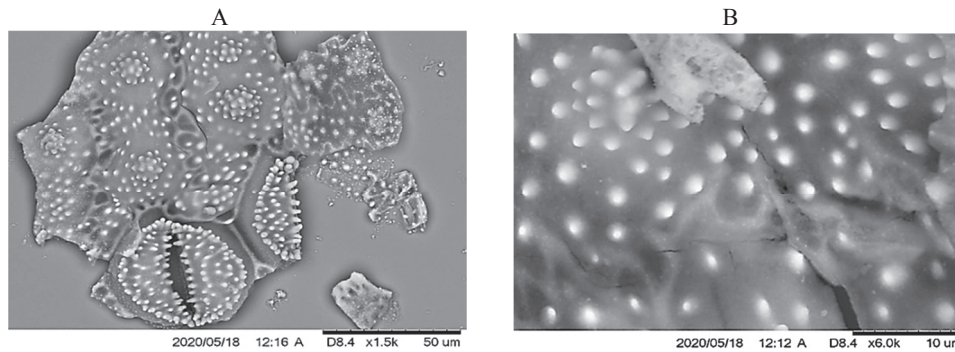
Photo 5. Surface of dried stinging nettle (*Urtica dioica*) sample with marked micro-area that underwent elemental analysis

Tabela 3. Wyniki analizy pierwiastkowej w mikroobszarze próbki suszonej pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*)

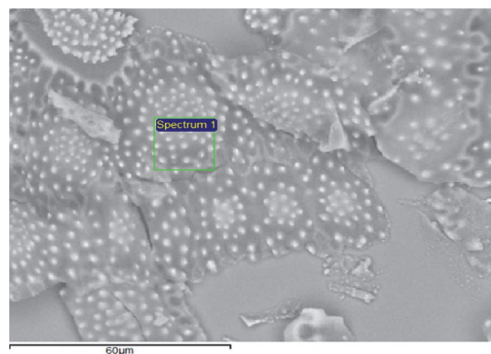
Table 3. Results of elemental analysis in micro-area of dried stinging nettle (*Urtica dioica*) sample

| Pierwiastek / Element | Zawartość / Content [g/kg] |
|-----------------------|----------------------------|
| Węgiel / Carbon (C) | 480,50 |
| Tlen / Oxygen (O) | 425,00 |
| Krzem / Silicon (Si) | 16,26 |
| Potas / Potassium (K) | 46,06 |
| Wapń / Calcium (Ca) | 32,25 |

Wyniki analizy pierwiastkowej skrzypu polnego (fot. 6) z powierzchni zaznaczonej na fot. 7. przedstawiono w tab. 4.



Fot. 6. Obraz mikroskopowy próbki suszonego skrzypu polnego (*Equisetum arvense*), w powiększeniu: (A) – 1500-krotnym, (B) – 6000-krotnym
 Photo 6. Microscopic image of dried field horsetail (*Equisetum arvense*) sample, with magnification: (A) – 1500×, (B) – 6000×



Fot. 7. Powierzchnia próbki suszonego skrzypu polnego (*Equisetum arvense*) z zaznaczonym mikroobszarem poddanym analizie pierwiastkowej
 Photo 7. Surface of dried horsetail (*Equisetum arvense*) sample with marked micro-area that underwent elemental analysis

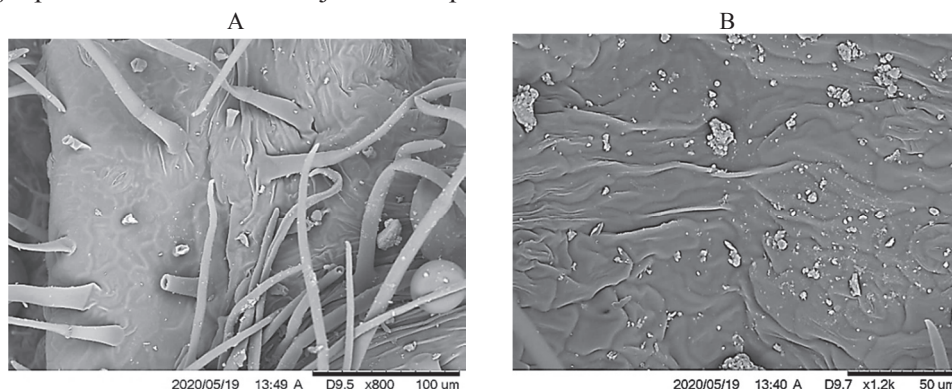
Tabela 4. Wyniki analizy pierwiastkowej w mikroobszarze próbki suszonego skrzypu polnego (*Equisetum arvense*)
 Table 4. Results of elemental analysis in the micro-area of dried field horsetail (*Equisetum arvense*) sample

| Pierwiastek / Element | Zawartość / Content [g/kg] |
|-------------------------|----------------------------|
| Węgiel / Carbon (C) | 174,10 |
| Tlen / Oxygen (O) | 546,10 |
| Magnez / Magnesium (Mg) | 2,62 |
| Krzem / Silicon (Si) | 251,20 |

c.d. tab. 4

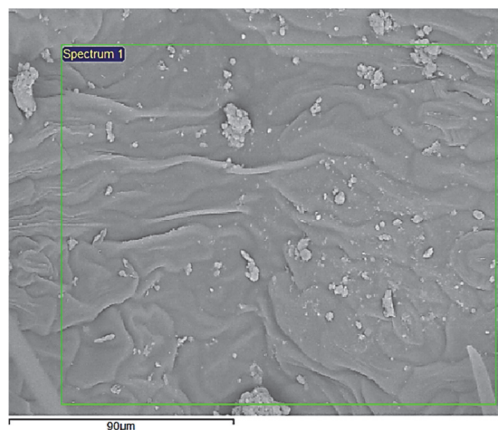
| | |
|-------------------------|-------|
| Fosfor / Phosphorus (P) | 3,69 |
| Siarka / Sulphur (S) | 2,91 |
| Potas / Potassium (K) | 11,30 |
| Wapń / Calcium (Ca) | 8,14 |

Wyniki analizy pierwiastkowej szalwii lekarskiej (fot. 8) z uprawy hydroponicznej z powierzchni zaznaczonej na fot. 9. przedstawiono w tab. 5.



Fot. 8. Obraz mikroskopowy próbki suszonej szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*) uprawianej hydroponicznie, w powiększeniu: (A) – 800-krotnym, (B) – 1200-krotnym

Photo 8. Microscopic image of dried common sage (*Salvia officinalis*) sample grown hydroponically, with magnification: (A) – 800×, (B) – 1200×



Fot. 9. Powierzchnia próbki suszonej szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*) z uprawy hydroponicznej z zaznaczonym mikroobszarem poddanym analizie pierwiastkowej

Photo 9. Surface of dried common sage (*Salvia officinalis*) sample grown hydroponically with marked micro-area that underwent elemental analysis

Tabela 5. Wyniki analizy pierwiastkowej w mikroobszarze próbki suszonej szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*) z uprawy hydroponicznejTable 5. Results of elemental analysis in micro-area of sample of dried common sage (*Salvia officinalis*) from hydroponic cultivation

| Pierwiastek / Element | Zawartość / Content [g/kg] |
|-----------------------|----------------------------|
| Węgiel / Carbon (C) | 501,70 |
| Tlen / Oxygen (O) | 399,20 |
| Potas / Potassium (K) | 70,81 |
| Wapń / Calcium (Ca) | 13,86 |
| Glin / Aluminium (Al) | 9,72 |
| Krzem / Silicon (Si) | 10,99 |

Próbki szalwii z uprawy hydroponicznej charakteryzowały się bardzo delikatnym i słabo wyczuwalnym zapachem olejków eterycznych. Liście rośliny o mało intensywnej barwie były kruche, delikatne i cienkie, łodygi natomiast wiotkie i łamliwe. Z kolei intensywnie wybarwione, grube, sztywne i aksamitne liście szalwii uprawianej w sposób konwencjonalny uwalniały intensywny zapach charakterystyczny dla tego gatunku. Łodygi rośliny o większej średnicy przekroju, nawet po wysuszeniu były odporne na rozcieranie i łamanie.

Na podstawie analiz mikroskopowych wykazano obecność krzemu w trzech próbkach badanych ziół: szalwii uprawianej w sposób konwencjonalny, pokrzywy i skrzypu polnego. W próbce szalwii uprawianej hydroponicznie zawartość krzemu znajdowała się poniżej limitu detekcji urządzenia.

Wykonane w dużych powiększeniach fotografie mikroskopowe obrazują budowę morfologiczną badanych roślin. Na fotografii mikroskopowej próbki skrzypu polnego wykonanej w powiększeniu 6000-krotnym (fot. 6) zaobserwowano wyraźnie zarysowane obszary rośliny, w których skumulowały się związki krzemu w postaci jasnych, uwypuklonych punktów (fot. 7). Liść pokrzywy, którego fragment zobrazowano na fotografiach SEM (fot. 4 i 5), w porównaniu z próbkami skrzypu polnego charakteryzował się niewielkimi obszarami kumulacji krzemu, co ma odzwierciedlenie w wynikach analizy składu pierwiastkowego obydwu surowców zielarskich. W próbkach szalwii z uprawy konwencjonalnej (fot. 8) nie zaobserwowano wyraźnych skupisk obszarów zawierających krzem, jednak analiza pierwiastkowa w mikroobszarze potwierdziła jego obecność w roślinie na poziomie $< 0,2\%$.

Wnioski

1. Zastosowanie spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia TXRF do analizy pierwiastków w wybranych surowcach zielarskich umożliwiło

- stwierdzenie, że najwięcej krzemu w swoich tkankach kumuluje skrzyp polny, co ma odzwierciedlenie w wynikach analiz mikroskopowych.
2. Szałwia lekarska uprawiana hydroponicznie charakteryzowała się małą zawartością krzemu. Zawartość tego pierwiastka w pokrzywie zwyczajnej wynosiła 5,2 g/kg, a w próbkach szalwii lekarskiej uprawianej konwencjonalnie – 1,9 g/kg.
 3. Przeprowadzone analizy pierwiastkowe w mikroobszarze z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego potwierdziły wyniki analiz uzyskanych techniką TXRF.

Literatura

- [1] Borkowski J., Felczyńska A., Górecki R.: Wpływ nawożenia krzemem na wzrost, plon i zdrowotność pomidorów. Zesz. Nauk. Instytutu Ogrodnictwa, 2014, 22, 195-202.
- [2] Brogowski Z.: Krzem w glebie i jego rola w żywieniu roślin. Post. Nauk Rol., 2000, 6, 9-16.
- [3] Datnoff L.E., Snyder G.H., Korndörfer G.H.: Silicon in Agriculture. Elsevier Science B.V., Amsterdam 2001.
- [4] Górecki R.S., Danielski-Busch W.: Effect of silicate fertilizers on yielding of greenhouse cucumber (*Cucumis sativus* L.) in container cultivation. J. Elementol., 2009, 14 (1), 71-78.
- [5] Khuder A., Sawan M.K., Karjou J., Razouk A.K.: Determination of trace elements in Syrian medicinal plants and their infusions by energy dispersive X-ray fluorescence and total reflection X-ray fluorescence spectrometry. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2009, 64, 721-725.
- [6] Sanchez-Moreno R.A., Gismara M.J., Sevilla M.T., Procopio J.R.: Direct and rapid determination of ultratrace heavy metals in solid plant materials by ET-AAS ultrasonic-assisted slurry sampling. Phytochemical Analysis, 2010, 21 (4), 340-347.
- [7] Soyulak M., Tuzen M., Narin I., Sari H.: Comparison of microwave, dry and wet digestion procedures for the determination of trace metal contents in spice samples produced in Turkey. J. Food Drug Anal., 2004, 12 (3), 254-258.
- [8] Stamatakis A., Papadantonakis N., Savvas D., Lydakakis-Simantiris N., Kefalas P.: Effects of silicon and salinity on fruit yield and quality of tomato grown hydroponically. Acta Horticulturae, 2003, 609, 141-147.
- [9] Starck Z.: Rola składników mineralnych w roślinie. W: Fizjologia roślin. Red. J. Kopcewicz, S. Lewak. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2002, ss. 228-246.

APPLICATION OF TOTAL REFLECTION X-RAY FLUORESCENCE SPECTROMETRY (TXRF) IN DETERMINING CONTENT OF SILICON IN PLANT MATERIAL

Summary

Numerous scientific studies, in which beneficial effects are shown of silicon on plants, are proof of the growing interest in the role of silicon in terms of its influence on the growth and proper development of plants. Also they highlight the need to supply the substratum with this element during plant production.

The objective of the research study was to tweak the method for preparing samples of plant material and to determine the content of silicon therein with the use of total reflection X-ray fluorescence spectrometry. The samples of plant material, which included lyophilized and dried leaves of common sage

(*Salvia officinalis*), dried leaves of field horsetail (*Equisetum arvense*) and dried leaves of stinging nettle (*Urtica dioica*), underwent an elemental analysis. The samples of dried plants were digested with a mixture of concentrated nitric acid(V) and hydrogen peroxide in a microwave mineraliser. The analysis of the silicon content in the samples was performed using a total reflection X-ray fluorescence spectrometer (TXRF). The silicon content in the common sage samples was 0.2 %, in the stinging nettle samples – more than 0.5 % and in the field horsetail samples – ca. 1.4 %. In order to confirm and complete the information obtained, the collected plant material underwent a microscopic analysis using a scanning electron microscope, which made it possible to determine the elemental composition in the micro-area by means of a secondary X-ray energy dispersion spectrometer. Microscopic photos were taken and an analysis was performed of the elemental composition of samples of the plant material in the micro-area; the analyses performed demonstrated that silicon was present in three samples of the plant material analysed: in conventionally grown sage, in nettle and field horsetail.

Key words: common sage, field horsetail, stinging nettle, silicon, lyophilisation, TXRF, SEM 

IZA BAJERLEIN, PATRYK BIELECKI

**OKREŚLENIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W WYCIĄGACH
UZYSKANYCH ZA POMOCĄ EKSTRAKCJI DWUTLENKIEM WĘGLA
W STANIE NADKRYTYCZNYM Z LIŚCI POKRZYWY ZWYCZAJNEJ
(*URTICA DIOICA* L.)**

Streszczenie

Ekologiczne ekstrakty roślinne bogate w substancje biologicznie aktywne są cennym surowcem dla przemysłu spożywczego, stąd ciągle poszukuje się nowych ich źródeł. Szczególną uwagę zwraca się na rośliny pospolite, odporne na trudne warunki atmosferyczne, łatwo dostępne i tanie w uprawie. Do tego typu roślin należy pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.). Celem pracy było określenie profilu kwasów tłuszczowych zawartych w liściach pokrzywy zwyczajnej, w wyciągach uzyskanych metodą ekstrakcji za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla z dodatkiem etanolu. Uzyskano 5 ekstraktów różniących się sposobem pozyskania oraz parametrami procesu – czasem, ciśnieniem i temperaturą. Profil kwasów tłuszczowych oznaczono metodą GC-MS. Identyfikację związków przeprowadzono na podstawie porównania widm masowych z biblioteką NIST 11 oraz porównania czasów retencji z certyfikowanym materiałem odniesienia. We wszystkich ekstraktach udział nienasyconych kwasów tłuszczowych był większy niż nasyconych kwasów tłuszczowych. W badaniach wykazano, że wzrost temperatury i ciśnienia procesu skutkowało wyekstrahowaniem większej ilości pożądaných nienasyconych kwasów tłuszczowych. Największą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych cechował się ekstrakt otrzymany w temp. 50 °C przy ciśnieniu 250 barów. W wyciągach uzyskanych przy zastosowaniu niskiego ciśnienia i wydłużonego czasu ekstrakcji nie zidentyfikowano kwasu eikozapentaenowego, który był obecny w pozostałych próbach.

Słowa kluczowe: pokrzywa zwyczajna, ekstrakcja nadkrytyczna, chromatografia gazowa, profil kwasów tłuszczowych

Wprowadzenie

Na przestrzeni ostatnich lat wzrosła świadomość konsumentów na temat zdrowego i racjonalnego odżywiania. Tendencję tę obserwuje się do chwili obecnej. Powszechny dostęp do informacji spowodował szersze zainteresowanie żywnością proz-

drowotną, zawierającą dodatki w postaci szczepów żywych kultur bakterii i związków biologicznie aktywnych, takich jak np. witaminy czy przeciwutleniacze oraz wzrost popytu na taką żywność [10, 15].

Do grupy substancji prozdrowotnych zalicza się związki syntetyzowane przez rośliny, które nie są niezbędne do prawidłowego ich funkcjonowania, czyli tzw. metabolity wtórne. Substancje te kumulowane w wakuoli są produktami ubocznymi w szlakach biosyntezy. Pierwotnym zadaniem wtórnych metabolitów roślinnych jest m.in. odstraszenie niepożądanych organizmów żerujących na danej roślinie (repelenty żywieniowe), osłabianie konkurentów pokarmowych (allelopatiny), przyciąganie organizmów symbiotycznych (chemoatraktanty). Związki te stanowi szeroka grupa niskocząsteczkowych substancji organicznych – szacuje się, że może być ich nawet dwa miliony, o różnym działaniu na organizm człowieka. Są to m.in. terpenoidy, alkaloidy, związki fenolowe, witaminy, czy niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT) [11]. W przemyśle spożywczym związki te stosowane są jako składniki produktów prozdrowotnych lub suplementów diety.

Do prozdrowotnych cech roślinnych metabolitów wtórnych należą m.in. właściwości grzybobójcze i bakteriobójcze, działania wspomagające w profilaktyce chorób takich, jak cukrzyca, nadciśnienie czy niektóre choroby nowotworowe. Szczególną rolę w profilaktyce chorób układu krążenia pełnią niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT). Zalicza się je do grupy związków egzogennych, czyli takich, które organizm ludzki musi przyjmować z pożywieniem, gdyż nie jest w stanie ich samodzielnie syntetyzować [10, 11, 15]. NNKT wykazują korzystny wpływ na organizm ludzki. Wpływają m.in. na obniżanie ciśnienia tętniczego krwi, zapobieganie miażdżycy i zawałom serca oraz zwiększanie ogólnej odporności organizmu. Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe występują głównie w rybach i owocach morza [1, 12, 14, 19], jak również w roślinach, w tym w nasionach lnu, słonecznika i rzepaku, w ziarnach soi, w pestkach dyni i winogron czy w orzechach [1, 5, 20]. W przypadku ryb oraz owoców morza problemem jest transport i długotrwałe przechowywanie tych produktów z zachowaniem cech świeżości i wartości odżywczej. W przypadku NNKT pochodzenia roślinnego wpływ na jakość oleju ma metoda jego pozyskiwania [21]. Tłoczenie jest odpowiednią metodą pozyskiwania oleju z roślin oleistych o dużej zawartości kwasów tłuszczowych, jednak nie jest efektywne w przypadku roślin z mniejszą ich zawartością. Z tego względu w niniejszej pracy zastosowano ekstrakcję za pomocą dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym do pozyskania kwasów tłuszczowych z liści pokrzywy zwyczajnej o znanych właściwościach prozdrowotnych [2, 4, 6].

Pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.) to wieloletnia roślina należąca do rodziny *Urticaceae*. Rozpowszechniona jest na obszarze Europy, Azji, Afryki Północnej i Ameryki Północnej. Ze względu na swoje właściwości jest szeroko stosowana w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. W medycynie ludowej

używana jest do wspomagania leczenia stanów zapalnych i zakażeń bakteryjnych układu moczowego. Często stosuje się ją w kosmetyce, głównie jako składnik produktów do włosów. Wykorzystywana jest również jako roślina paszowa [6, 8, 9]. W ostatnich badaniach wskazuje się, że zastosowanie ekstraktów z pokrzywy na komórki rakowe prowadzi do zahamowania ich proliferacji [4]. Szerokie zastosowanie pokrzywy zwyczajnej wynika z naturalnego bogactwa jej składników. Przeprowadzono wiele badań mających na celu ustalenie składu chemicznego tej rośliny [2, 3, 9, 13]. Obecne są w niej m.in. witaminy z grupy B, C, E, K, flawonoidy, karotenoidy, polifenole, mono- i oligosacharydy, a także wiele niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych [6, 8, 9].

Coraz większy popyt na żywność funkcjonalną wymusił pojawienie się nowych metod pozyskiwania ekstraktów. Istnieje wiele sposobów ekstrakcji związków biologicznie aktywnych, w tym NNKT [17]. Na potrzeby tej pracy zastosowano ekstrakcję z wykorzystaniem dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym (SFE-CO₂ Supercritical Fluid Extraction – CO₂) i etanolu jako współrozpuszczalnika. Jest to stosunkowo nowy sposób ekstrakcji związków głównie pochodzenia roślinnego. W metodzie tej stosuje się dwutlenek węgla jako ekstrahent w warunkach temperatury i ciśnienia powyżej parametrów krytycznych tego gazu (temp. 31 °C, ciśnienie 71,8 bara). Zaletą tej technologii jest głównie bardzo małe oddziaływanie na środowisko – dwutlenek węgla po rozprężeniu i tym samym oddzieleniu od ekstrahowanej substancji może zostać zawrócony do układu i użyty ponownie, przez co zredukowana jest jego emisja do atmosfery. Zmniejsza to jednocześnie koszty ekstrakcji. Dzięki zmianie głównych parametrów, takich jak temperatura i ciśnienie, można sterować procesem i ukierunkowywać go na ekstrakcję konkretnych grup związków. Równocześnie należy podkreślić, że otrzymany ekstrakt nie wymaga dalszej obróbki w postaci filtrowania czy wirowania i jest wolny od drobnoustrojów [7, 16, 18].

Celem pracy było określenie profilu kwasów tłuszczowych zawartych w liściach pokrzywy zwyczajnej, w wyciągach uzyskanych metodą ekstrakcji za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla z dodatkiem etanolu.

Material i metody badań

Materiał doświadczalny stanowił ekologiczny susz z liści pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica* L.) – Dary Natury, który poddawano ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla (99,995 %, Air Liquide Polska Sp. z o.o.) i etanolem (96 % cz.d.a., POCH, Polska) w stosunku 5 : 1. Parametry ekstrakcji regulowano w następującej kolejności: początkowo podczas doboru kierowano się tylko zmianą ciśnienia procesu (między 150 a 250 barów), następnie wydłużono czas trwania ekstrakcji, ostatecznie sprawdzono również wpływ podwyższenia temperatury o 10 °C. Każdorazowo do ekstrakcji odważano 1,5 g suszu (tab. 1).

Tabela 1. Parametry procesu ekstrakcji

Table 1. Extraction proces parameters

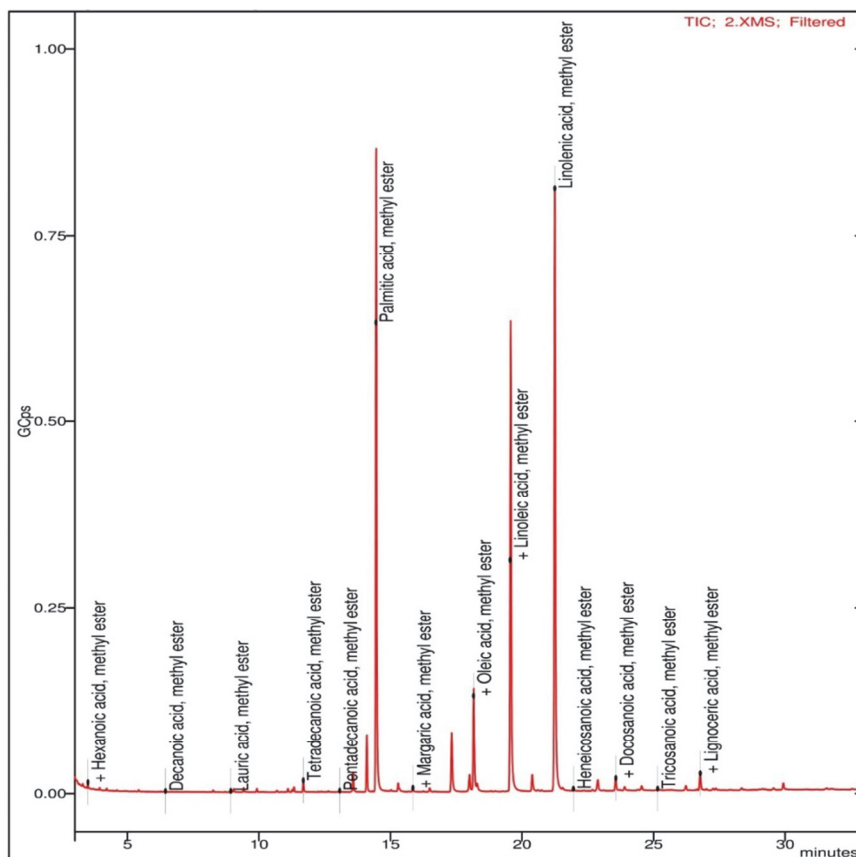
| Ekstrakt Extract | Temperatura Temperature [°C] | Ciśnienie Pressure [bar] | Przepływ EtOH EtOH flow rate [ml/min] | Przepływ CO ₂ CO ₂ flow rate [ml/min] | Faza dynamiczna Dynamic phase [min] | Faza sta- tyczna Static phase [min] | Faza dynamiczna Dynamic phase [min] |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------------|---|---|---|--|---|
| 1 | 50 | 200 | 2 | 10 | 15 | 100 | 15 |
| 2 | 50 | 150 | 2 | 10 | 15 | 100 | 15 |
| 3 | 50 | 250 | 2 | 10 | 15 | 100 | 15 |
| 4 | 50 | 250 | 2 | 10 | 25 | 240 | 25 |
| 5 | 60 | 250 | 2 | 10 | 15 | 100 | 15 |

Ekstrakty przechowywano w chłodziarce bez dostępu światła. Do wykonania oznaczenia profilu kwasów tłuszczowych pobierano 40 ml każdego ekstraktu, który odparowywano w wyparce próżniowej Heidolph Hei-VAP Advantage 3G (Heidolph Instruments, Niemcy) aż do całkowitego usunięcia etanolu. Następnie rozpuszczano ekstrakt w 2 ml dichlorometanu (do analizy pozostałości pestycydów GC, Chempur, Polska) i przenoszono 100 μ l roztworu do butelek z ciemnego szkła. Ekstrakty odparowywano do sucha w strumieniu azotu. W dalszej kolejności przeprowadzano derywatyzację kwasów tłuszczowych do estrów metylowych. W tym celu do każdej z próbek dodawano 2 ml 0,5 M metanolanu sodu (NaOH cz.d.a. POCH, Polska); metanol do HPLC (Sigma-Aldrich, USA) i ogrzewano w temp. 80 °C przez 15 min. Następnie dodawano 2 ml trifluorku boru (14 %, Merck, Polska) i ogrzewano w temp. 80 °C przez 20 min. Po schłodzeniu dodawano 2 ml nasyconego roztworu chlorku sodu (cz.d.a. POCH, Polska) oraz 2 ml heksanu (do chromatografii gazowej GC-MS, Merck, Polska). Po wytrząsaniu zbierano warstwę heksanową, filtrowano w obecności bezwodnego siarczanu magnezu (cz.d.a. POCH, Polska) przez filtr strzykawkowy PVDF 0,2 μ m (LLG Labware, Niemcy) i poddawano analizie.

Oznaczanie profilu kwasów tłuszczowych wykonywano metodą chromatografii gazowej. Metody przygotowania próbek oraz rozdziału chromatograficznego dobierano eksperymentalnie. Analizę prowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Bruker 436-GC (Bruker Inc., USA) ze spektrometrem masowym SCION SQ z pułapką jonową i jonizacją elektronami (Shimadzu, Japonia). Stosowano kolumnę kapilarną WCOT Varian CP-sil 88 (Agilent Technologies Inc., USA) o długości 50 m, średnicy 0,25 mm, filmem o grubości 0,20 μ m i z helem jako gazem nośnym. Identyfikację estrów metylowych kwasów tłuszczowych prowadzono dwutorowo: metodą porównania widm masowych z biblioteką NIST 11 oraz metodą porównania czasów retencji sygnałów chromatograficznych z certyfikowanym materiałem odniesienia (Supelco 37 component FAME mix, Sigma-Aldrich, USA).

Wyniki i ich omówienie

Na rys. 1. przedstawiono przykładowy chromatogram profilu estrów metylowych kwasów tłuszczowych, z których dominującymi były estry metylowe kwasu palmity-



Objaśnienia / Explanatory notes:

hexanoic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu kapronowego; decanoic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu dekanowego; lauric acid, methyl ester / ester metylowy kwasu laurynowego; tetradecanoic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu mirystynowego; pentadecanoic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu pentadekanowego; palmitic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu palmitynowego; margaric acid, methyl ester / ester metylowy kwasu margarynowego; oleic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu oleinowego; linoleic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu linolowego; linolenic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu linolenowego; heneicosanoic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu heneikozanowego; docosanoic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu dokozanowego; tricosanoic acid, methyl ester / ester metylowy kwasu trikozanowego; lignoceric acid, methyl ester / ester metylowy kwasu lignocerowego.

Rys. 1. Chromatogram estrów metylowych kwasów tłuszczowych zawartych w ekstrakcie 2. z suszu liści pokrzywy

Fig. 1. Chromatogram of fatty acid methyl esters contained in extract 2 of dried nettle leaves

nowego, linolowego i linolenowego. Zawartość oznaczonych estrów metylowych kwasów tłuszczowych w ekstraktach z suszu z liści pokrzywy przedstawiono w tab. 2.

We wszystkich ekstraktach występowały te same kwasy tłuszczowe (z wyjątkiem kwasu eikozapentaenowego w próbach 2 i 4). Wyekstrahowano zarówno kwasy tłuszczowe nasycone (SFA), kwasy tłuszczowe nienasycone (UFA), w których skład wchodziły kwasy tłuszczowe jednonienasycone (MUFA) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA). Głównym kwasem nasyconym we wszystkich analizowanych ekstraktach był kwas palmitynowy. Wśród kwasów nienasyconych dominowały kwasy linolowy i α -linolenowy. Próbkę cechowały się również dużą zawartością kwasów: stearynowego, oleinowego, arachidowego i lignocerowego.

Tabela 2. Profil kwasów tłuszczowych w ekstraktach uzyskanych za pomocą SFE-CO₂ z suszu liści pokrzywy

Table 2. Profile of fatty acids in extracts obtained by SFE-CO₂ from dried nettle leaves

| Nazwa kwasu Name of acid | Zawartość estrów metylowych kwasów tłuszczowych Content of fatty acids methyl esters [%] | | | | |
|---|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Ekstrakt 1 Extract 1 | Ekstrakt 2 Extract 2 | Ekstrakt 3 Extract 3 | Ekstrakt 4 Extract 4 | Ekstrakt 5 Extract 5 |
| Kwas kapronowy, C6:0 Caproic acid, C6:0 | 0,18 | 0,18 | 0,19 | 0,22 | 0,21 |
| Kwas kaprylowy, C8:0 Caprylic acid, C8:0 | 0,05 | 0,04 | 0,04 | 0,07 | 0,04 |
| Kwas kaprynowy, C10:0 Capric acid, C10:0 | 0,05 | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,06 |
| Kwas laurynowy, C12:0 Lauric acid, C12:0 | 0,06 | 0,06 | 0,08 | 0,06 | 0,10 |
| Kwas mirystynowy, C14:0 Myristic acid, C14:0 | 0,48 | 0,49 | 0,56 | 0,48 | 0,54 |
| Kwas pentadekanowy, C15:0 Pentadecanoic acid, C15:0 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,06 | 0,06 |
| Kwas palmitynowy, C16:0 Palmitic acid, C16:0 | 27,41 | 28,42 | 26,55 | 28,42 | 28,06 |
| Kwas oleopalmitynowy, C16:1, <i>n</i> -7 Oleopalmitic acid, C16:1, <i>n</i> -7 | 0,13 | 0,13 | 0,15 | 0,14 | 0,16 |
| Kwas margarynowy, C17:0 Margaric acid, C17:0 | 0,21 | 0,20 | 0,16 | 0,16 | 0,19 |
| Kwas stearynowy, C18:0 Stearic acid, C18:0 | 2,73 | 3,41 | 2,97 | 3,01 | 1,95 |
| Kwas oleinowy, C18:1, <i>n</i> -9 Oleic acid, C18:1, <i>n</i> -9 | 3,45 | 5,47 | 5,64 | 3,31 | 2,42 |

c.d. tab. 2

| | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Kwas linolowy, C18:2, <i>n</i> -6 Linoleic acid, C18:2, <i>n</i> -6 | 23,25 | 24,86 | 26,44 | 23,64 | 24,45 |
| Kwas arachidowy, C20:0 Arachidic acid, C20:0 | 1,20 | 1,06 | 0,94 | 0,91 | 0,86 |
| Kwas α -linolenowy, C18:3, <i>n</i> -3 α -linolenic acid, C18:3, <i>n</i> -3 | 37,70 | 33,38 | 34,11 | 37,29 | 38,78 |
| Kwas heneikozanowy, C21:0 Heneicosanoic acid, C21:0 | 0,15 | 0,13 | 0,11 | 0,14 | 0,11 |
| Kwas eikozadienowy, C20:2, <i>n</i> -6 Eicosadienoic acid, C20:2, <i>n</i> -6 | 0,08 | 0,07 | 0,07 | 0,06 | 0,05 |
| Kwas behenowy, C22:0 Behenic acid, C22:0 | 1,02 | 0,67 | 0,64 | 0,64 | 0,63 |
| Kwas arachidonowy, C20:4, <i>n</i> -6 Arachidonic acid, C20:4, <i>n</i> -6 | 0,31 | 0,29 | 0,23 | 0,29 | 0,36 |
| Kwas trikozanowy, C23:0 Tricosanoic acid, C23:0 | 0,11 | 0,10 | 0,07 | 0,06 | 0,06 |
| Kwas eikozapentaenowy, C20:5, <i>n</i> -3 Eicosapentaenoic acid, C20:5, <i>n</i> -3 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,04 |
| Kwas lignocerowy, C24:0 Lignoceric acid, C24:0 | 1,37 | 0,96 | 0,94 | 0,97 | 0,88 |

Na podstawie wyników obliczono zawartość SFA, UFA, MUFA, PUFA, sumę kwasów *n*-3 i *n*-6 (tab. 3). Zdecydowaną większość (64,7 ÷ 66,7 %) stanowiły kwasy jedno- i wielonienasycone. We wszystkich ekstraktach kwasy tłuszczowe *n*-3 dominowały nad *n*-6. Najwyższą wartością stosunku nienasyconych kwasów tłuszczowych do kwasów nasyconych cechował się ekstrakt 3., do którego otrzymania zastosowano najwyższe ciśnienie i krótki czas procesu ekstrakcji. Zawartość UFA kształtowała się na poziomie 64,7 ÷ 66,7 % wszystkich wyizolowanych kwasów tłuszczowych. Największą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych cechowały się ekstrakty 3. i 5. (tab. 3). Duża różnica zawartości UFA pomiędzy ekstraktem 4. i 5. (1,51 %) spowodowana była najprawdopodobniej wydłużonym czasem ekstrakcji podczas uzyskiwania próby 4. Można zatem przypuszczać, że wydłużony czas procesu wpływa na zwiększone wymywanie nasyconych kwasów tłuszczowych. Największą zawartość PUFA stwierdzono w ekstrakcie 5., a najmniejszą – w 2. Z kolei ekstrakt 3. cechował się największą zawartością sumy nienasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast w przypadku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych to ekstrakt 5. zawierał ich najwięcej (tab. 3).

Zastosowanie ekstrakcji płynami nadkrytycznymi i modulacja głównymi parametrami ekstrakcji: temperaturą (50 ÷ 60 °C), ciśnieniem (150 ÷ 250 barów) i czasem procesu (130 ÷ 290 min) pozwoliła na uzyskanie ekstraktów cechujących się różnym

Tabela 3. Wartości parametrów charakteryzujących profil kwasów tłuszczowych ekstraktów z suszu liści pokrzywy

Table 3. Values of parameters characterising fatty acid profile of extracts of dried nettle leaves

| Ekstrakt Extract | SFA [%] | MUFA [%] | PUFA [%] | Suma <i>n-6</i> Total <i>n-6</i> | Suma <i>n-3</i> Total <i>n-3</i> | <i>n-6/n-3</i> | UFA [%] | UFA/SFA |
|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|---------|---------|
| 1 | 35,070 | 3,580 | 61,350 | 23,640 | 37,710 | 0,627 | 64,930 | 1,851 |
| 2 | 34,517 | 5,479 | 60,004 | 27,277 | 32,727 | 0,833 | 65,483 | 1,897 |
| 3 | 33,343 | 5,791 | 60,866 | 26,743 | 34,123 | 0,784 | 66,657 | 1,999 |
| 4 | 35,257 | 3,451 | 61,292 | 23,995 | 37,297 | 0,643 | 64,743 | 1,836 |
| 5 | 33,747 | 2,580 | 63,674 | 24,858 | 38,816 | 0,640 | 66,253 | 1,963 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

SFA – kwasy tłuszczowe nasycone / saturated fatty acids; MUFA – kwasy tłuszczowe jednonienasycone / monounsaturated fatty acids; PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe / polyunsaturated fatty acids; UFA – kwasy tłuszczowe nienasycone / unsaturated fatty acids.

profilem kwasów tłuszczowych. Ekstrakt uzyskany w temp. 60 °C i przy ciśnieniu 250 barów cechował się największą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w stosunku do kwasów nasyconych (63,7 %), natomiast w przypadku ekstraktu uzyskanego w temp. 50 °C i przy ciśnieniu 150 barów zawartość PUFA kształtowała się na poziomie 60 %. Można zatem przypuszczać, że w celu wydajnego pozyskiwania z liści pokrzywy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych metodą ekstrakcji SFE-CO₂ z dodatkiem współrozpuszczalnika w postaci etanolu korzystne jest prowadzenie procesu w wyższej temperaturze (60 °C) i przy wyższym ciśnieniu (250 barów). Zbyt długi czas (290 min) prowadzenia procesu ekstrakcji próby 4. w porównaniu ze 130 min ekstrahowania próby 2. spowodował natomiast zmniejszenie stosunku UFA do SFA z 66,7 % do 64,7 %. Może to być spowodowane rozpadem i utlenianiem się nienasyconych kwasów tłuszczowych. Straty kwasu eikozapentaenowego (EPA) zaobserwowane w ekstraktach 2. i 4. prawdopodobnie były spowodowane przeprowadzeniem procesu przy zbyt niskim ciśnieniu 150 barów (ekstrakt 2) lub w zbyt długim czasie wmywania 290 min (ekstrakt 4).

Podsumowując, można powiedzieć, że proces ekstrakcji dwutlenkiem węgla w warunkach nadkrytycznych należy uznać za skuteczną metodę pozyskiwania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z liści pokrzywy zwyczajnej pod warunkiem zastosowania odpowiednich parametrów procesu.

Wnioski

1. Wzrost ciśnienia ze 150 do 250 barów i temperatury z 50 do 60 °C podczas procesu ekstrakcji liści pokrzywy przy udziale SFE-CO₂ z dodatkiem współrozpuszczalnika w postaci etanolu powoduje zwiększenie o 3,7 % wycięcia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w stosunku do kwasów nasyconych.

2. Wydłużenie procesu ze 130 do 290 min skutkuje obniżeniem o 2,4 % wartości stosunku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do nasyconych kwasów tłuszczowych w otrzymanych ekstraktach.
3. Ekstrakty z liści pokrzywy zwyczajnej o najwyższej jakości (bogate w kwasy tłuszczowe wielonienasycone) uzyskuje się podczas procesu ekstrakcji w temp. 50 °C, przy ciśnieniu 250 barów i w ciągu 130 min.

Literatura


- [1] De Carvalho C.C.C.R., Caramujo M.J.: The various roles of fatty acids. *Molecules*, 2018, 23 (10), #2583.
- [2] Durović S., Pawlić B., Sorgić S., Popov S., Savić S., Petronijević M., Radojković M., Cvetanović A., Zeković Z.: Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *J. Func. Food*, 2017, 32, 18-26.
- [3] Durović S., Zeković Z., Sorgić S., Popov S., Vujanović M., Radojković M.: Fatty acid profile of stinging nettle leaves: Application of modern analytical procedures for sample preparation and analysis. *Analytical Methods*, 2018, 9, 1080-1087.
- [4] Esposito S., Bianco A., Russo R., Di Maro A., Isernia C., Pedone P.V.: Therapeutic perspectives of molecules from *Urtica dioica* extracts for cancer treatment. *Molecules*, 2019, 24 (15), #2753.
- [5] Gugęła M., Zarzecka K., Sikorska A.: Prozdrowotne właściwości oleju rzepakowego. *Postępy Fito-terapii*, 2014, 2, 100-103.
- [6] Jakubczyk K., Janda K., Szkyrpan S., Gutowska I., Wolska J.: Pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.) – charakterystyka botaniczna, biochemiczna i właściwości prozdrowotne. *Pomeranian J. Life Sci.*, 2015, 61 (2), 191-198.
- [7] Janiszewska E., Witrowska-Rajchert D.: Ekstrakcja nadkrytyczna w przemyśle spożywczym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2005, 4 (45), 5-16.
- [8] Joshi B.C., Mukhija M., Kalia A.N.: Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *Int. J. Green Pharm.*, 2014, 8 (4), 201-209.
- [9] Kregiel D., Pawlikowska E., Antolak H.: *Urtica* ssp.: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules*, 2018, 23 (7), #1664.
- [10] Lauzon H., Morgeirsson B., Sveinsdóttir K., Gudjonsdóttir M., Karlsdóttir M., Marinsdóttir E.: Overview of fish quality research. Impact of fish handling, processing, storage and logistics on fish quality deterioration. *Skýrsla Mafis*, 2010, 39 (10), 1-73.
- [11] Ohlhorst S.D., Russel R., Bier D., Klurfeld D.M., Li Z., Mein J.R., Milner J., Ross A.C., Stover P., Konopka E.: Nutrition research to affect food and a healthy lifespan. *Advances in Nutrition*, 2013, 4, 579-584.
- [12] Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S., Bansal Y.K.: Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, 2015, 9, 293-304.
- [13] Pasquale M.: The essentials of essential fatty acids. *J. Diet. Suppl.*, 2009, 6 (2), 143-161.
- [14] Refajlovska V., Kavrakovski Z., Klopcevska J., Srbinska M.: Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. *Quality of Life*, 2013, 4 (1-2), 26-30.
- [15] Roche H.M.: Unsaturated fatty acids. *Proc. Nutr. Soc.*, 1999, 58, 397-401.
- [16] Rui H.L.: Dietary bioactive compounds and their health implications. *J. Food Sci.*, 2013, 78, 18-25.
- [17] Sapkale G.N., Patil S.M., Surwase U.S., Bhatbhave P.K.: Supercritical fluid extraction. *Int. J. Chem. Sci.*, 2010, 8 (2), 729-743.

- [18] Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K.M., Yoga Latha L.: Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *Afr. J. Trad. Compl. Altern. Med.*, 2011, 8 (1), 1-10.
- [19] Sharif K.M., Rahman M.M., Azmir J., Mohamed A., Jahurul M.H.A., Sahena F., Zaidul I.S.M.: Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *J. Food Eng.*, 2014, 124, 105-116.
- [20] Twinning C., Brenna J.T., Hairston N., Flecker A.S.: Highly unsaturated fatty acids in nature: What we know and what we need to learn. *Oikos*, 2016, 125, 749-760.
- [21] Wroniak M., Rękas A., Piekarniak I.: Wpływ rodzaju opakowania i warunków przechowywania na wybrane cechy jakości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2015, 2 (99), 62-78.

**DETERMINATION OF THE PROFILE OF FATTY ACIDS IN EXTRACTS OBTAINED BY
SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION FROM STINGING NETTLE LEAVES
(*URTICA DIOICA* L.)**

S u m m a r y

Ecological plant extracts, that are rich in biologically active substances, are a valuable raw material for the food industry, thus new sources thereof are constantly searched for. Special attention is paid to common plants that are resistant to difficult weather conditions, easily available and inexpensive to grow. This type of plants includes stinging nettle (*Urtica dioica* L.). The objective of the research study was to determine the profile of fatty acids contained in stinging nettle leaves, in extracts obtained by an extraction method using supercritical carbon dioxide with the addition of ethanol. There were obtained 5 extracts that differed in the method of obtaining them and in the process parameters – time, pressure and temperature. A GC-MS method was applied to determine the fatty acid profile. To identify the compounds, mass spectra were compared with the NIST 11 library as were retention times with a certified reference material. In all the extracts the content of unsaturated fatty acids was higher than that of saturated fatty acids. The research study showed that the increase in temperature and pressure resulted in washing out a greater amount of desirable unsaturated fatty acids. The highest content of unsaturated fatty acids was reported in the extract obtained at a temperature of 50 °C and a pressure of 250 bars. In the extracts obtained using a low pressure and an extended extraction time was not identified eicosapentaenoic acid, which was present in the remaining samples.

Key words: stinging nettle, supercritical carbon dioxide extraction, gas chromatography, profile of fatty acids 

EGLI C. GEORGIADOU, GEORGE A. MANGANARIS,
VASILEIOS FOTOPOULOS

THE DIVERSE ROLES OF VITAMIN E, ITS OCCURRENCE AND REGULATION IN DIFFERENT PLANT TISSUES

S u m m a r y

Fruits and vegetables contain vitamins, dietary fibre and phytochemicals, which promote human health. Specifically vitamins are major bioactive compounds, divided in water-soluble (vitamins B and C) and fat-soluble (vitamins A, D, E and K) ones, having strong antioxidant potential and limiting several diseases, including cancer and cardio-vascular diseases. Furthermore, vitamins play a key role in plant protection against abiotic and biotic stress factors. Vitamin E is a group of eight fat-soluble compounds known as tocopherols, which are synthesized exclusively by photosynthetic organisms. Tocopherols are categorised into two groups – tocopherols and tocotrienols. Each group contains four forms identified by prefixes α -, β -, γ - and δ -, yielding a total of eight forms. Vitamin E is an essential, lipid-soluble antioxidant in the human diet, protecting from cancer, diabetes, cardiovascular and neurological diseases. This review summarizes the recent developments in understanding the variety of roles of vitamin E as well as its major genetic regulatory pathways in plants. In addition, a comprehensive mapping of vitamin E occurrence is presented in different plant tissues, organelles and horticultural crop species, as well as throughout different stages of fruit development and at postharvest.

Key words: tocopherols, tocotrienols, tocopherols, vitamin E

Introduction

Vitamins are a small group of organic compounds that are essential in the human diet. Humans are not able to synthesize these compounds so they must be obtained through diet. There are 13 compounds classified as vitamins. They can be broadly classified into fat-soluble (A, D, E and K) and water-soluble (vitamin B complex: B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12 and vitamin C) – Fig. 1. These compounds are biosynthesized by bacteria, fungi and plants and their main function is acting as cofactors or coen-

*E. C. Georgiadou, G. A. Manganaris, V. Fotopoulos, Department of Agricultural Sciences, Biotechnology and Food Science, Cyprus University of Technology, 3603, Limassol, Cyprus.
Contact: vassilis.fotopoulos@cut.ac.cy*

zymes in various enzymatic reactions. Vitamins from plants (fruit and vegetables) are very significant because of their impact on human health. Due to their redox chemistry and role as enzymatic factors, vitamins are imperative for the metabolism of animals and plants. Some compounds play other particular roles such as antioxidants (vitamins C and E), substances that improve the functioning of the eyesight (β -carotene) or as a (pre-) hormone involved in calcium and phosphorus homeostasis in the blood stream (vitamin D). Therefore, human nutritional health is dependent on plant food either directly or indirectly (by eating animals that feed on plants). As vitamin compounds do not provide energy, they are needed in small amounts by humans. Vitamin deficiencies cause diseases that can be serious [17].

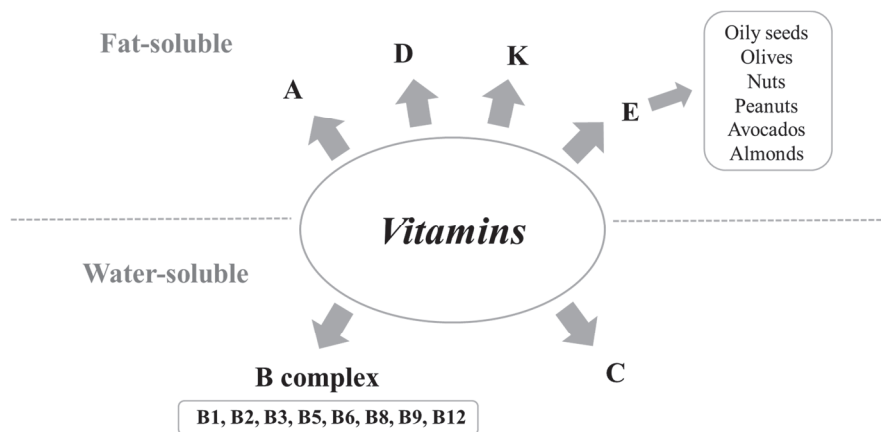


Fig. 1. Fat and water soluble vitamins

Rys. 1. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach i wodzie

Source / Źródło: the author's own study based on [17] / opracowanie własne na podstawie [17]

Vitamin E (tocochromanols) are considered to be lipophilic bioactive compounds. It has been claimed that vitamin E protects against diabetes and neurological diseases [2] and reduces the risk for Alzheimer's disease [51]. Furthermore, vitamin E is a natural antioxidant [9] fighting against oxidative damage because it quenches polyunsaturated free radicals and as a result breaks the chain reaction of lipid peroxidation. It also maintains the cardiovascular system and protects against cancer and other illnesses [35].

Humans cannot synthesize vitamin E, so sufficient quantity must be obtained through the diet that is mainly from plants that produce oil. The levels of vitamin E differ from plant to plant in composition, activity and quantity. Deficiency in vitamin E can cause hemolytic anemia in premature babies and neurological and ophthalmological disorders in children. In developing countries vitamin E deficiency is more com-

mon than in developed ones, which is only observed in specific conditions as premature babies, digestive pathology and genetic pathology [12].

The regulation of vitamin metabolism in plants has been extensively studied in order to develop new cultivars with high nutritional content. Using new technological approaches, attempts are being made to identify vitamin-rich alleles in order to introduce these to elite cultivars.

The aim of this paper is to present the various roles of vitamin E in plants as well as the importance of exploiting vitamin E metabolism in plants.

The diverse roles of vitamin E in fruits and vegetables

Vitamin E (tocochromanols) is a lipophilic antioxidant consisting of tocopherols and tocotrienols, which are compounds synthesized by photosynthetic organisms. Tocochromanols are essential for the dietary needs of humans [40]. There are eight distinct forms of vitamin E classified in two chemical groups (α -, β -, γ -, δ -tocopherols and α -, β -, γ -, δ -tocotrienols, respectively). These differ considerably in their vitamin E activity *in vivo*, the highest activity being shown by α -tocopherol on a molar basis and the most abundant one in nature [17]. Tocopherols and tocotrienols are considered to improve health and are found in fruit and vegetables [17], specifically in oily seeds, olives, nuts, peanuts, avocados and almonds [26, 30].

Vitamin E is a group of compounds with a common chroman-6-ol ring system. The four different tocopherols and tocotrienols found in nature, namely α , β , γ , or δ (Fig. 2) are determined by the number and positions of methyl groups on this ring system [11]. All the isomers have aromatic rings with hydroxyl group that can provide hydrogen atoms to decrease ROS [26]. Tocopherols have three chiral centers and the natural tocopherols are of the R, R, R configuration, while the chemically synthesized ones are racemic mixtures of eight stereoisomers. The single chiral center in tocotrienols is the only d-isomer in nature and a racemic mixture in synthetic ones. The retention of each compound by the human body is strongly impacted by the number and positions of ring methylation, degree of side chain saturation and stereochemistry [11].

Studies of Munné-Bosch [33] have shown that tocopherols take part in cellular signaling in plants, which demonstrates the role of tocopherols in plant development and stress tolerance. Tocopherols protect plants from losing excessive energy in photosynthetic membranes, detoxify reactive oxygen species (ROS) and lipid radicals, thus protect plants from wasting excessive energy in chloroplasts. In addition, α -tocopherol interacts strongly in plants with membrane lipids making the membrane more rigid. Therefore, its presence at high amounts in photosynthetic membranes during specific periods of plant development or stress could be significant in the functioning of the plant regarding membrane stability.

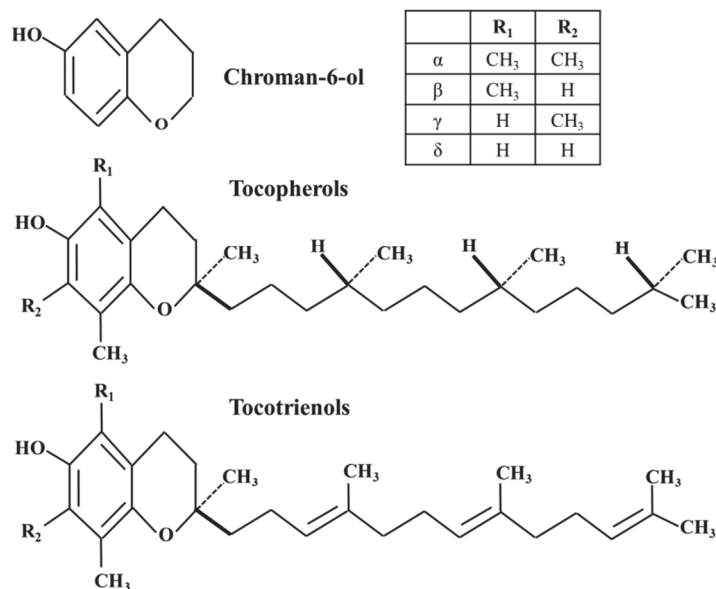


Fig. 2. Structure of tocopherols and tocotrienols

Rys. 2. Struktura tokoferoli i tokotrienoli

Source / Źródło: the study based on [11] / opracowanie na podstawie [11]

Occurrence and natural variation in vitamin E in plant tissues

Vitamin E within plant tissues/cellular compartments

There is a considerable variation of the content and composition of vitamin E in plant tissues. Low levels of vitamin E are found in photosynthetic tissues ($< 50 \mu\text{g/g}$) compared with seeds and particularly oil seeds, which contain 10 - 20 times this level. Fruits and seeds of some species such as oil palm (*Elaeis guineensis*), oils of which have well known health properties, contain high levels of tocotrienols [13]. Tocopherols have been found in photosynthetic bacteria, fungi, algae, plants and animals, even though animals cannot synthesize them [23]. Tocopherols have also been traced in seeds, flowers (e.g., sepals and petals), roots, tubers, cotyledons, hypocotyls, stems and particularly in leaves of higher plants. Tocopherol content varies in plant tissues with total concentrations ranging from exceptionally low levels in potato tuber ($< 1 \mu\text{g/g}$ dry matter) to very high levels in leaves and seeds ($> 1\text{mg/g}$ dry matter) [32].

During oxidative stress and senescence, plastoglobuli increase in number and create linkage groups that are attached to each other and remain continuous with the thylakoid membrane by extensions of the half-lipid bilayer [4].

Even though tocopherols are not usually detected in the cuticular waxes, tocopherols have been found in the wax of *Rubus* spp. at $1 \div 2 \%$ of total wax. The γ - and δ -

forms are found at higher concentrations in this wax, while α -tocopherol has been detected at very low amounts [44]. In turn, tocotrienols are found in high amounts in seeds [23].

Vitamin E in different fruits and vegetables

Oily seeds, olives, nuts, peanuts, avocados and almonds are abundant in vitamin E, specifically in α -tocopherol [26]. Muzzalupo et al. [34] found that the content of α -tocopherol in olive fruit accounts for $67.62 \div 88.60$ % of total tocopherol content, depending on their cultivar and developmental stage. In other studies, content of α -tocopherol in total tocopherols in cv. 'Koroneiki' was $85.64 \div 97.87$ % [20, 21], in cv. 'Carolea' (in two developmental stages, green and black olive fruit) – $72.00 \div 75.60$ % [8], while in five Greek olive cultivars ('Mavrelia', 'Koroneiki', 'Kalokerida', 'Lianolia Kerkiras' and 'Kalamon') – $73.09 \div 91.32$ % [22]. The difference in comparison with findings by Bodoira et al. [7] is that γ -tocopherol concentrations ($10.68 \div 41.83$ %) are only slightly lower than those of α -tocopherol ($50.02 \div 81.48$ %) at the early stages of olive fruit (cv. 'Arauco'). In tomato fruit Quadrana et al. [36] found that α -tocopherol accounts for $83.68 \div 96.87$ % of all other tocopherols, while Luby et al. [29] traced $29.64 \div 91.02$ % of all other tocopherols in carrot cultivars. Furthermore, Tlili et al. [48] found that α -tocopherol was the predominant compound in all samples ($62.05 \div 75.36$ %) of α - and γ -tocopherol content in commercial capers. The content of tocopherols and tocotrienols in different cultivars of fruit and vegetables is presented in Tab. 1.

Vitamin E during development and ripening

Several studies have focused on the content of vitamin E as it changes during the ripening of olive fruit during several developmental stages within a year [7, 8, 20, 34] and across multiple years [21]. The concentrations of α -tocopherol generally decreased, both within and across years [21]. During the early stages of olive fruit (cv. 'Arauco') high amounts of tocopherol content have been found, but as the fruit developed on the tree, there was a decrease [7]. Until reaching breaker stage, the olive fruit has a much higher concentration of tocopherols compared with later stages, suggesting that the colour alteration of the fruit is linked with modifications in vitamin E content [20]. It was also found that olive oil production and phenolic fraction increase, reaching their highest levels when the mesocarp reaches the end of its development and change colour [3, 7, 10, 38]. Furthermore, carbohydrate metabolism (glycolysis/glyconeogenesis, citrate cycle, fructose, manose and galactose metabolism) is more obvious during the mesocarp development. Interestingly, it was also revealed that during development in grape, which is also a non-climacteric fruit such as olive, tocopherol concentration dropped steadily [25]. The opposite is observed in climacteric fruit

like mango [45] and tomato [36], which implies that ethylene regulates vitamin E biosynthesis.

Table 1. Vitamin E sources

Tabela 1. Źródła witaminy E

| Cultivars of fruits and vegetables Odmiany owoców i warzyw | Tocopherols / Tokoferole [%] | | | | Tocotrienols Tokotrienole [%] | | | | Ref. Lit. |
|---|------------------------------------|------------------------------|----------|----------|----------------------------------|---------|----------|----------|--------------|
| | α | β | γ | δ | α | β | γ | δ | |
| | Range of values Zakres wartości | Mean value / Wartość średnia | | | | | | | |
| 'Arauco' olives Oliwki 'Arauco' | 50.02 ÷ 81.48 | 8.92 | 20.54 | - | - | - | - | - | [7] |
| 'Carolea' olives Oliwki 'Carolea' | 72.00 ÷ 75.60 | 12.20 | 10.10 | 3.75 | - | - | - | - | [8] |
| 'Koroneiki' olives Oliwki 'Koroneiki' | 95.64 ÷ 97.87 | 0.71 | 0.84 | 0.80 | - | - | 0.94 | - | [20] |
| 'Koroneiki' olives Oliwki 'Koroneiki' | 85.64 ÷ 97.50 | 2.55* | | 2.16 | 0.70 | 2.44** | | - | [21] |
| Greek olives / Oliwki greckie | 73.09 ÷ 91.32 | 4.57* | | 4.06 | 1.27 | 4.59** | | 1.47 | [22] |
| Carrots / Marchew | 29.64 ÷ 91.02 | 1.59* | | - | 19.80 | 0.72** | | - | [29] |
| Olives / Oliwki | 67.62 ÷ 88.60 | 4.87 | 2.24 | 15.48 | - | - | - | - | [34] |
| M28 Tomatoes Pomidory M28 | 83.68 ÷ 96.87 | 1.40 | 7.19 | 0.46 | - | - | - | - | [36] |
| Capers / Kapary | 62.05 ÷ 75.36 | - | 33.15 | - | - | - | - | - | [48] |

Explanatory notes / objaśnienia:

* – values for $\beta+\gamma$ -tocopherols / wartości dla $\beta+\gamma$ -tokoferoli; ** – values for $\beta+\gamma$ -tocotrienols / wartości dla $\beta+\gamma$ - tokotrienoli.

Vitamin E at postharvest

Vitamin E is affected by processing, storage and cooking of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Little research has taken place on the content of vitamin E in canned fruit and vegetables as they are not a significant source of the vitamin except for sweet potatoes, spinach and tomato products. Tomatoes have been analysed the most, with evidence showing that the levels of vitamin E are high in processed tomato products [41]. Abushita et al. [1] showed that tomato cultivars for processing had increased α -tocopherol (166 % higher wet matter on average) compared with tomatoes consumed fresh. Processed tomato cultivars to paste showed loss of 20.3 % of α -tocopherol. A rise in α -tocopherol was observed when raw material was initially heated, but degradation was observed when heating continued. Heating leads to α -tocopherol release, however once the maximum amount is released from the cells, α -tocopherol concentration declines due to thermal degradation [1]. In a model reaction

α -tocopherol was very stable against thermal treatment. There were no dramatic differences in α -tocopherol content in tomato juice, sunflower oil and a mixture of both when heated at 180 °C for 1 h [43]. Further research is needed to explain the structure of α -tocopherol in tomatoes and the effects of processing [1]. United States Department of Agriculture (USDA) data currently support the result that canned products generally contain significant levels of vitamin E if they are compared with fresh and frozen counterparts. Asparagus is the only vegetable researched that showed significantly lower amounts of vitamin E in the canned form compared with the fresh product.

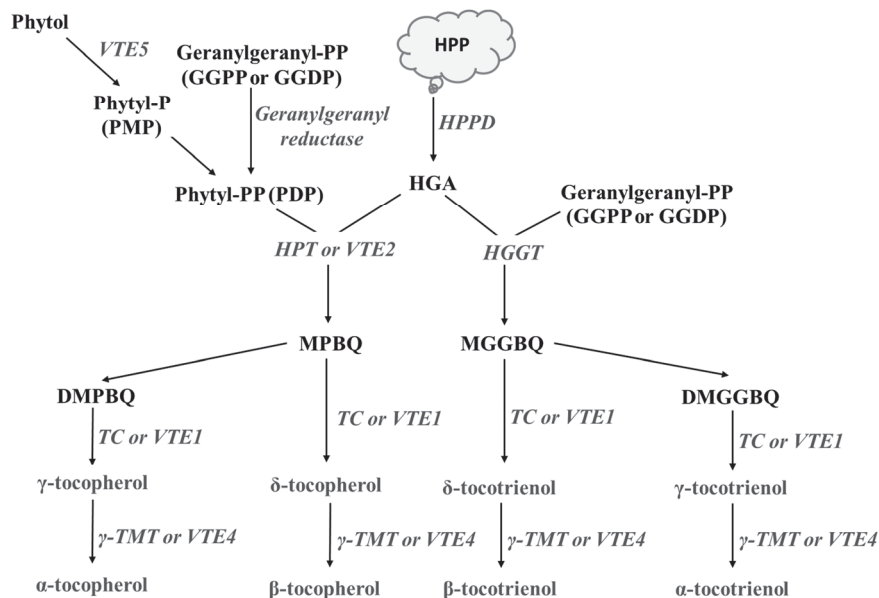
The analysis of cooking broccoli showed that all cooking methods lead to a significant release of α -tocopherol in fresh broccoli, while there was no relevant change in frozen broccoli [39]. However, this was not the case in foods subjected to strongly oxidative conditions (roasted steak, peas stewed in metal pot) [46]. It is possible that the most common heat treatments, such as broiling or roasting, cause a high loss of vitamin E. Vitamin E content in food treated in vegetable oil increases or remains stable, because vegetable oils are a good source of vitamin E [28]. On the other hand, frequently used vegetable oils for frying decrease the content of vitamin E. Probably microwave heating influences vitamin E content in vegetable oils the most, although the stage of degradation depends on the type of oil used. In addition, vitamin E is unstable in the presence of oxygen, light and peroxides (occurring as a result of unsaturated fat auto-oxidation). Retention of vitamin E is in the range of 60 ÷ 93% in legumes [28].

Genetic regulation of vitamin E

Genetic and genomic tools in the model plant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh have contributed towards the identification of vitamin E biosynthetic genes [53], as well as other plants such as *Nicotiana tabacum* L. and *Lactuca sativa* L. [52]. In recent studies, there have been identified vitamin E biosynthetic genes in a number of fruit crop species such as tomato [36], apple [42], mango [45], palm fruit [49], as well as olive [20, 21, 22].

Vitamin E originates from 4-hydroxyphenylpyruvic acid (HPP), homogentisic acid (HGA), geranylgeranyl diphosphate, phytol and phytyl phosphate (phytyl-P), which is derived from either the shikimate acid pathway, the methylerythritol phosphate pathway (MEP) or chlorophyll degradation, respectively. Phytyl diphosphate (phytyl-PP) is generated either from geranylgeranyl diphosphate (GGPP) being reduced by geranylgeranyl reductase or by phytol after phosphorylation by *phytyl kinase* (*VTE5*). HPP becomes HGA by *4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase* (*HPPD*), a precursor used for tocochromanols. HGA is decarboxylated and then condensated with the use of a phytyl diphosphate (Phytyl-PP) into 2-methyl-6-phytylbenzoquinol (MPBQ) by *homogentisate phytyl transferase* (*VTE2*). The MPBQ is catalyzed into 2,3-dimethyl-6-

phytyl-1,4-benzoquinol (DMPBQ) by *2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol methyl transferase* (*VTE3*) and then to γ -tocopherol by *tocopherol cyclase* (*TC* or *VTE1*) or to δ -tocopherol directly by *TC*. With the use of *γ -tocopherol methyltransferase* (*γ -TMT* or *VTE4*), γ - and δ -tocopherols are metabolized into α - and β -tocopherols. HGA can also be metabolized into 2-methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol (MGGBQ) by *homogentisate geranylgeranyl transferase* (*HGGT*) and then is catalyzed to δ -tocotrienol by *tocopherol cyclase* (*VTE1*) and afterwards to β -tocotrienol by *γ -tocopherol methyltransferase* (*VTE4*). The change of MGGBQ into 2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol (DMGGBQ) in addition to the reactions catalyzed by *VTE1* and *VTE4* is required by the biosynthesis of γ -tocotrienol and subsequently α -tocotrienol (Fig. 3).



Explanatory notes / Objasnienia:

Enzymes/genes: *HPPD* – *p*- or *4*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; *HPT* or *VTE2* – *homogentisate phytyltransferase* or vitamin E2; *geranylgeranyl reductase*; *VTE5* – *phytyl kinase* or vitamin E5; *phytyl phosphate kinase*; *HGGT* – *homogentisate geranylgeranyl transferase*; *MPBQ MT* or *VTE3* – *2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol methyl transferase* or vitamin E3; *TC* or *VTE1* – *tocopherol cyclase* or vitamin E1; *γ -TMT* or *VTE4* – *γ -tocopherol methyl transferase* or vitamin E4. Metabolites: phytol; phytyl-P or PMP – phytyl phosphate; phytyl-PP or PDP – phytyl diphosphate; GGPP or GGDP – geranylgeranyl pyrophosphate or geranylgeranyl diphosphate; HPP – *p*- or *4*-hydroxyphenylpyruvic acid; HGA – homogentisic acid; MPBQ – 2-methyl-6-phytylbenzoquinol; DMPBQ – 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol; MGGBQ – 2-methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol; DMGGBQ – 2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol; α -, β -, γ -, δ -tocopherols; α -, β -, γ -, δ -tocotrienols.

Fig. 3. Tocochromanol biosynthetic pathway

Rys. 3. Szlak biosyntezy tokochochromanolu

Source / Źródło: the study based on [20, 22] / opracowanie na podstawie [20, 22]

There is relatively little available research on the regulation of tocochromanol biosynthesis in fruits. Geranylgeranyl diphosphate (GGDP) is a popular precursor for tocochromanols and carotenoids. In detail, if the carotenoid biosynthetic pathways in the fruit are altered, then most possibly tocochromanol levels in this organ will also alter. This was observed in tomato fruit that was overexpressing a fruit phytoene synthase and accumulated more α -tocopherol [18]. However, the mechanisms, that caused the increased levels of vitamin E content in the fruit, are not apparent. A cause could be the light regulation of tocopherols in the fruit through the transcriptional activation of tocopherol biosynthetic genes (*geranylgeranyl reductase* and γ -*TMT*), which is found in the *DE-ETIOLATED1* (*DET-1*) defective tomato transgenics, which accumulate 2- to 10-fold more tocopherol [15]. Nonetheless, the *DET-1* mutation affects carotenoid biosynthesis, plastid biogenesis and other secondary metabolites. Therefore, it is possible that tocopherol content is altered due to fruit metabolism or an effect on plastid compartment size.

Near the breaker stage, when tocochromanol concentration is highest, a close correlation is observed with *VTE5* expression profile. *VTE5* transcript levels were up-regulated during the period of mesocarp development but were suppressed at the breaker stage and through the period of ripening in olive fruit [20]. Similar results were observed in tomato fruit [36]. This drop restricts the phytol diphosphate (phytyl-PP, PDP) input supply toward VTE biosynthesis [36] and is associated with the low concentrations of tocochromanols in olive fruit during ripening, showing that *VTE5* is a key component in the biosynthesis of vitamin E in olive fruit and is considered as a potential marker gene in relevant studies. In mango tocopherol concentration is correlated with transcript levels for *HPPD*, which is a catalyst in chromanol head group synthesis. Moreover, the *Mangifera indica p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase* (*MiHPPD*) expression is ethylene-inducible. Singh et al. [45] have found that the accumulation of vitamin in climacteric fruits during fruit ripening is developmentally controlled and submitted to hormonal regulation by ethylene. Georgiadou et al. [22] found that two Greek cultivars ('Kalokairida' and 'Lianolia Kerkyras') presented the highest vitamin E content, while cv. 'Lianolia Kerkyras' showed high tocochromanol content (especially α -tocopherol) and the highest overall antioxidant activity in all developmental stages, concomitant with an up-regulation expression profile of *HPPD*.

There are two methods used to increase the content of vitamin E in crops, namely plant breeding and metabolic engineering strategies [17, 47]. Levels of vitamin E can differ significantly both between plant species and within species (i.e., among cultivars), meaning that traits the nutritional value can be enhanced by exploiting micronutrient enrichment [50]. The combination of comprehensive molecular mapping and high-throughput phenotyping methods contribute towards the exploitation of this variability, to use as an efficient selection process [47]. Vitamin levels could be enhanced

by altering external stimuli (light exposure, temperature) via agronomic practices [31]. Another method to increase the contents and stability of vitamins in vegetables are treatments with plant growth regulators and/or elicitors. For instance, ethylene activates phydroxyphenylpyruvate dioxygenase during the ripening of climacteric fruits and consequently increases vitamin E levels [45]. Contrarily, the use of organic fertilizers does not appear to have a significant impact on tocopherol levels [6]. However, vitamin levels in plants were increased by chemical synthesis or fermentation, such as postharvest supplementation [14]. The nutritional quality of products at low cost can be further improved by the application of moderate stresses through agronomic practices (without effects on production).

The modification of genes involved in biosynthesis, recycling, transport, stability, catabolism or control of vitamin E amounts in plants is the basis of relevant metabolic engineering approaches [17]. In *Arabidopsis*, canola and soybean metabolic engineering of vitamin E has been achieved by expressing both *Synechocystis* bifunctional *prephenate dehydrogenase* (*tyrA*) and plant *HPPD* genes, resulting in an increase of 1.8 - 2.6 times in tocochromanol amounts in seeds [27]. Likewise, the yeast expression (*Saccharomyces cerevisiae*) *prephenate dehydrogenase* gene (*PDH*) in tobacco overexpressing the *Arabidopsis HPPD* gene resulted in large concentrations of tocotrienols in the leaves [37]. Similarly the yeast *PDH* and *Arabidopsis HPPD* genes, expressed in tomatoes under the control of *Solanum lycopersicum phosphoenolpyruvate carboxylase 2* (*SIPPC2*) fruit-specific promoter [16, 24], produce 3 times more tocotrienol concentration in tomatoes [5]. Furthermore, *homogentisate phytyl transferase* (*HPT*) overexpression isolated from apple fruit resulted in 1.8 ÷ 3.6 fold and 1.6 ÷ 2.9 fold rise in tomato leaf of α -tocopherol and γ -tocopherol, respectively, in contrast with the amount of α -tocopherol and γ -tocopherol in the fruit, which increased 1.7- and 3.1-fold, respectively [42].

An optimal approach to enhance the concentration of vitamin E in plants is the manipulation of *VTE4* transcript amounts, as it alters both δ - and γ -tocopherol to β - and α -tocopherol, respectively. *VTE4* overexpression and naturally amplified α -tocopherol accessions present the highest vitamin E increases independently of the host or the origins of the transgene. When altering pre-existing tocopherols into forms with a strong biological potency, vitamin E activity is improved. Thus, crops modified by *VTE4*-overexpression demonstrate 5 - 10 times more vitamin E activity than plants that have not been modified. Similarly, *Brassica napus VTE4* homolog showed a 50-fold increase in α -tocopherol content in transgenic *Arabidopsis* seeds [19]. *VTE4* overexpression also metabolises δ -tocopherol in crops into β -tocopherol, which is 16.6-times more bioactive at 50 % of the vitamin E activity of α -tocopherol. This method is the most effective in enriching vitamin E content in crops and has no negative impact in growth and fertility [30]. Overall, the role and regulation of tocochromanols is charac-

terized by great complexity and further research needs to be conducted using state-of-the-art systems biology and gene editing approaches in order to fully elucidate their metabolism and function.

Conclusions

This review brings to light the recent advancements in explaining the different roles of vitamin E in fruit and vegetables and its importance for health as the human body does not synthesize this vitamin. It also provides an up-to-date account on studies analysing the content and consistency of vitamin E in different plants and in different tissues during *in planta* developments as well as post-harvest. Closing, vitamin E major genetic regulatory pathways and future research directions are discussed.

Literatura

- [1] Abushita A.A., Daood H.G., Biacs P.A.: Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *J. Agr. Food Chem.*, 2000, 48(6), 2075-2081.
- [2] Aggarwal B.B., Sundaram C., Prasad S., Kannappan R.: Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochem. Pharmacol.*, 2010, 80(11), 1613-1631.
- [3] Alagna F., D'Agostino N., Torchia L., Servili M., Rao R., Pietrella M., Giuliano G., Chiusano M.L., Baldoni L., Perrotta G.: Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. *BMC Genomics*, 2009, 10(1), #399.
- [4] Austin J.R., Frost E., Vidi P.A., Kessler F., Staehelin L.A.: Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell*, 2006, 18(7), 1693-1703.
- [5] Baldet P., Ferrand C., Rothan C.: Vitamins in fleshy fruits. In: *Fruit Ripening: Physiology, Signaling and Genomics*. Eds. P. Nath, M. Bouzayen, A.K. Mattoo, J.C. Pech. CABI Publishing, Wallingford, UK, 2014, pp. 127-150.
- [6] Bito T., Ohishi N., Hatanaka Y., Takenaka S., Nishihara E., Yabuta Y., Watanabe F.: Production and characterization of cyanocobalamin-enriched lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown using hydroponics. *J. Agr. Food Chem.*, 2013, 61(16), 3852-3858.
- [7] Bodoira R., Torres M., Pierantozzi P., Taticchi A., Servili M., Maestri D.: Oil biogenesis and antioxidant compounds from "Arauco" olive (*Olea europaea* L.) cultivar during fruit development and ripening. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 2015, 117(3), 377-388.
- [8] Bruno L., Chiappetta A., Muzzalupo I., Gagliardi C., Iaria D., Bruno A., Greco M., Giannino D., Perri E., Bitonti M.B.: Role of geranylgeranyl reductase gene in organ development and stress response in olive (*Olea europaea*) plants. *Func. Plant Biol.*, 2009, 36(4), 370-381.
- [9] Colombo M.L.: An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules*, 2010, 15(4), 2103-2113.
- [10] Conde C., Delrot S., Gerós H.: Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J. Plant Physiol.*, 2008, 165(15), 1545-1562.
- [11] Dellapenna D., Mène-Saffrané L.: Vitamin E. *Adv. Botanical Res.*, 2011, 59, 179-227.
- [12] Dror D.K., Allen L.H.: Vitamin E deficiency in developing countries. *Food Nutr. Bull.*, 2011, 32(2), 124-143.

- [13] Ebong P.E., Owu D.U., Isong E.U.: Influence of palm oil (*Elaeis guineensis*) on health. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 1999, 53(3), 209-222.
- [14] Eggersdorfer M., Laudert D., Létinois U., McClymont T., Medlock J., Netscher T., Bonrath W.: One hundred years of vitamins - a success story of the natural sciences. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51(52), 12960-12990.
- [15] Enfissi E.M., Barneche F., Ahmed I., Lichtlé C., Gerrish C., McQuinn R.P., Giovannoni J.J., Lopez-Juez E., Bowler C., Bramley P.M., Fraser P.D.: Integrative transcript and metabolite analysis of nutritionally enhanced *DE-ETIOLATED1* downregulated tomato fruit. *The Plant Cell*, 2010, 22(4), 1190-1215.
- [16] Fernandez A.I., Viron N., Alhaghdow M., Karimi M., Jones M., Amsellem Z., Sicard A., Czerednik A., Angenent G., Grierson D., May S., Seymour G., Eshed Y., Lemaire-Chamley M., Rothan C., Hilson P.: Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol.*, 2009, 151(4), 1729-1740.
- [17] Fitzpatrick T.B., Basset G.J.C., Borel P., Carrari F., DellaPenna D., Fraser P.D., Hellmann H., Osorio S., Rothan C., Valpuesta V., Caris-Veyrat C., Fernie A.R.: Vitamin deficiencies in humans: Can plant science help. *Plant Cell Online*, 2012, 24 (2), 395-414.
- [18] Fraser P.D., Enfissi E.M., Halket J.M., Truesdale M.R., Yu D., Gerrish C., Bramley P.M.: Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: Effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *The Plant Cell*, 2007, 19(10), 3194-3211.
- [19] Fritsche S., Wang X., Jung C.: Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: An overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops. *Antioxidants*, 2017, 6 (4), #99.
- [20] Georgiadou E.C., Ntourou T., Goulas V., Manganaris G.A., Kalaitzis P., Fotopoulos V.: Temporal analysis reveals a key role for *VTE5* in vitamin E biosynthesis in olive fruit during on-tree development. *Front. Plant Sci.*, 2015, 6, #871.
- [21] Georgiadou E.C., Goulas V., Ntourou T., Manganaris G.A., Kalaitzis P., Fotopoulos V.: Regulation of on-tree vitamin E biosynthesis in olive fruit during successive growing years: The impact of fruit development and environmental cues. *Front. Plant Sci.*, 2016, 7, #1656.
- [22] Georgiadou E.C., Koubouris G., Goulas V., Sergeantani C., Nikoloudakis N., Manganaris G.A., Kalaitzis P., Fotopoulos V.: Genotype-dependent regulation of vitamin E biosynthesis in olive fruits as revealed through metabolic and transcriptional profiles. *Plant Biol.*, 2019, 21, 604-614.
- [23] Grusak M.A., DellaPenna D.: Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999, 50(1), 133-161.
- [24] Guillet C., Aboul-Soud M.A., Le Menn A., Viron N., Pribat A., Germain V., Just D., Baldet P., Rousselle P., Lemaire-Chamley M., Rothan C.: Regulation of the fruit-specific PEP carboxylase *Slppe2* promoter at early stages of tomato fruit development. *Plos One*, 2012, 7(5), #36795.
- [25] Horvath G., Wessjohann L., Bigirimana J., Monica H., Jansen M., Guisez Y., Caubergs R., Horemans N.: Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Albert Lavallée). *Plant Physiol. Biochem.*, 2006, 44(11), 724-731.
- [26] Kanellis A.K., Manganaris G.A.: Antioxidants and bioactive compounds in fruits. In: *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics*. Eds. P. Nath, M. Bouzayen, A.K. Mattoo, J.C. Pech. CABI Publishing, Wallingford, UK, 2014, pp. 99-126.
- [27] Karunanandaa B., Qi Q., Hao M., Baszis S.R., Jensen P.K., Wong Y.H.H., Jiang J., Venkatramesh M., Gruys K.J., Moshiri F., Post-Beittenmiller D., Weiss J.D., Valentin H.E.: Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(5), 384-400.
- [28] Lešková E., Kubíková J., Kováčiková E., Košická M., Porubská J., Holčíková K.: Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *J. Food Compos. Anal.*, 2006, 19(4), 252-276.

- [29] Luby C.H., Maeda H.A., Goldman I.L.: Genetic and phenological variation of tocopherol (vitamin E) content in wild (*Daucus carota* L. var. *carota*) and domesticated carrot (*D. carota* L. var. *sativa*). Hort. Res., 2014, 1, #14015.
- [30] Mène-Saffrané L., Pellaud S.: Current strategies for vitamin E biofortification of crops. Curr. Opin. Biotech., 2017, 44, 189-197.
- [31] Miller D.D., Welch R.M.: Food system strategies for preventing micronutrient malnutrition. Food Policy, 2013, 42, 115-128.
- [32] Munné-Bosch S., Alegre L.: The function of tocopherols and tocotrienols in plants. Crit. Rev. Plant Sci., 2002, 21(1), 31-57.
- [33] Munné-Bosch S.: α -tocopherol: A multifaceted molecule in plants. Vitam. Horm., 2007, 76, 375-392.
- [34] Muzzalupo I., Stefanizzi F., Perri E., Chiappetta A.A.: Transcript levels of *CHL P* gene, antioxidants and chlorophylls contents in olive (*Olea europaea* L.) pericarps: A comparative study on eleven olive cultivars harvested in two ripening stages. Plant Foods Hum. Nutr., 2011, 66(1), 1-10.
- [35] Nesaretnam K.: Multitargeted therapy of cancer by tocotrienols. Cancer Letters, 2008, 269(2), 388-395.
- [36] Quadrana L., Almeida J., Otaiza S.N., Duffy T., da Silva J.V.C., de Godoy F., Asís R., Bermúdez L., Fernie A.R., Carrari F., Rossi M.: Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. Plant Molec. Biol., 2013, 81(3), 309-325.
- [37] Rippert P., Scimemi C., Dubald M., Matringe M.: Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. Plant Physiol., 2004, 134(1), 92-100.
- [38] Sakouhi F., Herchi W., Sebei K., Absalon C., Kallel H., Boukhchina S.: Accumulation of total lipids, fatty acids and triacylglycerols in developing fruits of *Olea europaea* L. Sci. Hortic., 2011, 132, 7-11.
- [39] Schlich E., Boeker M., Dietrich J., Loh S., Ziems M.: Cooking parameters and vitamins. Hauswirtschaft und Wissenschaft, 2001, 3, 128-132.
- [40] Schneider C.: Chemistry and biology of vitamin E. Mol. Nutr. Food Res., 2005, 49(1), 7-30.
- [41] Scott C.E., Eldridge A.L.: Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. J. Food Compos. Anal., 2005, 18(6), 551-559.
- [42] Seo Y.S., Kim S.J., Harn C.H., Kim W.T.: Ectopic expression of apple fruit homogentisate phytyltransferase gene (*MdHPT1*) increases tocopherol in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) leaves and fruits. Phytochemistry, 2011, 72(4), 321-329.
- [43] Seybold C., Fröhlich K., Bitsch R., Otto K., Böhm V.: Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. J. Agric. Food Chem., 2004, 52(23), 7005-7010.
- [44] Shepherd T., Robertson G.W., Griffiths D.W., Birch A.N.E.: Epicuticular wax composition in relation to aphid infestation and resistance in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). Phytochemistry, 1999, 52(7), 1239-1254.
- [45] Singh R.K., Ali S.A., Nath P., Sane V.A.: Activation of ethylene-responsive p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase leads to increased tocopherol levels during ripening in mango. J. Exp. Bot., 2011, 62(10), 3375-3385.
- [46] Steinhart H., Rathjen T.: Dependence of tocopherol stability on different cooking procedures of food. Int. J. Vitam. Nutr. Res., 2003, 73(2), 144-151.
- [47] Tester M., Langridge P.: Breeding technologies to increase crop production in a changing world. Science, 2010, 327(5967), 818-822.
- [48] Tlili N., Nasri N., Khaldi A., Triki S., Munné-Bosch S.: Phenolic compounds, tocopherols, carotenoids and vitamin C of commercial caper. J. Food Biochem., 2011, 35(2), 472-483.
- [49] Tranbarger T.J., Dussert S., Joët T., Argout X., Summo M., Champion A., Cros D., Omoro A., Nouy B., Morcillo F.: Regulatory mechanisms underlying oil palm fruit mesocarp maturation, ripening,

- and functional specialization in lipid and carotenoid metabolism. *Plant Physiol.*, 2011, 156(2), 564-584.
- [50] Welch R.M., Graham R.D.: Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bot.*, 2004, 55, 353-364.
- [51] Wollen K.A.: Alzheimer's disease: The pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern. Med. Rev.*, 2010, 15(3), 223-244.
- [52] Yabuta Y., Tanaka H., Yoshimura S., Suzuki A., Tamoi M., Maruta T., Shigeoka S.: Improvement of vitamin E quality and quantity in tobacco and lettuce by chloroplast genetic engineering. *Transgenic Research*, 2013, 22(2), 391-402.
- [53] Zhang W., Liu T., Ren G., Hörtensteiner S., Zhou Y., Cahoon E.B., Zhang C.: Chlorophyll degradation: The tocopherol biosynthesis-related phytyl hydrolase in *Arabidopsis* seeds is still missing. *Plant Physiol.*, 2014, 166(1), 70-79.

ZRÓŻNICOWANE ZNACZENIE WITAMINY E, JEJ WYSTĘPOWANIE ORAZ FUNKCJE REGULACYJNE W RÓŻNYCH TKANKACH ROŚLINNYCH

Streszczenie

Owoce i warzywa zawierają m.in. witaminy, błonnik pokarmowy i fitozwiązki, które sprzyjają zdrowiu człowieka. W szczególności witaminy są głównymi związkami bioaktywnymi, które są rozpuszczalne w wodzie (B i C) lub w tłuszczach (A, D, E i K), wykazujące silny potencjał przeciwutleniający i ograniczające szereg chorób, w tym nowotwory i choroby układu krążenia. Witaminy odgrywają kluczową rolę w ochronie roślin przed abiotycznymi i biotycznymi czynnikami stresowymi. Witamina E to grupa ośmiu rozpuszczalnych w tłuszczach związków zwanych tokochromanolami, które są syntetyzowane wyłącznie przez organizmy fotosyntetyzujące. Tokochromanole dzieli się na dwie grupy – tokoferoli i tokotrienoli. Każda grupa zawiera cztery formy oznaczone przedrostkami α -, β -, γ - i δ -, co daje w sumie osiem form. Witamina E jest niezbędnym, rozpuszczalnym w tłuszczach przeciwutleniaczem w diecie człowieka, chroniącym przed nowotworami, cukrzycą, chorobami układu krążenia i neurologicznymi. W niniejszym przeglądzie podsumowano najnowsze osiągnięcia w zrozumieniu zróżnicowanego znaczenia witaminy E, a także jej głównych genetycznych szlaków regulacyjnych w roślinach. Ponadto przedstawiono kompleksowe odwzorowanie występowania witaminy E w różnych tkankach roślin, organellach i gatunkach roślin ogrodniczych, a także na różnych etapach rozwoju owoców i w trakcie zbiorów.

Słowa kluczowe: tokoferole, tokotrienole, tokochromanole, witamina E ☒

MACIEJ J. RYBICKI

COCCIDIOSTATS IN TREATING COCCIDIOSIS

S u m m a r y

Coccidiostats are a group of veterinary antibiotics, the residues of which in, e.g. meat or other edible tissues, are potentially dangerous to human health and life. Thus, it is important to effectively prevent intoxications. For that purpose it is essential to gather data on those antibiotics. Coccidiostats are used mainly in treating and preventing coccidiosis – a disease of the intestinal track of animals, especially of the poultry, caused by parasitic protozoans of the *Eimeria* genus. Two major groups are used – polyether ionophores and chemical coccidiostats, which differ in origin and mechanisms of action. Their application is governed by the Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council, in which the application of the following 11 coccidiostats was authorized: salinomycin, narasin, monensin, maduramicin, semduramicin, lasalocid, robenidine, nicarbazin, halofuginone, diclazuril and decoquinate. Each of the mentioned coccidiostat present in the products of animal origin can lead to intoxication resulting from production errors and poor manufacturing practices. The effects of those compounds in food include symptoms such as: polyneuropathy, rhabdomyolysis, hypercalcaemia, respiratory failure and even death of patients. The coccidiostats are irreplaceable in treating coccidiosis, which can always be associated with the possibility of their occurrence in food. The present-day methods used to identify these medicines make it possible to monitor the products as regards the occurrence thereof and to reduce the risk of exceeding safe dose limits as set out in the relevant legal acts.

Key words: coccidiostats, veterinary medicines, products of animal origin, food safety

Introduction

Coccidiostats are veterinary medicines used to treat and prevent coccidiosis, a common disease of breeding animals. The widespread use thereof raises general interest owing to the potential harmfulness of residues of those drugs in food products of animal origin.

The objective of the paper is to provide the most important information on the currently used coccidiostats, their mechanism of action and potential toxicity, and to highlight the presence of these drugs in modern animal husbandry. The intent of pre-

senting the knowledge on this subject is to raise the recipients' awareness of this group of substances and to give an introduction to a deeper study of the subject.

Coccidiosis

Coccidiosis is caused by protozoans of the *Eimeria* genus. In particular, it affects poultry and ruminating animals. It often occurs when inbreeding is carried under high moisture and temperature conditions. The level of basic hygiene and the density of animals per area unit are factors to increase the risk of infections. Main species to affect poultry are *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella* and *E. maxima*. There are also other species that affect specifically turkeys, such as *E. meleagridis*, and rabbits, such as *E. stiedae* [35].

An infection begins with the ingestion of parasites in the form of oocyst from faeces of infected animals. The ingested parasites release sporozoites and they attack the intestinal epithelium. Then, after a few asexual life-cycles, merozoites, which were formed in the host, differentiate into sexual forms – male microgametes and female macrogametes. After fertilization by microgametes, macrogametes produce oocysts, which are shed in faeces. The disease manifests itself as severe diarrhoea, a poor weight gain and sometimes it ends in death [39]. The symptoms are caused by inflammation of the mucous membrane of small intestines, set off by the intense proliferation of coccidia in the epithelium cells [35]. As a result the efficiency of breeding is decreased.

History of coccidiosis treatment

For many years coccidiosis has been a major cause of low productivity of the poultry production. In the 20th century, along with the increased poultry breeding level on the poultry farms, the number of infection outbreaks also increased. In those days efficient methods of prophylaxis and treatment were not available, therefore the only recommendation for breeders was to improve their hygiene procedures on the farms. Unfortunately it was impracticable to rear birds in absolute isolation from their faeces, since it precluded the disease eradication on farms [10]. The first change in the poultry production was the introduction of sulfaquinoxaline in the United States of America in the 1940s. That drug was initially intended to treat malaria, however its high toxicity to humans excluded it from the widespread use. Fortunately it was found to be effective against *Eimeria spp.* among the fowls [7]. The drug was extensively incorporated into the poultry feedstuffs; this quickly led to drug resistance against parasites, which was reported in the 1950s.

A milestone in overcoming coccidiosis was the introduction of monensin, the first ionophore coccidiostat, onto American market in the 1970s; monensin turned out to be much more effective against protozoa than sulfaquinoxaline [35]. The first report about

monensin appeared in 1967 when Agratrap isolated it from *Streptomyces cinnamomensis* in the Lilly Research Laboratories. Since then the ionophore coccidiostats have been in the spotlight of scientists looking for new antibiotics and this quickly led to the discovery of other coccidiostats of this group [1].

In the European Union the first admission of monensin as a feed additive was granted by the Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council in 2003 [17, 34]. However it was not the first coccidiostat approved for the use in the European Union; the Council Directive 70/524/EEC of 23 November 1970 [13] provided for the use of coccidiostats such as decoquinate and nicarbazin.

It could be predicted that, along with the increased use of single coccidiostats, the resistance against them would increase too. Hence more efficient multi-component products began to be sold more often, e.g. Eli Lilly's Maxiban. Furthermore, alternative methods of dealing with coccidiosis began to be sought. In 1992 vaccines were developed based on the precocious oocysts of the parasite strains. However they weren't very popular, because they were species-specific and unavailable for all the types of animals. At present there is only one vaccine authorized in the EU [35]. There were also acidifiers, enzymes and probiotics used to create barriers in the animals' digestive system in order to fight coccidiosis, although with a poor effect [35]. There are some novel reports on how to treat coccidiosis using herbal substances, however this issue is at the stage of discussion and investigation [28].

At present there are 11 coccidiostats authorized for the use in the EU; they were granted different permits for different species and under certain conditions of their use. They are regarded to be the most effective drugs in treating coccidiosis and are permitted for chickens, turkeys and rabbits. These are ionophores: monensin sodium, lasalocid sodium, maduramicin ammonium, narasin, salinomycin sodium, semduramicin sodium, and chemical coccidiostats: decoquinate, robenidine hydrochloride, halofuginone, diclazuril and nicarbazin [35].

Modes of action of coccidiostats

Coccidiostats can be divided into two classes. The first class includes natural substances produced by bacteria of the *Streptomycetaceae* family; they are called polyether ionophores. They are composed of tetrahydrofuran rings conjugated into spiroketal moieties. The second group consists of synthetic coccidiostats (also called chemicals): guanidines, triazines, quinolones, pyridines, alkaloids or/and thiamine analogues [12].

The ionophore antibiotics have two modes of action (MoA), but both of them lead to the same effect – a change in the concentration ratios of ions on the both sides of the cell membrane. Under the first MoA two particles of the antibiotic dimerize and create a channel to transport cations across a lipid bilayer [28]. Under the second MoA the ionophores in an anionic form bind the cations and actively carry the ions through a

cell membrane. After passing through the membrane to the cytoplasm they release the cations [3].

When in a physiological state, the cells efficiently defend themselves against the mentioned effect. Na^+/K^+ -ATPase and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase control the ion concentrations on the two sides of the cell membrane. According to what was said before, the ionophore antibiotics change those concentrations. For example lasalocid increases the concentration of Na^+ and Ca^{2+} in the cell; this leads to a simultaneous efflux of K^+ ions. The Ca^{2+} cations overload disrupts the functioning of mitochondria; this decreases the energy production and leads to necrosis. A high concentration of Ca^{2+} is also considered to be a cause of apoptosis owing to the activation of dedicated endonucleases. Furthermore, a high ratio of influx into the efflux of Na^+ ions disrupts the physiological ion concentrations on the both sides of the cell membrane. To restore a normal state an increased energy expenditure for ATPases is required. However when this ratio is too high, the cell is not able to maintain a proper ionic gradient and lyse. At the end high concentrations of Na^+ and Ca^{2+} cause the osmosis to increase, the cell to swell and to burst [20].

Chemical coccidiostats have various mechanisms of action. Decoquinate disrupts the electron transport in the protozoan mitochondria and inhibits the development of parasite [40]. Robenidine and nicarbazin are said to inhibit energy production in mitochondria, although its mode of action needs more investigation. In the reference literature there is very little information on MoA of halofuginone and diclazuril [9].

Legislation

The usage of coccidiostats was established by the European Union in 1970 by the Council Directive 70/524/EEC [13]. In 2003 this document was reviewed and replaced by the Regulation (EC) 1831/2003 of the European Parliament and of the Council [34]. Since then the ionophoric antibiotics: salinomycin, narasin, monensin, maduramicin, semduramicin and lasalocid have been permitted for the use as feed additives as have the synthetic coccidiostats: robenidine, nicarbazin, halofuginone, diclazuril and decoquinate [34, 35]. It is required by the European Union that its member states control residues of these drugs in food and assess their safety, which is supervised by the European Food Safety Authority (EFSA). The newly introduced coccidiostats must have their MRL (Maximum Residue Limit) determined before being introduced into the animal feed [27].

The European Commission released a report on the use of coccidiostats as feed additives in 2008. In the absence of efficient alternatives it was recommended to continue to maintain the authorization for the use of coccidiostats despite their numerous side effects [19, 35].

Nowadays there are 18.3 million of 40.7 million tonnes of annually produced feed for chickens, turkeys and rabbits, which contain coccidiostats [14]. It is important that the authorization for the use of coccidiostats in feedstuff is granted for target animal species, which usually cover chickens for fattening and chickens for rearing, but not laying hens [14]. Therefore, when the coccidiostats are detected in eggs, there is a very high probability of error during feeding procedures.

The coccidiostats are increasingly administered to animals worldwide and the result is the unavoidable presence thereof in food; on the other hand the awareness of harmfulness of those medicines raises and the search for quality and safety of food products goes on [25].

Toxicity

Coccidiostats are potentially harmful to health of animals and humans, and to their lives. At the beginning of the application of coccidiostats their toxicity mechanisms were monitored among the breeding animals as were the ionophores affecting nervous tissues. According to numerous research studies, the intoxication usually occurred as soon as the safe doses of medicines administered were exceeded, e.g. salinomycin poisoning in turkeys [32] or in rabbits [30], or monensin poisoning in broiler chickens [8]. Dogs [38] and horses can be poisoned by coccidiostats after an accidental exposure to them [27]. The most typical clinical symptoms are anorexia, diarrhoea, lack of motor coordination, stiff walking and reluctance to move, muscle tremor, myoglobinuria, depression and exhaustion. Ionophore poisoning can cause rapid death within 7 h or a chronic disease with symptoms of congestive heart failure [29].

Since the late 1990s the interest in the presence of coccidiostats in food has started to grow owing to the increasing number of reports on food contamination with nicarbazin and lasalocid [12]. Coccidiostats occur in the food of animal origin because of the non-compliance with grace periods and the contamination of the supposedly drug-free (non-medicated) animal feeding stuffs by coccidiostats. Also simple human errors or underdeveloped production processes and handling procedures can cause contamination. It is also possible to transfer those drugs between animals (animal-to-animal route) by ingestion of faeces [22].

Acute intoxications in humans are rare but possible. The symptoms of human poisoning are similar to those of animals. In 2000 in Brazil a 17-year old boy died after consumption of monensin. He appeared in the hospital with the symptoms of sickness, nausea and abdominal pain. Two days after his treatment began, the weakness and severe muscle pains appeared followed by tachycardia and drowsiness. Over the next few days an acute renal failure and pulmonary congestion developed in the patient and he died. The post mortem examination revealed that myoglobinuria was the main cause of his death [24].

In 2004 in New Zealand a worker in an animal feed factory accidentally swallowed a small amount of salinomycin and very quickly thereafter had nausea, shortness of breath and dizziness. Half an hour after swallowing salinomycin the patient was found to be agitated and he complained about leg weakness and photophobia. A neurological examination revealed a bilateral leg weakness. The patient re-arrived in the emergency department 14 days after swallowing with increasingly severe pain in his two legs. Here he stayed 40 days to recover and was finally discharged. The symptoms of pain and the weakness of his legs were associated with prolonged rhabdomyolysis [38].

In 2005 in India a maduramicin intoxication case was described. Several patients consumed a contaminated food product and within 4 h they developed vomiting and weakness of their legs. Next, a series of other symptoms developed such as polyneuropathy, rhabdomyolysis, hypercalcaemia and respiratory failure; finally 2 patients died [37].

Those few examples show that the introduced safety procedures are effective in preventing food contamination with coccidiostats and in keeping the concentration rates of those drugs in food at a safe level. On the other hand the growing food production forces the development of other more effective methods to detect and control both the coccidiostats and their consistent implementation. There are reports showing that the cooking of contaminated food poorly decreases concentrations of those drugs [36, 41]. Furthermore, the ionophores have a narrow range of safety and this increases the likelihood of intoxication [4]. The cases presented highlight the need for effective food screening for the presence of coccidiostats.

Determination methods

In 1969 Hammond and Weston [18] presented a thin-layer chromatography-based technique to detect decoquinat, amprolium, ethopabate, clopidol, buquinolate and aklomide in animal feeding stuffs; it was one of the first attempts to analyse samples with coccidiostats. To identify the coccidiostats, the values of retardation factors of these substances were compared with the reference values. Though the method didn't provide any quantitative determination, thus it was impossible to apply it for the purpose of confirming the safety of the detected dose. Moreover, that method involved 6 coccidiostats that are not in use anymore except for decoquinat.

At the turn of the 1980s-1990s the application of high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with UV detection became regularly used, so in 1985 Blanchflower, Rice and Hamilton [6] could report one of the first quantitative methods employed to determine coccidiostats. Monensin, narasin and salinomycin were extracted using methanol and separated by means of a reversed-phase HPLC. The detection limit of the assay was 0.25 mg kg⁻¹ as for monensin and 0.5 mg kg⁻¹ as for narasin and

salinomycin. The recoveries ranged from 95 to 108 %. However the method covered only ionophore coccidiostats and a derivatization technique with vanillin was necessary to detect them with UV.

Nowadays mass spectrometry is constantly used to precisely determine coccidiostats. Takatsuki, Suzuki and Ushizawa [42] were the first to present the incorporation of mass spectrometry for the purpose of determining coccidiostats. In paper of 1986 they described the application of gas chromatography coupled with mass spectrometry only to confirm the occurrence of monensin in a sample of chicken tissues. The quantitative determination of monensin residues was performed by LC with fluorometric detection. The detection limit was 1 ppb in the chicken tissues. The recoveries ranged from 46.5 to 77.6 % depending on the fortification levels.

Under the Council Directive 96/23/EC of 1996 the member states of the European Union were required to monitor poultry meat for the residues of banned hormones and legal veterinary medicines like coccidiostats [21]. From that moment many research centres started to develop methods to determine coccidiostats and the safety of food became a frequent issue in scientific periodicals [15, 16, 26].

Since several years the LC-MS/MS based methods to determine coccidiostats have undergone an intensive development and now they are considered to be methods of choice for the identification of those medicines. In the novel methods the main emphasis is on the improvement of sample preparation procedures and on the broadening the range of substances under determination.

In 2009 Stubbings and Bigwood [39] reported an LC-MS/MS procedure with the use of a modified QuEChERS sample preparation for 7 coccidiostats extracted from chicken meat. In 2012 Chico et al. [11] presented a method to determine 9 coccidiostats in eggs. Ethyl acetate was used as an extraction solvent with clean-up based on a gel permeation chromatography (GPC). In turn in 2016 Piątkowska et al. [31] developed a method to simultaneously determine 14 coccidiostats in fresh eggs. The samples were extracted using 0.1 % formic acid in acetonitrile : water (8 : 2) with EDTA added and cleaned using a solid phase extraction with Hybrid SPE cartridges. In 2017 Barreto et al. [2] used an extraction with acetonitrile followed by a low-temperature clean-up and centrifugation. The supernatant was collected and evaporated to dryness. They determined 14 coccidiostats in a poultry muscle and eggs. An interesting innovation was presented in 2019 by Klimek-Turek et al. [23], who applied simple procedures with a thin-layer chromatography to inexpensively and quickly prepare samples of coccidiostats. Future methods using molecularly imprinted polymers (MIP) to determine coccidiostats seem to be promising provided those special sorbents are less expensive [33]. An interesting trend is also the establishment of some new alternative methods, such as a flow cytometry-based immunoassay, to quantitatively determine coccidiostats [5].

Conclusions

The widespread use of coccidiostats in animal husbandry is burdened by a risk of occurrence of undesirable effects for consumers of the products of animal origin. An additional burden is the absence of satisfactory alternative to those drugs. Furthermore there is a potential risk of contaminating the environment with coccidiostats. Only the responsible use of those medicines can significantly reduce the risk of occurrence of those health hazards.

The developed determination methods are reliable and precise enough to be used for routine testing of food for the presence of coccidiostats.

Currently the coccidiostats are the most effective treatment of coccidiosis and, according to new research studies, they can be used also against multi-resistant bacteria.

References

- [1] Achter J., Anton J., Toplek F.B., Brandner S.: Monensin. Technische Universität Darmstadt, Darmstadt 2017.
- [2] Barreto F., Ribeiro C., Hoff R.B., Costa T.D.: A simple and high-throughput method for determination and confirmation of 14 coccidiostats in poultry muscle and eggs using liquid chromatography – quadrupole linear ion trap - tandem mass spectrometry (HPLC-QqLITMS/MS): Validation according to European Union 2002/657/EC. *Talanta*, 2017, 168, 43-51.
- [3] Bergen W.G., Bates D.B.: Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.*, 1984, 58, 1465-1483.
- [4] Bertini S., Feirrerro F., Berny P.: New improved high performance thin layer chromatography (HPTLC) method for the detection of ionophore antibiotics in feeds and animal tissues. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2003, 26, 147-156.
- [5] Bienenmann-Ploum M.E., Huet A.C., Campbell K., Fodey T.L., Vincent U., Haasnoot W., Delahaut P., Elliott C.T., Nielen M.W.: Development of a five-plex flow cytometric immunoassay for the simultaneous detection of six coccidiostats in feed and eggs. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 404, 1361-1373.
- [6] Blanchflower W.J., Rice D.A., Hamilton J.T.: Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of monensin, narasin and salinomycin in feeds using post-column derivatisation. *The Analyst*, 1985, 110, 1283-1287.
- [7] Campbell W.C.: History of the discovery of sulfaquinoxaline as a coccidiostat. *J. Parasitol.*, 2008, 94, 934-945.
- [8] Chalmers G.A.: Monensin toxicity in broiler chickens. *Canadian Vet. J.*, 1981, 22, 21-22.
- [9] Chapman H.D.: Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathol.*, 1997, 26, 221-244.
- [10] Chapman H.D., Jeffers T.K., Williams R.B.: Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult. Sci.*, 2010, 89, 1788-1801.
- [11] Chico J., Rúbies A., Centrich F., Companyó R., Prat M.D., Granados M.: Use of gel permeation chromatography for clean-up in the analysis of coccidiostats in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405, 4777-4786.

- [12] Clarke L., Fodey T.L., Crooks S.R.H., Moloney M., O'Mahony J., Delahaut P., O'Kennedy R., Danaher M.: A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *Meat Sci.*, 2014, 97 (3), 358-374.
- [13] Council Directive 70/524/EEC of 23 November 1970 concerning additives in feeding-stuffs. *O. J. L* 270, pp. 1-17, of 14.12.1970.
- [14] Dorne J.L., Fernández-Cruz M.L., Bertelsen U., Renshaw D.W., Peltonen K., Anadon A., Feil A., Sanders P., Wester P., Fink-Gremmels J.: Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 2013, 270, 196-208.
- [15] Dusi G., Gamba V.: Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. *J. Chromatogr. A.*, 1999, 835, 243-246.
- [16] Dusi G., Faggionato E., Gamba V., Baiguera A.: Determination of nicarbazin and clopidol in poultry feeds by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 2000, 882, 79-84.
- [17] European Medicines Agency: Monensin (Cattle, Including Dairy Cows). EMEA/CVMP/185123/2007-Final.
- [18] Hammond P.W., Weston R.E.: The detection of prophylactic drugs in animal feeding stuffs by thin-layer chromatography. *The Analyst*, 1969, 94, 921-924.
- [19] Huyghebaert G., Ducatelle R., Van Immerseel F.: An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary J.*, 2011, 187, 182-188.
- [20] Kart A., Bilgili A.: Ionophore antibiotics: Toxicity, mode of action and neurotoxic aspect of carboxylic ionophores. *J. Anim. Vet. Adv.*, 2008, 7, 748-751.
- [21] Kennedy D.G., Smyth W.G., Hewitt S.A., McEvoy J.D.: Monensin carry-over into unmedicated broiler feeds. *The Analyst*, 1998, 123, 2529-2533.
- [22] Kennedy D.G., Cannavan A., McCracken R.J.: Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *J. Chromatogr. A.*, 2000, 882, 37-52.
- [23] Klimek-Turek A., Rybicki M.J., Gierach A., Korol W., Dzido T.H.: Solvent front position extraction procedure for preparation of biological samples with coccidiostats for liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination. *J. Planar. Chromat.*, 2019, 32, 183-189.
- [24] Kouyoumdjian J.A., Morita M.P., Sato A.K., Pissolatti A.F.: Fatal rhabdomyolysis after acute sodium monensin (Rumensin) toxicity: Case report. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 2001, 59, 596-598.
- [25] Mainero Rocca L., Gentili A., Pérez-Fernández V., Tomai P.: Veterinary drugs residues: A review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Addit. Contam. Part A*, 2017, 34 (5), 766-784.
- [26] Matabudul D.K., Crosby N.T., Lumley I., Sumara S.: The optimisation of a rapid method for the determination of lasalocid in poultry feed using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. *Food Chem*, 2001, 75, 465-471.
- [27] McEvoy J.D.G.: Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: A review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 473, 3-26.
- [28] Muthamilselvan T., Kuo T.F., Wu Y.C., Yang W.C.: Herbal remedies for coccidiosis control: A review of plants, compounds, and anticoccidial actions. *Evid Based Complement and Alternat. Med.*, 2016, #2657981.
- [29] Nogueira V.A., França T.N., Peixeto P.V.: Intoxicação por antibióticos ionóforos em Animals. *Pesqui. Vet. Bras.*, 2009, 29, 191-197.
- [30] Peixeto P.V., Nogueira V.A., González A.P., Tokarnia C.H., França T.N.: Accidental and experimental salinomycin poisoning in rabbits. *Pesqui. Vet. Bras.*, 2009, 29, 695-699.
- [31] Piatkowska M., Jedziniak P., Zmudzki J.: Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 2016, 197, 571-580.

- [32] Potter L.M., Blake J.P., Blair M.E., Bliss B.A., Denbow D.M.: Salinomycin toxicity in turkeys. *Poult Sci.*, 1986, 65, 1955-1959.
- [33] Regal P., Díaz-Bao M., Barreiro R., Cepeda A., Fente C.: Application of molecularly imprinted polymers in food analysis: Clean-up and chromatographic improvements. *Cent. Eur. J. Chem.*, 2012, 10, 766-784.
- [34] Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *O. J. L* 268, pp. 29-43, of 18.10.2003.
- [35] Report from the Commission to the Council and the European Parliament on the use of coccidiostats and histomonostats as feed additives submitted pursuant to article 11 of Regulation (EC) no 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. COM/2008/0233 Final.
- [36] Rokka M., Eerola S., Perttilä U., Rossow L., Venäläinen E., Valkonen E., Valaja J., Peltonen K.: The residue levels of narasin in eggs of laying hens fed with unmedicated and medicated feed. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2005, 49, 38-42.
- [37] Sharma N., Bhalla A., Varma S., Jain S., Singh S.: Toxicity of maduramicin. *Emerg. Med. J.*, 2005, 22, 880-882.
- [38] Story P., Doube A.: A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. *N Z Med J.*, 2004, 117 (1190), #799.
- [39] Stubbings G., Bigwood T.: The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 637, 68-78.
- [40] Sykes J.E., Papich M.G.: *Antiprotozoal Drugs. Canine and Feline Infectious Diseases.* Elsevier, Davis 2014, pp. 97-104.
- [41] Šinigoj-Gačnik K., Zorman Rojs O.: Salinomycin concentration in eggs and tissues of laying hens. *Acta Vet. Brno*, 2008, 77, 423-429.
- [42] Takatsuki K., Suzuki S., Ushizawa I.: Liquid chromatographic determination of monensin in chicken tissues with fluorometric detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1986, 69, 443-448.

KOKCYDIOSTATYKI W LECZENIU KOKCYDIOZY

Streszczenie

Kokcydiostatyki to grupa antybiotyków weterynaryjnych, których pozostałości, na przykład w mięsie czy innych jadalnych tkankach, są potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia i życia ludzi. Ważne jest zatem, by skutecznie zapobiegać zatruciom. W tym celu należy koniecznie gromadzić dane na ich temat. Kokcydiostatyki stosowane są głównie w leczeniu i profilaktyce kokcydiozy – choroby jelit zwierząt, przede wszystkim drobiu, wywołanej przez pasożytnicze pierwotniaki z rodzaju *Eimeria*. Używane są dwie główne grupy – jonofory polieterowe i kokcydiostatyki chemiczne, które różnią się pochodzeniem i mechanizmem działania. Ich stosowanie jest regulowane Rozporządzeniem (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej, w którym zezwolono na stosowanie 11 kokcydiostatyków: salinomycyny, narazyny, monenzyny, maduramycyny, semduramycyny, lasalocydu, robenidyny, nikarbazyyny, halofuginonu, diklazurilu i dekokwinatu. Każdy z wymienionych kokcydiostatyków zawartych w produktach pochodzenia zwierzęcego może prowadzić do zatrucia będącego rezultatem błędów i złych praktyk produkcyjnych. Skutkiem obecności tych związków w żywności mogą być takie schorzenia, jak: polineuropatia, rabdmioliza, hiperkalcemia, niewydolność oddechowa, a nawet śmierć pacjentów. Kok-

cydiostatyki są niezastąpione w leczeniu kokcydiozy, co zawsze może się wiązać z możliwością ich wystąpienia w żywności. Współczesne metody oznaczania omawianych leków pozwalają na monitorowanie produktów pod względem ich obecności i zmniejszają ryzyko przekraczania bezpiecznych dawek określonych w odpowiednich aktach prawnych.

Słowa kluczowe: kokcydiostatyki, leki weterynaryjne, produkty pochodzenia zwierzęcego, bezpieczeństwo żywności ☒

GRAŻYNA MORKIS

PROBLEMATYKA ŻYWNOŚCIOWA W USTAWODAWSTWIE POLSKIM I UNIJNYM

Publikujemy kolejny przegląd aktów prawnych, które ukazały się w Dzienniku Ustaw RP oraz Dzienniku Urzędowym UE. Poniższe zestawienie zawiera akty prawne dotyczące szeroko omawianej problematyki żywnościowej wg stanu na dzień 31 sierpnia 2020 r.

Polskie akty prawne

1. Obwieszczenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 13 lipca 2020 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie niektórych wymagań weterynaryjnych, jakie powinny być spełnione przy produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego w określonych zakładach o małej zdolności produkcyjnej (Dz. U. 2020 r., poz. 1286).
Obwieszczenie zawiera jednolity tekst rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 19 maja 2010 r. w sprawie niektórych wymagań weterynaryjnych, jakie powinny być spełnione przy produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego w określonych zakładach o małej zdolności produkcyjnej. Rozporządzenie określa niektóre wymagania weterynaryjne dotyczące konstrukcji, rozplanowania i wyposażenia, jakie powinny być spełnione przy produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego w zakładach rozbioru mięsa oraz zakładach produkujących mięso mielone lub surowe wyroby mięsne.
2. Obwieszczenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 13 lipca 2020 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie niektórych wymagań weterynaryjnych, jakie powinny być spełnione przy produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego w rzeźniach o małej zdolności produkcyjnej (Dz. U. 2020 r., poz. 1287).

- Ogłoszono jednolity tekst rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 19 maja 2010 r. w sprawie niektórych wymagań weterynaryjnych, jakie powinny być spełnione przy produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego w rzeźniach o małej zdolności produkcyjnej.
3. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 15 lipca 2020 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o rolnictwie ekologicznym (Dz. U. 2020 r., poz. 1324).
Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 25 czerwca 2009 r. o rolnictwie ekologicznym.
4. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 22 lipca 2020 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o wyrobie napojów spirytusowych oraz o rejestracji i ochronie oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych (Dz. U. 2020 r., poz. 1419).
Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 18 października 2006 r. o wyrobie napojów spirytusowych oraz o rejestracji i ochronie oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych.
5. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 15 lipca 2020 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. 2020 r., poz. 1421).
Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt.
6. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 16 lipca 2020 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o towarach paczkowanych (Dz. U. 2020 r., poz. 1442).
Ogłoszono jednolity tekst ustawy z dn. 7 maja 2009 r. o towarach paczkowanych.
7. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 17 lipca 2020 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej dżemów, konfitur, galaretek, marmolad, powideł śliwkowych oraz słodzonego przecieru z kasztanów jadalnych (Dz. U. 2020 r., poz. 1284).
Dokonano zmiany w rozporządzeniu z dn. 29 lipca 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej dżemów, konfitur, galaretek, marmolad, powideł śliwkowych oraz słodzonego przecieru z kasztanów jadalnych dotyczące m.in. konfitur i konfitur ekstra.

Unijne akty prawne

1. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/916 z dn. 1 lipca 2020 r. zezwalające na rozszerzenie zastosowania ksylooligosacharydów jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283

oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470 (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. L 2020 r., 209, s. 6).

W unijnym wykazie nowej żywności, która uzyskała zezwolenie, ustanowionym na mocy rozporządzenia wykonawczego (UE) 2017/2470, odnoszącym się do ksylooligosacharydów jako nowej żywności, nastąpiło włączenie ksylooligosacharydów w suplementach diety przeznaczonych dla populacji dorosłych. Nowa żywność jest oznaczana w ramach etykietowania zawierających ją środków spożywczych jako „ksylooligosacharydy”.

2. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/973 z dn. 6 lipca 2020 r. w sprawie upoważnienia do zmiany warunków stosowania „ekstraktu białkowego z nerek wieprzowych” oraz zmiany rozporządzenia wykonawczego (UE) 2017/2470 (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. L 2020 r., 215, s. 7).

„Ekstrakt białkowy z nerek wieprzowych” może być stosowany jako suplement diety w rozumieniu dyrektywy 2002/46/WE oraz żywność specjalnego przeznaczenia medycznego w rozumieniu rozporządzenia (UE) nr 609/2013.

3. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/1154 z dn. 29 lipca 2020 r. rejestrujące w rejestrze chronionych nazw pochodzenia i chronionych oznaczeń geograficznych nazwę „Miód spadziowy z Beskidu Wyspowego” (ChNP) (Dz. U. L 2020 r., 255, s. 1).

Została zarejestrowana nazwa „Miód spadziowy z Beskidu Wyspowego” (ChNP). Nazwa oznacza produkt należący do klasy 1.4 – Inne produkty pochodzenia zwierzęcego (jaja, miód, różne przetwory mleczne z wyjątkiem masła itp.), zgodnie z załącznikiem XI do rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) nr 668/2014.

4. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/1163 z dn. 6 sierpnia 2020 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek proszku z pieczarek z witaminą D₂ jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470 (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. L 2020 r., 258, s. 1).

Proszek z pieczarek z witaminą D₂ został włączony do unijnego wykazu nowej żywności, która uzyskała zezwolenie ustanowione rozporządzeniem wykonawczym (UE) 2017/2470. Przez okres pięciu lat od daty wejścia w życie niniejszego rozporządzenia tylko wnioskodawca, czyli firma Oakshire Naturals LP ze Stanów Zjednoczonych, jest upoważniony do wprowadzenia do obrotu w Unii nowej żywności, chyba że kolejny wnioskodawca uzyska zezwolenie na tę nową żywność bez odniesienia do danych chronionych na podstawie art. 2 lub za zgodą Oakshire Naturals LP. Wpis w unijnym wykazie obejmuje warunki stosowania i wymogi dotyczące etykietowania określone w załączniku do niniejszego rozporządzenia. ☒

**SETNA ROCZNICA URODZIN
PROF. DR DR H.C. MULT. ANTONIEGO RUTKOWSKIEGO
1920-2020**



W dniu 13 listopada 2020 r. minęła 100. rocznica urodzin Profesora Antoniego Rutkowskiego. Z tej okazji chcemy podzielić się z Czytelnikami wspomnieniami Jego bliskich współpracowników z różnego okresu działalności Profesora. Nie powtarzamy Jego biogramu, gdyż ten był opublikowany w kwartalniku Żywność. Nauka Technologia. Jakość, 2018, 2 (115), 5-8.

WSPOMNIENIA

Profesor Antoni Rutkowski zapisał się w mojej pamięci jako wybitna postać naukowca, wychowawcy młodzieży, organizatora oraz człowieka o niezwyklej pracowitości. Jestem jedną spośród Jego licznych wychowanków, co napawa mnie dumą wynikającą z tego, że to właśnie On ukierunkował moje zainteresowania badawcze na starcie mojej kariery naukowej.

Dwa ważne momenty związane z Profesorem Rutkowskim utkwily w mojej pamięci. Pierwszy to rok 1960 – bylam zatrudniona na Wydziale Mleczarskim Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie. Dziekan tego Wydziału (prof. Tomasz Dziama) zapytał mnie, czy chciałabym podjąć pracę w nowo tworzącej się Katedrze Technologii i Przechowywania Żywności, której kierownictwo obejmuje prof. Antoni Rutkowski. Z wielką radością przyjąlam tę propozycję. Nie zdawałam sobie sprawy, jak trudna

czeka mnie praca, obejmująca nie tylko badania i dydaktykę, ale także organizowanie Jednostki od podstaw, co w owym czasie było niebywale trudne. Jednak dzięki talentowi Profesora i przyjaznemu klimatowi stworzonemu w Katedrze zaistniały warunki do realizowania podjętych zadań. Praca pod kierunkiem Profesora nauczyła nie tylko mnie, ale także inne współpracujące z Nim osoby, jak można intensywne badania naukowe łączyć z własnymi zainteresowaniami typu turystyka czy sport. Jego wykłady, seminaria i okolicznościowe spotkania ze studentami i pracownikami były ciekawe i często urozmaicane wspomnieniami z Jego licznych pobytów zagranicznych, co cieszyło się dużym zainteresowaniem. Po zakończeniu pracy na Uczelni po 10 latach (1969 r.) Profesor nadal z nią współpracował. Jego aktywna praca w Polskiej Akademii Nauk sprawiła, że w Olsztynie rozpoczęło działalność w 1988 r. Centrum Agrotechnologii i Weterynarii PAN. I znowu spotkałam się z pytaniem, tym razem ze strony Profesora Rutkowskiego, czy podjęłabym się organizacji Zakładu Podstaw Technologii Żywności, który był jednym z dwóch powołanych do życia w Centrum. Po wielu wahaniach wyraziłam zgodę, chociaż wiedziałam, jak ogromne zadania na mnie spoczywają. Mam odczucie, że tym oczekiwaniom sprostałam, bo już w 1992 r. Zakład zmienił nazwę na Oddział Nauki o Żywności (z wieloma Zakładami), a po sześciu latach Centrum przekształciło się w Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, które nadal odnosi sukcesy naukowe. Profesor Rutkowski przez wiele lat był przewodniczącym Rady Naukowej Instytutu, uważnie śledził i monitorował jego rozwój. Mam przeświadczenie, że stworzony z Jego dominującym udziałem Instytut spełnił oczekiwania Profesora w realizacji postawionych wcześniej celów badawczych. Ponadto Instytut prowadził aktywną współpracę z placówkami naukowymi w kraju i zagranicą.

Halina Kozłowska

My name is Rutkowski, Antoni Rutkowski. Tak z powodzeniem mógł się przedstawiać Profesor. Wszyscy z respektem reagowali na to nazwisko. Tak też było ze mną. Pierwszy kontakt z Profesorem miałem zaraz po podjęciu pracy w nowo utworzonym Centrum Agrotechnologii i Weterynarii PAN w Olsztynie (obecnie Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN), którego był jednym z założycieli i z tego względu przez lata dopytywał się, jak nam idzie. Jak się pojawiał w Centrum, niektórzy chcąc uniknąć bezpośredniego spotkania, kryli się dosłownie gdziekolwiek, bywało że w „miejscach odosobnienia”. Nie jestem w stanie dzisiaj powiedzieć, dlaczego. Może ze względu na bezpośredniość pytań, jakie potrafił zadawać, niekoniecznie związanych z nauką, a może ze względu na potężną posturę i pozycję w PAN. Podczas spotkań Rady Naukowej często siedział z zamkniętymi oczami, usypiając czujność

prelegenta. Jakież było zaskoczenie, kiedy ni stąd, ni zowąd zadawał pytanie „w punkt”. Z czasem mieliśmy coraz częstszy kontakt, poczuliśmy, że „nadajemy na tych samych falach”, bardzo polubiliśmy się. Na tyle, że Profesor zaproponował mi przejście na Ty. Z dumą mówiłem, że jest moim najstarszym Kolegą. Z powodu obowiązków i odległości spotykaliśmy się coraz rzadziej. Dużo mi opowiadał o swoich losach. Przechowuję liścik, w którym nazwał mnie swoim przyjacielem. Za młodu i w czasie wojny los miotał Antonim na wszystkie strony, ale często podkreślał, że w życiu miał szczęście. Udało mi się jeszcze parę razy odwiedzić Profesora w Konstancynie, z którego przysłał mi kartkę z trudnymi już do odczytania życzeniami świątecznymi. Zawsze pełen optymizmu, ciepły w środku, akceptujący życie takim, jakim było.

Mariusz Piskula

Każdego, kto zapoznaje się z działalnością naukową, organizacyjną czy społeczną Profesora Antoniego Rutkowskiego, uderza olbrzymi jej zakres, który wymagał niewiarygodnego wręcz zaangażowania w jego pozytywną realizację. Z perspektywy ponad 40 lat bezpośredniej współpracy z Profesorem Antonim Rutkowskim oceniam, że podstawą sukcesów Profesora były Jego cechy osobowościowe, a zwłaszcza niezwykła skromność, bezpośredniość i umiejętność współpracy ze wszystkimi, niezależnie od wieku, wykształcenia, pełnionych funkcji. Profesor przejawiał umiejętność negocjacji, która pozwalała unikać konfliktów i prawie zawsze doprowadzała do pozytywnego załatwienia sprawy. Profesor nie miał wrogów, może tylko nielicznych zazdrośników. Włączał do realizacji poszczególnych zadań młodych pracowników naukowych z uczelni/institutów, ale pozostawiał im dużo samodzielności, chociaż dyskretnie kontrolował. Nie znam przypadku, aby ktoś odmówił Profesorowi współpracy. Udział w realizacji tych zadań umożliwiał młodym pracownikom naukowym wprowadzenie do nowych środowisk, rozszerzanie horyzontów naukowych, jak i organizacyjnych. Niezwykła była pracowitość Profesora i zdolność organizowania pracy, zarówno swojej, jak i współpracowników, systematyczność działania, okresowa ocena i elastyczność wprowadzania korekt.

Było dla mnie wielkim zaszczytem i przywilejem współpracować z Profesorem Antonim Rutkowskim przez wiele lat, a w ostatnim okresie Jego życia ciągle podtrzymywać bliski kontakt i starać się ułatwić mu funkcjonowanie.

Andrzej Pisula

„*Nie umiera ten, kto trwa w pamięci żywych*” – myślę, że nie tylko mnie te słowa przychodzą na myśl w 100. rocznicę urodzin profesora Antoniego Rutkowskiego. Miałem ogromne szczęście i zaszczyt być wychowankiem, nieprzerwanie współpracować i przyjaźnić się z Profesorem przez ponad 40 lat. Tak długi czas pozwala mi z pełnym przekonaniem stwierdzić, że Profesor był nie tylko jedną z najwybitniejszych, najbardziej zasłużonych postaci w zakresie nauki o żywności w Polsce, ale również był niezwykle ważnym, wspaniałym człowiekiem wielkiego formatu. Człowiekiem, który zawsze kierował się zasadą partnerstwa i współpracy, hołdującym zasadzie, że najlepsze osiągnięcia w pracy uzyskuje się nie przez ostrą dyscyplinę pracowników, ale przez koleżeńskie rozwiązywanie problemów. Mistrzem, którego entuzjazm, inwencja twórcza i talent organizacyjny zachęcały i mobilizowały nas do działań. Przełożonym, który ze wszech miar promował młodych pracowników nauki, cieszył się i był dumny z ich osiągnięć. Przejście na emeryturę Profesora, a szczególnie pobyt w Konstancinie, był dla mnie dobrym okresem do rozmów bardziej osobistych, poznania wielu pasjonujących wątków Jego bogatej biografii, którą zamierzał opublikować.

Tym krótkim wspomnieniem, pragnę wyrazić mój najgłębszy szacunek za Jego wybitne dokonania, wsparcie i przyjaźń, jaką mnie obdarzył.

Stanisław Gwiazda

Jestem wychowankiem Profesora Antoniego Rutkowskiego, a w okresie pracy zawodowej przez 40 lat miałem wielkie szczęście współpracować z Profesorem i mogę powiedzieć, że był to dla mnie wielki zaszczyt, przywilej, a zarazem szkoła życia. W 100. rocznicę urodzin Profesora pragnę wspomnieć tylko niektóre cechy Jego wybitnej osobowości.

Profesor był skarbnicą pomysłów i potrafił znakomicie organizować m.in. nowe podmioty, sympozja, czasopisma, projekty. Zaszczepiał pomysły i angażował zwolenników do ich urzeczywistnienia, zarówno w kraju, jak i w przestrzeni międzynarodowej. Był tytanem pracy na wielu frontach, wykorzystywał każdą chwilę, m.in. w podróz zabierał zawsze materiały do pracy. Sam tego doświadczyłem we wspólnych podróżach w kraju i za granicą (Kanada, Niemcy). Profesor interesował się postępem i nie obawiał się nowości. Kiedy przechodził na emeryturę, w Uczelni zaczęliśmy posługiwać się komputerami. Widząc, jakie to daje możliwości pracy, szybko się wdrożył i używał przez lata coraz nowszych modeli urządzeń. Profesor uwielbiał podróże, był niezwykle mobilny i przemierzył znaczą część globu. W ostatnich latach, kiedy już miał trudności z chodzeniem, „przesiadł” się na wózek akumulatorowy, aby mieć możliwość przemieszczania się wśród zieleni Konstancina-Jeziornej.

Wspominam Profesora jako wspaniałego człowieka, z najwyższym szacunkiem i podziwem dla Jego ogromnego dorobku oraz z wdzięcznością za zaufanie i przyjaźń, jakich doświadczyłem.

Kazimierz Dąbrowski

Wspomnienie o Profesorze Antonim Rutkowskim jest jednocześnie bardzo proste i zarazem bardzo trudne. Łatwe, bo Profesor był postacią niezwykle barwną i wszechstronną, bo był znakomity jako Profesor, jako nasz Nauczyciel, jako nasz Kolega (przez bardzo duże K), a wreszcie znakomity jako Człowiek. Człowiek pełnokrwisty, z jednej strony niezwykle pracowity i szanowany przez świat naukowy, z drugiej zaś niezwykle głodny życia i o niesamowitej aktywności i poczuciu humoru. Dlatego przeróżnych anegdotek o Profesorze jest mnóstwo. Opowiem dwie historyjki ze wspólnego wyjazdu do Indii. Ten wyjazd był szczególny, gdyż po pierwsze – był to Międzynarodowy Kongres Tłuszczowy poświęcony Profesorowi Rutkowskiemu, po drugie – po kongresie wysłano Profesora w samolotową wycieczkę *all inclusive* dookoła Indii i do Nepalu. Profesor poprosił, aby mnie dołączono i pojechaliśmy razem. Przygoda była wyjątkowa i z Profesorem w systemie 24/7. Poniżej dwie historyjki okołokongresowe.

Anegdota nr 1: w dniu rozpoczęcia kongresu, wczesnie rano, Profesor dzwoni do mnie i prosi, abym szybko przyjechał, bo ma kłopoty. Przyjeżdżam i zastaję Profesora jako zawodnika sumo (kształty i ubiór), tyle, że z zakrwawioną twarzą i szyją. Widok był dość zatrważający. Okazało się, że Profesor zapomniał maszynki do golenia, a że miał wygłosić referat otwierający kongres, chciał wyglądać przyzwoicie. Więc pożyczył maszynkę i nie znając jej, ogolił się, tyle że częściowo ze skórą. Profesor zadzwonił do recepcji i przynieśli mu jakiś preparat, ponoć na skaleczenia, ale nic nie pomogło, więc Profesor poprosił mnie, abym przeczytał na etykiecie, jak się go używa. Już nazwa preparatu sprawę wyjaśniła – był to bowiem preparat na insekty. W końcu sytuacja się unormowała, tylko kołnierzyk białej koszuli stał się różowy.

Anegdota nr. 2: wieczorem wydano bankiet na cześć Profesora Rutkowskiego (zorganizowany przez jednego z największych producentów tłuszczów w Indiach). Po bankiecie Profesor i ten biznesmen indywidualnie dziękowali wszystkim uczestnikom. Ustawiła się więc długa kolejka. Tak się złożyło, że stałem za dr Ragnarem Ohlsonem, Szwedem, prezydentem International Society for Fat Research – bardzo częstym gościem wielu konferencji. Wcześniej Profesor Rutkowski mnie uczył, że należy zachowywać się jak miejscowi. I wracam do pożegnania. Stojący przede mną Szwed pożegnał się z hinduskimi gośćmi, ściskając ich ręce, więc ja zrobiłem tak samo. Po imprezie Profesor ochrzanił mnie, że się nie pożegnałem po hindusku, czyli złożone

dłonie i ukłon. Na moją uwagę, że zachowałem się, jak stojący przede mną „światowiec”, Profesor odpowiedział: „on jest d... a nie światowiec. Gdyby był światowcem, to by stał na moim miejscu, a nie w kolejce do mnie”.

Krzysztof Krygier

Setna rocznica urodzin Pana Profesora Antoniego Rutkowskiego przywołuje wspomnienia chwil, zdarzeń i przeżyć, które są z Nim związane, ale przede wszystkim uświadamia mi, jak wiele Mu zawdzięczam i jak bardzo mi Go brakuje. Byłam studentką Pana Profesora na specjalizacji technologia mięsa i tłuszczów, na Wydziale Technologii Żywności SGGW. Był rok 1977, a pan Profesor, wraz z zaprzyjaźnionym prof. Pirkka Fritz Niinivaarą, zorganizował dla swoich magistrantów wyprawę życia, wyjazd na kilkanaście dni do Finlandii. Pobyt poświęcony był na zwiedzanie Uniwersytetu, instytutów i zakładów spożywczych. Cóż to była za wspaniała przygoda dla młodych ludzi w tych smutnych, gierkowskich czasach. Przyjaźnie wtedy zawarte kultuwuję do dzisiaj, a znajomość z asystentem profesora Niinivaary, późniejszym profesorem Eero Puolanne, pozwoliła mi odbyć na Uniwersytecie Helsińskim trzy staże naukowe. Znacznie później blisko współpracowałam z Profesorem Rutkowskim w PTTŻ i oto następne wspomnienie z tym związane. Rok 2000 – zostałam zaproszona do uczestnictwa w projekcie UE w ramach 5. Programu Ramowego Flair Flow Europe, ale na uczelni nie było wtedy jeszcze woli do angażowania się, więc pomyślałam, a może PTTŻ? Razem z profesorem Niną Baryłko-Pikielną odwiedziłyśmy Pana Profesora w szpitalu! Wysłuchał, przepisał na temat projektu i zdecydował – brać. I był to pierwszy projekt międzynarodowy realizowany przez nasze Towarzystwo. To tylko dwa przykłady, które świadczą o tym, jaki był Profesor Antoni Rutkowski – otwarty na nowe, cały czas poszukujący, niebojący się podejmować wyzwań, a jednocześnie o bardzo dużym wyczuciu zarówno naukowej, jak i ogólnej koniunktury i kierunku, w którym zmierza świat. Jednocześnie życzliwy, wierzący w młodych pracowników, potrafiący docenić, doradzić i pomóc, kiedy była taka potrzeba. W chwilach, kiedy mam wątpliwości czy podejmować się jakiegoś wyzwania lub jak postąpić, zastanawiam się, co by mi podpowiedział Profesor Antoni. Jestem dumna i szczęśliwa, że mogę nazywać się Jego uczennicą.

Danuta Kołożyn-Krajewska

Profesor Antoni Rutkowski był Wielki, i ciałem, i duchem! Profesora poznałem w 1978 r., gdy jako początkujący asystent odbywałem staż w Zakładzie Technologii Mięsa i Tłuszczów SGGW, którym profesor kierował. Bliższa nasza współpraca zaczęła się w chwili powołania w 1990 r. Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności. Pełniąc kolejne funkcje w Towarzystwie, moje kontakty z Profesorem stawały się coraz częstsze. Przeszliśmy drogę od relacji Wielki Profesor – skromny asystent, do relacji przyjacielskich. Ogromnie ceniłem mądrość życiową Profesora i wielokrotnie korzystałem z Jego rad, które okazywały się zawsze celne.

Szczególną cechą Profesora była umiejętność słuchania. Potrafił wysłuchać uwagi i sugestie młodego człowieka i odnieść się do nich w sposób życzliwy. Doceniał inicjatywy młodych pracowników i je wspierał, czego przykładem może być powołanie do życia Sesji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, przy sprzeciwie wielu profesorów.

Wiele wskazówek Profesora, które podczas naszych licznych spotkań mi przekazał, pamiętam do dzisiaj i bardzo je sobie cenię. Jest dla mnie zaszczytem, że Profesor zaliczał mnie do grona „swoich chłopców”.

Tadeusz Sikora



Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Instytutu Nauk
o Żywieniu Człowieka SGGW w Warszawie, Zarząd Główny PTTŻ
oraz Sekcja Bezpieczeństwa Żywności KNoŻiŻ PAN

zapraszają na:

V SYMPOZJUM NAUKOWE

z cyklu

Bezpieczeństwo Żywnościowe i Żywności

online, 22 kwietnia 2021 r.

Kontakt: dr inż. Marzena Tomaszewska, tel. 22-593-70-75;
e-mail: sympozjum_bezpieczenstwo@sggw.edu.pl



Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Instytutu Nauk
o Żywieniu Człowieka SGGW w Warszawie,
oraz Zarząd Główny PTTŻ

zapraszają na:

KROKUSOWE XI SYMPOZJUM NAUKOWE

„Probiotyki i prebiotyki w żywności“

online, 23 kwietnia 2021 r.

Kontakt: dr inż. Barbara Sionek; tel. 22-593-70-67;
e-mail: sympozjumprobiotyki@gmail.com



Komitet Nauk o Żywności i Żywieniu Polskiej Akademii Nauk,
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
Polskie Towarzystwo Technologów Żywności – Oddział Gdański

zapraszają na:

XLV Sesję Naukową Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN

„Żywność w strategii Zielonego Ładu”

Gdańk, 1 - 2 lipca 2021 r.

Kontakt:

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
Wydział Chemiczny
ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

Informacje:

<https://chem.pg.edu.pl/xlv-sesja-naukowa-knoziz-pan>
e-mail: xlvsesjanaukowa.wch@pg.edu.pl
tel. (58) 347-26-56, (58) 347-13-95

TECHNOLOG ŻYWNOSCI

INFORMATOR POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI

Rok 30 Nr 4

grudzień 2020

Ze względu na zaistniałą sytuację epidemiczną kalendarz konferencji krajowych i zagranicznych ulega ciągłym zmianom. W sprawie szczegółów prosimy o sprawdzanie aktualnych informacji na stronach odpowiednich konferencji lub kontakt z organizatorami.

WAŻNIEJSZE KRAJOWE I ZAGRANICZNE KONFERENCJE NAUKOWE W ROKU 2021

Kwiecień

22 = V Sympozjum Naukowe z cyklu “Bezpieczeństwo żywnościowe i żywności” (online)

Organizatorzy: Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW w Warszawie, Zarząd Główny PTTŻ oraz Sekcja Bezpieczeństwa Żywności KNoŻiŻ PAN

Kontakt: dr inż. Marzena Tomaszewska; tel. (22) 593-70-75

e-mail: sympozjum_bezpieczenstwo@sggw.pl

23 = Krokusowe XI Sympozjum Naukowe nt. “Probiotyki i prebiotyki w żywności” (online)

Organizatorzy: Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW w Warszawie oraz Zarząd Główny PTTŻ

Kontakt: dr inż. Barbara Sionek; tel. (22) 593-70-67

e-mail: sympozjumprobiotyki@gmail.com

Maj

19 - 20 KRAKÓW = XVIII Konferencja Naukowa z cyklu „Wyzwania Zarządzania Jakością” (online)

Organizatorzy: Koło Naukowe Zarządzania Jakością, Katedra Zarządzania Jakością Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie, Polskie Towarzystwo Towaroznawcze – Oddział w Krakowie

Informacje: <https://www.facebook.com/events/748627192517981>

e-mail: konferencja.knzj@gmail.com

20 - 21 WROCŁAW = XXV Jubileuszowa Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ pt. „Przyszłość w żywności – żywność w przeszłości” i VIII International Session of Young Scientific Staff (online)

Organizatorzy: Oddział Wrocławski PTTŻ, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Sekcja Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Sekcja Chemii Żywności Polskiego Towarzystwa Chemicznego

Informacje: <https://smkn2020.wordpress.com>

Kontakt: dr inż. Anna Kancelista; e-mail: xxvsmknwroclaw@gmail.com

tel. (71) 320-77-73 / (71) 320-51-83

Czerwiec

WROCŁAW = The 9th International Conference on “Quality and Safety in Food Production Chain”

Organizator: Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Oddział Wrocławski PTTŻ

Informacje: <https://qualityconference.wordpress.com>

Kontakt: quality@wnoz.up.wroc.pl; tel. (71) 320-77-74 (81)

23 - 24 WARSZAWA = II Międzynarodowa Konferencja Naukowa z cyklu „Dylematy nauki o żywieniu człowieka – dziś i jutro” pt. „Żywienie a jakość życia osób starszych”

Organizatorzy: Katedra Żywienia Człowieka SGGW, Polskie Towarzystwo Nauk Żywnościowych – Oddział Warszawski

Informacje: http://konferencja_senior2020.sggw.pl/

Kontakt: dr inż. Katarzyna Kozłowska, tel. (22) 59-37-115

dr inż. Monika Zielińska, tel. (22) 59-37-122

e-mail: konferencja_senior2020@sggw.pl

Lipiec

1 - 2 GDAŃSK = XLV Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN pt. „Żywność w strategii Zielonego Ładu”

Organizatorzy: Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, Oddział Gdański PTTŻ, Komitet Nauk o Żywności i Żywieniu PAN

Informacje: <https://chem.pg.edu.pl/xlv-sesja-naukowa-knoziz-pan>

Kontakt: dr hab. inż. Edyta Malinowska-Pańczyk, prof. PG, tel. (58) 347-26-56

dr inż. Izabela Sinkiewicz, prof. PG, tel. (58) 347-13-95

e-mail: xlvsesja.naukowa.wch@pg.edu.pl; kom. 504-024-607

Wrzesień**16 - 17 KRAKÓW = XIV Konferencja Naukowa z cyklu „Żywność XXI wieku“ nt. "Żywność a oczekiwania współczesnego konsumenta"**

Organizatorzy: Oddział Małopolski PTTŻ, Wydział Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Informacje: <http://www.pttzm.org>

Kontakt: dr hab. inż. Stanisław Kowalski, prof. UR

e-mail: zywnoscxxi@pttzm.org; tel. (12) 662-47-47

22 - 23 KRAKÓW = XIII Międzynarodowa Konferencja Naukowa pt. „Wiedza – Gospodarka – Społeczeństwo” (online)

Organizatorzy: Kolegium Nauk o Zarządzaniu i Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie, Fundacja Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie

Informacje: <https://cmq.uek.krakow.pl/>

Kontakt: prof. Janusz Nesterak

e-mail: cmq@uek.krakow.pl ; tel. (12) 293-57-24; (12) 293-54-64

Październik**6 - 7 BARCELONA, Spain = 25th International Conference on Food Technology and Processing with the theme “Impacts of COVID-19 on the global food technology and processing units in food industry”**

Organizator: Conference Series LLC Ltd

Informacje: <https://foodtechnology.insightconferences.com>

Kontakt: foodtechnology@brainstormingmeetings.com; tel. +44 2033180199

Listopad**21 - 23 ŠTRBSKÉ PLESO, Slovakia = Hygiene Alimentorum XLI International Scientific Conference “New trends in improving the quality and safety of meat and meat products”**

Organizatorzy: Department of Food Hygiene and Technology of the University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice; State Veterinary and Food Administration of the Slovak Republic; EFSA National Focal Point on Technical and Scientific Matters; Slovak Meat Processors Association; Slovak Society for Agriculture, Forestry, Food and Veterinary Sciences at SAS in Bratislava

Informacje: <http://hygiena-alimentorum.uvlf.sk/>

Kontakt: hygiena.alimentorum@uvlf.sk

tel. +421 905-910-221; +421 915-984-752

WAŻNIEJSZE KRAJOWE I ZAGRANICZNE KONFERENCJE NAUKOWE
W ROKU 2022

Lipiec

**4 - 8 KRAKÓW = Konferencja Europejskiego Stowarzyszenia Badaczy Ziemniaka
21st EAPR Triennial Conference**

Organizatorzy: European Association for Potato Research, Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin

Informacje: <https://www.eapr2020.pl>

Kontakt: Magdalena Owczarek, tel. (12) 651-90-54

e-mail: eapr2020@targi.krakow.pl

**CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY POLSKIEGO TOWARZYSTWA
TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI**

Przy Zarządzie Głównym: **TCHIBO – WARSZAWA Sp. z o.o. Marki, HORTIMEX Plus
Spółka komandytowa Konin.**

Przy Oddziale Małopolskim: **ZAKŁADY PRZEMYSŁU TŁUSZCZOWEGO BIELMAR
Sp. z o.o., Bielsko-Biała.**

KOMUNIKATY

Informacje dla Autorów oraz wymagania redakcyjne publikujemy na stronie in-
ternetowej **<http://www.wydawnictwo.pttz.org>**

Przypominamy Państwu o aktualnym adresie internetowym Wydawnictwa –
e-mail: **redakcja@pttz.org**

SPIS TREŚCI
CZASOPISMA „ŻYWNOSĆ”
NR 122–125

Wykaz opublikowanych materiałów

Nr 122

| | |
|---|-----|
| Od Redakcji | 3 |
| PIOTR DOMARADZKI, MARIUSZ FLOREK, ZYGMUNT LITWIŃCZUK: Kształtowanie profilu smakowo-zapachowego mięsa wołowego w procesie dojrzewania na sucho | 5 |
| MARTA LISZKA-SKOCZYŁAS: Wpływ nawożenia roślin ziemniaka (<i>Solanum tuberosum</i> L.) na zawartość i jakość skrobi w bulwach | 31 |
| SYLWIA PTAK, ARKADIUSZ ŻARSKI, JANUSZ KAPUŚNIAK: Aspekty technologiczne, ekonomiczne i zdrowotne zastosowania promieniowania mikrofalowego w obróbce żywności | 47 |
| IZABELLA KWAŚNIEWSKA-KAROLAK, RADOSŁAW MOSTOWSKI: Wpływ preparatów enzymatycznych na trwałość pieczywa mieszanego wytworzonego na zakwasie i przechowywanego w warunkach zamrażalniczych..... | 63 |
| ALEKSANDRA SADOWSKA, ANNA DIOWKSZ: Wpływ transglutaminazy na objętość właściwą i porowatość miękiszu bezglutenowego chleba gryczanego..... | 74 |
| ELŻBIETA ROSIAK, BEATA MADRAS-MAJEWSKA, MATEUSZ GEMBA: Wybrane metody oceny jakości mikrobiologicznej miódów lipowych i akacjowych dostępnych na polskim rynku | 85 |
| LIDIA PIEKARSKA-RADZIK, ELŻBIETA KLEWICKA: Wpływ preparatu z jagód acai (<i>Euterpe oleracea</i>) na właściwości powierzchniowe, autoagregację i tworzenie biofilmu przez bakterie z rodzaju <i>Lactobacillus</i> | 96 |
| ROBERT GAJDA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA: Ekonomiczny aspekt bezpieczeństwa żywnościowego w gospodarstwach domowych osób starszych z uwzględnieniem wybranych cech socjodemograficznych | 111 |
| KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA, MARZENA TOMASZEWSKA, BEATA BILSKA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA: zachowania starszych konsumentów wobec zjawiska marnotrawstwa żywności | 122 |
| KATARZYNA ROLF, BARBARA PIETRUSZKA, IZABELA BARAN, GRAŻYNA JAWORSKA: Występowanie zespołu słabości oraz ryzyka żywieniowego wśród osób starszych korzystających z dziennych domów seniora | 137 |
| MAGDALENA PILSKA: Wiedza i postrzeganie tłuszczów a zwyczaje żywieniowe polskich konsumentów produktów do smarowania pieczywa..... | 148 |
| RADOSŁAW KOWALSKI, JAKUB WYROSTEK, GRAŻYNA KOWALSKA, URSZULA PANKIEWICZ: Wpływ ultradźwięków na stężenie wybranych związków bioaktywnych w naparach z mięty pieprzowej, rumianku pospolitego oraz kawy | 164 |
| GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym | 175 |
| LESŁAW JUSZCZAK: Nowe książki | 178 |

| | |
|---|------------|
| Z żałobnej karty: Prof. dr hab. inż. Tadeusz Kołczak 1938 - 2019..... | 181 |
| Technolog Żywności..... | 184 |

Nr 123

| | |
|---|------------|
| Od Redakcji..... | 3 |
| DAMIAN BARANOWSKI, JAROSŁAWA RUTKOWSKA, AGATA ANTONIEWSKA: Ksylitol – rola technologiczna i żywieniowa..... | 5 |
| MARCELINA KARBOWIAK, DOROTA ZIELIŃSKA: Postbiotyki – właściwości, zastosowanie i wpływ na zdrowie człowieka..... | 21 |
| JAGODA O. SZAFRAŃSKA, MAGDALENA POLAK-BERECKA: Plantarycyny – biosynteza, mechanizm działania i potencjał w zapewnianiu bezpieczeństwa żywności..... | 38 |
| MAGDALENA KOWALCZYK, AGATA ZNAMIROWSKA: Próba zastosowania β -D-galaktozydazy do produkcji probiotycznych lodów mlecznych..... | 50 |
| KAROLINA PYCIA, IRENEUSZ KAPUSTA: Wpływ stopnia dojrzałości oraz wielkości dodatku orzechów laskowych i włoskich na właściwości fizykochemiczne i przeciwutleniające wzbogaconego chleba pszennego..... | 62 |
| JOANNA KASZUBA, ZUZANNA POSADZKA, BARBARA KOGUT, GRAŻYNA JAWORSKA, PIOTR KUŹNIAR, AGNIESZKA ŁUKASZEK: Porównanie jakości muffin bezglutenowych z mąki jaglonej i gryczanej..... | 82 |
| AGNIESZKA DUDKIEWICZ, BARTŁOMIEJ KOŹNIEWSKI, ANNA SZYMAŃSKA: Zastosowanie spektroskopii bliskiej podczerwieni do analizy wartości odżywczej produktów garmażeryjnych i makaronów dostępnych na polskim rynku..... | 96 |
| WIESŁAW PRZYBYLSKI, DANUTA JAWORSKA, KATARZYNA KAJAK-SIEMASZKO, PIOTR SAŁEK, MATEUSZ LUBAŃSKI: Ocena produktów mięsnych z dodatkiem wybranych substancji bioaktywnych..... | 107 |
| ANNA FLIS-KACZYKOWSKA, PRZEMYSŁAW DMOWSKI: Ocena wybranych wyróżników jakości owoców cytrusowych..... | 121 |
| NATALIA ŻUREK, IRENEUSZ KAPUSTA, TOMASZ CEBULAK: Wpływ warunków ekstrakcji na potencjał przeciwutleniający wyciągów z kwiatów, liści i owoców głogu (<i>Crataegus</i> × <i>Macrocarpa</i> L.)..... | 130 |
| GRZEGORZ SUWAŁA: Identyfikacja fałszowania frakcji tłuszczowej wybranych czekolad..... | 142 |
| MAGDALENA NIEWCZAS-DOBROWOLSKA, TADEUSZ SIKORA: Ocena postrzegania ryzyka wybranych zagrożeń w żywności przy wykorzystaniu wskaźnika ryzyka żywnościowego (PFRI)..... | 156 |
| GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym..... | 170 |
| ALEKSANDRA WILCZYŃSKA: Jubileusz 50-lecia pracy naukowej prof. dr. hab. inż. Piotra Przybyłowskiego..... | 173 |
| Technolog Żywności..... | 177 |

Nr 124

| | |
|---|---|
| Od Redakcji..... | 3 |
| DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA: Zmiany nomenklatury taksonomicznej ważnych gatunków probiotycznych bakterii <i>Lactobacillus</i> | 5 |

| | |
|---|------------|
| KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA, MARTA WÓJTOWICZ, MICHAŁ DĄBROWSKI, DANUTA JAWORSKA: Bakterie kwasu octowego jako potencjalne probiotyki nowej generacji | 15 |
| IZABELA DMYTRÓW, KAROL WŁODARCZYK: Skład i wartość odżywcza mleka kłaczy i oślic w porównaniu z mlekiem krów | 28 |
| ELŻBIETA ROSIAK, MATEUSZ GEMBA, ALEKSANDRA WESOŁOWSKA: Wpływ procesu zamrażania i rozmrażania na bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka kobiecego | 40 |
| KATARZYNA OSTRÓŻKA, DOROTA WICHROWSKA: Wpływ zamienników cukru na stopień napowietrzenia i topliwość średnio twardych lodów śmietankowych | 52 |
| WIESŁAW PRZYBYLSKI, BARBARA SIOŃEK, DANUTA JAWORSKA, ANNA SPYCHALSKA, MARTYNA RUPIŃSKA: Wpływ dodatku inuliny na jakość sorbetów owocowych i warzywnych | 66 |
| MAGDALENA GAJEWSKA, BEATA BARTODZIEJSKA, ANNA SZOSLAND-FAŁTYN: Wykorzystanie procesów fermentacyjnych do opracowania innowacyjnej metody otrzymywania octu jabłkowego o właściwościach prozdrowotnych | 77 |
| AGNIESZKA REWUCKA, JADWIGA HAMUŁKA: Ocena dostępności oraz składu suplementów diety zawierających ksantofile – luteinę, zeaksantynę i astaksantynę | 87 |
| BARTŁOMIJ RUDA, ANNA OKOŃ, MONIKA TRZĄSKOWSKA, PIOTR SZYMAŃSKI, ZBIGNIEW J. DOLATOWSKI: Wpływ miejsca pozyskania drewna na jakość i bezpieczeństwo zdrowotne kielbas wędzonych | 100 |
| BŁAŻEJ MIELCZAREK, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA, TOMASZ P. OLEJNIK: Zastosowanie analizy strategicznej do zmian technologicznych w małym zakładzie piekarniczo-cukierniczym | 113 |
| BEATA MIKUTA, IZABELA MIŁKOWSKA, NATALIA SOBCZYK, ANITA SZCZECHOWICZ: Ocena spożycia podstawowych składników odżywczych przez osoby starsze z powiatu częstochowskiego | 131 |
| EDYTA ŻYROMSKA, BEATA BILSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA: Wybrane zwyczaje zakupowe mieszkańców województwa łódzkiego jako przyczyna marnotrawstwa żywności | 143 |
| GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym | 158 |
| Nowe książki | 161 |
| Technolog Żywności | 166 |

Nr 125

| | |
|---|----|
| Od Redakcji | 3 |
| MAGDALENA MIKUS, SABINA GALUS: Powlekanie żywności – materiały, metody i zastosowanie w przemyśle spożywczym | 5 |
| MAŁGORZATA ROBAK, KLAUDIA SZCZEPAŃSKA, MAGDALENA RAKICKA-PUSTUŁKA, MAŁGORZATA SEROWIK, ADAM FIGIEL: Biosynteza i suszenie rozpyłowe inwertazy z drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i> | 25 |
| KATARZYNA MODRZEJEWSKA, ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS: Porównanie wybranych parametrów mikrobiologicznych i biochemicznych napojów kombucha | 39 |
| KATARZYNA KOTARSKA, WOJCIECH DZIEMIANOWICZ, ANNA ŚWIERCZYŃSKA: Identyfikacja chemicznych zanieczyszczeń etanolu uzyskanego z ziarna różnych odmian kukurydzy | 52 |
| MARTYNA WOŹNIAK, PAWEŁ SIUDEM, KATARZYNA PARADOWSKA: Właściwości przeciwutleniające oraz zawartość kapsaicynoidów w wybranych przyprawach z dodatkiem ostrej papryki, dostępnych na polskim rynku | 64 |

| | |
|--|------------|
| KAROLINA DOBA, MARTA CIEŚLAK, WOJCIECH ZMUDZIŃSKI: Ocena zawartości wybranych makro- i mikroelementów w miodach komercyjnych oraz w miodach pochodzących bezpośrednio z pasieki | 78 |
| MAGDALENA PALACZ: Zastosowanie spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (TXRF) do oznaczania zawartości krzemu w materiale roślinnym | 90 |
| IZA BAJERLEIN, PATRYK BIELECKI: Określenie profilu kwasów tłuszczowych w wyciągach uzyskanych za pomocą ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym z liści pokrzywy zwyczajnej (<i>Urtica dioica</i> L.) | 103 |
| EGLI C. GEORGIADOU, GEORGE A. MANGANARIS, VASILEIOS FOTOPOULOS: Zróżnicowane znaczenie witaminy E, jej występowanie oraz funkcje regulacyjne w różnych tkankach roślinnych | 113 |
| MACIEJ J. RYBICKI: Kokcydiostatyki w leczeniu kokcydiozy | 127 |
| GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym | 138 |
| Setna rocznica urodzin prof. dr h.c. mult. Antoniego Rutkowskiego | 141 |
| Technolog Żywności | 150 |
| Spis treści czasopisma „Żywność” Nr 122 - 125 | 154 |
| Wykaz nazwisk Autorów w 2020 roku | 158 |
| Wykaz nazwisk Recenzentów w 2020 roku | 160 |

WYKAZ AUTORÓW W 2020 ROKU

- Antoniewska A.* 123/5
Bajerlein I. 125/103
Baran I. 122/137
Baranowski D. 123/5
Bartodziejska B. 124/77
Bielecki P. 125/103
Bilska B. 122/122, 124/143
Bogusławska-Wąs E. 125/39
Cebulak T. 123/130
Cieślak M. 125/78
Dąbrowski M. 124/15
Diowski A. 122/74
Dmowski P. 123/121
Dmytrów I. 124/28
Doba K. 125/78
Dolatowski Z.J. 124/100
Domaradzki P. 122/5
Dudkiewicz A. 123/96
Dziemianowicz W. 125/52
Figiel A. 125/25
Flis-Kaczykowska A. 123/121
Florek M. 122/5
Fotopoulos V. 125/113
Gajda R. 122/111
Gajewska M. 124/77
Galus S. 125/5
Gemba M. 122/85, 124/40
Georgiadou E.C. 125/113
Hamulka J. 124/87
Jaworska D. 123/107, 124/15, 124/66
Jaworska G. 122/137, 123/82
Juszczak L. 122/178
Kajak-Siemaszko K. 123/107
Kapusta I. 123/62, 123/130
Kapuśniak J. 122/47
Karbowiak M. 123/21
Kaszuba J. 123/82
Klewicka E. 122/96
Kogut B. 123/82
Kołozyn-Krajewska D. 122/111, 122/122, 124/5, 124/143
Kotarska K. 125/52
Kowalczyk M. 123/50
Kowalska G. 122/164
Kowalski R. 122/164
Koźniewski B. 123/96
Kuźniar P. 123/82
Kwaśniewska-Karolak I. 122/63
Liszka-Skoczylas M. 122/31
Litwińczuk Z. 122/5
Lubański M. 123/107
Lukaszek A. 123/82
Madras-Majewska B. 122/85
Manganaris G.A. 125/113
Mielczarek B. 124/113
Mikus M. 125/5
Mikuta B. 124/131
Miłkowska I. 124/131
Modrzejewska K. 125/39
Morkis G. 122/175, 123/170, 124/158, 125/138,
Mostowski R. 122/63
Neffe-Skocińska K. 122/122, 124/15
Niewczas-Dobrowolska M. 123/156
Okoń A. 124/100
Olejnik T.P. 124/113
Ostróżka K. 124/52
Palacz M. 125/90
Pankiewicz U. 122/164
Paradowska K. 125/64
Piekarska-Radzik L. 122/96
Pietruszka B. 122/137
Pilska M. 122/148
Polak-Berecka M. 123/38
Posadzka Z. 123/82
Przybylski W. 123/107, 124/66
Ptak S. 122/47
Pycia K. 123/62
Rakicka-Pustułka M. 125/25
Rewucka A. 124/87
Robak M. 125/25
Rolf K. 122/137
Rosiak E. 122/85, 124/40
Ruda B. 124/100
Rupińska M. 124/66

-
- Rutkowska J. 123/5
Rybicki M.J. 125/127
Sadowska A. 122/74
Sąlek P. 123/107
Serowik M. 125/25
Sikora T. 123/156
Sionek B. 124/66
Siudem P. 125/64
Sobczyk N. 124/131
Spychalska A. 124/66
Suwała G. 123/142
Szafrańska J.O. 123/38
Szczechowicz A. 124/131
Szczepańska K. 125/25
Szosland-Faltyn A. 124/77
Szymańska A. 123/96
Szymański P. 124/100
- Śliżewska K. 124/113
Świerczyńska A. 125/52
Tomaszewska M. 122/122
Trząskowska M. 124/100
Wesołowska A. 124/40
Wichrowska D. 124/52
Wilczyńska A. 123/173
Włodarczyk K. 124/28
Woźniak M. 125/64
Wójtowicz M. 124/15
Wyrostek J. 122/164
Zielińska D. 123/21, 124/5
Zmudziński W. 125/78
Znamirska A. 123/50
Żarski A. 122/47
Żurek N. 123/130
Żyromska E. 124/143

WYKAZ RECENZENTÓW W 2020 ROKU

Redakcja czasopisma „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość” 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. inż. Ewa Babicz-Zielińska, Wyższa Szkoła Zdrowia w Gdańsku
2. Dr inż. Maria Baranowska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
3. Prof. dr hab. Joanna Barłowska Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
4. Dr hab. inż., prof. UR Emilia Bernaś, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
5. Prof. dr hab. inż. Katarzyna Czaczyk, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
6. Prof. dr hab. inż. Magdalena Człapka-Matyasik, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
7. Dr hab. Dorota Derewiaka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
8. Prof. dr hab. Zbigniew J. Dolatowski, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie
9. Dr hab., prof. UEK Joanna Dziadkowiec, Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie
10. Dr hab. inż., prof. UR Adam Florkiewicz, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
11. Prof. dr hab. inż. Halina Gambuś, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
12. Dr hab. inż., prof. UP Paweł Glibowski, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
13. Prof. dr hab. Danuta Górecka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
14. Prof. dr hab. Marzena Jeżewska-Zychowicz, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
15. Prof. dr hab. inż. Lesław Juszczak, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
16. Dr hab., prof. UR Ireneusz Kapusta, Uniwersytet Rzeszowski
17. Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
18. Dr hab. inż., prof. UP Małgorzata Karwowska, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
19. Dr hab., prof. UR Karen Khachatryan, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
20. Prof. dr hab. inż. Agnieszka Kita, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
21. Dr hab. inż., prof. PŁ Elżbieta Klewicka, Politechnika Łódzka w Łodzi
22. Dr hab. Teresa Kłosińska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

23. Prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
24. Prof. dr hab. Jacek Kondratowicz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
25. Prof. dr hab. Józef Korczak, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
26. Dr hab., prof. UTH Małgorzata Kowalska Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny w Radomiu
27. Prof. dr hab. Grażyna Krasnowska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
28. Prof. dr hab. inż. Tomasz Lesiów, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
29. Prof. dr hab. Teresa Leszczyńska, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
30. Prof. dr hab. Zdzisława Libudzisz, Politechnika Łódzka w Łodzi
31. Dr hab. inż., prof. UPP Małgorzata Majcher, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
32. Dr hab. inż. Ewa Majewska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
33. Dr hab. inż. Katarzyna Marciniak-Łukasiak, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
34. Dr hab. inż. Magdalena Michalczyk, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
35. Dr inż. Beata Mikuta, Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy im. J. Długosza w Częstochowie
36. Dr hab. inż., prof. ZUT Anna Mituniewicz-Małek, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
37. Prof. dr hab. Agnieszka Najda, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
38. Dr hab. inż., prof. UP Agnieszka Nawirska-Olszańska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
39. Prof. dr hab. inż. Ewa Nebesny, Politechnika Łódzka w Łodzi
40. Dr inż. Katarzyna Neffe-Skocińska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
41. Prof. dr hab. Małgorzata Nogala-Kałużka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
42. Prof. dr hab. Renata Nowak, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
43. Dr hab. Agnieszka Olejnik-Szmidt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
44. Prof. dr hab. Jan Oszmiański, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
45. Dr inż., prof. UR Paulina Pająk, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
46. Prof. dr hab. inż. Anna Pęksa Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
47. Dr hab. inż., prof. IBPRS Stanisław Ptasznik, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie
48. Prof. dr hab. inż. Katarzyna Przybyłowicz, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
49. Prof. dr hab. inż. Piotr Przybyłowski, Uniwersytet Morski w Gdyni
50. Dr inż. Karolina Pycia, Uniwersytet Rzeszowski

51. Dr hab. inż. Justyna Rosicka-Kaczmarek, Uniwersytet Łódzki
52. Dr hab. inż., prof. UP Elżbieta Rytel, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
53. Dr hab. inż., prof. UR Marek Sady, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
54. Dr inż. Barbara Sionek, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
55. Dr, prof. UR Robert Socha, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
56. Dr hab. inż. Barbara Stachowiak, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
57. Prof. dr hab. Joanna Stadnik, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
58. Dr hab. inż., prof. PG Hanna Staroszczyk, Politechnika Gdańska w Gdańsku
59. Dr hab. Krystyna Szymandera-Buszka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
60. Dr inż. Piotr Szymański, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie
61. Dr hab. inż., prof. PŁ Katarzyna Śliżewska, Politechnika Łódzka w Łodzi
62. Prof. dr hab. Agnieszka Tajner-Czopek, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
63. Dr hab. inż., prof. UWM Anna S. Tarczyńska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
64. Dr hab. inż., prof. SGGW Joanna Trafiałek, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
65. Dr hab. inż. Monika Trząskowska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
66. Prof. dr hab. Tomasz Twardowski, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
67. Dr hab. Ewelina Węsierska, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
68. Dr hab. inż., prof. SGGW Małgorzata Wroniak, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
69. Dr hab., prof. SGGW Małgorzata Ziarno, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
70. Dr hab. inż., prof. SGGW Dorota Zielińska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
71. Dr hab. Urszula Złotek, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
72. Dr hab. inż., prof. UR Agata Znamierowska, Uniwersytet Rzeszowski

**Adresy Zarządu Głównego, Oddziałów i Sekcji
Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności**

| PREZES / ODDZIAŁ | ADRES |
|--|---|
| Prof. dr hab. inż. Agnieszka Kita Prezes PTTŻ | UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-62; e-mail: agnieszka.kita@upwr.edu.pl |
| Dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk Sekretarz PTTŻ | PŁ, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 ŁÓDŹ Tel.: (42) 631-27-77; e-mail: krzysztof.kolodziejczyk@p.lodz.pl |
| Dr hab. inż., prof. UMG Aleksandra Wilczyńska Oddział Gdański | UM, ul. Morska 81-87, 81-225 GDYNIA Tel.: (58) 558-62-81; e-mail: a.wilczyńska@wpit.umg.edu.pl |
| Dr hab. inż., prof. UP Małgorzata Karwowska Oddział Lubelski | UP, ul. Skromna 8, 20-704 LUBLIN; Tel.: (81) 462-33-41; e-mail: malgorzata.karwowska@up.lublin.pl |
| Dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk Oddział Łódzki | PŁ, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 ŁÓDŹ Tel.: (42) 631-27-77; e-mail: krzysztof.kolodziejczyk@p.lodz.pl |
| Dr hab. inż., prof. UR Mariusz Witczak Oddział Małopolski | UR, ul. Balicka 122, 30-149 KRAKÓW Tel.: (12) 662-48-35; e-mail: rrwitcza@cyf-kr.edu.pl |
| Prof. dr hab. inż. Iwona Konopka Oddział Olsztyński | UWM, Pl. Cieszyński 1, 10-726 OLSZTYN Tel.: (89) 523-34-66; e-mail: iwona.konopka@uwm.edu.pl |
| Dr hab. inż., prof. UR Małgorzata Dżugan Oddział Podkarpacki | UR w Rzeszowie, ul. M. Ćwiklińskiej 2, 35-601 RZESZÓW Tel.: (17) 872-16-19; e-mail: mdzugan@ur.edu.pl |
| Dr hab., prof. ZUT Izabela Dmytrów Oddział Szczeciński | ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 4, 71-550 SZCZECIN Tel.: (91) 449-65-00; e-mail: izabela.dmytrow@gmail.com |
| Dr hab. inż., prof. SGGW Ewa Jakubczyk Oddział Warszawski | SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA Tel.: (22) 593-75-62; e-mail : ewa_jakubczyk@sggw.pl |
| Dr hab. inż. Małgorzata Gumienna Oddział Wielkopolski | UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 848-72-67; e-mail: gumienna@up.poznan.pl |
| Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska Oddział Wrocławski | UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-64; e-mail: pttz_ow@wnoz.up.wroc.pl joanna.kawa-rygielska@upwr.edu.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 4, 71-550 SZCZECIN Tel.: (91) 449-66-00 wew. 6583; e-mail: arkadiusz.zych@zut.edu.pl |
| Dr hab. inż., prof. UP 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. inż. Antoni Gołachowski Technologii Węglowodanów | UPWr, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 WROCŁAW Tel.: (71) 320-77-68; e-mail: antoni.golachowski@upwr.edu.pl |
| Dr hab. inż. Dorota Walkowiak-Tomczak Technologii Owoców i Warzyw | UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 846-60-43; e-mail: dorota.walkowiak@up.poznan.pl |
| Dr inż. Monika Przeor Młodej Kadry Naukowej | UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (61) 848-73-30; e-mail: monika.przeor@up.poznan.pl |