



ŻYWNOŚĆ

Nauka Technologia Jakość

FOOD

Science Technology Quality

Nr 2 (131)

Kraków 2022

Rok 29

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Lesław Juszczyk; e-mail: rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl; tel. 12 662-47-78

Zastępca redaktora naczelnego: prof. dr hab. inż. Mariusz Witczak

Sekretarz redakcji (kontakt z autorami): e-mail: redakcja@pttz.org

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, prof. UJ

Redaktor statystyczny: prof. dr hab. Mariusz Witczak

Stali współpracownicy: dr Grażyna Morkis (Kraków)

Rada Naukowa: prof. dr hab. Tadeusz Sikora (*przewodniczący*), prof. dr hab. Grażyna Bortnowska, prof. dr hab. Jacek Domagała, prof. dr hab. Jozef Golian (Słowacja), prof. dr hab. Anna Gramza-Michałowska, prof. dr hab. Waldemar Gustaw, prof. dr hab. Grażyna Jaworska, prof. dr hab. Henryk Jeleń, prof. dr hab. Miroslava Kačániová (Słowacja), prof. dr hab. Joanna Kawa-Rygielska, prof. dr hab. Agnieszka Kita, prof. dr hab. Elżbieta Klewicka, prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska, prof. dr hab. Jolanta Król, prof. dr hab. Katarzyna Majewska, prof. dr hab. Stanisław Mleko, prof. dr hab. Mariusz Piskula, prof. dr hab. Piotr Przybyłowski, prof. dr hab. Krzysztof Surówka, prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, prof. dr hab. Dorota Żyżelewicz.

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 2022
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

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 2 (131)

Kraków 2022

Rok 29

SPIS TREŚCI

Od Redakcji.....	3
MAGDA FILIPCZAK-FIUTAK, MONIKA WSZOŁEK: Analiza składu chemicznego oraz jakości mikrobiologicznej i możliwości wykorzystania mleka oślego.....	5
MARTA CHABEREK, MAŁGORZATA GNIEWOSZ, KATARZYNA POBIEGA, KATARZYNA RYBAK: Charakterystyka papieru powleczonego olejkami eterycznymi i ocena jego zastosowania w pakowaniu mięsa wołowego.....	22
IWONA KAWACKA, AGNIESZKA OLEJNIK-SCHMIDT: Genoserotypowanie izolatów <i>Listeria monocytogenes</i> pochodzących z produktów mięsnych i środowiska produkcyjnego.....	34
EWELINA SIDOR, MONIKA TOMCZYK, MICHAŁ MIŁEK, MAŁGORZATA DŻUGAN: Wpływ czasu przechowywania na właściwości antyoksydacyjne i profil polifenolowy mrożonego i liofilizowanego czerwiu trutowego utrwalonego w miodzie.....	45
NIKOLA ŚMIGIELSKA, ANNA SZOSLAND-FAŁTYN, BEATA BARTODZIEJSKA: Przeżywalność bakterii probiotycznych w innowacyjnym napoju na bazie octu owocowego i serwatki.....	57
KATARZYNA MARCINIAK-ŁUKASIAK, KAROLINA GADOMSKA, MICHAŁ SOWIŃSKI, KATARZYNA ŻBIKOWSKA, PIOTR ŁUKASIAK, ANNA ŻBIKOWSKA: Ocena możliwości zastosowania napojów roślinnych w recepturze chleba bezglutenowego.....	70
ŁUKASZ BYCZYŃSKI, ROBERT DULIŃSKI: Wpływ dodatku alg do pieczywa żytniego na zawartość i biodostępność <i>in vitro</i> wybranych mikro- i makroelementów.....	86
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	99
JOANNA DZIADKOWIEC: Jubileusz pracy naukowo-dydaktycznej pana prof. dr hab. Tadeusza Sikory.....	103
MONIKA PRZEOR: XXVI Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PPTŻ.....	106
Z ŻAŁOBNEJ KARTY: Profesor dr hab. Irena Górka (1929-2024).....	110
Technolog Żywności.....	112

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 2 (131)

Kraków 2022

Vol. 29

CONTENTS

From the Editor	3
MAGDA FILIPCZAK-FIUTAK, MONIKA WSZOŁEK: The analysis of the chemical composition, microbiological quality and the possibilities of using donkey's milk.....	5
MARTA CHABEREK, MAŁGORZATA GNIEWOSZ, KATARZYNA POBIEGA, KATARZYNA RYBAK: The characterization of paper coated with essential oils and the evaluation of its use in the packaging of beef	22
IWONA KAWACKA, AGNIESZKA OLEJNIK-SCHMIDT: Genoserotyping of <i>Listeria monocytogenes</i> strains originating from meat products and meat processing environments	34
EWELINA SIDOR, MONIKA TOMCZYK, MICHAŁ MIŁEK, MAŁGORZATA DŻUGAN: The effect of storage time on the antioxidant activity and polyphenolic profile of frozen and lyophilized drone brood fixed in honey.....	45
NIKOLA ŚMIGIELSKA, ANNA SZOSLAND-FAŁTYN, BEATA BARTODZIEJSKA: The survivability of probiotic bacteria in an innovative beverage based on fruit vinegar and whey	57
KATARZYNA MARCINIAK-ŁUKASIAK, KAROLINA GADOMSKA, MICHAŁ SOWIŃSKI, KATARZYNA ŻBIKOWSKA, PIOTR ŁUKASIAK, ANNA ŻBIKOWSKA: An assessment of the possibility of using plant drinks in a gluten-free bread recipe.....	70
ŁUKASZ BYCZYŃSKI, ROBERT DULIŃSKI: The effect of the addition of algae to rye bread on the content and <i>in vitro</i> availability of selected micro- and macroelements.....	86
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish and EU legislation	99
JOANNA DZIADKOWIEC: Jubilee of the scientific and didactic work of prof. dr hab. Tadeusz Sikora	103
MONIKA PRZEOR: IXth International Session of Young Scientific Staff of PSFT	106
Z ŻAŁOBNEJ KARTY: Profesor dr hab. Irena Górská (1929-2024).....	110
The Food Technologist	116

Only reviewed papers are published

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

OD REDAKCJI

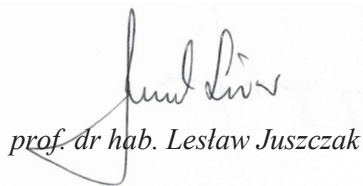
Szanowni Czytelnicy,

przekazujemy Państwu nr 1 (130) czasopisma *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, w którym publikujemy artykuły naukowe o zróżnicowanej tematyce z zakresu nauk o żywności i żywieniu.

Zapraszamy do odwiedzania naszej strony internetowej: <http://wydawnictwo.pttz.org> oraz strony Zarządu Głównego: <https://pttz.org/pl>

Kraków, czerwiec 2022 r.

Redaktor Naczelny



prof. dr hab. Lesław Juszcak

MAGDA FILIPCZAK-FIUTAK, MONIKA WSZOŁEK

ANALIZA SKŁADU CHEMICZNEGO ORAZ JAKOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ I MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA MLEKA OŚLEGO

Streszczenie

Wprowadzenie. Celem pracy było porównanie składu chemicznego, właściwości fizyko-chemicznych oraz jakości mikrobiologicznej mleka trzech gatunków zwierząt. Materiał badawczy stanowiło surowe mleko: krowie, kozie i ośle. Analizowano podstawowy skład chemiczny (zawartość białka ogółem, kazeiny, białek serwatkowych, tłuszczu, laktozy, suchej masy, popiołu). Ponadto oznaczono profil kwasów tłuszczowych oraz zawartość pierwiastków mineralnych, a także jakość mikrobiologiczną każdego rodzaju mleka.

Wyniki i wnioski. Mleko ośle charakteryzowało się największą zawartością laktozy (7,30 %), niską koncentracją białka ogółem (1,63 %) - przy dużym udziale białek serwatkowych (0,56 %) oraz najmniejszą spośród badanych gatunków mleka zawartością tłuszczu (0,38 %) – przy największym udziale kwasów linolowego (6,95 %) i linolenowego (9,38 %). Stwierdzono istotne różnice jakości mikrobiologicznej mleka oślego, oznaczając najmniejszą ogólną liczbę drobnoustrojów ($3,53 \log \text{ jtk/cm}^3$), bakterii psychrotrofowych ($2,26 \log \text{ jtk/cm}^3$) oraz bakterii z grupy *coli* ($1,97 \log \text{ jtk/cm}^3$). Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki pozwalają stwierdzić istotne różnice pomiędzy mlekiem oślim, a mlekiem krowim i kozim. Ponadto mleko ośle może stanowić alternatywę dla dzieci cierpiących z powodu alergii na białko mleka krowiego, jak również być surowcem do produkcji nowych rodzajów napojów fermentowanych.

Słowa kluczowe: mleko ośle, skład podstawowy, jakość mikrobiologiczna, związki mineralne, alergia, białko mleka krowiego, CMPA o

Wprowadzenie

Mimo wielu przeciwników spożywania mleka i produktów otrzymywanych na jego bazie oraz dzięki równie licznym jego zwolennikom branża mleczarska cieszy się wciąż dużym zainteresowaniem. Konsumenci wybierają nie tylko dobrze znane mleko

Dr inż. M. Filipczak-Fiutak, ORCID: 0000-0001-5355-8022, dr hab. inż. M. Wszolek, ORCID: 0000-0002-0590-280X, Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; Kontakt: magda.filipczak-fiutak@urk.edu.pl

krowie, czy też mleko kozie, ale również bardziej niszowe gatunki mleka – jak ośle. W wielu pracach badawczych analizowano szczególne właściwości mleka koziego oraz fakt braku reakcji alergicznych po jego spożyciu [4, 44, 48]. Jednak publikacje te nie potwierdziły właściwości antyalergicznym przypisywanych mleku tego gatunku, w przeciwieństwie do mleka oślego [6, 15, 39]. Alergie oraz nietolerancje pokarmowe u dzieci jak i dorosłych stawiają wyzwania przed naukowcami, a także producentami żywności. Stosunkowo nowym odkryciem w dziedzinie żywności jest fakt, że profil białkowy mleka oślego i mleka kobiecego cechuje duże podobieństwo [10]. To podobieństwo czyni mleko ośle cennym surowcem, którego baza stopniowo rozwija się także na terenie naszego kraju.

W związku z powyższym porównanie cech jakościowych mleka trzech gatunków ssaków oraz zgłębienie wiedzy dotyczącej mleka oślego pozyskiwanego w Polsce jest uzasadnieniem celu badań w niniejszej pracy.

Material i metody

Material badawczy stanowiło surowe mleko zbiorcze trzech gatunków ssaków: krowie, kozie oraz ośle. Mleko krowie od krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej pozyskano z gospodarstwa w Dziekanowicach koło Krakowa; kozie od kóz rasy alpejska i biała uszlachetniona pochodziło z gospodarstwa mieszczącego się w Włodowicach, województwo Śląskie. Ośle mleko (klacze rasy *Asinus domesticus*) pochodziło z prywatnego gospodarstwa agroturystycznego z okolic Krakowa.

Kwasowość czynną zmierzono przy użyciu pH-metru cyfrowego CP-215 oraz elektrody zespolonej AS Ag-Pt Elektron (Polska). Oznaczenie kwasowości miareczkowej wykonano metodą miareczkowania 0,25 M roztworem NaOH wobec fenoloftaleiny [2]. Suchą masę oznaczono susząc próbki do stałej masy w temp. 105 °C. Zawartość tłuszczu oznaczono metodą Gerbera, zawartość laktozy – metodą Bertranda [30]. Substancje azotowe ogółem oznaczono metodą Kjeldahla przy użyciu aparatu typu 322 firmy Büchi (Szwajcaria). Oznaczenia zawartości kazeiny wykonano wykorzystując metodę Aschaffenburga i Drewry’ego [29, 50]. Zawartość substancji mineralnych oznaczono po termicznej mineralizacji próbki w temperaturze 500 °C w piecu muflowym [2].

Jakość mikrobiologiczną próbek mleka oznaczono metodą płytkową z wykorzystaniem pożywek mikrobiologicznych firmy Biocorp, posiewy przeprowadzono zgodnie z ogólnymi wymaganiami dotyczącymi analiz mikrobiologicznych [36]. We wszystkich trzech gatunkach mleka oznaczano ogólną liczbę bakterii tlenowych oraz obecność bakterii psychrotrofowych [31, 32]. Zanieczyszczenie bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* na podłożu Lauryl Sulfate Broth [37], drożdże i pleśnie oznaczono, wykorzystując selektywną pożywkę z chloramfenikolem [33], natomiast oznaczenie liczby paciorkowców mezofilnych wykonano na podłożu M17 o pH 7,15.

Oznaczenie zawartości składników mineralnych wykonano metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu FAAS (Spektrometer AA240FS, Agilent, USA) wg odpowiednich norm [34, 35], po uprzedniej mineralizacji „na mokro” metodą ciśnieniową w piecu mikrofalowym MarsXpress (Mineralizator MarsXPress, CEM, USA).

Analiza składu kwasów tłuszczowych poprzedzona była ekstrakcją. Do analizy pobierano 1 g badanej próbki i ekstrahowano w 5 cm³ mieszaniny chloroform/metanol w stosunku 2 : 1. Próbkę z rozpuszczalnikami poddano wytrząsaniu na vortexie, następnie dodano 1 cm³ wody i po powtórnych wytrząsaniu wirowano przy 7 tys. obr/min przez 5 minut. Do dalszej analizy pobrano dolną warstwę chloroformową, którą sączono przez bezwodny siarczan sodowy. W strumieniu azotu odparowano rozpuszczalnik (50 °C). Do transestryfikacji pobrano 4 krople tłuszczu, rozpuszczono w 5 cm³ heksanu i dodano 0,3 cm³ 2 M roztworu KOH w metanolu. Całość wytrząsano, a następnie zakwaszono wodorosiarczanem sodu. Do analizy chromatograficznej użyto 0,25 cm³ roztworu rozcieńczonego pięciokrotnie. Rozdział kwasów tłuszczowych wykonano z wykorzystaniem chromatografu gazowego (Trace 1300, ThermoScientific, USA) (gaz nośny – hel, 40 psi) w kolumnie BPX 70 (60 m x 0,22 mm), grubość fazy 0,25 µm. Analizy wykonano w programie temperatury: 140 °C (1 min) – 1,5 °C/min – 210 °C (5min). Temperatura dozownika wynosiła 220 °C, a detektora – 240 °C, dozowanie dzielnikowe 100 : 1. Gazem nośnym był hel (40 psi).

Badania prowadzono w trzech seriach, każdorazowo wykonując analizy w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki zestawiono i opracowano przy pomocy programu komputerowego Statistica 12.0 z uwzględnieniem średnich arytmetycznych i odchyłeń standardowych między badanymi parametrami. W celu scharakteryzowania właściwości mleka oślego w porównaniu do mleka koziego i krowiego przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ich wskaźników jakościowych. Ponadto istotność różnic pomiędzy badanymi parametrami określono testem Tukeya przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Stwierdzono istotne różnice składu podstawowego oraz właściwości fizykochemicznych mleka oślego w stosunku do krowiego i koziego (tabela 1). Natomiast skład podstawowy mleka koziego zbliżony jest do krowiego, przy czym obydwie gatunki charakteryzuje większa zawartość białka, tłuszczu i popiołu, a mniejsza zawartość laktozy w porównaniu z oślim.

Kwasowość potencjalna mleka oślego (1,93 °SH), w porównaniu do mleka przeżuwaczy jest bardzo mała, co można tłumaczyć niewielką koncentracją białka (szczególnie kazeiny) i odmiennym składem soli mineralnych (niewielka zawartość fosforanów). Największa objętość ługu wykorzystanego podczas miareczkowania zobojętnia

Tabela 1. Skład i właściwości fizykochemiczne mleka oślego, koziego i krowiego
 Table 1. Composition and physicochemical properties of donkey's, goat's and cow's milk

Wskaźnik fizykochemiczny Physicochemical parameters	Gatunek mleka / Milk species		
	Ośle Donkey's	Kozie Goat's	Krowie Cow's
Kwasowość potencjalna [°SH] Titratable acidity [°SH]	1,93 ^A ± 0,08	6,66 ^B ± 0,12	6,40 ^B ± 0,10
Kwasowość czynna [pH] Acidity [pH]	7,19 ^A ± 0,03	6,61 ^B ± 0,04	6,73 ^B ± 0,05
Gęstość [g/cm ³] Density [g/cm ³]	1,034 ^A ± 0,0	1,027 ^B ± 0,0	1,029 ^B ± 0,0
Sucha masa [%] Dry matter [%]	9,49 ^A ± 0,12	12,21 ^B ± 0,14	12,35 ^B ± 0,16
Tłuszcz [%] Fat [%]	0,42 ^A ± 0,08	3,72 ^B ± 0,10	4,07 ^B ± 0,08
Białko [%] Protein [%]	1,63 ^A ± 0,09	3,25 ^B ± 0,14	3,36 ^B ± 0,11
Kazeina [%] Casein [%]	0,97 ^A ± 0,04	2,49 ^B ± 0,03	2,74 ^B ± 0,04
Białka serwatkowe [%] Whey protein [%]	0,73 ^{AB} ± 0,03	0,42 ^A ± 0,01	0,45 ^B ± 0,04
Laktoza [%] Lactose [%]	7,15 ^A ± 0,11	4,10 ^B ± 0,04	4,46 ^B ± 0,07
Popiół [%] Ash [%]	0,45 ^A ± 0,02	0,88 ^B ± 0,01	0,72 ^C ± 0,05

Objaśnienia / Explanatory notes:

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

A, B – wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0,05$

występujące w stanie zjonizowanym grupy NH^{3+} i imidazolowe w białkach (kazeinie) oraz powoduje przekształcenie fosforanów jednozasadowych w dwuzasadowe. Wartość kwasowości otrzymana w badaniach własnych była mniejsza od podanej przez Salimei i wsp. [39] (2,72 °SH). Niska kwasowość miareczkowa mleka oślego powiązana była z największą wartością pH (7,19) w stosunku do pozostałych dwóch gatunków mleka, odpowiednio 6,73 dla krowiego i 6,61 dla koziego. Według Guo i wsp. [15] pH mleka oślego zawiera się w przedziale 7,14 ÷ 7,22. Autorzy, na podstawie przeprowadzonych badań dotyczących zmian składu podstawowego mleka w ciągu 180 dni, wnioskują, że pH nie ulega istotnym wahaniom w czasie trwania laktacji. Takie spostrzeżenia potwierdzają również badania Piccione i wsp. [27], w których średnia wartość pH mleka oślego kształtowała się między 7,00 ÷ 7,10 i była niezależna

od pory dojenia, czy też stadium laktacji. Kwasowość (wyrażona jako kwasowość czynna lub miareczkowa) jest jednym z ważniejszych parametrów fizykochemicznych, który określa przydatność mleka jako surowca do przetwórstwa. Wartości tych parametrów, oznaczone dla wszystkich trzech analizowanych rodzajów mleka nie różniły się od dostępnych danych literaturowych i świadczą o tym, że mleko było świeże, pozbawione oznak nadkwaszenia i kwalifikujące się jako surowiec do dalszego przerobu. Badając gęstość, stwierdzono największą jej wartość w odniesieniu do mleka oślego ($1,034 \text{ g/cm}^3$), natomiast pozostałe dwa gatunki charakteryzowały się niemal identyczną wielkością tego parametru ($1,027 \div 1,029 \text{ g/cm}^3$). Guo i wsp. [15] dla mleka oślego rasy Jiangyue podają wartość $1,032 \text{ g/cm}^3$, a więc również większą od tej oznaczonej dla mleka krowiego i koziego, a ponadto bardzo zbliżoną do wyniku otrzymanego w badaniach własnych dla mleka oślego. Dodatkowo autorzy stwierdzają, brak istotnych wahań gęstości mleka oślego w czasie laktacji. Większa gęstość mleka oślego mogła wynikać m.in. z mniejszej w porównaniu do mleka przeżuwaczy, zawartości tłuszczu. Sucha masa jest odzwierciedleniem zawartości podstawowych składników każdego gatunku mleka. Istotnie najniższą zawartością suchej masy charakteryzowało się mleko ośle (9,49 %), natomiast w mleku krowim i kozim stwierdzono wartości odpowiednio: 12,35 i 12,21 %. Zawartość suchej masy mleka oślic wynikająca z danych literaturowych przedstawia się następująco: 8,37 – 9,50 % [23], 8,58 % [18], 8,86 % [40], 9,53 % [15], co pozostaje w zgodzie z wynikami badań własnych. Głównym komponentem suchej masy mleka, szczególnie oślego jest laktoza, uznawana za składnik charakterystyczny tego gatunku mleka. W mleku oślim stwierdzono 7,15 % laktozy, co stanowi wartość większą od oznaczonej przez Massourasa i wsp. [23] ($6,01 \div 6,78 \%$) oraz Guo i wsp. [15] (6,33 %), natomiast zbliżoną do podanej przez Innocente i wsp. [18] – 7,16 %. Laktoza poprawia wchłanianie wapnia, fosforu, magnezu i baru w przewodzie pokarmowym, co ma wpływ na mineralizację kości u noworodków. Ponadto wysokie stężenie tego cukru w mleku oślim wpływa na jego smakowość, co jest ważnym aspektem w kontekście żywienia dzieci [42]. Piccione i wsp. [27], badając zawartość poszczególnych składników mleka oślego, nie stwierdzili istotnych różnic stężenia laktozy (ok. $6,8 \text{ g/100 cm}^3$) w czasie 7 miesięcy laktacji. Należy podkreślić, że spośród analizowanych trzech gatunków mleka tylko mleko ośle różniło się istotnie pod względem zawartości podstawowego sacharydu mleka.

Frakcja tłuszczowa w mleku pochodzącym od różnych gatunków zwierząt może różnić się pod względem ilości, kompozycji kwasów tłuszczowych i stanu rozproszenia, który ma wpływ na jego optyczne, reologiczne i technologiczne właściwości (kolor, przewodnictwo, szybkość podstoju tłuszczu oraz przydatność do przetwórstwa na sery i masło) [4]. Istotnie najmniejszą zawartość tłuszczu stwierdzono w mleku oślim (0,42 %), największą natomiast – w mleku krowim 4,07 %. Według Salimei i wsp. [39] mleko ośle charakteryzuje się zawartością tłuszczu na poziomie 0,38 %, z kolei inni

autorzy podają: 0,5 % [27], 0,76 % [40], a nawet 1,16 % [15]. Z cytowanej powyżej literatury, a także analiz własnych wynika, że zawartość tłuszczu w mleku oślim charakteryzuje duża zmienność. Najmniejszą zawartością białka charakteryzowało się mleko ośle (1,63 %), natomiast pomiędzy mlekiem pozostałych badanych gatunków zwierząt nie stwierdzono istotnych różnic. Również mniejszą, w porównaniu z mlekiem omawianych przeżuwaczy, koncentrację białka w mleku oślim potwierdzają Salimei i wsp. [39] ($1,72 \pm 0,02$ %), a także Piccione i wsp. [27] (1,6 %) czy Tidona i wsp. [45] ($1,54 \pm 0,18$ %). Według Massourasa i wsp. [23] zawartość białka w mleku oślim waha się w granicach $1,22 \div 1,87$ %. Rozbieżności można tłumaczyć zależnością składu ilościowego poszczególnych komponentów mleka od czynników środowiskowych, sposobu żywienia czy rasy zwierząt. Z uwagi na fakt, iż większość dostępnych danych literaturowych dotyczących charakterystyki mleka oślego opiera się na surowcu pozyskiwanym od zwierząt hodowanych w innych szerokościach geograficznych, uzasadnione jest prowadzenie analizy mleka oślego pochodzącego od zwierząt hodowanych na terenie naszego kraju. Najmniejszą zawartość kazeiny stwierdzono w mleku oślim (0,97 %). Według Guo i wsp. [15] zawartość frakcji kazeinowej w mleku oślim może być mniejsza od oznaczonej w badaniach własnych i zawiera się w przedziale $0,64 \div 1,03$ g/100g. Zawartości kazeiny w mleku krowim (2,74 %) i kozim (2,49 %), większe od wartości oznaczonej dla mleka oślego, również nie różniły się statystycznie istotnie między sobą ($p \leq 0,05$). Zawartość kazeiny w mleku krowim w zakresie $2,46 \div 2,80$ g/100 g podają Guo i wsp. [15], natomiast zawartość tego białka w mleku kozim według Leitnera i wsp. [21] to 2,81g/100g, co stanowi wynik zbliżony do otrzymanego w badaniach własnych. Największa koncentracja białek serwatkowych (0,73 %) charakteryzowała mleko ośle, co istotnie odróżniało ten gatunek od mleka przeżuwaczy. Tidona i wsp. [45] podają zakres $0,43 \div 0,85$ %, co potwierdzają badania Guo i wsp. [15] $0,49 \div 0,80$ %. Uważa się, że proporcja pomiędzy kazeiną a białkami serwatkowymi istotnie wpływa na prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji uczuleniowej na białko mleka. Lara-Villoslada i wsp. [20], przeprowadzając doświadczenie z wykorzystaniem myszy, stwierdzili mniej osobników, u których wystąpiła biegunka po spożyciu mleka ze zmodyfikowaną fazą białkową, w porównaniu z grupą kontrolną karmioną niemodyfikowanym mlekiem krowim. Autorzy twierdzą, że im mniejsza wartość współczynnika proporcji, tym słabszy potencjał alergizujący, a stosunek kazeiny do białek serwatkowych 40:60 (0,67) w mniejszym stopniu powoduje alergię od tego naturalnie występującego w mleku krowim 80:20 (ok. 4). Przeliczając proporcję zawartości kazeiny do białek serwatkowych mleka oślego analizowanego w ramach pracy, otrzymano wartość 1,33. Zgodnie z danymi prezentowanymi przez Tidona i wsp. [45] dla mleka oślic wartość ta waha się w przedziale od 1,05 do 1,70. Ponadto autorzy twierdzą, że największym wzajemnym stosunkiem kazeiny do białek serwatkowych charakteryzuje się mleko oślic z początkowych miesięcy laktacji. Takie właśnie mleko

analizowano w badaniach własnych. Większa zawartość kazeiny w stosunku do białek serwatkowych tego gatunku mleka w badaniach własnych mogła wynikać z niecałkowitego strącenia kazeiny w $\text{pH} = 4,6$, jakie stosowano w badaniach własnych, jak i wielu innych pracach podczas frakcjonowania białek mleka. Według Uniacke-Lowe i wsp. [46], maksymalne strącenie kazeiny w przypadku mleka oślego wymaga mniejszej wartości pH , równej nawet 4,2. Obecność składników mineralnych wyrażonych jako popiół w przypadku mleka oślego była najmniejsza (0,45 %) co potwierdzają badania [15]. Jednak należy podkreślić, iż mleko kobiece również charakteryzuje się mniejszą w stosunku do innych ssaków zawartością związków mineralnych, w związku z czym mleko krowie w procesie humanizacji jest częściowo odmineralizowane. Zawartość popiołu w mleku oślim zmniejsza się w czasie laktacji – systematyczny spadek może tłumaczyć fakt, że w początkowym stadium laktacji, gdy przyrost wagi żrebięcia jest największy, mleko będące jedynym pokarmem żrebięcia jest bogatsze w związki mineralne niż później, kiedy młode spożywają również inne pokarmy. Najwięcej popiołu stwierdzono w mleku kozim (0,88 %), co także znalazło odzwierciedlenie w literaturze. Według Yangilar [49], jak również Park [26] zawartość popiołu w mleku kozim wynosi 0,8%.

Należy podkreślić istotną zależność składu mleka z szerokością geograficzną, w której prowadzona jest hodowla zwierząt mlecznych. Między innymi stąd brak różnic między mlekiem krowim a kozim, pod względem zawartości laktozy, a także innych komponentów suchej masy mleka. Mleko kozie jest bardziej lekkostrawne w stosunku do krowiego, a także charakteryzuje się większą pojemnością buforową. Pomimo tego, analizując średni skład podstawowy mleka koziego, można zauważyć, że nie różni się ono istotnie od krowiego. Mleko kozie charakteryzuje się jednak pewnymi szczególnymi cechami, które odróżniają te dwa gatunki mleka w aspekcie technologicznym. Należą do nich: mniejsza średnica kuleczek tłuszczowych, odmienna budowa i rozmiary miceli kazeinowych, różnice w proporcjach poszczególnych frakcji białkowych – mniejsza lub brak zawartości kazeiny- α_1 (delikatniejszy skrzep), większa zawartość związków azotowych niebiałkowych, lepsza zdolność wiązania wody i mniejsza lepkość [14, 49]. Zatem różnice istniejące pomiędzy mlekiem krowim i kozim mogą nie być widoczne w trakcie podstawowych analiz mleka, charakteryzujących suchą masę i ilościowy udział jej komponentów.

Charakterystykę mikrobiologiczną mleka oślego, krowiego i koziego przedstawiono w tabeli 2. Najmniejszą ogólną liczbę drobnoustrojów, a także bakterii psychrotrofowych stwierdzono w mleku oślim (3,53 i 2,26 $\log \text{jtk/cm}^3$, odpowiednio), natomiast większe i bardzo zbliżone wartości oznaczono dla mleka krowiego i koziego, odpowiednio: 6,47 i 6,30 $\log \text{jtk/cm}^3$ ogólnej liczby bakterii mezofilnych oraz 5,74 i 5,40 $\log \text{jtk/cm}^3$ bakterii psychrofilnych. Niską koncentrację bakterii w mleku oślim

Tabela 2. Liczebność mikroflory mleka oślego, krowiego i koziego [log jtk/cm³]Table 2. The number of microflora in donkey's, cow's and goat's milk [log cfu/cm³]

Rodzaj mikroflory [log jtk/cm ³] Type of microflora [log cfu/cm ³]	Gatunek mleka / Milk species		
	Ośle Donkey	Kozie Goat	Krowie Cow
Ogólna liczba drobnoustrojów Total microorganism number	3,53 ^A ± 0,02	6,30 ^B ± 0,07	6,47 ^B ± 0,04
Bakterie kwaszące Lactic acid bacteria	3,31 ^A ± 0,22	5,94 ^B ± 0,15	6,10 ^B ± 0,03
Bakterie z grupy coli Coliforms	1,97 ^A ± 0,39	4,31 ^B ± 0,61	5,40 ^B ± 0,02
Drożdże Yeast	0,99 ^A ± 0,5	4,89 ^B ± 0,28	5,37 ^B ± 0,46
Bakterie psychrotrofowe Psychrotrophic bacteria	2,26 ^A ± 0,37	5,40 ^B ± 0,31	5,74 ^B ± 0,09

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

potwierdzają w swoich badaniach również Salimei i wsp. [39] oraz Massourasa i wsp. [23]. Zakłada się, że liczebność bakterii w mleku oślim związana jest z frakcją białek serwatkowych tego gatunku mleka, natomiast za właściwości przeciwbakteryjne głównie odpowiada lizozym. Lizozym znany jest jako naturalny środek antybakteryjny z uwagi na zdolność katalizowania hydrolizy wiązań glikozydowych w ścianach komórkowych bakterii [8]. Według Buscino i wsp. [6] enzym ten wraz z immunoglobulinami, laktoferyną oraz laktoperoksydazą mogą wspomagać niemowlęcy układ pokarmowy redukując częstotliwość występowania infekcji. Inni autorzy donoszą o obecności w mleku oślim lizozymu występującego w dwóch wariantach – LYS A i LYS B, które różnią się trzema aminokwasami podstawionymi w 48, 52 i 61 miejscu w łańcuchu polipeptydowym [16]. Średnia zawartość lizozymu w mleku oślim (1 mg/cm³) jest znacznie większa w porównaniu do mleka krowiego (w tym rodzaju mleka występują śladowe ilości lizozymu), kobiecego (0,12 mg/cm³) oraz koziego – również śladowe ilości [15]. Należy jednak podkreślić, że istotnie większa wartość ogólnej liczby drobnoustrojów oznaczona dla mleka krowiego i koziego jest charakterystyczna dla tych gatunków mleka i zgodna z danymi literaturowymi. Stwierdzono istotne różnice liczebności bakterii kwaszących pomiędzy mlekiem oślim a krowim i kozim. Najwięcej bakterii tego rodzaju występowało w mleku krowim: 6,10, najmniej w mleku oślim – 3,31 log jtk/cm³. Stosunkowo dobry wzrost bakterii kwasu mlekowego i drożdży w mleku oślim w 20 °C sugeruje, że naturalna mikrobiologiczna ochrona mleka oślego nie wpływa na tego rodzaju drobnoustroje, stąd Coppola i wsp. [9] sugerują, że mleko ośle może być idealnym surowcem do produkcji nowych typów napojów fermentowanych. *Escherichia coli*, będąca głównym gatunkiem z rodzaju *Entero-*

bacter wchodzącego w skład tzw. grupy coli, powoduje głównie skażenie mleka surowego, a z uwagi na zdolność szybkiego fermentowania laktozy z wydzieleniem kwasów i gazów prowadzi do jego psucia [47]. Odnotowano istotne różnice w liczebności bakterii z grupy coli w mleku oślim 1,94 (log jtk/cm³), a krowim i kozim (5,40 i 4,31 log jtk/cm³, odpowiednio). Temperatura chłodnicza może efektywnie wpłynąć na kontrolę wzrostu mikroorganizmów jednak obecność drobnoustrojów z grupy coli nie powinna zostać pominięta. Dlatego, jak w przypadku każdego gatunku mleka, bardzo ważna jest higiena udoju i utrzymanie określonych standardów przy produkcji mleka oślego. Badania wykonane przez Pilla i wsp. [28] potwierdzają niskie prawdopodobieństwo infekcji w wymieniu oślicy oraz brak patogenów pokarmowych, co sugeruje, że mleko ośle może należeć do bezpiecznej żywności, jeśli gruczoł mlekowy jest zdrowy, a udój prowadzony jest z uwzględnieniem wszystkich wymaganych zasad higieny. Największą liczebność drożdży stwierdzono w mleku krowim – 5,37, mniejszą w mleku kozim – 4,89, natomiast najmniej w mleku oślim – 0,99 log jtk/cm³. Według Massourasa [23] liczebność drobnoustrojów tego rodzaju w mleku oślim jest większa i zawiera się między 1,86 a 2,95 log jtk/cm³, co może wynikać z większej liczebności stada od którego pozyskiwano mleko w badaniach cytowanych autorów.

Zawartości poszczególnych składników mineralnych w analizowanym mleku oślim, kozim i krowim przedstawiono w tabeli 3. Największą zawartość wapnia stwierdzono w mleku krowim (1010,02 mg/kg), istotnie mniejszą natomiast w mleku oślim (469,55 mg/kg). Od lat 30. XX wieku duża zawartość wapnia jest stale wykorzystywana podczas popularyzowania mleka krowiego jako prozdrowotnego składnika diety. Duże stężenie wapnia i innych związków mineralnych jest charakterystyczne dla mleka owczego, podczas gdy mleko ośle i kobiece odznaczają się stosunkowo najmniejszą ich koncentracją [4]. Zawartość Ca i P w mleku oślim zbliżona jest do tej w mleku krowim i około 3 razy większa niż w mleku kobiecym. Jednocześnie mleko ośle charakteryzuje się około 1,5 raza mniejszą koncentracją omawianych pierwiastków [11, 39]. Należy jednak zauważyć, że oznaczony na podstawie badań własnych stosunek wapnia do fosforu w mleku oślim wynosi w przybliżeniu 1 : 1 więc jest niższy niż w mleku kobiecym. Koncentracja makroelementów mleka kobiecego z wyjątkiem sodu jest mniejsza w stosunku do tej w mleku oślim [10], a ta z kolei niższa niż w mleku krowim takich jak krowy [12] i kozy [26].

Zawartość związków mineralnych w mleku zależy od potrzeb gatunkowych osesków w związku z czym stwierdzono różnice w zawartości sodu, potasu, magnezu i cynku pomiędzy wszystkimi badanymi gatunkami mleka, przy czym koncentracja wszystkich związków mineralnych była najmniejsza w mleku oślim, co potwierdza również najmniejsza zawartość popiołu oznaczona dla tego gatunku mleka (0,45 %, tab. 1).

Tabela 3. Zawartość związków mineralnych mleka oślego, krowiego i koziego
 Table 3. Concentration of mineral compounds in donkey's, cow's and goat's milk

Związki mineralne [mg/kg] Mineral compounds [mg/kg]	Gatunek mleka Milk species		
	Ośle Donkey's	Kozie Goat's	Krowie Cow's
Ca	469,55 ^A ± 44,51	989,67 ^B ± 25,01	1010,02 ^B ± 1,85
P	457,69 ^A ± 12,7	1213,5 ^B ± 11,62	1072,3 ^B ± 38,94
Na	158,37 ^A ± 9,17	334,17 ^B ± 3,79	372,25 ^C ± 2,36
K	488,72 ^A ± 21,40	1693,68 ^B ± 2,30	1507,33 ^C ± 7,73
Mg	50,33 ^A ± 2,42	129,82 ^B ± 1,57	103,15 ^C ± 0,12
Mn	0,042 ^{AC} ± 0,021	0,123 ^B ± 0,015	0,10 ^{BC} ± 0,001
Fe	0,69 ^A ± 0,071	0,81 ^{AB} ± 0,013	0,97 ^B ± 0,059
Zn	3,19 ^A ± 0,22	4,06 ^B ± 0,09	5,31 ^C ± 0,13

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

Stężenie żelaza, cynku i miedzi w mleku przeżuwaczy jest powiązana głównie z frakcją kazeinową, podczas gdy w mleku kobiecym pierwiastki te powiązane są z rozpuszczalnymi białkami. W porównaniu do mleka przeżuwaczy, mleko kozie charakteryzuje się mniejszą zawartością tych pierwiastków, jednak mimo mniejszej zawartości żelaza w mleku kozim (0,81 mg/kg), jak podają Copolla i wsp. [9], jest ono bardziej przyswajalne (biologicznie dostępne) niż to z mleka krowiego. Powodem tego jest wyższa zawartość nukleotydów w mleku kozim, które przyczyniają się do podwyższenia absorpcji tego pierwiastka w jelitach [38].

Na podstawie analizy profilu kwasów tłuszczowych stwierdzono, że frakcja tłuszczowa mleka oślego istotnie różni się od tłuszczu z mleka krowiego i koziego nie tylko pod względem ilościowym, ale także jakościowym. Stwierdzono istotne różnice zawartości kwasów tłuszczowych w mleku oślim w porównaniu z ich koncentracją w tłuszczu mleka przeżuwaczy (tabela 4). Najmniejszy procentowy udział kwasu masłowego (C 4:0) stwierdzono w mleku oślim (0,23 %), podczas gdy najwięcej tego związku oznaczono w tłuszczu mleka krowiego (3,19 %), co potwierdzają Jaworski i Kuncewicz [19]. Natomiast otrzymany w badaniach własnych wynik zawartości kwasu masłowego w mleku oślim odbiega od danych literaturowych ponieważ Blasi i wsp. [5] podają wyższą wartość (1,2 %), natomiast Salimei i wsp. [39] – 0,6 %. Podobne zależności stwierdzono w zawartości kwasu kapronowego (tab. 4).

Ponownie najmniej kwasu kapronowego (C 6:0) odnotowano w mleku oślim (0,66 %). Blasi i wsp. [5] podają wartość bardzo zbliżoną do otrzymanej w badaniach własnych (0,5 %), natomiast Salimei i wsp. [39] – dwukrotnie wyższą. Z kolei poziom

Tabela 4. Profil kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka oślego, koziego i krowiego

Table 4. The fatty acid profile of donkey's, cow's and goat's milk fat

Kwasy tłuszczowe [%] Fatty acids [%]	Gatunek mleka Milk species		
	Ośle Donkey's	Kozie Goat's	Krowie Cow's
C4:0	0,23 ^A ± 0,02	1,99 ^C ± 0,222	3,19 ^B ± 0,050
C6:0	0,66 ^A ± 0,037	1,37 ^B ± 0,030	1,44 ^B ± 0,070
C8:0	7,48 ^A ± 0,58	1,81 ^B ± 0,015	1,03 ^B ± 0,005
C10:0	13,13 ^A ± 1,19	7,06 ^C ± 0,08	2,50 ^B ± 0,021
C10:1	2,12 ^A ± 0,15	0,20 ^B ± 0,007	0,25 ^B ± 0,007
C12:0	9,85 ^A ± 0,96	3,99 ^B ± 0,029	2,97 ^B ± 0,003
C14:0	6,36 ^A ± 0,50	10,91 ^B ± 0,041	10,30 ^B ± 0,017
C14:1	0,28 ^A ± 0,02	0,25 ^A ± 0,002	0,93 ^B ± 0,002
C15:0	0,31 ^A ± 0,004	1,09 ^B ± 0,005	1,02 ^B ± 0,004
C16:0	18,23 ^A ± 1,01	27,65 ^B ± 0,105	31,28 ^B ± 0,151
C16:1	2,63 ^A ± 0,06	1,34 ^C ± 0,069	2,11 ^B ± 0,027
C17:0	0,21 ^A ± 0,05	0,54 ^B ± 0,001	0,58 ^B ± 0,003
C17:1	0,39 ^A ± 0,01	0,33 ^C ± 0,025	0,27 ^B ± 0,025
C18:0	1,31 ^A ± 0,00	11,23 ^C ± 0,070	12,47 ^B ± 0,155
C18:1 (cis + trans)	17,73 ^A ± 0,91	27,42 ^C ± 0,10	25,52 ^B ± 0,29
W tym izomerów trans:	0	1,72 ^B	4,21 ^A
C18:2	6,97 ^A ± 0,00	1,97 ^B ± 0,019	2,85 ^B ± 0,114
C18:3	10,25 ^A ± 0,69	0,17 ^B ± 0,002	0,27 ^B ± 0,007
CLA	0	0,34 ^A ± 0,017	0,70 ^A ± 0,002
C20:0	0,025 ^A ± 0,004	0,27 ^C ± 0,005	0,19 ^B ± 0,005
C20:1	0,014 ^A ± 0,04	0,08 ^C ± 0,008	0,13 ^B ± 0,005
Krótkołańcuchowe lotne(SCVFAs)	23,62±0,44	12,43±0,05	8,41 ± 0,03
Średnio łańcuchowe nasycone (MCSFAs)	16,52±0,5	15,99±0,03	14,29±0,01
Nasycone (SFAs)	35,78± 0,36	55,68± 0,04	58,81± 0,05
Jednonienasycone (MUFAs)	23,16 ±0,20	29,62±0,04	29,21±0,07
Wielonienasycone (PUFAs)	17,22 ±0,34	2,14 ±0,01	3,12 ±0,06

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

kwasu kaprylowego (C 8:0) (7,48 %) oznaczony w tłuszczu mleka oślego był ponadpięciokrotnie większy niż w mleku krowimi trzykrotnie większy niż w mleku kozim, odpowiednio 1,03 i 1,81 %. Podobne zależności odnotowano w stosunku do kwasu kaprynowego (C 10:0) w tłuszczu mleka trzech gatunków zwierząt. W rezultacie udział krótkołańcuchowych, lotnych kwasów tłuszczowych był największy w tłuszczu mleka oślego i wynosił 23,62 %, wobec 8,41 % w mleku krowim i 12,43 % w mleku kozim. Zawartość kwasu laurynowego (C 12:0) w mleku oślim była trzykrotnie większa niż

w mleku krowim, a 2,5 raza większa niż w kozim, natomiast kwasów mirystynowego (C 14:0) i pentadecylowego (C 15:0) było istotnie mniej. Z tego względu sumaryczny udział nasyconych średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych w badanych gatunkach mleka był porównywalny.

Udział najpowszechniejszego w przyrodzie kwasu palmitynowego (C 16:0), który występował w największej ilości we wszystkich badanych gatunkach mleka, okazał się być na najniższym poziomie w mleku oślim i wynosił 18,23 %. Ponad 50% więcej tego kwasu stwierdzono w mleku kozim, a o ok. 72 % więcej w tłuszczu mleka krowiego. Podobne wyniki uzyskiwali inni autorzy [1, 5]. Kwas stearynowy (C 18:0) jest drugim, po palmitynowym, najczęściej występującym nasyconym kwasem tłuszczowym w każdym tłuszczu [13]. W tłuszczu mleka krowiego i koziego jego zawartość oznaczono na poziomie około 12 %, co w przypadku mleka krowiego potwierdzają Ceballos i wsp. [7], jednak w przypadku tłuszczu mleka koziego dane literaturowe są niższe o 10 ÷ 20 %. Prawdopodobnie wynika to z różnic rasowych i innych sposobów żywienia i hodowli [1, 7]. W mleku oślic oznaczona zawartość kwasu stearynowego (C 18:0) była ponad dziesięć razy mniejsza i wynosiła 1,31 %. Według Salimei [39] wartość ta jest zbliżona i wynosi 1,12 %, natomiast Blasi i wsp. [5] stwierdzają poziom 1,5 %.

Stwierdzono istotne różnice zawartości kwasów jednonienasyconych, w tym oleinowego (C 18:1). Mleko ośle charakteryzowało się najniższą jego zawartością (17,73 %), natomiast w mleku krowim i kozim odnotowano wartości odpowiednio 25,52 i 27,42 %. Blasi i wsp. [5] dla mleka oślego stwierdzają nieco wyższą wartość: 19,8 %, natomiast Salimei [39] – dużo niższą 9,65 %. W udziale kwasu oleinowego (trans C 18:1) stwierdzono istotne różnice pomiędzy mlekiem krowim i kozim, odpowiednio: 4,21% i 1,72%. W mleku oślim izomer ten nie występuje wcale, ponieważ jednokopytne nie są przeżuwaczami. Największe różnice w profilu kwasów tłuszczowych pomiędzy mlekiem oślim a krowim i kozim występują w zakresie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Najwięcej (17,22 %) znajduje się ich w mleku oślim, linolowego (C 18:2) i linolenowego (C 18:3) odpowiednio: 6,97 i 10,25 %, natomiast w przypadku mleka krowiego i koziego kształtowały się na podobnym, lecz dużo mniejszym poziomie. Według Blasi i wsp. [5] mleko ośle zawiera 9% kwasu linolowego i 5,1 % linolenowego, Salimei [39] natomiast stwierdza wyższą wartość dla kwasu linolowego (8,15 %) i niższą dla kwasu linolenowego (6,3 %). Jaworski i Kunciewicz [19] podają zawartość kwasu linolenowego w mleku krowim w zakresie 1,8 – 2,1 % w zależności od pory roku. Udział skoniungowanego kwasu linolowego (CLA) w mleku krowim i kozim kształtuje się na poziomie 0,7 i 0,34 %, natomiast w tłuszczu mleka oślic, z uwagi na fakt że ten gatunek zwierząt nie należy do przeżuwaczy, kwas ten nie występuje. Koncentracja sprzężonego kwasu linolowego zależy głównie od sposobu żywienia [24]. Liczne dane literaturowe wskazują na wzrost zawartości CLA w tłuszczu

czu mleka krów wypasanych na pastwisku w stosunku do tych karmionych paszami skoncentrowanymi (Total Mixed Ration- TMR) [3, 22, 43]. W kontekście rozpatrywania mleka oślego jako gatunku mleka zbliżonego składem do mleka kobiecego warto podkreślić, że tłuszcz mleka kobiecego charakteryzuje bardzo specyficzny profil kwasów tłuszczowych, znacząco różny od tego występującego u przeżuwaczy. Zawiera prawie o 1/3 mniej nasyconych kwasów tłuszczowych (SFAs) i 9 razy więcej wielonienasyconych kwasów (PUFAs).

W ostatnich latach podejmowane są badania nad możliwością wykorzystania mleka pochodzącego od innych gatunków ssaków do karmienia niemowląt i małych dzieci cierpiących z powodu alergii na białko mleka krowiego. Okazało się, że są przeciwwskazania w przypadku mleka koziego i owczego ze względu na ich wysoką zdolność reakcji krzyżowych z białkiem mleka krowiego zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. CMPA (cow's milk protein allergy) występuje głównie w dzieciństwie, dotykając ok 3 % dzieci w wieku do 3 lat [41], a skuteczność terapii zależy od całkowitej eliminacji białka mleka krowiego z diety dzieci. Ponadto produkty będące zamiennikami powinny być hipoalergiczne, nie wchodzić w reakcje krzyżowe z mlekiem krowim, a dodatkowo powinny zachować odpowiednią wartość odżywczą i być smaczne. Smakowitość jest ważna w przypadku dzieci, ponieważ niesmacznych produktów nie chcą one jeść – zwłaszcza dzieci alergiczne będące poddawanych różnym dietom [25]. Na podstawie analiz własnych stwierdzono istotne różnice zarówno składu podstawowego, zawartości związków mineralnych, jakości mikrobiologicznej, jak i profilu kwasów tłuszczowych pomiędzy mlekiem oślim a krowim i kozim. Ponadto, porównując otrzymane rezultaty badań z literaturą, można zauważyć podobieństwo pomiędzy mlekiem oślim a mlekiem kobiecym. W związku z czym istnieje prawdopodobieństwo, że mleko ośle mogłoby stanowić substytut mleka krowiego dla dzieci cierpiących z powodu CMPA. W badaniach klinicznych z udziałem dzieci cierpiących z powodu alergii na białko mleka krowiego, u których nie było możliwości zastąpienia tego gatunku mleka żadnym dostępnym substytutem mleka krowiego, terapia z wykorzystaniem mleka oślego okazała się skuteczna w niemal w 83 %. Spośród 46 dzieci biorących udział w badaniu 38 tolerowało mleko ośle przez cały okres obserwacji, a stopień reakcji krzyżowych immunoglobulin E (IgE) mleka oślego był bardzo niski. Ośle mleko okazało się również odpowiednim substytutem pod względem smakowitości oraz przyrostu masy ciała tych dzieci [17]. Reasumując – ośle mleko jest bardzo obiecującym substytutem mleka krowiego zarówno dzięki jego hipoalergiczności, ale też wartości odżywczej i walorom smakowym [25]. Tak zachęcające wyniki powinny prowadzić do kontynuacji prac badawczych, a także do wzrostu produkcji mleka oślego, a w związku z tym obniżenia kosztów pozyskiwania tego surowca w naszym kraju.

Wnioski

1. Mleko ośle charakteryzowało się największą zawartością laktozy (7,30 %), niską koncentracją białka ogółem (1,63 %) – przy dużym udziale białek serwatkowych (0,56 %) oraz najmniejszą spośród badanych gatunków mleka zawartością tłuszczu (0,38 %) – przy największym udziale kwasów linolowego (6,95 %) i linolenowego (9,38 %).
2. Stwierdzono istotne różnice jakości mikrobiologicznej mleka oślego, w stosunku do mleka krowiego i koziego, oznaczając najmniejszą ogólną liczbę drobnoustrojów ($3,53 \log \text{ jtk/cm}^3$), bakterii psychrotrofowych ($2,26 \log \text{ jtk/cm}^3$) oraz bakterii z grupy *coli* ($1,97 \log \text{ jtk/cm}^3$).
3. Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki pozwalają stwierdzić istotne różnice pomiędzy mlekiem oślim, a mlekiem krowim i kozim. Mleko ośle może stanowić alternatywę dla dzieci cierpiących z powodu alergii na białko mleka krowiego, jak również być surowcem do produkcji nowych rodzajów napojów fermentowanych.

Badania zostały sfinansowane z dotacji przeznaczonej przez MNiSW na działalność statutową.

Literatura

- [1] Alonso L., Fontecha J., Lozada L., Fraga M.J., Juárez M.: Fatty acid composition of caprine milk: major chain and trans fatty acids. *J. Dairy Sci.*, 1999, 10, 135-149.
- [2] AOAC. (1995). Official methods of analysis 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. International, Arlington, VA, USA.
- [3] Audist M.K., Kay J.K. Thomson N.A., Napper A.R., Kolvers E.S.: Concentration of conjugated linoleic acid in milk from cows grazing pasture or fed a Total Mixed Ration for an entire lactation. *Proc. New Zeal. Soc. An.*, 2002, 62, 240-241.
- [4] Barłowska J., Sz wajkowska M., Litwińczuk Z., Król J.: Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Food Sci. Food Safety*, 2001, 10, 291-302.
- [5] Blasi F., Montesano D., Angelis M., Maurizi A., Ventura F., Cossignani L., Simonetti M.S, Damiani P.: Results of stereospecific analysis of triacylglycerol fraction from donkey, cow, ewe, goat and buffalo milk. *J. Food Compos. Anal.*, 2008, 21, 1-7.
- [6] Buscino L., Gianpietro P.G., Lucenti P., Lucaroni F., Pini C., Di Felice G.: Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, 105, 1031-1034.
- [7] Ceballos LS., Morales ER, de la Torre Adarve G., Castro JD., Martinez LP., Sampelayo MRS.: Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J. Food Compos. Anal.*, 2009, 22(4), 322-9.
- [8] Chiavari C., Coloretti F., Nanni M., Sorrentino E., Grazia L.: Use of donkey milk for fermented beverage with lactobacilli. *Lait*, 2005, 85, 481-490.
- [9] Coppola R., Salimei E., Succi M., Sorrentino E., Nanni M., Ranieri P.: Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Ann. Microbiol.*, 2002, 52, 55-60.

- [10] Darragh L., Lonnerdal B.: Human milk. J. W. Fuquay P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.) (2nd ed.) Encyclopedia of dairy sci., 2011, Vol. 3, 581-590, San Diego, CA, USA: Academic Press.
- [11] Fantuz F., Ferraro S., Todini L., Piloni R., Mariani P., Salimei E.: Donkey milk concentration calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium. *Inter. Dairy J.*, 2012, 24, 143-145.
- [12] Gaucheron F.: The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2005, 45(4), 473-83.
- [13] Gawęcki J., Hryniewiecki L.: Podstawy nauki o żywieniu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2007.
- [14] Gomes J.J.L., Duarte A.M., Batista A.S.M., Figueiredo R.M.F., Sousa E.P., Souza E.L., Queiroga R.C.R.E.: Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2013, 54, 18-24.
- [15] Guo H.Y., Pang K., Zhang X.Y., Zhao L., Chen S.W., Dong M.L., Ren F.Z.: Composition physicochemical properties, distribution, nitrogen fraction distribution and amino acid profile of donkey milk. *J. of Dairy Sci.*, 2007, 90, 1663-1643.
- [16] Herrouin M., Mollé D., Fauquant J., Ballestra F., Maubois J. L., Lenoil J.: New genetic variants identified in donkey's milk whey protein. *J. of Protein Chem.* 2000, 19, 105-115.
- [17] Iacono G., Carroccio A., Cavataio F.: Use of donkey's milk in multiple food allergy. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, 1992, 14, 177-81.
- [18] Innocente N., Parpinel M., Biasutti M.: Composition and nutritional value of donkey milk. *Proc. IDF International Symposium on Sheep and Goat and other non-Cow Milk*, Athens, Greece, May 2011, 16-18.
- [19] Jaworski J., Kuncewicz A.: Właściwości fizykochemiczne mleka. W: *Mleczarstwo*, tom I. Red. S. Ziajka, Wydawnictwo UWM, Olsztyn, 2008, 53-100.
- [20] Lara-Villoslada F., Olivares M., Xaus J.: The balance between casein and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity. *J. Dairy Sci.*, 2005, 88(5), 1654-60.
- [21] Leitner G., Chaffer M., Shamay A., Shapiro F., Merin U., Ezra E., Saran A., Silanikove N.: Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis sheep. *J Dairy Sci.*, 2004, 87(1), 46-52.
- [22] Looor J.J., Soriano F.D., Lin X., Herbein J.H., Polan C.E.: Grazing allowance after the morning or afternoon milking for lactating cows fed a Total Mixed Ration (TMR) enhances trans11-18:1 and cis9, trans11-18:2 (rumenic acid) in milk fat to different extents. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2003, 109(1), 105-19.
- [23] Massouras T., Bitsi N., Paramithiotis S., Manolopoulou E., Drosinos E.H., Triantaphyllopoulos K.A.: Microbial Profile Antibacterial Properties and Chemical Composition of Raw Donkey Milk. *Animals*, 2020, 10(11), 2001.
- [24] Michalski M. C. Briard V., Juaneda P.: CLA profile in native fat globules of different sizes selected from raw milk. *Int. Dairy J.*, 2005, 15(11), 1089-94.
- [25] Monti G., Bertino E., Muratore M.C., Coscia A., Cersi F., Silvestro L., Fabris C., Fortunato D., Giuffrida M.G., Conti A.: Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: An *in vivo* and *in vitro* study. *Pediatr. Allergy and Immunol.*, 2007, 18, 258-264.
- [26] Park Y.W., Juarez M., Ramos M., Haenli G.F.W.: Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 2007, 68, 88-113.
- [27] Piccione G., Fazio F., Caola G., Refinetti R.: Daily rhythmicity in nutrient content of asinine milk. *Livestock Science*, 2008, 116, 323-327.
- [28] Pilla R., Daprà V., Zecconi A., Piccinini R.: Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. *J. of Dairy Res.*, 2010, 77, 392-397.
- [29] PN EN-ISO 8968-1:2004. Mleko. Oznaczenie zawartości azotu. Część 1. Metoda Kjeldahla.
- [30] PN-75/A 86130. Mleko i Przetwory Mleczarskie – Napoje Mleczne – Metody Badań.

- [31] PN-93/A-86034/04. Badania mikrobiologiczne. Ogólna liczba drobnoustrojów – oznaczenie metodą płytkową w temperaturze 30°C.
- [32] PN-93/A-86034/06. Badania mikrobiologiczne. Drobnoustroje psychrotrofowe – oznaczania liczby metodą płytkową w temperaturze 6,5 i 21°C.
- [33] PN-93/A-86034/07. Badania mikrobiologiczne. Pleśnie i drożdże – oznaczanie liczby metodą płytkową w temperaturze 25°C.
- [34] PN-EN 14084:2004. Artykuły żywnościowe – Oznaczanie pierwiastków śladowych – Oznaczanie zawartości ołowiu, kadmu, cynku, miedzi i żelaza metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) po mineralizacji mikrofalowej.
- [35] PN-EN 15505:2009 Artykuły żywnościowe – Oznaczanie pierwiastków śladowych – Oznaczanie zawartości sodu i magnezu metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) po mineralizacji mikrofalowej.
- [36] PN-EN ISO 7218:2008. Mikrobiologia żywności i pasz. Wymagania ogólne zasady badań mikrobiologicznych.
- [37] PN-ISO 4831:2007 Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby bakterii z grupy coli – Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby.
- [38] Raynal-Ljutovac K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I., Chilliard Y.: Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Rumin. Res.*, 2008, 79(1), 57-72.
- [39] Salimei E., Fantuz F., Coppola R., Chiofalo B., Polidori P., Varisco G.: Composition and characteristics of ass's milk. *Animal Res.*, 2004, 53, 67-79.
- [40] Salimei E.: Animals that produce dairy foods – Donkey. In: *Encyclopaedia of Dairy Sciences*. Eds. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney. 2nd ed. Academic Press. San Diego, CA, USA, 2011, vol. 1, 365-373.
- [41] Sampson H.A.: Update of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, 113, 805-19.
- [42] Schaafsma G.: Nutritional significance of lactose and lactose derivatives. In H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sci.*, 2003. Vol. 3, 1529-1533. London: Academic Press.
- [43] Schroeder G.F., Delahoy J.E., Vidaurreta I., Bargo F., Gagliostro G.A., Muller L.D.: Milk fatty acid composition of cows fed a Total Mixed Ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat. *J. Dairy Sci.*, 2003, 86(10), 3237-48.
- [44] Szczepaniak A., Libudzisz A.: Mleko Kozie i jego właściwości. *Przeg. Mlecz.*, 2000, 5, 136-139.
- [45] Tidona F., Criscione A., Devold T.G., Bordonaro S., Marletta D., Vegarud G.E.: Protein composition and micelle size of donkey milk with different protein patterns: effects on digestibility. *Int. Dairy J.*, 2014, 35, 57-62.
- [46] Uniacke-Lowe T., Huppertz T., Fox P.F.: Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *Int. Dairy J.*, 2010, 20, 609-629.
- [47] Usajewicz I.: Mikrobiologia fermentowanych produktów mleczarskich. W: *Mleczarstwo*, tom I. Red. S. Ziajka, Wydawnictwo UWM, Olsztyn, 2008, 188-204.
- [48] Wszolek M.: Wartość odżywcza, właściwości fizykochemiczne i biologiczne składników mleka koziego. *Nowa Medycyna*, 1997, IV (9), 41-48.
- [49] Yangilar F.: As a potentially functional food: goat's milk and products. *J. Food Nutr. Res.*, 2013, 1(4), 69-81.
- [50] Zmarlicki S.: *Ćwiczenia z analizy mleka i produktów mlecznych*. SGGW, Warszawa 1978.

**THE ANALYSIS OF THE CHEMICAL COMPOSITION, MICROBIOLOGICAL QUALITY
AND THE POSSIBILITIES OF USING DONKEY'S MILK****S u m m a r y**

Background. The aim of the study was to compare the chemical composition, physicochemical properties and microbiological quality of milk from three animal species. The experimental material was raw cow's, goat's and donkey's milk. The basic chemical composition was analyzed (total protein, casein, whey protein, fat, lactose, dry matter, ash content). In addition, the profile of fatty acids and the content of mineral compounds, as well as the microbiological quality of each type of milk were determined.

Results and conclusion. Donkey's milk was characterized by the highest content of lactose (7.30 %), a low concentration of total protein (1.63 %) - with a high share of whey proteins (0.56 %) and the lowest fat content among the examined types of milk (0.38 %) - with the highest content of linoleic acids (6.95 %) and linolenic acids (9.38 %). Significant differences in the microbiological quality of donkey's milk were found, with the lowest total number of microorganisms ($3.53 \log \text{ cfu/cm}^3$), psychrotrophic bacteria ($2.26 \log \text{ cfu/cm}^3$) and coliform bacteria ($1.97 \log \text{ cfu/cm}^3$). The results obtained in this study exhibit significant differences between donkey's milk and cow's and goat's milk. Moreover, donkey's milk could be an alternative for children suffering from allergies to cow's milk protein, as well as a raw material for the production of new types of fermented beverages.

Key words: donkey's milk, basic composition, microbiological quality, mineral compounds, allergy, cow's milk protein, CMPA ☒

MARTA CHABEREK, MAŁGORZATA GNIEWOSZ, KATARZYNA POBIEGA,
KATARZYNA RYBAK

**CHARAKTERYSTYKA PAPIERU POWLECZONEGO OLEJKIEM
ETERYCZNYM I OCENA JEGO ZASTOSOWANIA
W PAKOWANIU MIĘSA WOŁOWEGO**

Streszczenie

Wprowadzenie. Opakowanie aktywne poprawia bezpieczeństwo mikrobiologiczne i właściwości sensoryczne żywności, przez co wydłuża okres przydatności produktu do spożycia. Do żywności podatnej na zanieczyszczenie mikrobiologiczne należy surowe mięso wołowe. *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* to patogeny powszechnie występujące w surowym mięsie, które są przyczyną zatruć pokarmowych konsumentów na całym świecie. Papier celulozowy jest powszechnie stosowany do pakowania surowego mięsa. Aktywny papier można uzyskać przez powleczenie papieru substancjami przeciwdrobnoustrojowymi. Rolę naturalnych konserwantów mogą pełnić roślinne olejki eteryczne. Celem badań była charakterystyka papieru powleczonego olejkami eterycznymi z kory cynamonowej, olejkami z liści cynamonowych lub olejkami goździkowymi i ocena jego zastosowania w pakowaniu surowego mięsa wołowego.

Wyniki i wnioski. Powleczenie papieru olejkami eterycznymi z kory cynamonowej lub olejkami goździkowymi zmieniło barwę papieru na żółto-białą w stosunku do niebiesko-białej barwy papieru kontrolnego i z dodatkiem olejku z liści cynamonowych. Powleczenie papieru wpłynęło na jego strukturę. Olejki eteryczne wniknęły w puste przestrzenie w papierze i wypełniły pory. Zapakowanie surowego mięsa wołowego powleczonym papierem ograniczyło wzrost *Listeria innocua* i *E. coli* podczas chłodniczego przechowywania. Barwa mięsa nie uległa zmianie przez 72 godziny. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania papieru powleczonego olejkami eterycznymi jako aktywnego opakowania do surowego mięsa wołowego.

Słowa kluczowe: opakowanie aktywne, papier, olejki eteryczne, surowe mięso wołowe

Inż. M. Chaberek, prof. dr hab. M. Gniewosz, ORCID: 0000-0003-2282-8231, dr inż. K. Pobiega, ORCID: 0000-0003-3532-8666, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, mgr inż. K. Rybak, ORCID: 0000-0003-3595-0818, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydział Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 150c, 02-776 Warszawa; Kontakt: malgorzata_gniewosz@sggw.edu.pl

Wprowadzenie

Ochrona żywności przed oddziaływaniem czynników zewnętrznych to podstawowa funkcja opakowania żywności. Wzrost popytu na żywność bezpieczniejszą i zdrowszą przyczynił się do rozwoju nowej koncepcji w utrwalaniu żywności zwanej opakowaniem aktywnym [30]. Jest to system, w którym produkt, opakowanie i środowisko oddziałują pozytywnie, poprawiając bezpieczeństwo i właściwości sensoryczne oraz utrzymując jakość produktu, co wydłuża okres przydatności do spożycia [3, 30]. W tym nurcie mieszczą się badania nad użyciem aktywnego, przeciwbakteryjnego materiału opakowaniowego do zwiększenia ochrony żywności przed rozwojem mikroorganizmów, w tym patogenów [19, 29]. Do żywności podatnej na zanieczyszczenie mikrobiologiczne należy świeże mięso. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* to patogeny powszechnie występujące w świeżym i przetworzonym mięsie, które są przyczyną zatrucia pokarmowych konsumentów na całym świecie [4].

Najszerzej stosowanymi materiałami w opakowaniach żywności są różnego rodzaju papiery i kartony [27]. Papier celulozowy wyróżnia się lekkością, niskim kosztem, dobrą biodegradowalnością i jest powszechnie akceptowany przez konsumentów [11, 15, 21]. Obiecującą metodą do uzyskania aktywnego papieru jest powlekanie substancjami o charakterze przeciwdrobnoustrojowym. W literaturze przedstawiono już badania papieru powleczonego chitosanem [10], nanocząsteczkami srebra [8], czy też eugenolem [14].

Olejki eteryczne roślin przyprawowych są od wielu lat badane pod względem przydatności do poprawy jakości i bezpieczeństwa żywności [25]. Szczególne znaczenie mają olejki eteryczne o aktywności przeciwdrobnoustrojowej ze względu na możliwość użycia ich jako naturalnych konserwantów [28]. Olejek eteryczny goździkowy pozyskiwany jest z pąków drzew *Syzygium aromaticum*. W składzie chemicznym olejku goździkowego występuje wiele aktywnych składników, takich jak eugenol, fenylopropanoid, ester monoterpenowy i β -kariofilen, które są bezpieczne, nietoksyczne i dobrze znane ze swoich właściwości przeciwbakteryjnych oraz przeciwutleniających. Olejek goździkowy ma udokumentowane działanie bakteriobójcze na niektóre z najważniejszych patogenów przenoszonych przez żywność, w tym *E. coli*, *L. monocytogenes* i *Salmonella* Typhimurium [1]. Olejek cynamonowy pozyskuje się m.in. z kory lub liści cynamonowca (*Cinnamomum verum*). Olejki eteryczne z kory cynamonowca zawierają wiele związków fenolowych, takich jak aldehyd trans-cynamonowy, limonen, eugenol i aldehyd benzoesowy, które mają dobre działanie przeciwbakteryjne i przeciwutleniające [12]. Wykazano, że olejek z kory cynamonowej jest skuteczny zarówno przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, jak i Gram-dodatnim, w tym między innymi *L. monocytogenes* i *E. coli* O157:H7 [5, 22]. Olejek eteryczny z kory cynamonowej zazwyczaj zawiera bardzo wysokie stężenie aldehydu cynamonowego i małe stężenie eugenolu. Odwrotnie, w składzie olejku z liści cynamonowych jest zazwyczaj

wysokie stężenie eugenolu, nawet do 60 ÷ 77 % i mniejsze – aldehydu cynamonowego. Udowodniono, że aldehyd cynamonowy ma najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne w porównaniu z innymi składnikami olejków eterycznych, np. eugenolem [18, 20].

Celem niniejszych badań była charakterystyka papieru powleczonego olejkami eterycznymi z kory cynamonowej, olejkami z liści cynamonowych lub olejkami goździkowymi pod względem wyglądu i barwy. Następnie oceniono jego zastosowanie w pakowaniu surowego mięsa wołowego. Badano hamowanie wzrostu *L. innocua* i *E. coli* na świeżym surowym mięsie wołowym zapakowanym w papier powleczony olejkami eterycznymi i przechowywanym w warunkach chłodniczych przez 72 godziny. Niepatogenna *L. innocua* została wybrana jako bakteria zastępcza dla chorobotwórczej bakterii *L. monocytogenes* w celu zapewnienia bezpieczeństwa pracy badaczom i wyeliminowania ekspozycji na ten patogen. Oba gatunki są genetycznie i fenotypowo podobne i dlatego w wielu badaniach naukowych bakterię *L. monocytogenes* zastępuje się bakterią *L. innocua* [13, 16]. Podczas przechowywania badano także wpływ pakowania mięsa wołowego w powleczony papier na barwę mięsa.

Material i metody badań

Materiałem do badań były: papier półpergaminowy (PolPak, Polska), trzy olejki eteryczne (OE) – z liści cynamonowych, kory cynamonowca i goździkowy (Sigma-Aldrich, Polska) oraz świeże surowe mięso wołowe z karku zakupione w handlu detalicznym.

Materiałem biologicznym były dwa szczepy referencyjnych bakterii *Listeria innocua* ATCC 33090 i *Escherichia coli* ATCC 13076 pochodzące z muzeum czystych kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW w Warszawie. Szczepy przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia w 25-procentowym glicerolu w temperaturze -80 °C. Przed każdym doświadczeniem szczepy uaktywniano w podłożu TSA (agar tryptonowo-sojowy, Biomaxima, Polska) w temperaturze 37 °C przez 18 ÷ 24 godziny. Następnie przy użyciu densimatu (BioMérieux, Francja) w soli fizjologicznej przygotowywano zawiesinę wyjściową szczepów o gęstości 0,5 stopnia w skali Mc Farlanda, co odpowiada około 1×10^8 komórek/cm³, którą stosowano do dalszych badań.

Papier powlekano każdym olejkiem eterycznym oddzielnie, uzyskując trzy doświadczone próbki; papier powleczony olejkami z liści cynamonowych (P+OECL), olejkami z kory cynamonowej (P+OECK) i olejkami goździkowymi (P+OEG). Próbką kontrolną był papier niepowleczony (P). Powlekanie arkuszy papieru wykonywano przy użyciu automatycznego aplikatora byko-drive XL (BYK Instruments, Niemcy) przy prędkości 20 mm/s, uzyskując grubość warstwy olejku na papierze 100 μm. Na-

stępnie arkusze papieru suszono w temperaturze 24 ± 2 °C przy RH 50 ± 5 % przez 24 godziny.

Barwę próbek papieru powleczonego i niepowleczonego oznaczano w 9 losowo wybranych punktach w systemie CIE L*a*b* przy użyciu kolorymetru (Konica Minolta CM-5 chromameter, Konica Minolta, Japonia). Obserwacje struktury (powierzchni i przekroju poprzecznego) papieru przeprowadzano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, Phenom XL, Thermo Fisher Scientific, USA) z napięciem przyspieszenia 5 kV. Wszystkie próbki zostały napyłone złotem przed obrazowaniem.

Próbki surowego mięsa wołowego aseptycznie krojono na kawałki o masie 10 g i naświetlano promieniowaniem UV przez 10 min z każdej strony w celu sterylizacji powierzchni mięsa. Następnie na powierzchnię mięsa наносzono po 150 µl inokulum *L. innocua* lub *E. coli* o gęstości 10^8 jtk/cm³, pozostawiano na 15 min w celu wnikięcia komórek bakterii i zawijano papierem. Przygotowywano po trzy serie inokulowanych bakteriami *L. innocua* lub *E. coli* próbek surowego mięsa wołowego zapakowanych w papier niepowleczony (próbka kontrolna P), papier powleczony olejkami z liści cytrynowych (P+OECL), olejkami z kory cytrynowca (P+OECK) lub olejkami goździkowymi (P+OEG). Zapakowane próbki mięsa przechowywano w temperaturze 4 ± 2 °C przez 72 godziny.

Próbki surowego mięsa wołowego odwijano z papieru, przenoszono do 90 cm³ zbuforowanej wody peptonowej i homogenizowano (Stomacher 400, Kleinfeld Labor-technik, Niemcy) przez 60 sek. Następnie przygotowywano szereg dziesiętnych rozcieńczeń w zbuforowanej wodzie peptonowej. Próbki mięsa inokulowane *L. innocua* pobrane z odpowiednich rozcieńczeń posiewano na dwie równoległe płytki z podłożem Oxford Agar (BTL, Polska), a inokulowane *E. coli* na płytki z podłożem XLD Agar (BTL, Polska). Płytki inkubowano w temperaturze 37 °C przez 24 godziny. Liczbę bakterii oznaczano w określonym czasie (godzina 0) oraz po 24 i 72 godzinach. Wynik przedstawiono w logarytmach liczby tworzącej kolonie w gramie mięsa.

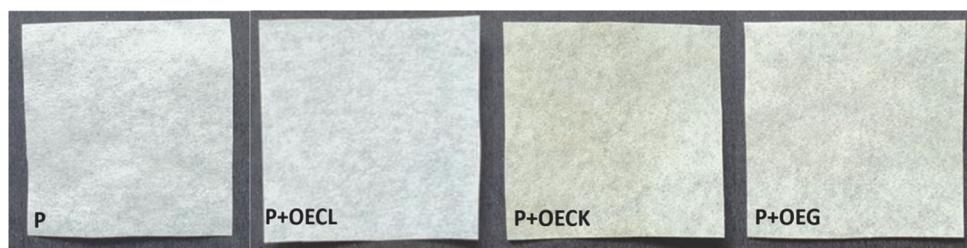
Przygotowywano również po trzy próbki surowego mięsa wołowego bez inokulacji bakteriami, które zapakowano w papiery powlezione olejkami eterycznymi oraz papier kontrolny i przechowywano w warunkach chłodniczych, jak wyżej. W próbkach oznaczano barwę surowego mięsa wołowego w systemie CIE L*a*b* (CM-5, Konica Minolta, Japonia) w określonym czasie (godzina 0) i po 72 godzinach. Pomiar barwy był wykonywany w trzech losowo wybranych miejscach mięsa w trzech równoległych próbkach (łącznie 9 pomiarów).

Obliczano średnie wyniki i odchylenie standardowe, korzystając z programu Excel 2011. Dokonano analizy wariancji Anova, a średnie wyniki porównano przy użyciu testu Tukeya w programie Statistica wersja 13.3.

Wyniki i dyskusja

Charakterystyka papieru powleczonego olejkami eterycznymi

Wygląd papieru powleczonego olejkami eterycznymi w stosunku do niepowleczonego papieru (próbki kontrolnej) przedstawiono na rys. 1, a wartości parametrów barwy papierów w tab. 1.



Rys. 1. Wygląd papieru niepowleczonego (P) i powleczonego olejkami z liści cytrynowych (P+OECL), olejkami z kory cytrynowej (P+OECK), olejkami goździkowymi (P+OEG)

Fig. 1. The appearance of uncoated paper (P) and paper coated with cinnamon leaf oil (P+OECL), cinnamon bark oil (P+OECK), clove oil (P+OEG)

Tabela 1. Wartości parametrów barwy L*, a*, b* papieru niepowleczonego (P), powleczonego olejkami z liści cytrynowych (P+OECL), olejkami z kory cytrynowej (P+OECK), olejkami goździkowymi (P+OEG)

Table 1. Values of the L*, a*, b* color parameters of uncoated paper (P), paper coated with cinnamon leaf oil (P+OECL), cinnamon bark oil (P+OECK), clove oil (P+OEG)

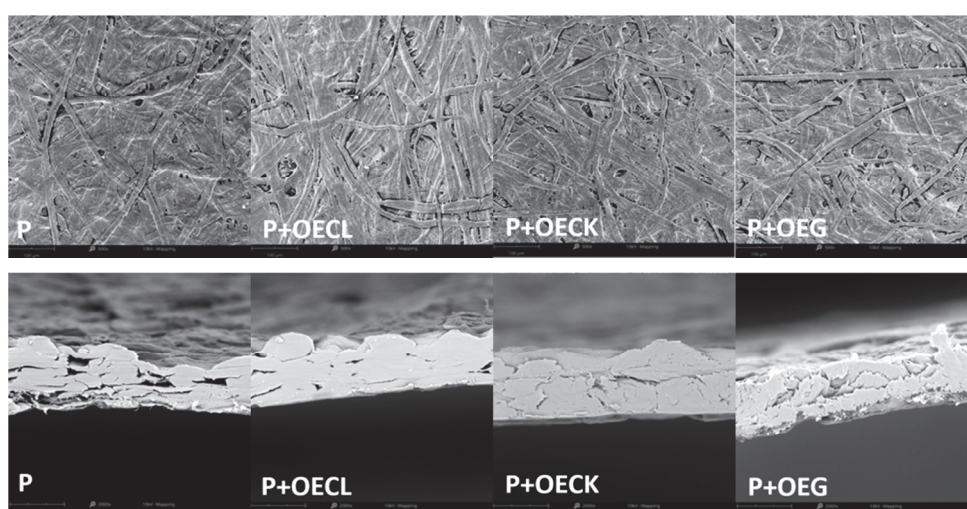
Parametry barwy Color parameters	Rodzaj papieru / Type of paper			
	P	P+OECL	P+OECK	P+OEG
L*	70,30 ^b ± 0,15	71,47 ^c ± 0,43	68,62 ^a ± 0,66	67,77 ^a ± 0,44
a*	- 0,28 ^b ± 0,01	- 0,30 ^b ± 0,02	- 0,55 ^a ± 0,1	- 0,45 ^a ± 0,03
b*	- 0,68 ^a ± 0,01	- 0,66 ^a ± 0,02	0,55 ^c ± 0,18	- 0,05 ^b ± 0,03
Δ E	-	1,18	1,95	2,63

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviations; $n = 9$; a, b – wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy $p \leq 0,05$ / mean values in rows denoted by different letters differ significantly statistically at $p \leq 0.05$.

Stwierdzono, że papier powleczony olejkami eterycznymi nie różnił się wyglądem od papieru niepowleczonego, z wyjątkiem barwy (rys. 1). Wartości parametrów a* i b*, które były bliskie zeru, reprezentują odpowiednio bardzo słabą intensywność w odcieniu zielonym (a*) oraz słabą w odcieniu niebieskim lub żółtym (b*) (tab. 1).

Papier niepowleczony (P) i papier powleczony olejkami z liści cynamonowych (P+OECL) miały wyższe ujemne wartości parametru b^* , co powodowało niebiesko-biały wygląd. Papiery powleczone warstwą olejku z kory cynamonowej (P+OECK) lub olejku goździkowego (P+OEG) delikatnie pociemniały i z powodu wyższych ujemnych wartości parametru a^* oraz dodatnich lub mniejszych ujemnych wartości parametru b^* miały żółto-biały wygląd. Zmiana barwy papieru w wyniku powleczenia olejkami eterycznymi była niewielka w zakresie od 1,18 do 2,64, co oznacza, że nie będzie zauważona przez przeciętnego konsumenta [24].



Rys. 2. Powierzchnia i przekrój poprzeczny papieru niepowleczonego (P) i papieru powleczonego olejkami eterycznymi, a obrazy SEM przedstawiono na rys. 2. Obserwowano nierówną i porowatą strukturę powierzchni papieru kontrolnego (P). Dodatkowo widoczne były splecione długie włókna celulozowe z licznymi porami o różnej wielkości. Na obrazach powierzchni papieru powleczonego olejkami eterycznymi można zaobserwować zmienioną strukturę powierzchni w stosunku do papieru niepowleczonego. W przekroju poprzecznym papieru kontrolnego uwidoczniły się warstwy włókien celulozowych z licznymi porami i nierówną grubością. Struktura papierów powleczonych olejkami eterycznymi w przekroju poprzecznym była bardziej jednolita, a grubość większa. Dodatkowo, w przekroju poprzecznym kształt włókien celulozowych był prawie niewidoczny z wypełnionymi porami między nimi. Podobne zmiany struktury papieru

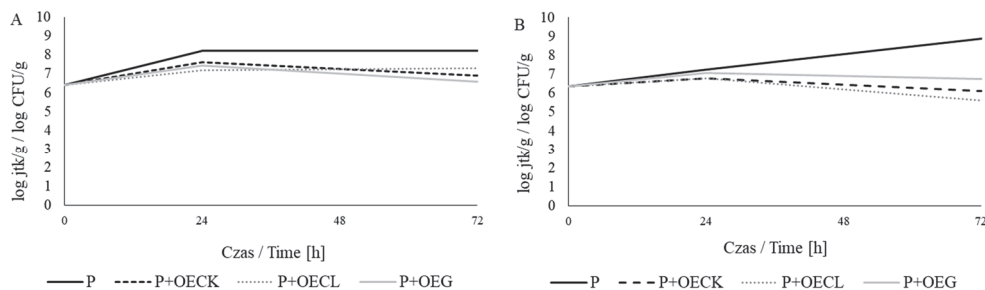
Fig. 2. The surface and cross-section of uncoated paper (P) and paper coated with cinnamon leaf oil (P+OECL), cinnamon bark oil (P+OECK), clove oil (P+OEG)

Przeprowadzono obserwacje struktury papieru niepowleczonego i powleczonego olejkami eterycznymi, a obrazy SEM przedstawiono na rys. 2. Obserwowano nierówną i porowatą strukturę powierzchni papieru kontrolnego (P). Dodatkowo widoczne były splecione długie włókna celulozowe z licznymi porami o różnej wielkości. Na obrazach powierzchni papieru powleczonego olejkami eterycznymi można zaobserwować zmienioną strukturę powierzchni w stosunku do papieru niepowleczonego. W przekroju poprzecznym papieru kontrolnego uwidoczniły się warstwy włókien celulozowych z licznymi porami i nierówną grubością. Struktura papierów powleczonych olejkami eterycznymi w przekroju poprzecznym była bardziej jednolita, a grubość większa. Dodatkowo, w przekroju poprzecznym kształt włókien celulozowych był prawie niewidoczny z wypełnionymi porami między nimi. Podobne zmiany struktury papieru

były obserwowane po powleczeniu hydrożelową powłoką składającą się z nanowłókien celulozy utlenionej z gumą guar, która nie tylko utworzyła błonę na powierzchni papieru, ale także częściowo wniknęła w jego pory. Powłoka hydrożelowa, podobnie jak spoiwo, zwiększała adhezję pomiędzy włóknami, co również przyczyniło się do poprawy właściwości mechanicznych papieru. Analiza danych wskazuje, że również zaobserwowano poprawę wytrzymałości na rozciąganie papieru po jego powleczeniu alginianem sodu z karboksymetylocelulozą w wyniku poprawy wiązania między włóknami [2, 23].

Ocena zastosowania papieru powleczanego olejkami eterycznymi w pakowaniu mięsa wołowego

Mięso dostępne na rynkach detalicznych powinno być stabilnej jakości i wolne od chorobotwórczych bakterii i grzybów, które mogą powodować poważne choroby ludzi. Liczba mikroorganizmów jest jednym z najważniejszych wskaźników oceny świeżości mięsa [6]. Na rys. 3 przedstawiono zmiany liczby bakterii na mięsie wołowym zapakowanym powleczonym papierem podczas chłodniczego przechowywania.



Rys. 3. Zmiana liczby *L. innocua* (A) i *E. coli* (B) na mięsie wołowym zapakowanym papierem powleczonym olejkami eterycznymi podczas chłodniczego przechowywania. P – papier niepowleczony, (P+OECL) – papier powleczony olejkami z liści cynamonowych, (P+OECK) – papier powleczony olejkami z kory cynamonowej, (P+OEG) – papier powleczony olejkami goździkowymi

Fig. 3. A change in the number of *L. innocua* (A) and *E. coli* (B) on beef packaged in paper coated with essential oils during refrigerated storage. P – uncoated paper, (P+OECL) – paper coated with cinnamon leaf oil, (P+OECK) – paper coated with cinnamon bark oil, (P+OEG) – paper coated with clove oil

Liczba *L. innocua* w mięsie zapakowanym w papier niepowleczony zwiększyła się o około 2 cykle logarytmiczne już po 24 godzinach i utrzymywała się na tym poziomie przez 72 godziny. W próbkach mięsa zapakowanego w papiery P+EOG i P+EOCK liczba *L. innocua* nie zwiększyła się po 72 godzinach. W mięsie zapakowanym w papier P+OECL liczba *L. innocua* wzrosła o około 1 cykl logarytmiczny. Podobnie, podczas 72 godzin przechowywania nastąpił wzrost liczby *E. coli* w mięsie

zapakowanym w papier niepowleczony (P) o 2 cykle logarytmiczne. W próbkach mięsa zapakowanego w papier P+OECL stwierdzono redukcję liczby *E. coli* o około 1 cykl logarytmiczny, a w próbkach zapakowanych papierami P+OEG i P+OECK nie było zmiany liczby *E. coli*.

Wzrost aktywności drobnoustrojów w produktach spożywczych wskazuje na proces psucia się. W niniejszym badaniu liczba *L. innocua* i *E. coli* była znacząco niższa w próbkach surowego mięsa wołowego zapakowanego papierem powleczonym olejkami eterycznymi w porównaniu z próbkami zapakowanymi niepowleczonym papierem. Siła hamowania rozwoju bakterii na mięsie przez olejki eteryczne umieszczone w formie warstwy na papierze była podobna, mimo różnic w ich składzie chemicznym [1, 12, 18, 20]. Olejki cynamonowy i goździkowy są bardzo skuteczne w zwalczaniu mikroorganizmów psujących żywność [26]. Olejek z kory i liści cynamonowych oraz olejek goździkowy osłabiają ścianę komórkową i błonę cytoplazmatyczną bakterii, dzięki czemu aktywne składniki olejku mogą wnikać do komórek. W konsekwencji składniki te reagują z grupami -SH w miejscach aktywnych enzymów, powodując ich inaktywację i przyczyniają się do śmierci komórek [20]. Obiecujące wyniki uzyskali Rodríguez i wsp. [19], którzy badali działanie przeciwdrobnoustrojowe papieru z aktywną powłoką parafinową zawierającą olejek cynamonowy. Stwierdzono, że papier znacząco hamował wzrost Gram-ujemnych bakterii *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* i *Pseudomonas aeruginosa*, ale nie hamował rozwoju bakterii Gram-dodatnich.

Tabela 2. Zmiana barwy mięsa wołowego opakowanego powleczonym papierem podczas chłodniczego przechowywania

Table 2. Color change of beef wrapped in coated paper during refrigerated storage

Rodzaj papieru Type of paper	Czas / Time [h]	Parametry barwy mięsa / Meat color parameters		
		L*	a*	b*
P	0	28,01 ^a ± 1,27	11,91 ^b ± 1,11	7,62 ^a ± 0,38
	72	31,28 ^a ± 1,26	8,04 ^a ± 0,87	7,94 ^a ± 0,67
P+OECL	0	26,51 ^a ± 1,99	12,05 ^b ± 1,15	8,62 ^a ± 0,89
	72	26,96 ^a ± 2,54	11,75 ^b ± 0,29	8,39 ^a ± 0,90
P+OECK	0	26,82 ^a ± 2,07	11,85 ^b ± 0,66	7,80 ^a ± 0,86
	72	28,04 ^a ± 1,27	11,04 ^b ± 0,84	7,53 ^a ± 0,79
P+OEG	0	27,58 ^a ± 1,79	11,39 ^b ± 1,03	8,41 ^a ± 0,81
	72	26,78 ^a ± 2,30	9,83 ^{ab} ± 0,61	9,08 ^a ± 0,20

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; $n = 9$; a, b – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy $p \leq 0,05$ / mean values in columns denoted by different letters differ significantly statistically at $p \leq 0.05$

Barwa jest ważnym atrybutem jakości mięsa, który jest postrzegany przez konsumentów jako wskaźnik świeżości. Na barwę wpływa zmienność pigmentów występujących w mięsie, takich jak zawartość mioglobiny i jej formy [7, 9]. Wartości barwy CIE próbek surowego mięsa wołowego zapakowanego niepowleczonym i powleczonym papierem podczas chłodniczego przechowywania przedstawiono w tab.2. Zapakowanie surowego mięsa wołowego papierem powleczonym olejkami eterycznymi nie miało wpływu na jasność barwy mięsa (L^*) oraz nasycenie barwy czerwonej (a^*) i żółtej (b^*) podczas 72 godzin chłodniczego przechowywania. Szczególnie ważne są zmiany wartości a^* , ponieważ stopień czerwoności mięsa jest elementem atrakcyjności wizualnej dla konsumentów [17]. Stwierdzono, że po 72 godzinach mięso zapakowane w papier niepowleczony miało istotnie statystycznie zmniejszoną wartość parametru a^* , co oznacza utratę intensywności czerwoności mięsa. Tak istotnych zmian wartości a^* nie obserwowano po 72 godzinach w barwie mięsa zapakowanego w papier powleczony, co sugeruje korzystny wpływ olejków eterycznych na stabilność czerwoności mięsa. Radha Krishnan i wsp. [17] stwierdzili ochronne działanie ekstraktów przypraw i ziół na stabilizację barwy surowego mięsa wołowego podczas 15-dniowego chłodniczego przechowywania. Podobnie potraktowanie mielonego mięsa jagnięcego olejkami z kory cynamonowej zminimalizowało zmiany barwy [9]. Może to być spowodowane obecnością w olejku z kory cynamonowej związków bioaktywnych, takich jak aldehyd cynamonowy i inne polifenole, które odpowiadają za działanie antyoksydacyjne w mięsie, hamując procesy utleniania tłuszczu [17].

Wnioski

1. Powleczenie papieru olejkami eterycznymi z kory cynamonowej lub olejkami goździkowymi zmieniło barwę papieru na żółto-białą. Z kolei olejek z liści cynamonowych miał niebiesko-białą barwę i nie różnił się od barwy papieru kontrolnego. Zmiana barwy papieru w wyniku powleczenia olejkami eterycznymi była niewielka i nie będzie zauważona przez przeciętnego konsumenta.
2. Powleczenie papieru olejkami eterycznymi wpłynęło na jego strukturę. Olejki eteryczne wniknęły w puste przestrzenie w papierze i wypełniły pory, dzięki czemu struktura papierów w przekroju poprzecznym była bardziej jednolita, a grubość większa w stosunku do papieru kontrolnego.
3. Zapakowanie surowego mięsa wołowego powleczonym papierem ograniczyło wzrost *L. innocua* i *E. coli* podczas przechowywania w temperaturze 4 °C przez 72 godziny. Barwa mięsa nie uległa zmianie przez 72 godzinach.
4. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania papieru powleczonego olejkami eterycznymi jako aktywnego opakowania do surowego mięsa wołowego.

5. Konieczne jest przeprowadzenie badań mięsa wołowego zapakowanego w papier powleczony olejkami eterycznymi w celu weryfikacji ewentualnych zmian jakości sensorycznej mięsa.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem automatycznego aplikatora warstw (byko-drive XL), skaningowego mikroskopu elektronowego (Phenom XL) i automatycznego licznika kolonii mikroorganizmów (ProtoCol-3) zakupionego w ramach projektu „Centrum żywności i żywienia - modernizacja kampusu SGGW w celu stworzenia Centrum Badawczo-Rozwojowego Żywności i Żywienia (CŻiŻ)” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Mazowieckiego na lata 2014-2020 (nr projektu RPMA.01.01.00-14-8276/17).

Literatura

- [1] Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Kahla-Nakbi A. B., Rouabhia M., Mahdouani K., Bakhrouf A.: The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*, L. Myrtaceae): A short review. *Phytother. Res.*, 2007, 21, 501-506.
- [2] Dai L., Xi X., Li X., Li W., Du Y., Lv J., Wang W., Ni Y.: Self-assembled all-polysaccharide hydrogel film for versatile paper-based food packaging. *Carbohydr. Polym.*, 2021, 271(1), 118425.
- [3] Domínguez R., Barba F.J., Gómez B., Putnik P., Kovačević D.B., Pateiro M., Santos E.M., Lorenzo J.M.: Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food Res. Int.*, 2018, 113, 93-101.
- [4] EFSA: The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.*, 2021, 2 (19), #6406
- [5] Ghabraie M., Vu K.D., Tata L., Salmieri S., Lacroix M.: Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2016, 66, 332-339.
- [6] Hammad H.H.M., He L., Nawaz Z., Jin G., Huang X., Ma M., Abdegadir W.S., Elgasim E.A., Khalifa I.: Effect of frozen and refrozen storage of beef and chicken meats on inoculated microorganisms and meat quality. *Meat Sci.*, 2021, 175, #108453.
- [7] Hammad H.H.M., Ma M., Jin G., He L.: Nitroso-hemoglobin preparation and meat product colorant development. *J. Food Process. Technol.*, 2017, 8(2), #1000658.
- [8] He Y., Li H., Fei X., Peng L.: Carboxymethyl cellulose/cellulose nanocrystals immobilized silver nanoparticles as an effective coating to improve barrier and antibacterial properties of paper for food packaging applications. *Carbohydr. Polym.*, 2021, 252, #117156.
- [9] Hussain Z., Li X., Zhang D., Hou C., Ijaz M., Bai Y., Xiao X., Zheng X.: Influence of adding cinnamon bark oil on meat quality of ground lamb during storage at 4 °C. *Meat Sci.*, 2021, 171, #108269.
- [10] Jung J., Kasi G., Seo J.: Development of functional antimicrobial papers using chitosan/starch-silver nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 112, 530-536.
- [11] Koga H., Kitaoka T., Isogai A.: In situ modification of cellulose paper with amino groups for catalytic applications. *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 9356-9361.
- [12] Li Y., Kong D., Wu H.: Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Ind. Crops Prod.*, 2013, 41, 269-278.

- [13] Mohan V., Wibisono R., de Hoop L., Summers G., Fletcher G.C.: Identifying suitable *Listeria innocua* strains as surrogates for *Listeria monocytogenes* for horticultural products. *Front. Microbiol.*, 2019, 10, #2281.
- [14] Muratore F., Barbosa S.E., Martini R.E.: Bioactive paper by eugenol grafting onto cellulose. Effect of reaction variables. *Food Packag. Shelf Life*, 2018, 15, 159-168.
- [15] Muratore F., Barbosa S.E., Martini R.E.: Development of bioactive paper packaging for grain-based food products. *Food Packag. Shelf Life*, 2019, 20, #100317.
- [16] O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Martin, E.M., Griffiths, C.L., Johnson, M.G.: Heat resistance of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157: H7, and *Listeria innocua* M1, a potential surrogate for *Listeria monocytogenes*, in meat and poultry: a review. *J. Food Sci.*, 2006, 71, R23-R30
- [17] Radha Krishnan K., Babuskin S., Babu P.A.S., Fayidh M.A., Sabina K., Archana G., Sukumar M.: Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. *J. Sci. Food Agr.*, 2014, 94,2456-2463.
- [18] Ribeiro-Santos R., Andrade M., Madella D., Martinazzo A.P., Moura L. D.A.G., de Melo N.R., Sanches-Silva A.: Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: cinnamon. *Trends Food Sci. Technol.*, 2017, 62, 154-169.
- [19] Rodriguez A., Batlle R., Nerin C.: The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Prog. Org. Coat.*, 2007, 60, 33-38.
- [20] Sánchez-Rubio M., Taboada-Rodríguez A., Cava-Roda R., Lopez-Gomez A., Marín-Iniesta F.: Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2016, 73, 140-146.
- [21] Shankar S., Bang Y.-J., Rhim J.-W.: Antibacterial LDPE/GSE/Mel/ZnONP composite film-coated wrapping paper for convenience food packaging application. *Food Packag. Shelf Life*, 2019, 22, #100421.
- [22] Sharma V., Rao L.J.M.: An overview on chemical composition, bioactivity and processing of leaves of *Cinnamomum tamala*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2014, 54(4), 433-448.
- [23] Sheng J., Li J., Zhao L.: Fabrication of grease resistant paper with nonfluorinated chemicals for food packaging. *Cellulose*, 2019, 26(10), 6291-6302.
- [24] Szopa P., Czerniak J., Gacek A.: Zastosowanie pomiarów dwuwidmowych barwy w towaroznawstwie. *Zesz. Nauk. UEK*, 2013; 924, 59-74.
- [25] Tiwari B.K., Valdramidi V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J.: Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 5987-6000.
- [26] Torrecilhas J.A., Ornaghi M.G., Passeti R.A.C., Mottin C., Guerrero A., Ramos T.R., Pelaez Vital A.C., Sañudo C., Malherois E.B., do Prado I.N.: Meat quality of young bulls finished in a feedlot and supplemented with clove or cinnamon essential oils. *Meat Sci.*, 2021, 174, #108412.
- [27] Triantafyllou V.I., Akrida-Demertzi K., Demertzis P.G.: A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard materials to solid food matrices. *Food Chem.*, 2007, 101, 1759-1768.
- [28] Velluti A., Sanchis V., Ramos A.J., Egidio J., Marín, S.: Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.*, 2013, 89(2-3), 145-154.
- [29] Won M.M., Cha E-J, Yoon O-K, Kim N-S, Kim K., Lee D-S.: Use of headspace mulberry paper bag micro solid phase extraction for characterization of volatile aromas of essential oils from Bulgarian rose and Provence lavender. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 631, 54-61.
- [30] Yildirim S., Rocker B., Pettersen M.K., Nilsen-Nygaard J., Ayhan Z., Rutkaite R., Radusin T., Suminska P., Begonya Marcos B., Coma V.: Active packaging applications for food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2018, 17, 165-199.

THE CHARACTERIZATION OF PAPER COATED WITH ESSENTIAL OILS AND THE EVALUATION OF ITS USE IN THE PACKAGING OF BEEF

S u m m a r y

Background. Active packaging improves the microbial safety and sensory properties of food, extending shelf life of the stored product. Raw beef is an example of food prone to microbial contamination. *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* are commonly found in raw meat, and their presence can lead to food poisoning of consumers worldwide. Cellulose paper is commonly used to wrap raw meat. Active paper can be obtained by coating the paper with antimicrobial agents. Plant-derived essential oils can act as a natural preservative. The aim of the study is the characterization of paper coated with cinnamon bark essential oil, cinnamon leaf essential oil and clove essential oil, as well as the evaluation of its use in packing raw beef.

Results and conclusion. Coating paper with cinnamon bark essential oil and clove essential oil changed the color of paper to yellow and white compared to the blue and white colors of the control sample and paper enriched with cinnamon leaf essential oil. Coating the paper affected its structure. Essential oils penetrated the voids in the paper and filled the pores. Wrapping raw beef in the coated paper reduced the growth of *Listeria innocua* and *E. coli* during refrigerated storage. Wrapping beef in the coated paper did not affect the beef color during 72-hour storage. The results obtained indicate the possibility of using paper coated with essential oils as active packaging for raw beef.

Key words: active packaging, paper, essential oils, raw beef ☒

IWONA KAWACKA, AGNIESZKA OLEJNIK-SCHMIDT

GENOSEROTYPING OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS ORIGINATING FROM MEAT PRODUCTS AND MEAT PROCESSING ENVIRONMENTS

Summary

Background. *Listeria monocytogenes* is a foodborne human pathogen and a causative factor of listeriosis, which is an illness with a high mortality rate. Serotyping is a method for differentiating *L. monocytogenes* isolates based on unique combinations of somatic (O) and flagellar (H) antigens on the surface of their cells. Standard serotyping involves agglutination methods, which require using antisera. However, there are also genoserotyping methods which allow to categorise *L. monocytogenes* isolates into particular groups of serotypes (referred to as serogroups) based on genetic analyses. Differentiating *L. monocytogenes* isolates is an important issue in terms of food safety, surveillance and traceability of contamination sources. In this work, we present results of the genoserotyping of 153 *L. monocytogenes* isolates originating from meat products and meat processing environments at Polish processing plants. Two protocols were used for genoserotyping analyses: the first one allows to differentiate between four most common serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) and the second one allows to distinguish hypervirulent serovar 4h from other serotypes.

Results and conclusion. Results achieved using both methods were consistent and all isolates were categorised into corresponding serogroups within the two methodologies. Most of the isolates (73.9 %) were characterised as members of the IIa serogroup (representing the 1/2a, 3a serovars). The IVb (4b, 4d, 4e) serogroup was the second most common (and comprised 18.3 % of isolates), followed by IIb (1/2b, 3b, 7) and IIc (1/2c, 3c), however, the last two groups were equally numerous (and each of them comprised 3.9 % of all isolates). None of the collected isolates belonged to the serogroup representing the 4a, 4c, 4ab and 4h serotypes.

Key words: serotyping, genoserotyping, serotypes, food safety, food surveillance

Introduction

Listeria monocytogenes is a bacterium that can be found in a variety of food products, including meat, fish, milk and vegetables [12, 18]. Heat treatment inactivates

Mgr inż. I. Kawacka ORCID: 0000-0002-8010-7531, dr hab. A. Olejnik-Schmidt, ORCID: 0000-0002-5418-5632, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań; Kontakt: iwona.kawacka@up.poznan.pl

bacteria of that species, however, products can sometimes be contaminated after processing and due to that fact *L. monocytogenes* can be found in both raw and processed foods [2]. The bacterium can also settle in food processing environments, which may be a cause of food contamination [2, 18]. *L. monocytogenes* is tolerant to high salt concentration (up to 10 %) and low pH (in the range of 3 ÷ 9), as well as is able to proliferate at refrigeration temperatures (minimum 0 ÷ 1 °C), which makes the bacterium challenging to control in food products [2, 12].

L. monocytogenes consumed with contaminated food may cause an infection, called listeriosis, which is manifested as acute febrile gastroenteritis (with symptoms such as fever, diarrhoea, muscle pain and headache). However *L. monocytogenes* can cross intestinal barrier, blood-brain barrier and maternal-foetal barrier, leading to invasive listeriosis. Those types of infections can cause septicaemia, maternal-foetal infections (often resulting in abortions or stillbirths) or neurolisteriosis (e.g. in a form of meningitis) [18]. A mortality rate of listeriosis reaches 20 ÷ 30 % [2, 24].

Bacteria that belong to *L. monocytogenes* genus can be differentiated on the basis of their unique combinations of somatic (O) and flagellar (H) antigens on cells' surface [3, 11, 19]. Currently, there are 14 known serotypes (marked with the following symbols: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7, 4h) [9, 23], but only four of them (namely 4b, 1/2a, 1/2b, 1/2c) cause more than 95 % listerial cases and comprise more than 95 % isolates from food products [9]. Interestingly, the 1/2a isolate is the most frequently isolated from food, whereas the 4b serotype is responsible for the majority of infections [3, 20].

Standard agglutination methods with antisera can be used for stereotyping *L. monocytogenes* strains, however, the technique is limited by costs, availability and the need for technical expertise. Furthermore, the reproducibility of the results is not always satisfactory [9]. To increase the ease and accessibility of this classification system [3], some authors proposed PCR-based genoserotyping protocols. Genoserotyping is based on detecting particular genes in bacterial genome, which allows to categorise isolates into particular groups of serotypes (referred to as serogroups).

The first PCR-based genoserotyping methodology, established by Borucki and Call [3], included four pairs of primers and allowed to categorise bacteria into five serotype groups. However, PCR reactions need to be held separately, not in multiplex PCR, which increases analysis time. First multiplex-PCR serotyping protocol was proposed by Doumith et al. [9]. It allows to differentiate 4 major *L. monocytogenes* serovars (namely 4b, 1/2a, 1/2b, 1/2c) and therefore the technique has discriminatory power similar to traditional serotyping (as 95 % of isolates belongs to one of those four serotypes). Specifically, the methodology allows to differentiate serogroups: IIa (including the 1/2a, 3a serovars), IIb (1/2b, 3b, 7), IIc (1/2c, 3c), IVb (4b, 4d, 4e) and serogroup L (including all other *Listeria sensu stricto* species and remaining serotypes

of *L. monocytogenes*: 4a, 4c, 4ab and 4h) [5,13]. Although the protocol of Doumith et al. [9] is commonly accepted, the 4h serovar, which has been discovered recently, cannot be distinguished from other serovars by this protocol. The isolates of the 4h serovar are considered hypervirulent, posing a threat to food safety [23], and due to that fact Feng et al. [10] proposed an assay in which the 4h serovar is specifically distinguished from other serotypes [10]. There are also other protocols regarding genosertotyping of *L. monocytogenes* strains in multiplex-PCR reactions [6,8,15], a serotyping scheme using a combination of an antibody-based serogrouping and a multiplex PCR assay [4] and protocols for real-time PCR [1,21].

In general, the identification of genosertotypes is one of the methods of differentiating *L. monocytogenes* strains, which is an important issue in terms of food safety, food surveillance and traceability of contamination sources. Alía et al. [1] stated that carrying out the correct differentiation of *L. monocytogenes* serotypes is of utmost importance, as the epidemiology and persistence of this bacterium in meat processing plants may be related to its serotype [1].

Our hypothesis is that *L. monocytogenes* isolates originating from Polish meat products and meat processing environments present diverse genosertotypes. The aim of this research was to determine the genosertotypes of *L. monocytogenes* strains of that origin and additionally to compare the results obtained with two genosertotyping protocols – the one that is commonly accepted, proposed by Doumith et al. [9], and the modern one, put forward by Feng et al. [10].

Materials and methods

Microorganisms

Strains of putative *Listeria* spp. originating from Polish meat products (raw and processed ones) and meat processing environments in Poland were obtained during routine microbiological quality analyses. Environmental samples were obtained from surfaces both being in contact with food (e.g. knife surface, workers' gloves or transport boxes) and not coming into contact with food (e.g. shoe soles, floors or walls of a facility). The samples were collected between October 2020 and November 2021. Microorganisms were isolated on plates with selective agar media (OXFORD or ALOA). Bacteria from one colony of typical appearance were restreaked on Brain Heart Infusion (BHI) (POCH, Poland) agar plate and incubated at 37 °C for 24 hours prior to DNA isolation. Overall, 153 *L. monocytogenes* isolates were obtained from the samples delivered, 45 of which originated from the environment and 108 originated from food products. Details regarding the origin of the samples are presented in Fig. 1.

DNA isolation

Microorganisms were removed from 24-hour BHI agar plate culture with a sterile inoculation loop and subjected to DNA isolation procedure. Isolation was performed with a commercially available kit Genomic Mini (A&A Biotechnology, Poland), in line with the manufacturer's instructions. DNA concentration was measured with a Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop, USA).

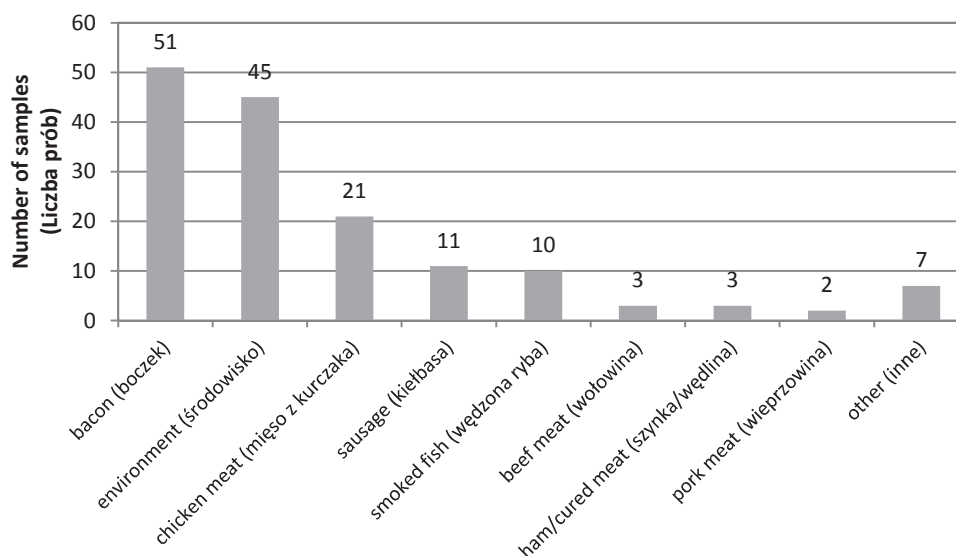


Fig. 1. Bar chart showing the sources of the samples included in the study

Rys. 1. Wykres słupkowy obrazujący źródła pochodzenia prób uwzględnionych w badaniu

Confirmation of species affiliation

Species were confirmed as *L. monocytogenes*, using two genetic methods, namely RFLP-PCR by Paillard et al. [16] and multiplex PCR by Li et al. [14], according to the protocols described in the references, with minor modifications. PCRs were performed in 10 μ L final volume using RUN polymerase (A&A Biotechnology, Poland). Restriction digestions were performed using HhaI and XmnI (ThermoFisher Scientific, USA) enzymes with a corresponding Tango buffer. Only microorganisms confirmed as *L. monocytogenes* with both techniques were included in the study.

Genoserotyping

Genoserotyping was performed with multiplex PCR reactions, according to two protocols proposed by Doumith et al. [9] and Feng et al. [10], with minor modifica-

tions. Primers, whose sequences are presented in Table 1, were synthesised to order by Genomed company.

In genosertotyping protocol according to Doumith et al. [9], the multiplex mixture contained 1U of *Taq* RUN polymerase (A&A Biotechnology) and compatible reaction buffer at recommended concentration, 0.2 mM dNTPs (A&A Biotechnology) and 1.5 μ M of *lmo1118*, 1.0 μ M of: *lmo0737*, ORF2819 and ORF2110, and 0.2 μ M of *prs* final concentration for each primer. DNA was added in the amount of 10 ng per reaction. The mixture was filled with water to reach the final volume of 10 μ L. Negative control sample with PCR-grade water used instead of DNA was employed in each reaction set. PCR was performed in T-Gradient thermocycler (Biometra) with the following programme: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles of: 94 °C for 24 s, 53 °C for 69 s, 72 °C for 69 s; and a final step of 72 °C for 7 min.

In the genosertotyping protocol proposed by Feng et al. [10], the multiplex mixture was prepared in a similar way as described above, however, different primers were used, namely: *LMxysn_1095*, *lmo1083* and *smcL*, all at final concentration of 0.25 μ M. DNA isolated from *L. ivanovii* ATCC 19119 was used as a positive control for *smcL* amplicon, as well as PCR-grade water was used as a negative control sample in each reaction set. PCR was performed with the following programme: initial denaturation at 95 °C for 5 min; 30 cycles: at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min; and a final step at 72 °C for 10 min.

Table 1. Primers used in the study and their sequences
Tabela 1. Startery użyte w badaniu i ich sekwencje

Primers' name Nazwa starterów	Primers' sequence (5' → 3') Sekwencja starterów (5' → 3')	Product size (bp) Rozmiar produktu (pz)	Reference Źródło
<i>lmo0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCGCTTGCCATTC	691	Doumith et al. protocol [9]
<i>lmo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	906	
ORF2819	F: AGCAAAAATGCCAAAACCTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTTG	471	
ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	
<i>prs</i>	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTGCGG	370	
<i>LMxysn_1095</i>	F: AATACTTGGACAGACGGAACGC R: TCATCTGGCTCTTTTAGAACCG	602	Feng et al. protocol [10]
<i>lmo1083</i>	F: CACAAATGGTCTTGACGGGG R: TTTGCGCGTGATTTAGTGG	390	
<i>smcL</i>	F: CACAGACCATTGTGGTGACTTG R: CGGTGCTTTCATTTTTTACTC	889	

Reaction products were separated on 2 % agarose gel (dyed with ethidium bromide) in $1 \times$ TAE buffer and visualised using Gel Doc Imaging System (Bio-Rad).

Data analysis

Microsoft Excel 2007 software was used to analyse the data and prepare the charts.

Results and discussion

In this study, we present the results of the genoserotyping of 153 *L. monocytogenes* isolates originating from meat products and processing environments. Experiments were performed in line with two genoserotyping protocols. The results achieved by employing both methodologies, which are presented in Fig. 2, were consistent and coherent in the case of all isolates, meaning that all of the samples were categorised into corresponding serogroups within the two methodologies. Hypothesis that isolates originating from Polish meat products and meat processing environments present diverse genoserotypes was confirmed by both methodologies.

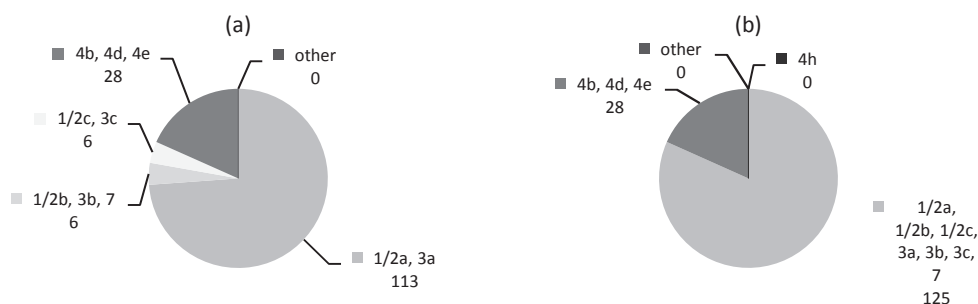


Fig. 2. Pie chart representing the results of genoserotyping acc. to: (a) Doumith et al. [9]; (b) Feng et al. [10] protocol

Rys. 2. Wykres kołowy przedstawiający wyniki genoserotypowania otrzymane według protokołu: (a) Doumith i wsp. [9]; (b) Feng i wsp. [10]

In the protocol according to Feng et al. [10], none of the isolates was identified as the 4h serovar, as well as none of the isolates was classified as a member of the serogroup consisting of the other serovars (4a, 4ab and 4c). Owing to that, in the case of our samples, the methodology of Doumith et al. [9] allowed to achieve more detailed results, as one serogroup (comprising the 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c and 7 serovars) from the protocol of Feng et al. [10] was further separated into three distinct groups in the protocol of Doumith et al. [9] (as can be seen in Fig. 2). Detailed results of serogrouping achieved in the protocol of Doumith et al. [9], with separation into samples from food products and processing environments, are presented in Table 2.

Most of the isolates included in the study (73.9 %) belonged to the IIa serogroup, whereas the IVb serogroup was the second most common (and comprised 18.3 % of all of the samples). Six isolates (3.9 %) were identified as belonging to the IIb serogroup, of which 4 were detected in food (these were samples from brawn (Polish *salceson*), pork meat, Vienna sausage and chicken meat) and 2 were detected in a processing environment (isolates originated from knife surface and shoe sole). All isolates (6 - 3.9 %) characterised as the IIc serogroup were identified in food products. Their origin was as follows: Vienna sausages (3 samples), chicken meat (2 samples) and white steamed sausage. None of the collected isolates belonged to the L serogroup, representing the remaining 4a, 4c, 4ab and 4h serovars.

Table 2. Results of serotyping acc. to protocol of Doumith et al. (2004)

Tabela 2. Wyniki serotypowania wg protokołu Doumith i wps. (2004)

Serogroup / Serogrupa		All isolates Wszystkie izolaty		Isolates from food products Izolaty pochodzące z żywności		Isolates from food processing environment Izolaty ze środowiska produkcyjnego żywności	
Symbol	Serovars Serowary	Number Liczba	%	Number Liczba	%	Number Liczba	%
IIa	1/2a, 3a	113	73.9	82	75.9	31	68.9
IIb	1/2b, 3b, 7	6	3.9	4	3.7	2	4.4
IIc	1/2c, 3c	6	3.9	6	5.6	0	0.0
IVb	4b, 4d, 4e	28	18.3	16	14.8	12	26.7
L	4a, 4c	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Sum / Suma:	153		108		45	

Out of 51 isolates originating from bacon, 47 belonged to the IIa serogroup and 4 to the IVb serogroup. Chicken meat samples (21 in total) represented three distinct serotypes, of which 18 samples were characterised as the IIa serogroup, 2 isolates belonged to the IIc serogroup and 1 isolate belonged to the IIb serogroup. Sausages (11 samples) also contained diverse *L. monocytogenes* isolates, as 6 samples (3 from dried fermented sausages (Polish *kabanos*), 2 from Vienna sausages and one from Silesian sausage) were characterised as the IIa serogroup, 4 samples (3 from Vienna sausages and one from white steamed sausage) belonged to the IIc serogroup and one sample (from Vienna sausage) was classified under the IIb serogroup. In contrast to the abovementioned group of products, all 10 samples from smoked fish contained isolates characterised as the IVb serogroup.

In general, our findings are consistent with most of literature reports. The results of genostereotyping according to protocol of Feng et al. [10] have not been published to date, however, many authors have used the protocol of Doumith et al. [9]. For ex-

ample, Psareva et al. [17] examined *L. monocytogenes* isolates collected between 2001 and 2020, originating from meat, poultry, dairy, and fish products from the Central European part of Russia. Out of 40 samples, 22 (55.0 %) belonged to the IIa serogroup; 11 (27.5 %) belonged to the IVb group; 4 (10.0 %) isolates belonged to the IIc group and 3 (7.5 %) to the IIb group [17], which makes the prevalence of particular serogroups similar to those achieved in our research.

On the other hand, Wang et al. [22] performed traditional serotyping of *L. monocytogenes* isolates from pork samples available at supermarkets in Wuhan, China. The 1/2a serovar comprised 45 out of 63 of all samples (71.4 %), the 1/2c serovar comprised 12 samples (19.0 %) and the 1/2b serovar comprised 6 samples (9.5 %). Other serovars were not detected [22]. That study demonstrated that the 1/2a serotype was the most commonly prevalent in food products, however, the authors did not detect any isolate which belonged to the 4b, 4d or 4e serovars, whereas in our case, the IVb serogroup was the second most common. Similarly to findings of Wang et al. [22], according to Coban et al. [7], who used the protocol of Doumith et al. [9], the IVb serogroup was the least numerous (1 sample – 1.0 %) in their study. The authors serogrouped 103 isolates originating from poultry samples from the retail markets and slaughterhouses in Turkey. However, the majority of *L. monocytogenes* strains (78 samples – 75.7 %) were characterised as the IIa serogroup (which is in agreement with our findings), followed by the IIc serogroup (15 samples – 14.5 %) and the IIb group (6 samples – 5.8 %) [7].

Chen et al. [5] performed genoserotyping of 102 isolates from food samples purchased at retail in U.S. FoodNet sites using the protocol of Doumith et al. [9]. The IIa serogroup was the most prevalent, with 46 isolates (45.1 %), while the second most common serogroup was IIb, with 28 samples (27.5 %), followed by the IVb group, with 20 (19.6 %) samples, and the IIc group, with 5 (4.9 %) samples. Interestingly, the authors also identified 3 isolates (2.9 %) which were characterised as the L serogroup (comprising the remaining serovars: 4a, 4ab, 4c and 4h) [5]. Microorganisms of that serogroup were not identified in this study.

In contrast to the aforementioned reports in which the IIa serogroup was the most common among isolates, Simonavičienė et al. [20], who used the protocol of Doumith et al. [9], have found that the IVb serogroup was the most prevalent in cold smoked fish (salmon) products from Lithuania. Out of 37 *L. monocytogenes* isolates, 35 (90.5 %) belonged to the IVb serogroup, whereas only 2 samples (5.4 %) were identified as members of the IIa serogroup [20]. However, these results are also in agreement with our findings, as only one serogroup, namely IVb, was identified in all 10 samples originating from smoked fish included in our study.

In conclusion, scientific data is not entirely consistent as regards the detailed proportions and prevalence rate of particular serogroups of *L. monocytogenes* isolates,

however, in most cases the IIa serogroup (or the 1/2a serovar) is the most prevalent, which was also a result of our findings. In general, the 1/2a serotype is commonly considered a serotype the most frequently isolated from food products [3]. The discrepancies in the proportions of particular serogroups probably result from examining a different type of samples, originating from different sources, obtained at distant geographical locations and collected during different time frames.

Conclusions

1. *L. monocytogenes* isolates occasionally appearing in meat products and a processing environment were genetically diverse, as they were assigned to different serogroups. The prevalence rate of particular serogroups (and thus serotypes) is not equally distributed among isolates.
2. The IIa serogroup (comprising the 1/2a, 3a serovars) was the most common in our study and comprised 73.9 % of all samples. The IVb serogroup (comprising the 4b, 4d, 4e isolates) was the second most common and comprised 18.3 % of all isolates. The IVb serogroup was also the only one detected in all 10 samples of smoked fish included in our study.
3. Both genosertotyping protocols proposed by Doumith et al. [9] and Feng et al. [10] are useful tools to differentiate *L. monocytogenes* isolates. The methodologies present results that were consistent (in the case of all tested isolates) and complementary, as the protocol by Feng et al. [10] allows to distinguish the 4h serovar from other serovars, whereas the protocol by Doumith et al. [9] separates 7 serovars which fall into one group in the protocol by Feng et al. [10], into three serogroups.

Acknowledgements

This research was funded by the Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland, grant for young researchers No 506.771.03.0.

References

- [1] Alía A., Andrade M.J., Córdoba J.J., Martín I., Rodríguez A.: Development of a multiplex real-time PCR to differentiate the four major *Listeria monocytogenes* serotypes in isolates from meat processing plants. *Food Microbiol.*, 2020, 87, # 103367.
- [2] Bintsis T.: Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol.*, 2017, 3(3), 529-563.
- [3] Borucki M.K., Call D.R.: *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41(12), 5537-5540.
- [4] Burall L.S., Simpson A.C., Datta A.R.: Evaluation of a serotyping scheme using a combination of an antibody-based serogrouping method and a multiplex PCR assay for identifying the major serotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 2011, 74(3), 403-409.

- [5] Chen Y., Chen Y., Pouillot R., Dennis S., Xian Z., Luchansky J.B., Porto-Fett A.C.S., Lindsay J.A., Hammack T.S., Allard M., Van Doren J.M., Brown E.W.: Genetic diversity and profiles of genes associated with virulence and stress resistance among isolates from the 2010-2013 interagency *Listeria monocytogenes* market basket survey. *PLoS One*, 2020, 15(4), #0231393.
- [6] Chen Y., Knabel S.J.: Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Bacteria of the Genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and Major Serotypes and Epidemic Clones of *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(19), 6299-6304.
- [7] Coban A., Pennone V., Sudagidan M., Molva C., Jordan K., Aydi, A.: Prevalence, virulence characterization, and genetic relatedness of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken retail points and poultry slaughterhouses in Turkey. *Braz. J. Microbiol.*, 2019, 50(4), 1063-1073.
- [8] De Santis E.P.L., Pilo A.L., Cosseddu A.M., Canu N.A., Scarano C., Marongiu P.: Multiplex PCR for the identification and serotyping of *L. monocytogenes* isolated from sheep cheese-processing plants. *Vet. Res. Commun.*, 2007, 31, 359-363.
- [9] Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P.: Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42(8), 3819-3822.
- [10] Feng Y., Yao H., Chen S., Sun X., Yin Y., Jiao X.: Rapid Detection of Hypervirulent Serovar 4h *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR. *Front. Microbiol.*, 2020, 26, 11, 1309.
- [11] Gorski L.: Serotype Assignment by Sero-agglutination, ELISA, and PCR. *Methods Mol. Biol.*, 2021, 1157, 41-61.
- [12] Kaptchouang Tchatchouang C.-D., Fri J., De Santi M., Brandi G., Schiavano G.F., Amagliani G., Ateba C.N.: Listeriosis Outbreak in South Africa: A Comparative Analysis with Previously Reported Cases Worldwide. *Microorg.*, 2020, 17, 8(1), 135.
- [13] Kurpas M., Osek J., Moura A., Leclercq A., Lecuit M., Wiczorek K.: Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated From Ready-to-Eat Meat and Meat Processing Environments in Poland. *Front Microbiol.*, 2020, 11, #1412.
- [14] Li F., Ye Q., Chen M., Zhang J., Xue L., Wang J., Wu S., Zeng H., Gu Q., Zhang Y., Wei X., Ding Y., Wu Q.: Multiplex PCR for the Identification of Pathogenic *Listeria* in *Flammulina velutipes* Plant Based on Novel Specific Targets Revealed by Pan-Genome Analysis. *Front. Microbiol.*, 2021, 11, #634255.
- [15] Nho S.W., Abdelhamed H., Reddy S., Karsi A., Lawrence M.L.: Identification of high-risk *Listeria monocytogenes* serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 2015, 119, 3, 845-852.
- [16] Paillard D., Dubois V., Duran R., Nathier F., Guittet C., Caumette P., Quentin C.: Rapid Identification of *Listeria* Species by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA Gene Fragments. *AEM*, 2003, 69, 11, 6386-6392.
- [17] Psareva E.K., Liskova E.A., Razheva I.V., Yushina Y.K., Grudistova M.A., Gladkova N.A., Potemkin E.A., Zhurilov P.A., Sokolova E.V., Andriyanov P.A., Voronina O.L., Kolbasov D.V., Ermolaeva S.A.: Diversity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food Products in the Central European Part of Russia in 2000-2005 and 2019-2020. *Foods*, 2021, 10, 11, #2790.
- [18] Quereda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba, C. Dessaux, C. García-del Portillo, F. Pucciarelli, M.G. Ortega, A.D.: Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*, 2021, 12, 1, 2509-2545.
- [19] Seeliger H.P.R., Höhne K.: Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species. In: *Methods in Microbiology*. Eds. Bergan T., Norris J.R., vol. 13, Academic Press, 1979, pp. 31-49.
- [20] Simonavičienė I., Zakarienė G., Lozoraitytė A., Zaborskienė G., Gerulis G., Stimbirys A.: Identification and serotyping of *Listeria monocytogenes*, isolated from various salmon products, sold in retail market in Lithuania. *Ital. J. Food Saf.*, 2021, 10, 3, 9341.

- [21] Vitullo M., Grant K.A., Sammarco M.L., Tamburro M., Ripabelli G., Amar C.F.L.: Real-time PCRs assay for serogrouping *Listeria monocytogenes* and differentiation from other *Listeria* spp. Mol. Cell. Probes, 2013, 27, 1, 68-70.
- [22] Wang Y., Ji Q., Li S., Liu M.: Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated From Retail Pork in Wuhan, China. Front. Microbiol., 2021, 12, 620482.
- [23] Yin Y., Yao H., Doijad S., Kong S., Shen Y., Cai X., Tan W., Wang Y., Feng Y., Ling Z., Wang G., Hu Y., Lian K., Sun X., Liu Y., Wang C., Jiao K., Liu G., Song R., Chen X., Pan Z., Loessner M.J., Chakraborty T., Jiao X.: A hybrid sub-lineage of *Listeria monocytogenes* comprising hypervirulent isolates. Nat. Commun., 2019, 10, #4283.
- [24] Zhu Q., Gooneratne R., Hussain M.A.: *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. Foods, 2017, 6, 3, #21.

GENOSEROTYPOWANIE IZOLATÓW *LISTERIA MONOCYTOGENES* POCHODZĄCYCH Z PRODUKTÓW MIĘSNYCH I ŚRODOWISKA PRODUKCYJNEGO

Streszczenie

Wprowadzenie. *Listeria monocytogenes* jest ludzkim patogenem związanym z żywnością oraz czynnikiem wywołujący listeriozę, czyli chorobę o wysokim odsetku śmiertelności. Serotypowanie jest metodą różnicowania izolatów *L. monocytogenes* w oparciu o unikatowe kombinacje antygenów somatycznych (O) i rzęskowych (H) na powierzchni ich komórek. Klasyczne serotypowanie jest wykonywane z wykorzystaniem metod aglutynacyjnych, które wymagają użycia przeciwciał. Istnieją jednak metody genoserotypowania, które pozwalają zakwalifikować izolaty *L. monocytogenes* do poszczególnych grup serotypów (nazywanych serogrupami) na podstawie analiz genetycznych. Różnicowanie izolatów *L. monocytogenes* jest ważnym zagadnieniem w kontekście bezpieczeństwa żywności, kontroli i śledzenia źródeł skażeń. W niniejszej pracy przedstawiamy wyniki genoserotypowania 153 izolatów *L. monocytogenes* pochodzących z produktów mięsnych i środowiska produkcyjnego w polskich zakładach przetwórstwa. Do przeprowadzenia analiz genoserotypu wykorzystano dwie metodyki: pierwsza pozwala na rozróżnienie czterech najczęściej występujących serotypów (1/2a, 1/2b, 1/2c oraz 4b), natomiast druga pozwala rozróżnić hipervirulentny serowar 4h od innych serotypów.

Wyniki i wnioski. Otrzymane oboma metodami wyniki były zgodne i wszystkie izolaty zostały zakwalifikowane do odpowiadających sobie serogrup w obrębie obu metodyk. Większość izolatów (73.9 %) została scharakteryzowana jako należąca do serogrupy IIa (reprezentującej serowary 1/2a, 3a). Serogrupa IVb (4b, 4d, 4e) była drugą najbardziej liczną (zawierała 18.3 % izolatów), a następnie IIb (1/2b, 3b, 7) oraz IIc (1/2c, 3c), przy czym ostatnie dwie grupy były równoliczne (i każda z nich zawierała 3.9 % wszystkich izolatów). Żaden z zebranych izolatów nie należał do serogrupy reprezentującej serotypy 4a, 4c, 4ab i 4h.

Słowa kluczowe: serotypowanie, genoserotypowanie, serotypy, bezpieczeństwo żywności, kontrola żywności ☒

EWELINA SIDOR, MONIKA TOMCZYK, MICHAŁ MIŁEK,
MAŁGORZATA DŻUGAN

**THE EFFECT OF STORAGE TIME ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY
AND POLYPHENOLIC PROFILE OF FROZEN AND LYOPHILIZED DRONE
BROOD FIXED IN HONEY**

S u m m a r y

Background. The purpose of the study was to evaluate the effect of drone brood fixation in rape honey and to analyze changes in its antioxidant activity during storage. The fixation was carried out for frozen and lyophilized drone brood, which were mixed with honey in various proportions (1, 2, and 4 % w/w). The antioxidant activity (DPPH and FRAP methods) and the total content of polyphenolic compounds (TPC) after 3, 6, and 9 months of storage were analyzed. After 9 months of storage, the polyphenolic profile (HPTLC method) and physicochemical parameters of samples were assessed.

Results and conclusion. The addition of drone brood to honey increased the antioxidant activity of the final product considerably (by 33 to 110 %), while only slightly affected the physicochemical parameters (conductivity and a diastase number) compared to control honey. Moreover, honey with the addition of drone brood still continued to meet the requirements for honey standard. The polyphenol profile obtained by HPTLC method for honey with the addition of drone brood was enriched mainly with ellagic and ferulic acids compared to control honey. It was found that fixing the drone brood in honey allows to maintain its antioxidant properties for 6 months, whereas a significant decrease in reducing power (FRAP) and polyphenolic content (TPC) during prolonged storage were observed (from 8 to 26 %). Due to the fact that lower losses were observed for the addition of frozen than for lyophilized drone brood after 9 months of storage, preserving the frozen brood in honey (up to 5 % w/w) can be recommended as an effective and inexpensive method available in apiary conditions.

Key words: drone brood, treatment, honey, antioxidant activity, polyphenolic profile

Introduction

Drone brood homogenate is a bee product obtained from drone larvae collected from drone cells in a honeycomb at various stages of development. In the form of a

Mgr inż. E. Sidor, ORCID: 0000-0002-3954-4940, dr inż. M. Tomczyk, ORCID: 0000-0002-4010-4352, dr inż. M. Miłek, ORCID: 0000-0001-9312-2506, dr hab. M. Dżugan, prof. UR, ORCID: 0000-0003-1601-6296, Zakład Chemii i Toksykologii Żywności, Instytut Technologii Żywności i Żywnienia, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Ćwiklińskiej 1a, 35-601 Rzeszów; Kontakt: ewelina.sidor.dokt@gmail.com

homogenate, because of its similar chemical properties, it is considered to be the male equivalent of royal jelly. It is commonly used as Apilarnil, which is obtained from drone brood subjected to homogenization, then frozen at $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ and fixed by lyophilization to preserve its biological properties [4].

Drone brood, as a nutrient-rich little-known beekeeping product has many beneficial healing properties. It is a valuable source of protein (13.28 %) and minerals (e.g. phosphorus, sodium, sulfur, magnesium, calcium), but also contains phenols (ellagic acid, chlorogenic acid) and steroid hormones (testosterone, progesterone, estradiol) [16]. Due to its low acquisition cost and effectiveness, it was used as a remedy for various diseases. Some of the biological and therapeutic effects of drone brood have been confirmed in *in vitro* laboratory studies [13, 16].

It is known that drone brood loses its biological activity in a very short time, so it is important to fix it as quickly as possible. The simplest and cheapest method is freezing (up to 6 days at $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ or up to 10 months at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Drone brood can be frozen in liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) or lyophilized (shelf life up to 2 years). However, drone brood can be deposited on a stable absorbent such as honey. For this purpose, a previously prepared homogenate of drone brood is added to honey in the amount of up to $1 \div 5\%$ of the final volume. The storage of the final product at room temperature allows its properties to be retained for 6 months [5].

The effect of honey variety as a fixing agent has not been studied in detail. However, rape honey is best suited for this purpose. It is one of the best-known varieties in Poland due to the earliest harvesting time, a low price, and easy availability. In a liquid form, it has a light color and crystallizes the fastest among all honey varieties found in Poland ($3 \div 7$ days). After crystallization, it turns white or changes its color to creamy. Rape honey contains essential oils, tannins, bitter compounds, flavonoids (mainly quercetin, kaempferol, apigenin) [23]. This honey type nourishes and regenerates an exhausted organism [12]. Recently, it has been promoted to replace unhealthy sugar with honey, which cannot be overdosed because of its sweet taste and quick satiation with sweet taste.

The aim of the study was to fix drone brood (frozen or lyophilized) in rape honey and to analyze changes in the antioxidant activity of obtained mixtures during storage.

Materials and methods

Chemicals

Chemicals [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine], reagents (Folin-Ciocalteu reagent), were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solvents and acids (ethyl alcohol, ethyl acetate, formic acid, acetic acid) were purchased from Chempur (Piekary

Śląskie, Poland) and reagents for HPTLC visualization (natural product reagent, PEG 400) were obtained from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany).

Material Collection

The drone brood was collected from an apiary in the south-eastern part of Poland in the June 2020 season. The drone brood of the *Apis mellifera carnica* breed families were selected by hand from a drone frame, immediately sealed in sterile containers, and transferred to the laboratory. The samples were homogenized using a tissue homogenizer (TH 02, Omni International, Kennesaw, GA, USA) with 7 mm Omni Tips™ plastic tips. The material was then frozen at -18°C or lyophilized (using Alpha 1–2, LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Germany). Rape honey was purchased from a local apiary located in the Podkarpackie Province in the 2020 beekeeping season.

As a method of drone brood fixation, both the frozen (F) or lyophilized (L) drone brood were introduced to honey during creaming. Liquefied rape honey (100 g) was weighted in a glass jar (200 cm³), inoculated with crystallized honey (99:1) and mixed with a kitchen mixer for 60 s, four times a day to start the crystallization process. Six honey samples were creamed. Subsequently, frozen drone brood was added to honey in increasing amounts of 1, 2, and 4 % (w/w). For lyophilized drone brood, the addition was recalculated taking into account a loss of water during lyophilization as 0.3, 0.6 and 1.2 % w/w, but for the better understanding, it was marked as the same as the dose of frozen brood dose (corresponded value 1, 2 and 4 % w/w). The whole mixture was mixed again with the kitchen mixer for 60 s. Samples prepared in such a manner were stored in a refrigerator at 4 °C for three days and mixed two times a day to obtain homogeneous consistency. After complete crystallization, the honeys were stored at 21 ± 2 °C without exposure to sunlight for 3, 6, 9 months until analyses.

DPPH Test

The inhibition of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical was measured by following the assay procedure described by Dżugan et al. [2], with minor modifications. The reduction of DPPH radicals was calculated using the following t AA % = $[(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$, where A₀ is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the tested samples and expressed as μmol of Trolox (TE) equivalents per 100 g of honey (μmol/100 g) based on a calibration curve ($y = 15.553x$, $r^2 = 0.9970$), prepared for Trolox in the range of 25-300 nmol/cm³.

FRAP Assay

The FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter) assay was carried out according to Dżugan et al. [2]. The results were expressed as μmol of Trolox (TE) equiv-

alents per 100 g of honey ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$) based on a calibration curve ($y = 0.152x$, $r^2 = 0.9998$), prepared for 0.1 mmol Trolox in the range of 25-300 nmol/cm³.

Total Phenolic Content Determination (TPC)

The total phenolic content was determined using a Folin-Ciocalteu reagent, according to Dżugan et al. [2], with minor modifications. The phenolic content expressed as mg of gallic acid (GAE) equivalents per 100 g of honey (mg GAE/100 g) was calculated based on a calibration curve prepared for gallic acid in the range of 0 ÷ 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($y = 0.336x$, $r^2 = 0.9914$).

Polyphenolic profile using HPTLC chromatography

The polyphenolic profiles for honeys were performed on HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ plate (20 × 10 cm) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The samples for an analysis were prepared by making a 20 % solution of honeys in water acidified with HCl (pH = 2). Subsequently, the solutions were passed through the C-18 Sep-Pak cartridges (Waters, Milford, USA) retaining phenolic compounds. Ballast compounds were rinsed with 10 mL of acidified water and finally polyphenols were rinsed with 2.5 mL of methanol. Five μL of such prepared honey samples were applied to the HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ plate as 7 mm bands from the lower edge of a plate, at the rate of 100 nL/s, using a semi-automated HPTLC application device (Linomat 5, CAMAG, Muttenz, Switzerland). Chromatographic separation was performed in a chromatographic tank saturated for 20 min with the mobile phase (ethyl acetate: water: formic acid: acetic acid; 15:2:1:1) and developed to a distance of 70 mm. The results obtained were documented using an HPTLC imaging device (TLC Visualizer, CAMAG) at 366 nm. Additionally, the plate was derivatized using an automated TLC plate derivatizer (CAMAG Derivatizer) with Natural Product Reagent (diphenylboric acid β -aminoethyl ester complex) and in the second step with an alcoholic PEG 400 solution. The chromatographic image obtained was analyzed using HPTLC software (Vision CATS, CAMAG). The profile of polyphenolic compounds of honey with the addition of drone brood was analyzed in comparison to control honey and drone brood fingerprints in terms of the pattern of bands, their color and intensity. Single phenolic compounds was identified based on R_f values determined for standard substances (ellagic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, quercetin, apigenin) separated under the same conditions (not shown on the chromatogram).

Physicochemical parameters determination

The water content, active acidity and free acidity, conductivity and diastase number were determined for all tested samples strictly as described in our earlier paper [15], in accordance with the legal requirements for honey [11].

Statistical analysis

All calculations were made in triplicate. Three-way analysis of variance followed by HSD Tukey's test ($p < 0.05$) was applied to find significant differences in antioxidant activity regarding the used drone brood addition value, the time of storage and the form of added drone brood. The Student's t-test was used to check whether the differences between the control sample and other means are statistically significant. Correlation coefficients (r Pearson) were calculated. All calculations were performed using Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, USA).

Results and discussion

Changes in antioxidant activity and total phenolic content of drone brood fixed in rape honey during storage

Rape honey (control) showed antioxidant activity measured using a DPPH method at the level of $3.1 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$, which gave almost 10 % of the ability to scavenge free radicals (Fig. 1a). The addition of 1 % of frozen drone brood to honey significantly increased the antiradical capacity by 64.5 %. However, the addition of 2 % of drone brood did not have a direct effect on a double increase in the antiradical activity. The highest increase in the analyzed parameter, compared to control honey, was demonstrated for the highest addition of frozen drone brood (an increase of 77.4 %).

The storage time did not influence the activity of the tested honeys significantly. However, after 9 months of the storage of honey, a significant decrease in antioxidant activity was found in all the analyzed samples. The ability of rape honey (control) to scavenge free radicals increased by 6.45 %, which is characteristic of stored honey (Maillard reaction) [21]. On the other hand, as regards the honeys to which drone brood was added, a decrease in antioxidant activity was found ($9.3 \div 36.95 \%$). The greatest decrease was found for honey with a 4 % addition of frozen drone brood. Despite a decrease in activity after 9 months of storage, the honey retained a higher activity compared to the control honey.

A similar relationship was found for the results of ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) (Fig. 1b), which was confirmed by a correlation among the results after 3 months of storage ($r = 0.532$). However, the addition of lyophilized drone brood enriched honey with bioactive compounds to a lower extent, but the highest increase compared to the control was found for the 4 % addition of frozen brood (60.53 %). The storage of drone brood fixed in honey for 9 months decreased the ability to reduce ferric ions in all samples significantly. Compared to the honeys stored for 6 months, the activity of rape honey decreased by 17.31 %, while in the case of honeys with brood addition, it ranged from 2.84 to 32.95 %.

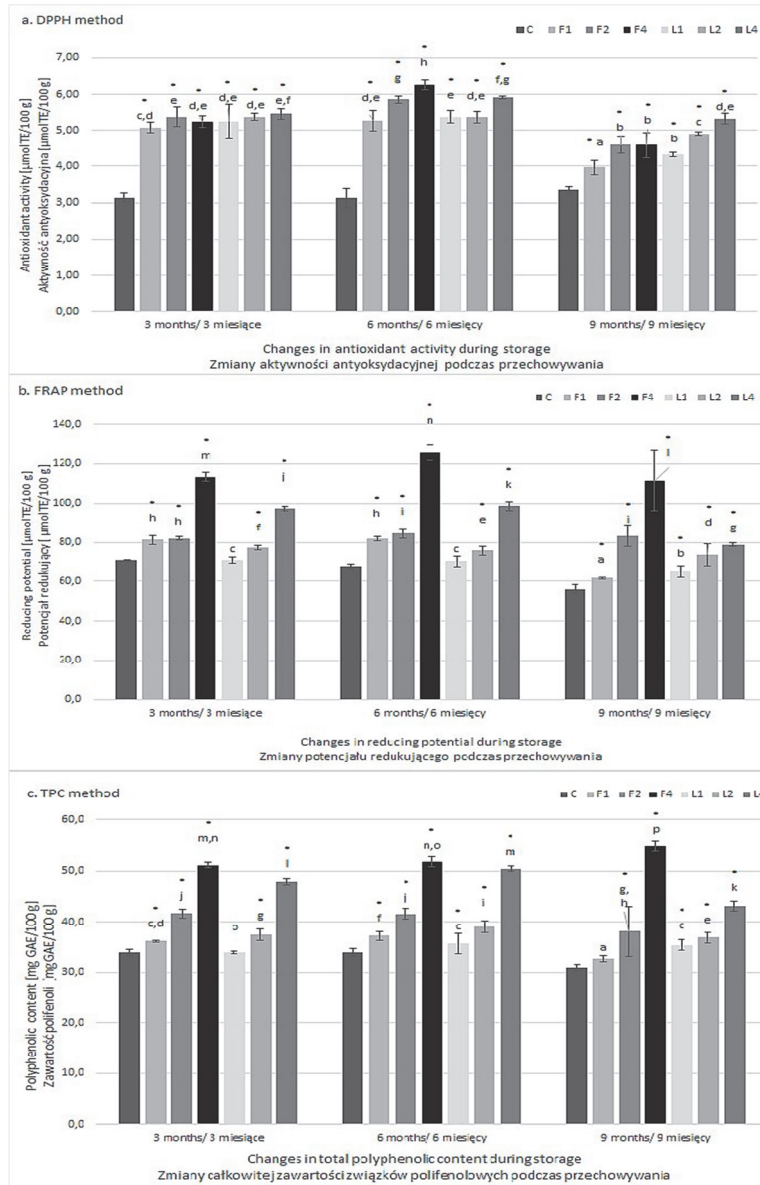


Fig. 1. Changes in the antioxidant properties of drone brood fixed in honey compared to control rape honey measured using the DPPH method (a), the FRAP method (b), and as total phenolic content (c); (n=3)

Ryc. 1. Zmiany właściwości przeciwutleniających czerwia trutowego utrwalonego w miodzie w porównaniu z kontrolnym miodem rzepakowym mierzone metodą DPPH (a), metodą FRAP (b) oraz jako całkowita zawartość polifenoli (c); (n=3)

Explanatory notes / objaśnienia: a, b, c, d, e, f, g - means marked with different letters differ significantly / średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p < 0.05$); * significant differences compared to control honey / istotnie różne w porównaniu do próby kontrolnej ($p < 0.05$)

The synergistic effect of the mixture of various bee products with honey has been already reported. Habryka et al. [3] enriched honey with 25 % bee pollen and achieved eight-and-a-half times higher DPPH activity of the finished product compared to control honey. However, the 5 % addition contributed to a two-and-a-half-fold increase in activity. The authors [3] obtained a similar effect by enriching honey with propolis at various concentrations (0.1 ÷ 1 %). Socha et al. [17] analyzed the effect of adding bee bread to honey. A FRAP analysis showed that after the addition 20 % of bee bread to honey, the reducing ability increased 10 times, which was statistically significant.

The total polyphenol content in the rape honey was 33.9 mg GAE/100 g (Fig. 1c). The highest increase was recorded for the greatest addition of frozen and lyophilized drone brood by 51.03 and 41.29 %, respectively. Furthermore, the addition of drone brood increased the content of phenolic compounds significantly, except for the addition of 1 % brood lyophilisate compared to control honey. After 6 months of storage, the content of polyphenolic compounds in the enriched honey increased on average by 3-5 %, which was statistically significant and strongly correlated with the FRAP results ($r = 0.925$). Moreover, the influence of the form of the additive, the amount of the additive and the storage time on changes in the antioxidant potential and the content of polyphenols was found. All interactions were statistically significant ($p < 0.05$). The 9-month storage of drone brood fixed in honey resulted in a decrease in the content of polyphenolic compounds by 14.29 % for honey with a 4 % addition of lyophilized drone brood. Habryka et al. [3] enriched honey with 5 % bee pollen and showed a significant increase in the total content of polyphenolic compounds. Majewska and Trzaneek [8] obtained similar results.

The comparison of the HPTLC polyphenolic profiles of drone brood fixed in rape honey after 9 months of storage

The comparison of polyphenolic profiles of drone brood fixed in rape honey was provided in Fig. 2.

The visualization of drone brood extract (DB) at 366 nm shows a phenolic profile ($R_f = 0.12, 0.20, 0.25, 0.31, 0.45, 0.84, 0.91$), which can be considered unique because the bands are visually different in color (light blue, blue). Additionally, chlorogenic acid ($R_f = 0.03$) was identified at the start line as the light blue band. Rape honey showed a different phenolic profile than drone brood. For honey, the most intense bands were found at R_f (0.12, 0.21, 0.31). This fingerprint was dominated by brown ($R_f = 0.05 \div 0.25$), and light yellow bands (R_f above 0.90). In addition, the presence of light yellow and light blue bands was found. Some bands that were barely visible in the control honey showed higher intensity in honey with the addition of drone brood at $R_f = 0.31, 0.12$ (blue bands) and 0.95 (yellow band) identified as apigenin. Increasing the

intensity and visibility of the bands, as well as increasing the addition share, proves that the content of phenolic compounds in honey becomes higher with the addition of drone brood. The results obtained were in line with the Stanek and Jasicka-Misiak's results [18], who compared the phenolic profile of nectar honeys. They showed dominant bands of yellow, light blue, blue and black, among which they identified the presence of p-coumaric acid, chlorogenic acid and myricetin in nectar honeys. However, Tomczyk et al. [19] analyzed the phenolic profile of Polish honeys, showing orange, blue, yellow, and green bands in rape honey. The composition of polyphenols in drone brood was similar to that in the previous studies [14, 15]. Blue bands dominated in the drone brood homogenate chromatogram, which proves the presence of ferulic acid (Rf

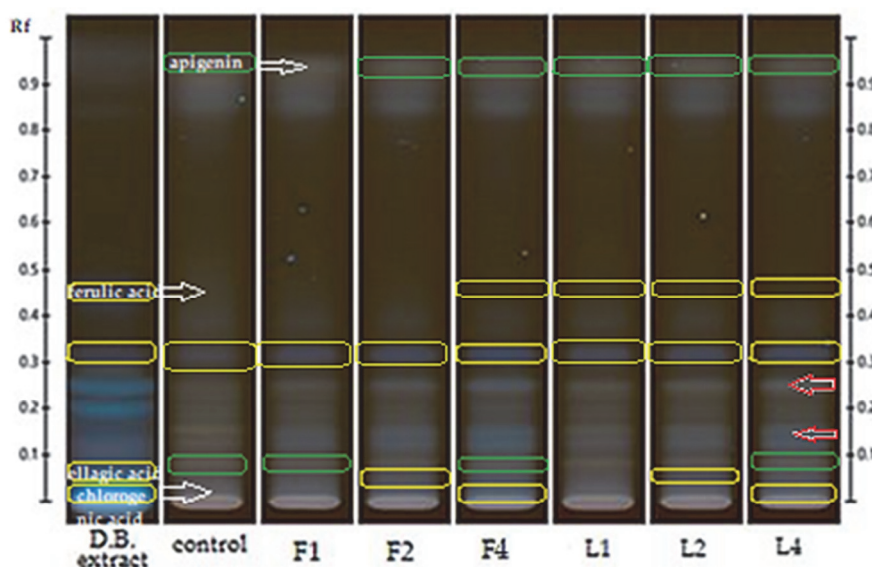


Fig. 2. Polyphenolic profiles (using the HPTLC method) after 9 months of storage of frozen (F1, F2, and F4) and lyophilized (L1, L 2 and L 4) drone brood fixed in honey. DB - drone brood extract and control - rape honey were used for the comparison.

Rys. 2. Profile polifenolowe (metodą HPTLC) po 9 miesiącach przechowywania zamrożonego (F1, F2 i F4) i liofilizowanego (L1, L 2 i L 4) czerwiu trutowego utrwalonego w miodzie. Dla porównania użyto DB - ekstrakt z czerwiu trutowego i kontrolny miód rzepakowy.

Explanatory notes / objaśnienia:

Selected compounds which migrated from the drone brood extract to honey are marked in yellow, compounds originated from rape honey are marked in green. The red arrow indicates the small amount of polyphenols present in honey, which the content of which was increased by drone brood addition (bands which were intensified).

Na żółto zaznaczono wybrane związki migrujące z ekstraktu czerwiu trutowego do miodu, na zielono zaznaczono związki pochodzące z miodu rzepakowego. Czerwona strzałka wskazuje polifenole obecne w miodzie w niewielkiej ilości, których zawartość została zwiększona przez dodanie czerwiu trutowego (prążki, które zostały zintensyfikowane).

= 0.48) and ellagic acid ($R_f = 0.08$) in the tested material. Moreover, apigenin as yellow band was identified [15]. Based on the HPTLC results, the beneficial effect of drone brood additive on polyphenolic profile of rape honey was shown, the higher share of drone brood, the more polyphenols were observed.

Physicochemical parameters and organoleptic evaluation of enriched honeys after 9 months of storage under legal regulations for honey

After 9 months of storage, the organoleptic evaluation of the honeys was carried out. During the evaluation of honeys with frozen drone brood, it was found that their taste and smell corresponded to the typical characteristics of rape honey and no foreign ones were found. Only the color of the honey with 4 % addition was slightly darker and the consistency more fluid, however, these observations did not reduce the overall quality of the honey. The honeys enriched with lyophilized drone brood behaved similarly. In this case, their taste and smell did not differ from that of the control honey. The color of the honey was very similar to that of the control honey, also with the 4 % additive. The honey enriched with lyophilized drone brood retained a more stable consistency compared to the addition of frozen brood due to low water content. In addition, it was observed that the highest addition stabilized the consistency and was the most stable among all of the honeys being evaluated.

Bee honey is obtained according to generally accepted beekeeping practice and is always subjected to quality control before being placed on the market. The physicochemical parameters, thanks to which the quality of honey is controlled based on a laboratory analysis, include, among other things, water content, electrical conductivity, acidity, pH, and diastase number. A good quality of the rape honey was confirmed, which was in line with the findings of other authors for Polish [7, 10, 19] and European [1, 6, 22] rape honey. The analysis of physicochemical parameters after 9 months of the storage of the honeys did not show deviations from the norm for nectar honeys [11]. The addition of 4 % of frozen drone brood did not exceed allowed water content. However, the value was significantly different from the control honey. Meanwhile, a beneficial increase in acidity, conductivity and diastase number was observed for the enriched honey, resulting from native acidity, high bioelement content, and diastatic activity of raw drone brood [15]. However, the values observed were still within the legal limits for honey quality standard.

Developing new products and introducing them to the market is extremely difficult and should take into account market requirements and consumer preferences. Most importantly, a new product and its ingredients should neither be hazardous to nor mislead the consumer [9]. Due to the hormonal activity of drone brood, detailed studies should be performed to confirm safe consumption and the maximum daily dose should be established before introducing it as a dietary product.

Table 1. Physicochemical properties of honey enriched with drone brood after 9 months of storage (n=3).

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne miodu wzbogaconego czerwiem trutowym po 9 miesiącach przechowywania (n=3).

Sample / Próbką	Water content Zawartość wody [%]	pH	Acidity Kwasowość [mval/kg]	Conductivity Przewodność właściwa [mS/cm]	Diastase number Liczba diasta- zowa
Control	17.00	4.70	13.15	0.215	11.07
F 1	17.20	4.52	16.10*	0.225	13.69*
F 2	17.30*	4.59	19.60*	0.249*	17.16*
F 4	19.70*	4.45	24.80*	0.256*	17.50*
L 1	17.15	4.63	15.90*	0.216	13.53*
L 2	17.00	4.59	17.20*	0.225	14.00*
L 4	17.00	4.56	22.70*	0.244*	14.96*
Standard requirements PN-88/A-77626	<20	-	<50	0.2-0.8	>8

Explanatory notes / Objasnienia:

*significant differences compared to control honey / istotnie różnie w porównaniu do miodem kontrolnym (p < 0.05)

Conclusions

1. The addition of drone brood to rape honey significantly increased its antioxidant activity and enriched polyphenolic profile in a dose-dependent manner.
2. The use of frozen drone brood in the highest dose was more beneficial than the lyophilized additive, for this product less changes in antioxidant activity were observed during prolonged storage.
3. The use of honey to fix the drone brood did not change significantly its physicochemical parameters, which still meet the requirements of honey quality standards.
4. Fixing frozen drone brood in honey seems to be the most applicable method under apiary conditions.

References

- [1] Chakir A., Romane A., Marcazzan G.L., Ferrazzi P.: Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. Arab. J. Chem., 2016, 9, 946–954.
- [2] Dżugan M., Tomczyk M., Sowa P., Grabek-Lejko D.: Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. Molecules, 2018, 23 (8), #2069.
- [3] Habryka C., Socha R., Juszcak L.: Effect of bee pollen addition on the polyphenol content, antioxidant activity, and quality parameters of honey. Antioxidants, 2021, 10, #810.
- [4] Kędzia B., Holderna-Kędzia E.: Mniej znane produkty pszczele. Sądecki Bartnik, Stróże 2017.

- [5] Kryłow W.N., Agafonow A.W., Kriwcow, N.I.: Theory and Methods of Apitherapy; GNU, Moscow 2007, pp. 168–180.
- [6] Laaroussi H., Bouddine T., Bakour M., Ousaaid D., Lyoussi B.: Physicochemical Properties, Mineral Content, Antioxidant Activities, and Microbiological Quality of *Bupleurum spinosum* Gouan Honey from the Middle Atlas in Morocco. *J. Food Qual.*, 2020, # 7609454.
- [7] Majewska E., Derewiaka D., Ciecierska M.: Fizykochemiczne wyróżniki jakości wybranych miodów nektarowych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2015, 440–444.
- [8] Majewska E., Trzaniek, J.: Antioxidant activity of multi-flower honey and other bee products. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2009, 4, 1089–1094.
- [9] Makala H., Olkiewicz M.: Zasady opracowywania nowych produktów z uwzględnieniem oczekiwania konsumentów. *Żywność: Nauka, Technologia, Jakość*, 2004, 1(38), 120–133.
- [10] Miastkowski K., Bakier S.: Research on the impact of water activity in honey on the process of dehydration. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2018, 2, 49-53.
- [11] PN-88/A-77626. Miód pszczeli. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- [12] Ranneh Y., Akim A.M., Hamid H.A., Khazaai H., Fadel A., Zakaria Z.A., Albuja M., Bakar M.F.A.: Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complement. Med. Ther.*, 2021, 21, 1-17.
- [13] Sawczuk R., Karpinska J., Miłtyk W.: What do we need to know about drone brood homogenate and what is known. *J. Ethnopharmacol.*, 2019, 245, #111581.
- [14] Sidor E., Miłek M., Tomczyk M., Dżugan M.: Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development. *Antioxidants*, 2021, 10, #639.
- [15] Sidor E., Miłek M., Zaguła G., Bocian A., Dżugan M.: Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication. *Foods*, 2021, 10, #2233.
- [16] Sidor E., Dżugan M.: Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach. *Molecules*, 2020, 25, #5699.
- [17] Socha R., Habryka C., Juszcak, L.: Effect of bee bread additive on content of phenolic compounds and antioxidant activity of honey. *Food. Science. Technology. Quality.*, 2018, 25, 108-119.
- [18] Stanek N., Jasicka-Misiak, I.: HPTLC Phenolic Profiles as Useful Tools for the Authentication of Honey. *Food Anal. Methods*, 2018, 11, 2979-2989.
- [19] Tomczyk M., Miłek M., Sidor E., Kapusta, I., Litwińczuk, W., Puchalski C., Dżugan M.: The Effect of Adding the Leaves and Fruits of *Morus alba* to Rape Honey on Its Antioxidant Properties, Polyphenolic Profile, and Amylase Activity. *Molecules*, 2020, 25, #84.
- [20] Tomczyk M., Tarapatsky M., Dżugan M.: The influence of geographical origin on honey composition studied by Polish and Slovak honeys. *Czech J. Food Sci.*, 2019, 37, 232–238.
- [21] Wilczyńska A.: Zmiany barwy oraz aktywności antyoksydacyjnej miodów podczas przechowywania. *Bromat. Chem. Toksykol.* XLIV, 2013, 945-950.
- [22] Yadata D.: Detection of the Electrical Conductivity and Acidity of Honey from Different Areas of Tepi. *Food Sci. Technol.*, 2014, 2, 59–63.
- [23] Zhang G.Z., Tian, J., Zhang Y.Z., Li S.S., Zheng H.Q., Hu F.L.: Investigation of the maturity evaluation indicator of honey in natural ripening process: The case of rape honey. *Foods*, 2021, 10, # 2882.

**WPLYW CZASU PRZECHOWYWANIA NA WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE
I PROFIL POLIFENOLOWY MROŻONEGO I LIOFILIZOWANEGO CZERWIU
TRUTOWEGO UTRWALONEGO W MIODZIE**

Streszczenie

Wprowadzenie. Celem pracy była ocena wpływu utrwalenia czerwiu trutowego w miodzie rzepakowym oraz analiza zmian jego aktywności antyoksydacyjnej podczas przechowywania. Utrwalanie przeprowadzono na mrożonym i liofilizowanym czerwiu trutowym, który zmieszano z miodem w różnych proporcjach (1, 2 i 4 % w/w). Analizowano aktywność przeciwutleniającą (metodami DPPH i FRAP) oraz całkowitą zawartość związków polifenolowych (TPC) po 3, 6 i 9 miesiącach przechowywania. Po 9 miesiącach przechowywania oceniono profil polifenolowy (metoda HPTLC) oraz parametry fizykochemiczne.

Wyniki i wnioski. Dodatek czerwiu trutowego do miodu silnie zwiększył aktywność przeciwutleniającą produktu końcowego (o 33 do 110 %), a jedynie nieznacznie wpłynął na parametry fizykochemiczne (przewodność i liczbę diastazową) w porównaniu z miodem kontrolnym. Ponadto miód z dodatkiem czerwiu trutowego nadal spełnia wymagania normy dla miodu. Profil polifenolowy uzyskany metodą HPTLC dla miodu z dodatkiem czerwiu trutowego został wzbogacony głównie o kwas elagowy i ferulowy w porównaniu z miodem kontrolnym. Stwierdzono, że utrwalanie czerwiu trutowego w miodzie pozwala na zachowanie jego właściwości antyoksydacyjnych przez 6 miesięcy, natomiast zaobserwowano znaczne spadki mocy redukującej (FRAP) i zawartości polifenoli (TPC) podczas dłuższego przechowywania (od 8 do 26 %). W przypadku dodatku czerwiu mrożonego, po 9 miesiącach przechowywania obserwowano mniejsze straty niż w przypadku liofilizatu, dlatego przechowywanie mrożonego czerwiu w miodzie (do 5 % m/m) można polecić jako skuteczną i niedrogą metodę dostępną w warunkach pasiecznych.

Słowa kluczowe: czerw trutowy, utrwalanie, miód, aktywność antyoksydacyjna, profil polifenolowy ☒

NIKOLA ŚMIGIELSKA, ANNA SZOSLAND-FAŁTYN,
BEATA BARTODZIEJSKA

PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII PROBIOTYCZNYCH W INNOWACYJNYM NAPOJU NA BAZIE OCTU OWOCOWEGO I SERWATKI

Streszczenie

Wprowadzenie. Serwatka, stanowiąca odpad w zakładach mleczarskich, jest niedocenianym surowcem o dużych właściwościach odżywczych. Jednym ze sposobów jej wykorzystywania może być produkcja fermentowanych napojów. Celem badań było opracowanie innowacyjnego fermentowanego napoju na bazie serwatki i octu owocowego oraz określenie w nim przeżywalności dwóch probiotycznych szczepów bakterii kwasu mlekowego. Zakres pracy obejmował przygotowanie poszczególnych komponentów, dobranie właściwych ich proporcji oraz sprawdzenie wpływu warunków i czasu przechowywania na przeżywalność szczepów. Materiał biologiczny stanowiły szczepy drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae*, szczepy bakterii octowych *Acetobacter pasteurianus* O4 i *Acetobacter pasteurianus* MW3 oraz szczepy bakterii kwasu mlekowego: *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 oraz *Lactiplantibacillus plantarum* LMG P-21021. Przeżywalność bakterii mlekowych zbadano w warunkach beztlenowych. Serwatkę zmieszano z octem jabłkowym w proporcjach 10 % i 50 % octu. Napój przetrzymywano w temperaturze 21 ± 2 °C i 3 ± 2 °C przez 21 dni.

Wyniki i wnioski. Napój analizowano raz w tygodniu, a liczba bakterii kwasu mlekowego po 21 dniach przechowywania kształtowała się na wysokim poziomie, przekraczając rekomendowaną przez WHO liczbę bakterii w napojach probiotycznych – $10^6 \div 10^7$ jtk/cm³. Napój na bazie serwatki i dodatku 10 % octu był dobrym medium, a liczba bakterii mlekowych w tym napoju w każdym jego wariantcie wynosiła średnio $8,4 \pm 0,29$ log jtk/cm³.

Słowa kluczowe: serwatka, ocet, bakterie kwasu mlekowego (LAB), bakterie kwasu octowego (AAB), napój fermentowany, probiotyki

Wprowadzenie

Serwatka kwasowa, powstająca w największych ilościach przy produkcji twarogów i serków wiejskich, jest jednym z głównych produktów ubocznych przemysłu

Mgr N. Śmigielska, dr inż. A. Szosland-Fałtyń, ORCID: 0000-0002-5004-8059, dr B. Bartodziejska, ORCID: 0000-0002-5492-5514, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego – Państwowy Instytut badawczy in. Prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa; Kontakt: nikola.smigielska@ibprs.pl

mleczarskiego. Stanowi około 85 ÷ 90 % objętości mleka i jest bogata w wiele cennych składników, takich jak: białko, laktoza, wapń i fosfor, kwasy organiczne oraz witaminy [17, 20]. Serwatka kwasowa powstaje na drodze koagulacji mleka poprzez ukwaszenie i charakteryzuje się pH poniżej wartości 5,0. Obecność kwasu mlekowego, a także niskie pH oraz wysokie stężenie minerałów czyni ją produktem trudnym do wykorzystania. Znalazła zastosowanie w przemyśle rolniczym jako nawóz, a także jako dodatek do pasz dla zwierząt hodowlanych. Wykorzystywana jest również w innych obszarach np. jako podłoża hodowlane dla mikroorganizmów, a także jako substrat do produkcji biopaliw [16, 17, 22]. Badania przeprowadzone na przestrzeni ostatnich lat świadczą o pozytywnym wpływie serwatki na zdrowie dzieci oraz osób dorosłych [21]. Serwatka ma działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwwirusowe oraz przeciwutleniające, a także wspomagające w leczeniu nowotworów i chorób sercowo-naczyniowych [20]. Ponadto, serwatka ze względu na dużą zawartość białka wpływa pozytywnie na regenerację organizmu po wysiłku fizycznym [5, 23]. Z uwagi na jej prozdrowotne działanie poszukuje się sposobów polepszenia smaku serwatki i jej wykorzystania w produkcji napojów [19, 20].

Ocet jest produktem powszechnie wykorzystywanym do konserwowania żywności, ale także używanym jako polepszacz smaku wielu potraw. Z uwagi na skład bogaty w związki aktywne, m.in.: kwasy organiczne, polifenole, witaminy oraz melanoide, posiada wiele korzystnych właściwości. Udowodniono działanie przeciwhiperlipidemiczne, przeciwhiperlipidemiczne, a także przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniające i przeciwzapalne octu [1, 4, 6].

Celem pracy było opracowanie receptury innowacyjnego fermentowanego napoju na bazie serwatki i octu owocowego oraz ocena przeżywalności dwóch probiotycznych szczepów bakterii kwasu mlekowego. Dodatkową motywacją do opracowywania napoju na bazie serwatki z dodatkiem octu owocowego było ograniczenie marnowania owoców, a co za tym idzie soków owocowych, z których nadprodukcją zmagają się rolnicy oraz mali i średni przedsiębiorcy rolni.

Material i metody badań

Przedmiotem badań były napoje na bazie octu owocowego i serwatki. Do produkcji octu użyto ekologicznego soku jabłkowego (Żywność Ekologiczna Bio Food sp. z o.o.), poddanego procesowi fermentacji alkoholowej poprzez wprowadzenie szczepów drożdży z kolekcji kultur Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego Państwowego Instytutu Badawczego (IBPRS-PIB) *Saccharomyces cerevisiae* rasy Tokay. Po przeprowadzonej fermentacji alkoholowej do otrzymanego półproduktu dodano szczepy bakterii kwasu octowego *Acetobacter pasteurianus* O4 oraz *Acetobacter pasteurianus* MW3 pochodzące z kolekcji IBPRS-PIB w celu przeprowadzenia fermentacji octowej. Szczepami probiotycznymi użytymi do ukwaszenia mleka w celu

otrzymania serwatki były *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 oraz *Lactiplantibacillus plantarum* LMG P-21021 pochodzące z preparatów farmaceutycznych, komercyjnie dostępnych.

Przed rozpoczęciem procesu przygotowania octu sprawdzono jakość mikrobiologiczną soku jabłkowego. Posiew przeprowadzono metodami zgodnymi z obowiązującymi normami, w kierunku: ogólnej liczby drobnoustrojów przy użyciu podłoża PCA (Oxoid, Wielka Brytania), mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej z wykorzystaniem podłoża MRS (Merck, Niemcy), *Enterobacteriaceae* używając podłoża VRBG (Merck, Niemcy), *Escherichia coli* z wykorzystaniem podłoża TBX (Oxoid, Wielka Brytania), gronkowców koagulazo-dodatnich na podłożu RPF z suplementem (Oxoid, Wielka Brytania), pleśni i drożdży, używając podłoża z chloramfenikolem (Merck, Niemcy), a także w kierunku wykrycia obecności patogenów: *Listeria monocytogenes* przy użyciu pożywek: Half Fraser, Fraser oraz ALOA (Graso, Polska) oraz *Salmonella* spp., stosując pożywki: MKTT, Rambach (Merck, Niemcy) i podłoża RVS i XLD (Oxoid, Wielka Brytania) [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. Pierwszy etap otrzymywania octu stanowiła beztlenowa fermentacja alkoholowa w temperaturze 25 °C z wykorzystaniem drożdży winiarskich *S. cerevisiae* (o gęstości inokulum 10^6 jtk/cm³), trwająca 7 dni. Powstały w tym procesie półprodukt analizowano na zawartość alkoholu według normy PN-A-79120-04:1990, która polega na oddestylowaniu alkoholu z próbki i odczytaniu mocy z tablic na podstawie piknometrycznie oznaczonej gęstości destylatu [7].

Kolejnym etapem była biosynteza kwasu octowego w temperaturze 30 °C, do której użyto półproduktu otrzymanego na drodze fermentacji alkoholowej oraz szczepów bakterii octowych (AAB) *A. pasteurianus* O4 i *A. pasteurianus* MW3, których łączna gęstość inokulum wynosiła 10^6 jtk/cm³. Podczas procesu biosyntezy kwasu octowego oznaczano moc powstającego octu zgodnie z metodyką opisaną przez Czubę [2] poprzez bezpośrednie miareczkowanie 1 ml octu roztworem NaOH o stężeniu 0,1 M wobec roztworu fenoloftaleiny jako wskaźnika oraz przeliczenia według obowiązującego wzoru.

Przed dodaniem probiotycznych bakterii kwasu mlekowego do mleka pasteryzowanego w temperaturze 65 °C przez 30 minut (niska pasteryzacja) sprawdzono jego jakość mikrobiologiczną z użyciem metod analogicznych do wykorzystywanych podczas analizy soku jabłkowego. Mleko z dodatkiem probiotycznych bakterii kwasu mlekowego (LAB) w trzech różnych wariantach (z dodatkiem *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, z dodatkiem *L. plantarum* LMG P-21021 oraz z dodatkiem obu tych szczepów) (o gęstości inokulum 10^8 jtk/cm³), przelano do jałowych butelek i inkubowano przez 4 dni w temperaturze 21 ± 1 °C. Powstały skrzep przelano do sita i oddzielono od serwatki.

Z uwagi na potencjalnie prozdrowotne działanie uzyskanego napoju określono zawartość pierwiastków w otrzymanym occie, a ze względów bezpieczeństwa oznaczono zawartość metali ciężkich. Oznaczono zawartość Ca, Mn, Mg, Zn, Cu, Fe, K, Na i NaCl oraz metali ciężkich: Cd, Pb i Hg. Oznaczanie pierwiastków oraz kadmu i ołowiu wykonano w oparciu o procedurę metody płomieniowej spektrometrii absorpcji atomowej (FAAS) na aparacie Hitachi Z-200. Próbki mineralizowano na sucho w piecu muflowym w temperaturze $420 \div 450$ °C. Po mineralizacji i rozpuszczeniu, próbki oznaczano spektrometrycznie z użyciem krzemowej lampy diodowej UV. Stężenie pierwiastków określano na podstawie krzywych wzorcowych. Zawartość rtęci oznaczano przy użyciu metody atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) w analizatorze rtęci AMA 254. Próbkę umieszczono na podajniku aparatury, gdzie następowo jej suszenie oraz spalanie w 1000 °C, po czym następowo pomiar absorbancji przy długości fali 253,65 nm.

W ostatnim etapie zmieszano powstałe warianty serwatki z octem w odpowiedniej ilości, tak aby otrzymać 10-procentową i 50-procentową zawartość octu w napoju i przechowywano je w dwóch temperaturach: 3 °C oraz 21 °C przez okres 21 dni. Przeżywalność probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej sprawdzano we wszystkich wariantach napoju (łącznie 12 rodzajów napoju) w czasie 0, po 2, 7, 14 i 21 dniach, wysiewając 1 cm³ odpowiednich rozcieńczeń i zalewając płynnym podłożem MRS (w trzech powtórzeniach). Tak przygotowane płytki inkubowano w 37 °C ± 1 °C w warunkach beztlenowych w systemie Anaerobe Gas Generating Pouch (Thermo Scientific), zgodnie z normą PN-ISO 15214:2002 [13] przez 48 h.

Analizę wyników przeprowadzono w programie Statistica (wersja 14, Statsoft, Polska). Wykonano test T dla prób zależnych przy $p \leq 0,05$, aby określić różnice statystycznie istotne pomiędzy czasem 0, a poszczególnymi dniami przechowywania przygotowanych napojów. W celu określenia różnic statystycznie istotnych pomiędzy różnymi temperaturami przechowywania napoju oraz różnymi mocami octu użytego do produkcji napoju wykonano test T dla prób niezależnych przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań jakości mikrobiologicznej ekologicznego soku jabłkowego użytego do produkcji octu oraz niskopasteryzowanego mleka użytego do wyprodukowania serwatki, przedstawiono w tab. 1. Podczas analizy soku jabłkowego nie zaobserwowano wzrostu bakterii, pleśni ani drożdży. Nie wykryto również patogenów, co świadczyło o jałowości soku. W przypadku analizy mikrobiologicznej mleka określono ogólną liczbę drobnoustrojów na podłożu PCA, na pozostałych podłożach wzrostu nie zaobserwowano.

Tabela 1. Wyniki oceny jakości mikrobiologicznej soku jabłkowego i mleka
 Table 1. Results of the microbiological quality assessment of apple juice and milk

Parametr mikrobiologiczny Microbiological parameter	Wynik / Result	
	Sok jabłkowy / Apple juice	Mleko / Milk
Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/cm ³] Total count of bacteria [cfu/cm ³]	< 1	3,7 ± 0,02
Liczba bakterii kwasu mlekowego [jtk/cm ³] Count of Lactic Acid Bacteria [cfu/cm ³]	< 1	< 1
Liczba <i>E. coli</i> [jtk/cm ³] Count of <i>E. coli</i> [cfu/cm ³]	< 1	< 1
Liczba <i>Enterobacteriaceae</i> [jtk/cm ³] Count of <i>Enterobacteriaceae</i> [cfu/cm ³]	< 1	< 1
Liczba gronkowców koagulazododatnich [jtk/cm ³] Count of coagulase-positive staphylococci [cfu/cm ³]	< 1	< 1
Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm ³] Count of yeasts and moulds [cfu/cm ³]	< 1	< 1
Obecność <i>Salmonella</i> spp. Presence of <i>Salmonella</i> spp.	nie wykryto / not detected	nie wykryto not detected
Obecność <i>Listeria monocytogenes</i> Presence of <i>Listeria monocytogenes</i>	nie wykryto / not detected	nie wykryto not detected

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviations

Podczas procesu fermentacji alkoholowej z wykorzystaniem wyselekcjonowanych szlachetnych drożdży winiarskich kontrolowano zawartość alkoholu, która po 7 dniach wyniosła 7,5 %. W następnym etapie przeprowadzano biosyntezę kwasu octowego, używając produktu powstałego podczas fermentacji alkoholowej oraz szczepów AAB. Podczas trwającej fermentacji octowej analizowano na bieżąco moc powstającego octu, która finalnie, po 77 dniach wynosiła 4,4 %.

Zawartość pierwiastków oraz metali ciężkich w occie jabłkowym przedstawiono w tabeli 2. Zawartość pierwiastków była na wysokim poziomie, co potwierdza wcześniej sugerowane, prozdrowotne działanie octu. Zawartość metali ciężkich (Cd, Pb, Hg) w occie była poniżej granicy oznaczalności, co z kolei świadczy o bezpieczeństwie produktu.

Liczba bakterii probiotycznych w napojach dla wszystkich badanych szczepów wyjściowo wynosiła średnio $8,0 \pm 0,31 \log \text{ jtk/cm}^3$. Przedstawiono wyniki dla napojów o mocy octu 10 % i 50 % przechowywanych w temperaturze 3 °C oraz 21 °C przez okres 21 dni. Napój analizowano po 0, 2, 7, 14 i 21 dniach przechowywania. Różnice statystycznie istotne, pomiędzy czasem 0, a poszczególnymi dniami przechowywania

Tabela 2. Zawartość pierwiastków i metali ciężkich w occie jabłkowym

Table 2. Content of elements and heavy metals in apple cider vinegar

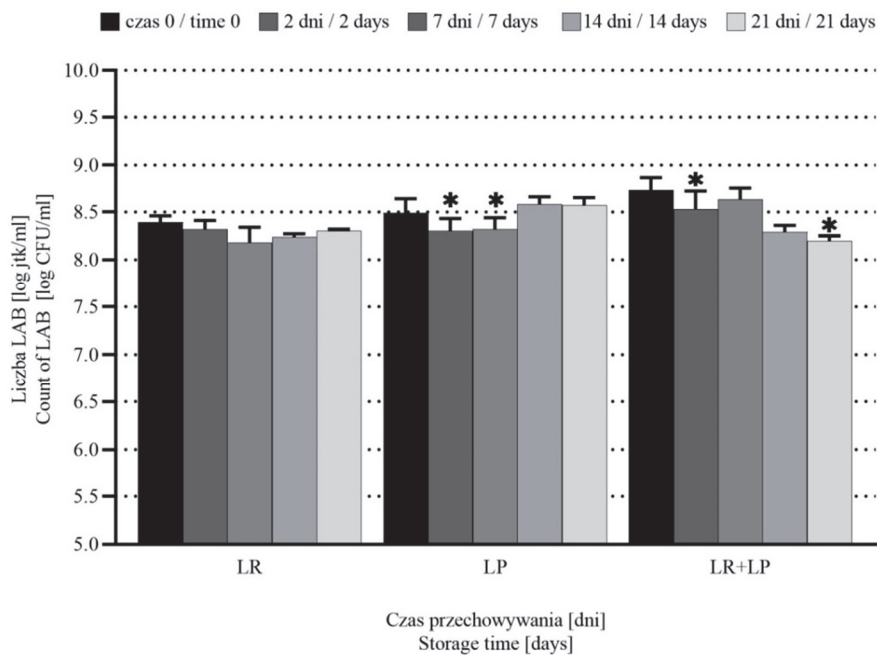
Pierwiastek / Element	[mg/dm ³]	SD
Ca	64,4	12,0
Mn	1,67	0,13
Mg	60,3	15,00
Zn	0,541	0,10
Cu	0,480	0,09
Fe	0,805	0,16
K	1,197	0,20
Na	11	0,42
NaCl	0,0027	0,001
Cd	< 0,003*	-
Pb	< 0,020*	-
Hg	< 0,001*	-

Objaśnienia / Explanatory notes:

(*) – granica oznaczalności metali ciężkich: Cd, Pb, Hg / limit of determination for heavy metals: Cd, Pb, Hg. W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe – SD / The table shows mean values and standard deviations – SD.

przedstawiono na wykresie. Zaobserwowano, że w napoju z 10 % zawartością octu przechowywanym w 3 °C, przeżywalność szczepów *L. rhamnosus* GG jako *L. plantarum* oraz kokultury tych szczepów utrzymywała się na wysokim poziomie, powyżej $8,0 \pm 0,17 \log \text{ jtk/cm}^3$, przez cały okres przechowywania (rys. 1.). W napoju przechowywanym w 21 °C zawierającym 10-procentowy dodatek octu, po 14 dniach przechowywania, przeżywalność szczepu *L. plantarum* obniżyła się do $7,9 \pm 0,04 \log \text{ jtk/cm}^3$, wynik ten był statystycznie istotny. W tym samym napoju, przeżywalność szczepu *L. rhamnosus* GG oraz kokultura szczepów *L. rhamnosus* GG i *L. plantarum* po 21 dniach przechowywania wynosiła odpowiednio $8,7 \pm 0,04 \log \text{ jtk/cm}^3$ oraz $8,5 \pm 0,03 \log \text{ jtk/cm}^3$ (rys. 2.). W drugim wariantcie napoju, o mocy octu 50 % przechowywanym w 3 °C, zaobserwowano obniżenie przeżywalności wszystkich szczepów bakterii probiotycznych. Największe obniżenie przeżywalności odnotowano dla szczepu *L. rhamnosus* GG, wynosiło ono jeden rząd logarytmiczny po 21 dniach inkubacji ($7,0 \pm 0,07 \log \text{ jtk/cm}^3$), wynik ten był statystycznie istotny. Liczba bakterii *L. plantarum* oraz kokultury *L. rhamnosus* GG i *L. plantarum* po 21 dniach przechowywania wynosiła średnio $7,6 \pm 0,35 \log \text{ jtk/cm}^3$ (rys. 3.). Analizując napój o 50-procentowej zawartości octu przechowywanym w 21 °C wykazano obniżenie przeżywalności szczepu *L. plantarum*, wynoszącej po 21 dniach $6,1 \pm 0,04 \log \text{ jtk/cm}^3$ (obniżenie o 2 rzędy logarytmiczne), co było statystycznie istotne. Liczba bakterii szczepu *L. rhamnosus* GG

oraz kokultury szczepów *L. rhamnosus* GG i *L. plantarum* po 21 dniach wynosiła średnio $7,7 \pm 0,08 \log \text{ jtk/cm}^3$ (rys. 4).

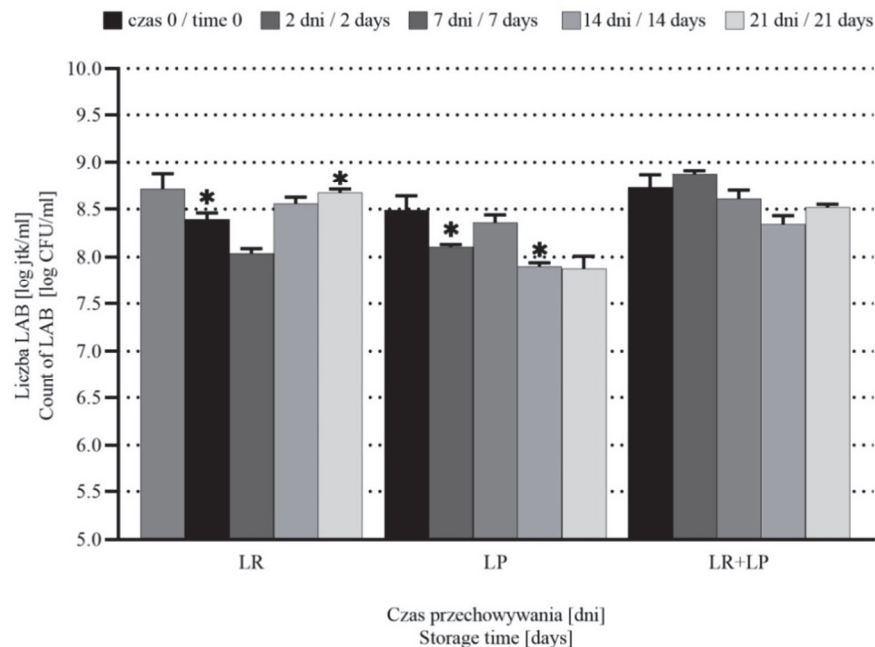


Objaśnienia / Explanatory notes: LR - *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103; LP - *Lactiplantibacillus plantarum* LMG P-21021. Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe; * - wartości statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) / The figure shows mean values (bars) and standard deviations; * - statistically significant values ($p \leq 0,05$)

Rys. 1. Przeżywalność szczepów probiotycznych w napoju na bazie serwatki i 10-procentowy octu owocowego przechowywanym w 3 °C

Fig. 1. The survivability of probiotic strains in a beverage based on whey and 10 % of fruit vinegar stored at 3 °C

Wykazano, że średnie wartości przeżywalności bakterii probiotycznych w napojach zawierających 10 % octu są istotnie wyższe od średnich wartości przeżywalności w napojach z 50 % zawartością octu. Temperatura przechowywania napojów nie wpłynęła istotnie na przeżywalność bakterii probiotycznych. Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) określiły liczbę bakterii probiotycznych w produkcie, gwarantującą osiągnięcie efektu terapeutycznego na poziomie $6 \div 7 \log \text{ jtk/cm}^3$ [3]. W analizowanych napojach liczba bakterii probiotycznych LAB utrzymywała się na wysokim poziomie, przekraczając w ciągu 21-dniowego okresu przechowywania minimalną ilość bakterii, ustaloną dla produktów probiotycznych.

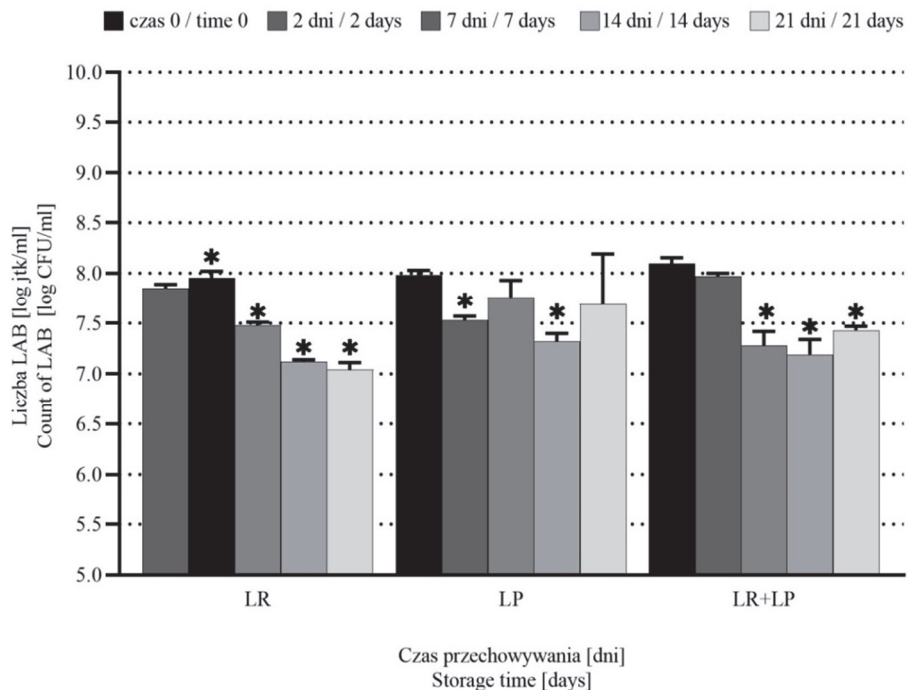


Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Przeżywalność szczepów probiotycznych w napoju na bazie serwatki i 10-procentowego octu owocowego przechowywanego w 21 °C

Fig. 2. The survivability of probiotic strains in a beverage based on whey and 10 % of fruit vinegar stored at 21 °C]

W badaniach przeprowadzonych przez Sady i wsp. [18] obserwowano istotny statystycznie spadek przeżywalności drobnoustrojów w napojach na bazie serwatki i soku pomarańczowego, jabłkowego oraz z czarnej porzeczki. Po 21 dniach przechowywania napojów serwatkowo-owocowych przeżywalność niektórych szczepów spadła poniżej $6,0 \log \text{ jtk/cm}^3$. Największe obniżenie przeżywalności drobnoustrojów obserwowano w napoju składającym się z serwatki i soku z czarnej porzeczki. Napojem charakteryzującym się najwyższym poziomem przeżywalności drobnoustrojów był napój pomarańczowy. W uzyskanych przez Skryplonek i Jasińską [19] napojach probiotycznych z mrożonej serwatki kwasowej oraz mleka i dodatków funkcjonalnych tj. oligofruktozy oraz koncentratu białek serwatkowych WPC 35 nie wykazano istotnych wahań przeżywalności bakterii probiotycznych w 14-dniowym okresie przechowywania. W owocowych napojach probiotycznych stabilność mikrobiologiczna jest znacznie niższa, niż w mlecznych napojach probiotycznych, czy też mleczno-owocowych.

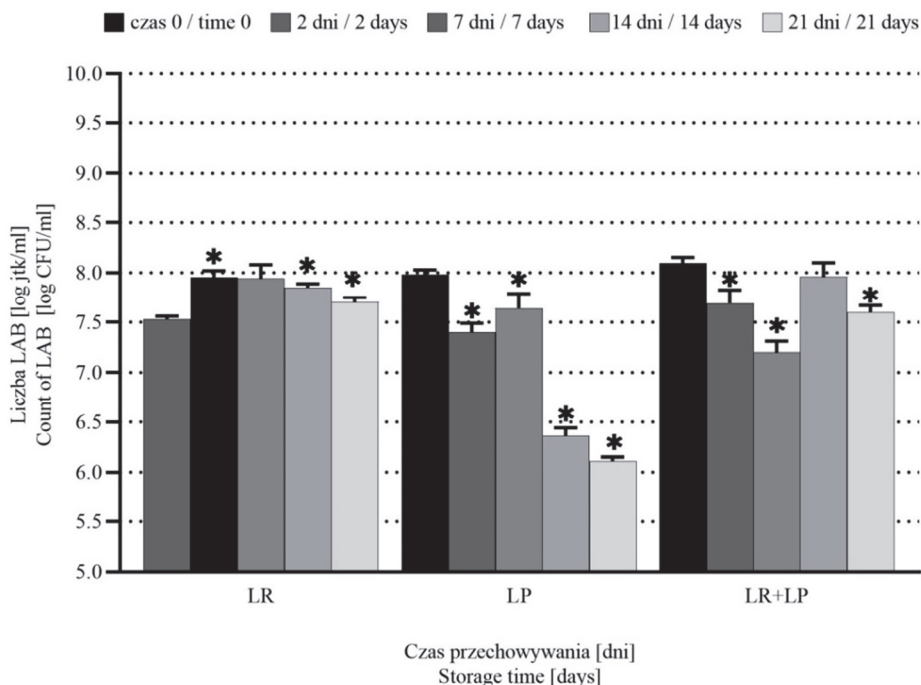


Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 3. Przeżywalność szczepów probiotycznych w napoju na bazie serwatki i 50 % octu owocowego przechowywanym w 3 °C

Fig. 3. The survivability of probiotic strains in a beverage based on whey and 50 % of fruit vinegar stored at 3 °C

Należy nadmienić, że LAB występują naturalnie w procesie fermentacji i powstawania dojrzewającego octu chińskiego Shanxi, produkowanego ze zbóż. Pełnią one bardzo ważną rolę podczas procesu powstawania poprzez polepszanie smaku octu. LAB są obecne we wszystkich etapach dojrzewania octu, tolerując trudne warunki procesów fermentacji alkoholowej i octowej [24, 25]. Podsumowując, otrzymane napoje, poprzez wysoką liczbę bakterii kwasu mlekowego spełniały wymagania postawione produktom probiotycznym. Uzyskane produkty były bezpieczne i stabilne mikrobiologicznie przez cały okres przechowywania.



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

Rys. 4. Przeżywalność szczepów probiotycznych w napoju na bazie serwatki i 50 % octu owocowego przechowywanym w 21 °C

Fig. 4. The survivability of probiotic strains in a beverage based on whey and 50 % of fruit vinegar stored at 21 °C

Wnioski

1. Badane probiotyczne szczepy bakterii mlekowych wykazały wyższą przeżywalność w napojach o niższej zawartości octu jabłkowego.
2. Napój na bazie serwatki uzyskanej po fermentacji mleka szczepami LAB i dodatku 10 % octu był dobrym medium, zapewniającym wysoką liczbę bakterii mlekowych.
3. W napoju z dodatkiem 50 % octu szczep *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 wykazał wyższą wrażliwość w temperaturze 3 °C na dodatek octu, natomiast *Lactiplantibacillus plantarum* LMG P-21021 wykazał wyższą wrażliwość w temperaturze 21 °C.
4. W ciągu 21-dniowego okresu przechowywania napoju z dodatkiem 10 % octu, niezależnie od temperatury i szczepu, liczba bakterii kwasu mlekowego była powyżej 7,0 log jtk/cm³.

5. Uzyskane wyniki badań wskazują, że innowacyjny napój dzięki utrzymującej się wysokiej liczbie bakterii kwasu mlekowego jest bezpieczny i stabilny mikrobiologicznie przez okres 21 dni.

Literatura

- [1] Budak N.H., Aykin E., Seydim A.C., Greene A.K., Guzel-Seydim Z.B.: Functional properties of vinegar. *J. Food Sci.*, 2014, 79(5): 757-64.
- [2] Czuba J.: Octownictwo. Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Warszawa 1986, pp. 101-103.
- [3] FAO/WHO: Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. [online]. FAO/WHO. Rome 2006. Dostęp w Internecie [11.05.2022.]: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- [4] Gajewska M., Bartodziejska B., Szosland-Fałtyń A.: Wykorzystanie procesów fermentacyjnych do opracowania innowacyjnej metody otrzymywania octu jabłkowego o właściwościach prozdrowotnych. *ŻYwność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2020, 27, 3 (124), 77-86.
- [5] Nieman D.C., Zwetsloot K.A., Simonson A.J., Hoyle A.T., Wang X., Nelson H.K., Lefranc-Millot C., Guérin-Deremaux L.: Effects of Whey and Pea Protein Supplementation on Post-Eccentric Exercise Muscle Damage: A Randomized Trial. *Nutrients*, 2020, 12 (8), 2382.
- [6] Ousaad D., Mechchate H., Laaroussi H., Hano C., Bakour M., El Ghouizi A., Conte R., Lyoussi B., El Arabi I.: Fruits Vinegar: Quality Characteristics, Phytochemistry, and Functionality. *Molecules*, 2021, 27(1), 222.
- [7] PN-A-79120-04:1990. Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego.
- [8] PN-EN ISO 11290-1:2017:07. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp. Część 1: Metoda wykrywania.
- [9] PN-EN ISO 21528-2:2017-08. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Część 2: Metoda liczenia kolonii.
- [10] PN-EN ISO 4833-1:2013-12 + Ap1:2016-11. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu wgłębnego w temperaturze 30 stopni C.
- [11] PN-EN ISO 6579-1:2017-04/A1:2020-09. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania, oznaczania liczby i serotypowania *Salmonella*. Część 1: Wykrywanie *Salmonella* spp.
- [12] PN-EN ISO 6888-2:2022-03. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). Część 2: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynogenem.
- [13] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 stopni C.
- [14] PN-ISO 16649-2:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2: Metoda płytkowa w temperaturze 44 stopni C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo beta-D-glukuronidu.
- [15] PN-ISO 7954:1999. Mikrobiologia. Ogólne zasady oznaczania drożdży i pleśni. Metoda płytkowa w 25 stopniach C.


- [16] Rocha-Mendoza D., Kosmerl E., Krentz A., Zhang L., Badiger S., Miyagasuku-Cruzado G., Mayta-Apaza A., Giusti M., Jimenez-Flores R., Garcia-Cano I.: Invited review: Acid whey trends and health benefits. *J. Dairy Sci.*, 2020, 104(2), 1262-1275.
- [17] Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D.: Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2017, 52 (9), 1983-1994
- [18] Sady M., Najgebauer-Lejko D., Domagała J.: The suitability of different probiotic strains for the production of fruit-whey beverages. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2017, 16(4), 421-429.
- [19] Skryplonek K., Jasińska M.: Jakość fermentowanych napojów probiotycznych otrzymanych z mrożonej serwatki kwasowej i mleka w czasie chłodniczego przechowywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2016, 1 (104), 32-44.
- [20] Skryplonek K., Dmytrów I., Mituniewicz-Małek A.: Probiotic fermented beverages based on acid whey. *J. Dairy Sci.*, 2019, 102(9), 7773-7780.
- [21] Stobaugh H.C., Ryan K.N., Kennedy J.A., Grise J.B., Crocker A.H., Thakwalakwa C, Litkowski P.E., Maleta K.M., Manary M.J., Trehan I.: Including whey protein and whey permeate in ready-to-use supplementary food improves recovery rates in children with moderate acute malnutrition: a randomized, double-blind clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2016, 103 (3), 926-33.
- [22] Wesołowska-Trojanowska M., Targoński Z.: Wykorzystanie serwatki w procesach biotechnologicznych. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 2014, 1(12).
- [23] West D.W.D., Sawan S. A., Mazzulla M., Williamson E, Moore D.R.: Whey Protein Supplementation Enhances Whole Body Protein Metabolism and Performance Recovery after Resistance Exercise: A Double-Blind Crossover Study. *Nutrients*, 2017, 11, 9 (7), 735.
- [24] Wu J. J., Ma Y. K., Zhang F. F., Chen F. S. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiol.*, 2012, 30(1), 289-97.
- [25] Zheng Y., Mou J., Niu J., Yang S., Chen L., Xia M., Wang M. Succession sequence of lactic acid bacteria driven by environmental factors and substrates throughout the brewing process of Shanxi aged vinegar. *Appl. Microbiol, Biotechnol.*, 2018, 102(6), 2645-2658.

THE SURVIVABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA IN AN INNOVATIVE BEVERAGE BASED ON FRUIT VINEGAR AND WHEY

S u m m a r y

Background. Whey, a waste product from cheese production, is an underutilized raw material with high nutritional value. This waste product may be used in the production of fermented beverages. The aim of this study was to develop an innovative fermented beverage based on whey and fruit vinegar and to determine the survivability of two probiotic strains of lactic acid bacteria. The study included the preparation of individual components, the selection of their appropriate proportions and the verification of the influence of storage conditions and time on the survivability of the strains. The biological material consisted of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strain, *Acetobacter pasteurianus* O4 and *Acetobacter pasteurianus* MW3 acetic bacteria strains and lactic acid bacteria strains: *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 and *Lactiplantibacillus plantarum* LMG P-21021. The survivability of lactic acid bacteria was tested under anaerobic conditions. The beverage was made of whey mixed with 10 % to 50 % apple cider vinegar. The above beverage was kept at a temperature of 21 ± 2 °C and 3 ± 2 °C for 21 days.

Results and conclusion. The beverage was analyzed once a week, and the number of lactic acid bacteria after 21 days of storage was at a high level, exceeding the WHO recommended number of bacteria in probiotic beverages – $10^6 \div 10^7$ CFU/cm³. The beverage based on whey and the addition of 10 % vinegar was a good medium, and the number of lactic acid bacteria in each variant of the beverage was on average 8.4 ± 0.29 log CFU/cm³.

Key words: whey, vinegar, lactic acid bacteria (LAB), acetic acid bacteria (AAB), fermented beverage, probiotics 

KATARZYNA MARCINIAK-ŁUKASIAK, KAROLINA GADOMSKA,
MICHAŁ SOWIŃSKI, KATARZYNA ŻBIKOWSKA, PIOTR ŁUKASIAK,
ANNA ŻBIKOWSKA

AN ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF USING PLANT DRINKS IN A GLUTEN-FREE BREAD RECIPE

Summary

Background. A gluten-free diet is the only treatment for diseases related to gluten intolerance. Bread is the basic ingredient of any diet. In recent years, we have observed an increase in the availability of gluten-free products on the Polish market, but their quality still differs from traditional products. The production of gluten-free food is associated with many technological difficulties in ensuring that products have the appropriate consistency and texture. Lactose intolerance is also relatively common in people who are newly diagnosed with celiac disease. Therefore, it seems advisable to undertake research aimed at replacing milk with plant-based drinks in a gluten-free bread recipe. The aim of the study was to determine the effect of the addition of plant drinks on the quality of gluten-free bread. Milk, soy, almond and rice drinks were used for baking. Gluten-free bread was subjected to a sensory evaluation. The weight, specific weight, volume, moisture, texture and color of the bread were also tested.

Results and conclusion. The type of drink used affects both the taste, aroma, structure and texture. Breads with milk substitutes have a less noticeable taste of bread and yeast. However, in the assessment of sensory desirability, the best results were obtained in the case of gluten-free bread with the addition of a soy drink. It was found that the use of plant drinks did not significantly affect the weight after baking, specific weight and moisture. The use of plant-based drinks to obtain gluten-free bread may be an alternative for people on a vegan diet.

Key words: gluten-free bread, plant-based milk, texture, sensory analysis

Dr hab. inż. prof. SGGW K. Marciniak-Łukasiak, ORCID: 0000-0001-8214-4689, inż. K. Gadomska ORCID: 0000-0003-1861-0600, mgr inż. M. Sowiński, ORCID: 0000-0003-1613-0662, prof. dr hab. inż. A. Żbikowska, ORCID: 0000-0001-7013-4520, Katedra Technologii i Oceny Żywności, Wydział Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa; K. Żbikowska, ORCID: 0000-0003-2066-9740, Wydział Medyczny, Uniwersytet Medyczny w Warszawie, ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa; dr hab. inż. prof. PP P. Łukasiak, ORCID: 0000-0003-4012-9135, Instytut Informatyki, Wydział Informatyki i Telekomunikacji, Politechnika Poznańska, ul. Piotrowo 2, 60-965 Poznań; Kontakt: katarzyna_marciniak_lukasiak@sggw.edu.pl

Introduction

Bread is one of the basic components of a daily human diet. It is the main source of carbohydrates and provides many valuable nutrients, including B vitamins and fiber to support the proper functioning of the intestines. Due to changing eating habits and an increase in various types of food allergies and intolerances, newer recipes and technological solutions are sought to expand the offer of products available on the market [13, 21, 28]. Demand for gluten-free products continues to grow, with a global market of \$21.61 billion in 2019 and is projected to reach nearly \$24 billion by 2027. Taking into account an upward trend in the value of the gluten-free market and consumer interest, it is important to ensure the availability and variety of this type of product [11].

Gluten-free bread is the basis of the elimination diet of patients suffering from gluten-dependent diseases, which include, among others: celiac disease, non-celiac hypersensitivity to gluten, Dühring's disease and wheat allergy [25]. According to research, celiac disease affects about 1 % of the population, and the incidence of this disease is gradually increasing. Failure to follow a strict diet ultimately leads to the disappearance of intestinal villi, which in turn results in malabsorption of nutrients from food. The limited absorption of ingredients necessary for the proper functioning of the body may cause various clinical symptoms [4].

In recent years, we can observe an increase in the availability of gluten-free products on the Polish market, but their quality still differs from traditional products. The production of gluten-free food is associated with technological difficulties in ensuring that products have the appropriate consistency and texture. Gluten-free food is also characterized by a lower nutritional value compared to products obtained from traditional cereals. The use of a gluten-free diet carries the risk of deficiency of many ingredients, therefore it should be varied and enriched with protein, fiber and macro – and microelements [2].

In order to improve the rheological properties of the dough, which will allow for the proper forming of the billets and obtaining the appropriate properties of the finished product, many studies are carried out to improve the recipes of gluten-free bread. In order to replace gluten, which is a structureforming factor, substances are used to support the proper development of the dough, emulsifiers, as well as texturing and thickening substances. The most commonly used are hydrocolloids, which include, among others, guar gum, xanthan gum, Locust bean gum, pectin, carboxymethyl cellulose and hydroxyethyl cellulose. These substances also have the ability to bind water, gel and act as stabilizers [5, 7, 16]. Enzymes (transglutaminases, amylases and proteases) and exopolysaccharides, which are produced by lactic acid bacteria, are also increasingly used, which allows the elimination of chemical substances that make up the structure [3, 8, 17, 19, 29].

Lactose intolerance is also relatively common in people with newly diagnosed celiac disease. Therefore, an increasing number of consumers are choosing plant-based drinks (milk) substitutes for medical reasons. Plant drinks substitutes or extracts are water-soluble extracts from legumes, oilseeds, cereals or pseudocereals that look like cow's milk [26]. Plant-based food is gaining more and more popularity. This trend is based on several factors such as lifestyle changes, interest in alternative diets, and growing awareness of sustainable production of food, especially protein. Plant-based drinks substitutes can serve as an alternative to traditional products [12]. Therefore, it seems advisable to undertake research aimed at replacing milk in the recipe of gluten-free bread with plant-based drinks.

Materials and methods

Gluten-free bread concentrates were used with following ingredients: corn starch (BogutynMłyn, Poland), potato starch (Melvit, Poland), corn flour (Kupiec, Poland), millet flour (Melvit, Poland), instant yeast (Lesaffre, Poland), sugar (SuedzuckerPolska Sp. z o.o, Poland), salt (Kłodawa S.A. Poland), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) (J. Rettenmaier&Söhne, Poland). The following ingredients were added to the concentrates: “Łaciate” milk (fat content 3.2 %, Mlekpól, Poland), soy, almond and rice plant-based drinks (Alpro, Poland), tap water.

The basis of gluten-free bread concentrates was corn starch. The same amount of potato starch, corn flour, instant yeast, sugar, salt, and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) was present in each of the samples. Only the amount of corn starch was changed. The concentrate recipes were established on the basis of our own research, in which the amount of ingredients needed to prepare the dough was determined. The loose ingredients, which were used to prepare the mixture, were weighed in accordance with the recipes on technical scales with a precision of 0.01. The recipe composition is given in Table 1.

Table 1. The recipe composition of gluten-free bread concentrates.
Tabela 1. Skład recepturowy koncentratów pieczywa bezglutenowego.

Ingredients / Składniki	Raw material content [%] / Zawartość surowca [%]
Corn flour / Mąka kukurydziana	30
Rice flour / Mąka ryżowa	35
Potato starch / Skrobia ziemniaczana	19
Sugar / Cukier	5.1
Salt / Sól	1.5
Yeast / Drożdże	2.4
Millet flour / Mąka jagłana	5
HPMC / Hydroksypropylometylceluloza	2

All ingredients were mixed in a mixer for 5 min, and next the mixture was stored in a plastic bowl for 30 min at 40 °C. After 30 min, the dough was placed in shaped bowls where the fermentation process was continued for the next 10 min until the optimum volume was reached. The baking proceeded in a UNOX combi-steamer oven (XBC type, model: XBC 404) at 175 °C for 23 min, on a third level of vaporization. The refrigerated breads were packed using a polyethylene bag, they were stored at a temperature of 22 ± 2 °C. All measurements were repeated twice.

The bread volume was measured using the rapeseed displacement method 10-05. The bread moisture was determined according to the Approved method 44-15A [1].

Cubes with an area of 27 cm³ were cut from the bread crumb and then weighed on technical scales with an accuracy of 0.01. Knowing the mass and volume, the specific weight was calculated.

The measurements of crumb hardness were done by using a texture Analyzer TA-XTplus (Stable Micro Systems, United Kingdom). Slices with a thickness of 20 mm were cut from the center of the analyzed loaves. Subsequently, the slices were squeezed and relaxed. As before, we used a cylindrical head with an attachment in the shape of a cylinder of a diameter of 36 mm. Measurements were done at the speed of movement of the head of 1 mm/s penetrating the sample to a depth of 10 mm with a charge cell of 250 N. An analysis of the moisture and hardness of the crumb was made after 24 and 48 hours after baking.

A sensory evaluation was carried out using the scaling method by a trained team of 10. The length of the scale segment was 100 mm, which corresponded to 100 conventional units. The evaluators marked the intensity of individual features for each of the loaves separately. The taste, smell, structure and texture of the crumb were assessed, as well as consumer desirability [22, 23].

The characterization of the gluten-free bread color was performed using the L*a*b* system [20]. All sampled gluten-free breads were analyzed in terms of the referred parameters using a Minolta CR-310 colorimeter (Konica-Minolta, Japan), which was calibrated a priori with a white standard tile. Each measurement was repeated five times.

A statistical analysis of the results obtained was performed applying Statgraphics Plus 4.1. The differences between the averages were estimated by conducting a multivariate regression analysis. The significance level (α) was set to 0.05 and the smallest statistically significant difference was chosen using Tukey's test. A PCA analysis was done using Statistica 13.3 software.

Results and discussion

The physical properties of bread, which include, among others, the volume and specific weight as well as the porosity, moisture and hardness of the crumb determine its quality, and the consumer's assessment [24].

Table 2. Volume and specific weight of gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drink: soy (GF soy), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Tabela 2. Objętość i masa właściwa pieczywa bezglutenowego z dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soy), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

Sample / Próbką	Volume [cm ³ /100 g] Objętość [cm ³ /100 g]	Specific weight [g/cm ³] Ciężarwłaściwy [g/cm ³]
GF milk / Mlekokrowie	212.74 ± 1.69	0.21 ± 0.02
GF soy / Napój roślinny sojowy	243.27 ± 2.01	0.23 ± 0.02
GF almond / Napój roślinny migdałowe	162.32 ± 1.65	0.21 ± 0.02
GF rice / Napój roślinny ryżowe	143.59 ± 1.95	0.20 ± 0.03

The volume of the gluten-free breads made was in the range of 140 cm³/100 g - 240 cm³/100 g (Table 2). The gluten-free bread with the addition of a plant drink (240 cm³/100 g) was characterized by the highest volume among the examined breads. The gluten-free bread with the addition of milk (210 cm³/100 g) showed a similar volume. The gluten-free bread with the addition of rice drink was characterized by the smallest volume (140 cm³/100 g). The gluten-free bread with almond drink (160 cm³/100 g) showed a higher volume than the bread with the addition of rice drink. The volume of the bread with the addition of plant drinks was different compared to the bread with the addition of milk. The weight of the loaves immediately after baking ranged between 130.04 g - 133.42 g and did not differ significantly. The highest weight was observed for the bread with almond drink (133.42 g), and the lowest for the bread with soy drink (130.04 g). The gluten-free bread made in the work differed in terms of volume and weight from the results obtained by Gambuś [10]. This may be the result of using a different recipe composition. The specific weight of the gluten-free bread ranged between 0.21 g/cm³ - 0.23 g/cm³ and did not differ significantly. The gluten-free bread with the addition of soy drink had the highest specific weight (0.23 g/cm³). On the other hand, the lowest specific weight was shown by the gluten-free bread with the addition of rice drink (0.20 g/cm³). Moisture shows the degree of freshness of the bread and affects the staling process, which adversely affects the changes in the sensory characteristics of the bread [9].

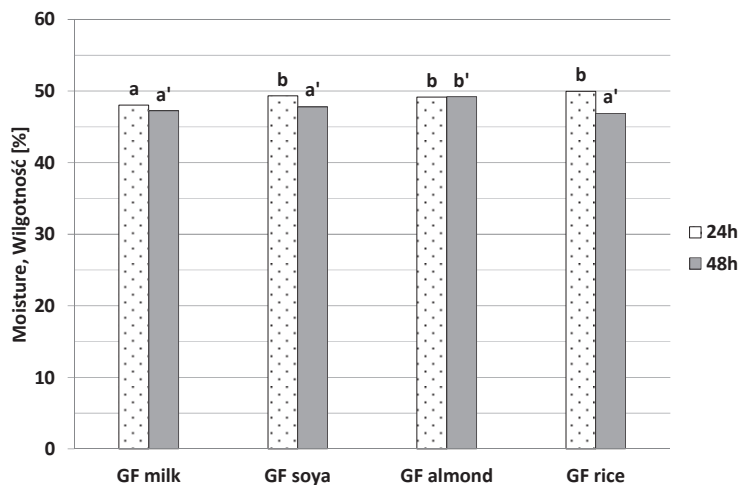


Figure 1. Moisture of gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drinks: soy (GF soy), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Rysunek 1. Wilgotność pieczywa bezglutenowego z dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soy), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

Explanatory notes / Objasnienia:

Values marked with the same symbols (a-b, a'b') mean no statistically significant differences ($\alpha = 0.05$) / Wartości oznaczone tymi samymi symbolami (a-b, a'b') nie różnią się istotnie statystycznie ($\alpha = 0,05$).

The moisture of the analyzed breads ranged from 47.53 ÷ 48.65 % after 24 hours and 45.98 ÷ 48.62 % after 48 hours (figure 1), which is consistent with Cacak-Pietrzak's research [3], according to which the moisture of a gluten-free bread should not exceed 53 %. An analysis of the moisture content of the gluten-free bread showed slight differences in the values 24 hours after baking among the gluten-free breads examined. There were also no significant differences in the bread moisture values after 24 and 48 hours of storage. The most noticeable decrease in moisture after 48 hours was observed in the gluten-free bread with the addition of rice drink. The moisture content of the gluten-free bread made at work is similar to the results obtained by Dłużewska and Marciniak-Lukasiak [8] and Gambuś [10]. Demirkesen [6], in his research on the moisture content of a gluten-free bread baked with rice flour and the addition of chestnut flour, showed that during the storage of bread, the process of staling occurs due to the migration of moisture from the crumb to the crust. As a result of this process, the ability to bind water by the crumb decreases, hence the lowest moisture losses in the bread are observed in samples stored for the shortest time. The use of vegetable drinks as a milk substitute did not increase the rate of loss of bread moisture during 48 hours of storage.

Color influences the positive or negative attitude of consumers to a given product [27]. When analyzing the results of the color parameters, it was found that they did not

differ significantly (Table 3). The values of the L* parameter ranged between 72.43 ÷ 75.02. The highest value of the L* parameter was found for the bread with rice drink (75.02), and the lowest for the bread with milk (72.43). The values of the a* and b* parameters, showing the share of red and green, as well as blue and yellow, also did not differ significantly. All values of the a* parameter are negative, which proves the share of the green color. The highest proportion of green color was found in the case of the bread crumb with the addition of milk (-6.25), and the lowest for the crumb of the bread with the addition of almond drink (-5.39). The b* parameter values, indicating the share of yellow and blue colors, have positive values in each case. Positive values indicate the participation of the yellow color. Its largest share was observed in the case of the bread crumb with the addition of soy drink (27.32). On the other hand, the lowest share was seen in the crumb of the bread with the addition of rice drink (25.12). The obtained values of the L* parameter of the gluten-free bread crumb are similar to the values obtained by Krupa-Kozak [14], however, they differ in the proportion of yellow and green colors.

Table 3. The values of the color parameters of gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drinks: soy (GF soy), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Tabela 3. Wartości parametrów barwy pieczywa bezglutenowego bezglutenowego z dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soy), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

Sample / Próbkka	L*	a*	b*
GF milk / Mlekokrowie	72.43 ^a ± 0.55	-6.25 ^c ± 0.07	25.91 ^a ± 0.50
GF soy / Napój roślinny sojowy	73.25 ^a ± 1.13	-6.24 ^c ± 0.05	27.32 ^b ± 0.64
GF almond / Napój roślinny migdałowe	73.35 ^a ± 0.93	-5.39 ^c ± 0.03	26.16 ^{ab} ± 0.67
GF rice / Napój roślinny ryżowe	75.02 ^a ± 0.67	-5.81 ^c ± 0.02	25.12 ^a ± 0.31

Explanatory notes /Objaśnienia:

Values in columns marked with the same symbols (a-c) mean no statistically significant differences ($\alpha = 0.05$). Wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi symbolami (a-c) nie różnią się istotnie statystycznie ($\alpha = 0,05$)

Texture proves the quality of food products. By analyzing the results of the texture parameters (Table 3), it was observed that the lowest value of the hardness parameter was found in the bread with the addition of milk. The hardness of this bread did not change during 48-hour storage. The gluten-free bread with the addition of rice drink was characterized by the highest value of the hardness parameter after 24 hours. In the case of the breads with the addition of soy and almond drinks, the hardness increased during storage. However, these values were not statistically significant. Similar relationships were observed by Kulczak [15], who assessed selected physical properties of a gluten-free bread with the use of instant pea flour and buckwheat products.

The value of the elasticity parameter ranged between $0.82 \div 0.89$ after 24 hours of storage and $0.79 \div 0.86$ after 48 hours of storage (Table 4). The gluten-free bread with the addition of rice drink was characterized by the highest value of the elasticity parameter, both after 24 and 48 hours of storage. No statistically significant differences were observed. In the studies by Marciniak-Łukasiak and Skrzypacz [18], in which the addition of amaranth flour was used, the elasticity increased during storage, which may be related to differences in the recipe composition.

Table 4. Hardness, Springness, Cohesiveness, Gumminess, Chewiness of gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drinks: soy (GF soy), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Tabela 4. Twardość, sprężystość, spoistość, gumowatość, żujność pieczywa bezglutenowego bezglutenowegoz dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soy), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

Time [h] Czas [h]	Sample Próbka	Hardness [N] Twardość [N]	Springness Sprężystość	Cohesiveness Spójność	Gumminess [N] Gumiastość [N]	Chewiness [N] Żujność [N]
24	GF milk	$15.89^a \pm 1.25$	$0.82^a \pm 0.12$	$0.26^a \pm 0.03$	$4.03^a \pm 0.93$	$3.33^a \pm 0.53$
	GF soy	$20.85^c \pm 1.42$	$0.84^a \pm 0.06$	$0.33^b \pm 0.04$	$6.90^b \pm 0.87$	$5.82^b \pm 0.42$
	GF almond	$18.96^b \pm 1.02$	$0.86^a \pm 0.21$	$0.43^c \pm 0.02$	$8.18^c \pm 1.02$	$7.03^c \pm 0.81$
	GF rice	$23.23^d \pm 1.43$	$0.89^a \pm 0.11$	$0.35^b \pm 0.03$	$8.13^c \pm 1.23$	$7.31^c \pm 0.60$
48	GF milk	$15.71^a \pm 0.97$	$0.83^a \pm 0.06$	$0.29^a \pm 0.03$	$4.60^a \pm 1.02$	$3.83^a \pm 0.62$
	GF soy	$21.68^c \pm 1.32$	$0.83^a \pm 0.09$	$0.32^a \pm 0.02$	$6.99^c \pm 1.21$	$5.81^c \pm 0.41$
	GF almond	$22.81^c \pm 1.25$	$0.79^a \pm 0.06$	$0.30^a \pm 0.03$	$6.91^c \pm 1.32$	$5.48^c \pm 0.52$
	GF rice	$17.84^b \pm 1.02$	$0.86^a \pm 0.05$	$0.31^a \pm 0.04$	$5.45^b \pm 0.82$	$4.71^b \pm 0.54$

Explanatory notes /Objaśnienia:

Values marked with the same symbols (a-e) mean no statistically significant differences ($\alpha = 0.05$) / Wartości oznaczone tymi samymi symbolami (a-e) nie różnią się istotnie statystycznie ($\alpha = 0,05$).

The gumminess of the bread made ranged between $4.03 \div 8.18$ N after 24 hours of storage and $4.60 \div 6.99$ N after 48 hours of storage (Table 4). The gumminess of all breads with the addition of plant-based drinks was greater than that of the bread containing cow's milk. These differences were statistically significant. The highest value of the gumminess parameter was found in the bread with the addition of almond drink (8.18 N). In the case of the gluten-free bread with the addition of almond drink and rice drink, the value of the gumminess parameter after 48 hours was lower than after 24 hours of baking. The chewiness of the breads after 24 hours of storage ranged from 3.33 to 7.31 N, while after 48 hours of storage it was from 3.83 to 5.81 N. Similar to gumminess, the chewiness values were higher for the breads with the addition of plant drinks. The chewiness parameter of the bread with the addition of rice drink 24 hours after baking was the highest and amounted to 7.31, and the smallest parameter of the

bread with the addition of milk was 3.33. The chewiness parameter of the bread with the addition of almond drink and the addition of rice drink after 48 hours was lower than after 24 hours of baking.

Four types of gluten-free bread were subjected to a sensory evaluation. The taste, smell, structure and texture of the crumb were assessed, as well as consumer desirability. The bread taste was the most noticeable in the case of the gluten-free bread with the addition of milk and obtained the highest scores. The taste of this taste in gluten-free bread with the addition of soy drink was lower than in the case of the bread with the addition of milk (70 AU – an arbitrary unit). The bread taste in the gluten-free bread with the addition of almond drink was felt to a lesser extent than in the bread with the addition of soy drink (50 AU). The gluten-free bread with the addition of rice drink had the least noticeable bread taste and obtained 40 AU. The bread with milk is the most salty (70 AU). The saltiness of the breads with the addition of soy and almond drinks was assessed at the same level (30 AU) and it is noticeably lower than in the case of the bread with the addition of milk. The gluten-free bread with the addition of rice drink showed the least salty taste (20 AU).

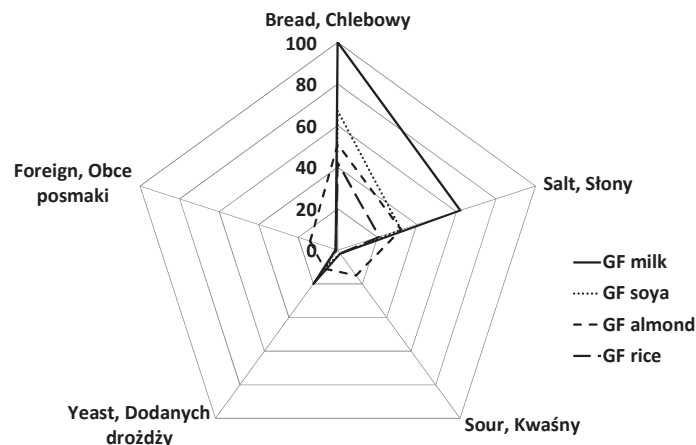


Figure 2. The taste of the gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drinks: soy (GF soya), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Rysunek 2. Smak pieczywa bezglutenowego z dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soya), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

The breads with the addition of milk, soy and rice drinks do not taste sour. The sour taste was felt only in the bread with the addition of almond drink (10 AU). The taste of added yeast was not observed in the case of the bread with the addition of rice drink (AU). For the breads with the addition of soy and almond drinks, added yeast was tasted to a lesser degree (10 AU). The bread with the addition of milk had the most percep-

tible taste of added yeast (40 AU). No foreign aftertaste was noted in the breads with the addition of milk, soy drink and rice drink (0 AU). Only the bread with the addition of the almond drink had a slightly perceptible foreign aftertaste (10 AU) (Figure 2). A smell analysis showed that each of the gluten-free breads assessed did not have any foreign smells. The breads with the addition of milk, soy and rice drinks were characterized by the smell of bread felt at the same level. Only in the case of the bread with the addition of almond drink, the bread smell was much more intense, which translates into a sensory evaluation. The smell of added yeast was the most pronounced in the bread with the addition of milk (100 AU). Yeast added to the gluten-free bread with the addition of soy drink was felt strongly (90 AU).

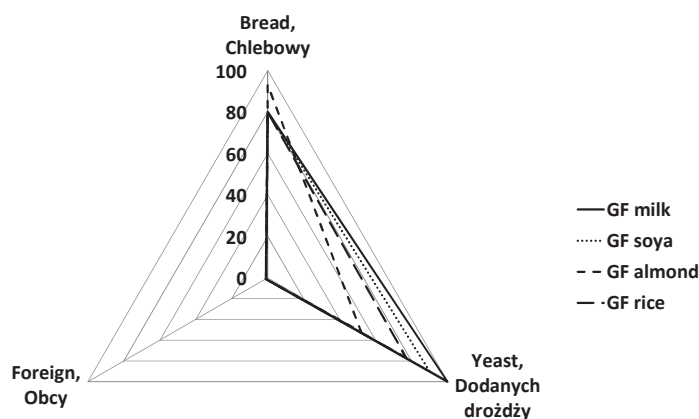


Figure 3. The smell of the gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drinks: soy (GF soya), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Rysunek 3. Zapach pieczywa bezglutenowego z dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soya), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

The yeast flavor in the bread with the addition of rice drink was less pronounced than in the bread with the addition of soy drink (70 AU). The bread with the addition of almond drink was characterized by the least perceptible smell of added yeast (50 AU) (Figure 3). An analysis of the structure and texture showed that the gluten-free bread with the addition of rice drink was the most brittle, compact and hard, and obtained 90 AU in each feature (Figure 4). The gluten-free bread with the addition of milk showed the same crispness as the bread with the addition of rice drink (90 AU). The bread with the addition of soy drink (80 AU) was less tender. The bread with almond drink was the least brittle, hard (40 AU) and compact (50 AU). The breads with the addition of milk and soy drink were characterized by a strongly compact structure (70 AU), and also showed high hardness. The gluten-free bread with the addition of milk was harder (60 AU) compared to the gluten-free bread with the addition of soy drink (50 AU). The

highest level of consumer demand was observed for the gluten-free bread with the addition of soy drink (70 AU) (Figure 5). The gluten-free bread with milk (60 AU) and the gluten-free bread with almond drink (50 AU) were highly coveted among consumers. The least desired bread was the gluten-free bread with the addition of rice drink (40 AU).

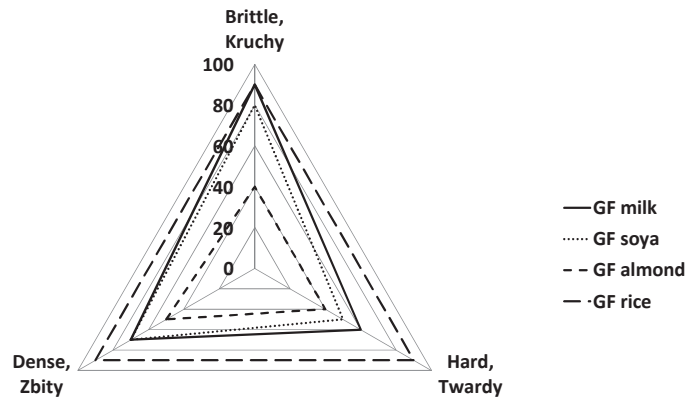


Figure 4. The structure features of the gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drinks: soy (GF soya), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Rysunek 4. Struktura miększu pieczywa bezglutenowego z dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soya), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

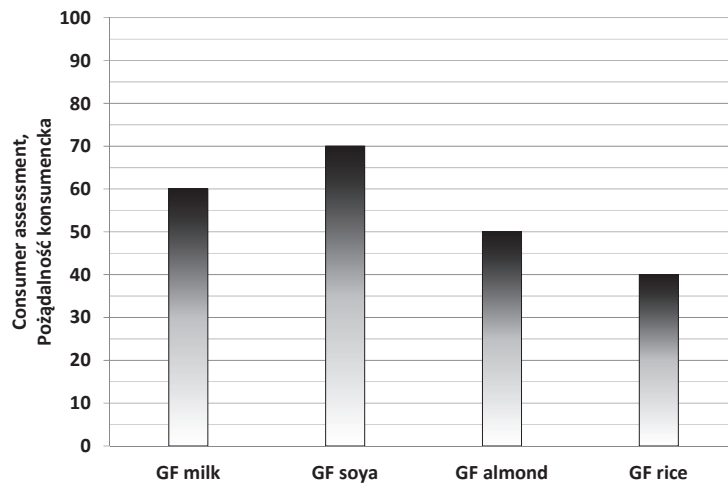


Figure 5. The consumer assessment of the gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drinks: soy (GF soya), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Rysunek 5. Pożądalność konsumencka pieczywa bezglutenowego z dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soya), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

A Principal Component Analysis (Figure 6) of the results of the evaluated bread samples showed that sample variation corresponded to the first main component (Factor 1), which accounted for 54.88 % of the total variability and was related mainly to taste features (bread, salt, yeast), yeast smell, specific weight and texture features (chewiness, springness, cohesiveness, hardness and gumminess) and moisture. The second component (Factor 2) constituted 33.60 % of the general variable and was related mainly to the structure (hard, dense, brittle), tastes (sour, foreign) and bread smell. Based on the eigenvalues obtained, the analysis can be limited to two factors explaining 88.48 % of the total variability.

The PCA results showed that the analyzed samples can be clustered into four distinctive groups. Each cluster corresponds to a different sample, as well as some of them can be clustered in groups as having similar influence in the phenomena explanation.

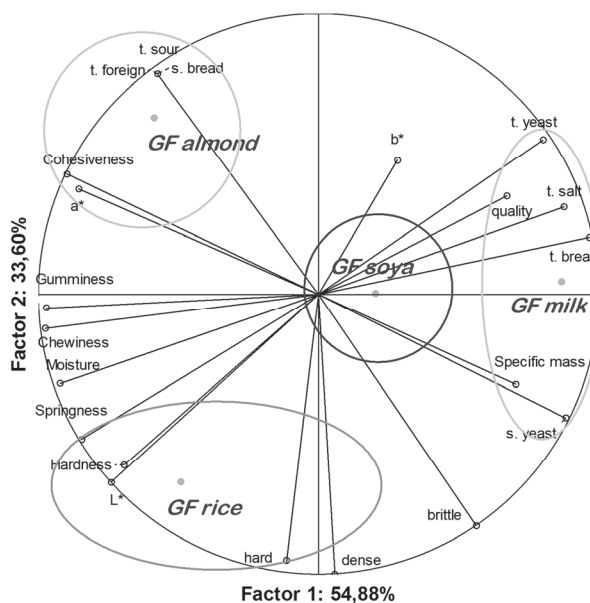


Figure 6. A Principal Component Analysis (PCA) of the gluten-free breads with the addition of cow's milk (GF milk), and plant-based drinks: soy (GF soy), almond (GF almond) and rice (GF rice) drinks.

Rysunek 6. Analiza składowych głównych (PCA) pieczywa bezglutenowego z dodatkiem mleka krowiego (GF milk), oraz napojów roślinnych: sojowego (GF soy), migdałowego (GF almond) i ryżowego (GF rice).

Explanatory notes / objaśnienia:

's.' stands for smell, 't.' stands for taste, features 'hard', 'dense' and 'brittle' correspond to the structure / 's.' oznacza zapach, 't.' oznacza smak, cechy 'hard', 'dense' i 'brittle' odpowiadają strukturze mięksamu.

The clusters obtained distinguish the samples with a different type of the addition of plant-based drinks. The gluten-free bread with the addition of cow's milk can be characterized by the high level of specific weight. Additionally, bread, salt and yeast taste was recognized. One can notice that those breads were accompanied by yeast smell and could be almost fully explained by Factor 1. The gluten-free breads with the addition of almond drink shows better texture features than the samples with soy drink and cow's milk. The bread smell and foreign and sour taste was more intense in such samples. The rice drink addition creates a less harder, dense and brittle structure. The texture features are similar as in the case of the almond drink addition. As for the addition of almond drink, the case of rice drink addition were characterized by the similar texture features and moisture level. The addition of soy drink can be explained by the features corresponding to Factor 1. A brittle structure, bread taste and high mass index distinguish this sample. Based on the analysis provided, one can conclude that the bread samples with different types of drinks addition were characterized by different factors. Lower values of texture features can distinguish the samples with the almond and rice drinks addition from other samples. The addition of the soy milk and cow's milk increases the bread taste and specific weight index. For both samples, the structure was more brittle, and together with the features mentioned previously, both samples obtained the highest consumer assessment score. One can conclude that the results obtained suggest that the addition of soy drink or cow's milk has the promising organoleptic and sensory features of gluten-free breads. As a result, both samples were recognized as the most demanding breads among the analyzed ones.

Conclusions

1. The use of plant-based drinks does not affect the weight after baking, specific weight and volume of the bread.
2. The moisture of the bread analyzed in the work was in the range of $47.53 \div 48.65$ % after 24 hours and $45.98 \div 48.62$ % after 48 hours. There were also no significant differences in the moisture content of the bread after 24 and 48 hours of storage. The most noticeable decrease in moisture after 48 hours was observed for the gluten-free bread with the addition of rice drink.
3. The parameters of the color components of the bread crumb measured in the CIELAB system (L^* , a^* , b^*) did not differ significantly. The values of the L^* parameter ranged from $72.43 \div 75.02$, and the lowest value was observed for the gluten-free bread with the addition of milk.
4. The analysis of the texture parameters showed that the bread with the addition of milk had the lowest value of the hardness parameter and it did not change during the 48-hour storage. The gluten-free bread with the addition of rice drink was characterized by the highest value of the hardness parameter after 24 hours.

5. The type of plant drink / milk used affects the sensory characteristics of a gluten-free bread. The type of drink affects both the taste and aroma, as well as the structure and texture. Breads with milk substitutes have a less noticeable taste of bread and added yeast. However, in the assessment of sensory desirability, the best results were obtained in the case of the gluten-free bread with the addition of soy drink.
6. The results obtained justify the continuation of research in this direction. It is planned to expand the research to include unconventional plant drinks such as oat, coconut or mixtures of plant drinks. It is worth mentioning that the use of plant-based drinks to make gluten-free breads can be an alternative for people on a vegan diet.

References

- [1] AACC International.: Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 10th ed. Methods 10-05 and 44-15A. The Association, St. Paul, MN 2000
- [2] Alvarez-Jubete L., Arendt E.K., Gallagher E.: Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, 21, 106-113.
- [3] Cacak-Pietrzak G., Ceglińska A., Zaorska A., Rajkowska A.: Ocena jakości handlowego pieczywa bezglutenowego. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 2019, 2, 40-45.
- [4] Caio G., Volta U., Sapone A., Leffler D.A., Giorgio R., Catassi C., Fasano A.: Celiac disease: A comprehensive current review. *BMC Med.*, 2019, 17, 142.
- [5] Culetu A., Duta D.E., Papageorgiou M., Varzakas T.: The Role of Hydrocolloids in Gluten-Free Bread and Pasta; Rheology, Characteristics, Staling and Glycemic Index. *Foods*, 2021, 10(12), 3121.
- [6] Demirkesen I., Sumnu G., Sahin S.: Quality of gluten-free bread formulations baked in different ovens. *Food Bioproc. Technol.*, 2013, 6(3), 746-753.
- [7] Dłużewska E., Marciniak-Lukasiak K., Dojczew D.: Koncentraty chleba bezglutenowego z dodatkiem wybranych hydrokolidów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2001, 2 (27), 57-67.
- [8] Dłużewska, E., Marciniak-Lukasiak, K., Kurek, N.: Effect of transglutaminase additive on the quality of gluten-free bread. *CyTA-J. Food*, 2015, 13(1), 80-86.
- [9] Fik M.: Czerstwienie pieczywa i sposoby przedłużania jego świeżości. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, 2 (39), 5-22.
- [10] Gambuś H., Gambuś F., Sabat R.: Próby poprawy jakości chleba bezglutenowego przez dodatek mąki z szarłat. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2002, 9 (2), 99-112.
- [11] Grand view research.: Gluten-Free Products Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Bakery Products, Dairy/Dairy Alternatives), By Distribution Channel (Grocery Stores, Mass Merchandiser), By Region, And Segment Forecasts, 2020-2027, 2020.
- [12] Jeske S., Zannini E., Arendt E.K.: Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. *Food Res. Int.*, 2018, 110, 42-51.
- [13] Kaim U., Harasym J.: Produkcja chleba bezglutenowego wyzwaniem dla współczesnego piekarnictwa. *Nauki Inżynierskie i Technologie. Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*, 2017, 4(27), 41-54.

- [14] Krupa-Kozak U., Bączek N., Adamowicz J.: Wpływ kazeinianu i cytrynianu wapnia na jakość i właściwości technologiczne chleba bezglutenowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 3 (94), 136-150.
- [15] Kulczak M., Błaśnińska J., Słowik E.: Wybrane cechy fizyczne chleba bezglutenowego z udziałem preparowanej mąki grochowej i przetworów gryczanych. *Acta Agrophys.*, 2014, 21, 445-455.
- [16] Lazaridou A., Duta D., Papageorgiou M., Belc N., Biliaderis C.G.: Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *J. Food Engin.*, 2007, 79(3), 1033-1047.
- [17] Lynch K.M., Coffey A., Arendt, E.K.: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Res.Int.*, 2018, 110, 52-61.
- [18] Marciniak-Lukasiak K., Skrzypacz M.: Koncentrat chleba bezglutenowego z dodatkiem mąki z szarłat. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 4(59), 131-140.
- [19] Moradi M., Bolandi M., Arabameri M., Karimi M., Baghaei H., Nahidi F., EslamiKanafi M.: Semi-volume gluten-free bread: effect of guar gum, sodium caseinate and transglutaminase enzyme on the quality parameters. *J. Food Measure. Character.*, 2021, 15(3), 2344-2351.
- [20] Papadakis S.E., Abdul-Malek S., Kamdem R.E., Yam K.L.: A versatile and inexpensive technique for measuring color foods. *Food Technol.*, 2000, 54, 48-51.
- [21] Pastuszka D., Gambuś H., Sikora M.: Wartość odżywcza i dietetyczna pieczywa bezglutenowego z dodatkiem nasion lnu oleistego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, 3(82), 155-167.
- [22] Różyło R., Laskowski J., Dziki D.: Właściwości fizyczne chleba pszennego wypiekanego z ciasta o zróżnicowanych parametrach. *Acta Agrophys.*, 2021, 18(2) 431-430.
- [23] PN-ISO 4121:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Ocena produktów żywnościowych przy użyciu metod skalowania.
- [24] PN-ISO 6564:1999. Analiza sensoryczna. Metodologia. Metody profilowania smakowości.
- [25] Ruszkowska M., Kropisz P.: Charakterystyka pieczywa bezglutenowego wytworzonego z mąk niekonwencjonalnych. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 2017, 5, 180-181.
- [26] Silva A.R., Silva M.M., Ribeiro B.D.: Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Res. Int.*, 2020, 131, 108972.
- [27] Spence C.: Background colour & its impact on food perception & behaviour. *Food Qual. Prefer.*, 2018, 68, 156-166.
- [28] Ziemińchód A., Różyło R.: Effect of the addition of goji berries on the physical properties of gluten-free bread. *Acta Agrophysica*, 2018, 25(1), 117-127.
- [29] Zys A., Garncarek Z.: Wykorzystanie transglutaminazy mikrobiologicznej do wytwarzania produktów bezglutenowych. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*, 2018, 542, 213-223.

OCENA MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA NAPOJÓW ROŚLINNYCH W RECEPTURZE CHLEBA BEZGLUTENOWEGO

S u m m a r y

Wprowadzenie. Dieta bezglutenowa jest jedynym sposobem leczenia schorzeń związanych z nietolerancją glutenu. Pieczywo jest podstawowym składnikiem każdej diety. Na przestrzeni ostatnich lat na rynku polskim możemy zaobserwować wzrost dostępności produktów bezglutenowych, jednak ich jakość wciąż odbiega od jakości produktów tradycyjnych. Produkcja żywności bezglutenowej wiąże się z wielo-

ma trudnościami technologicznymi związanymi z nadaniem produktom odpowiedniej konsystencji i tekstury. Stosunkowo często u osób ze świeżo zdiagnozowaną celiakią występuje również nietolerancja laktozy. Dlatego też celowym wydaje się podjęcie badań w kierunku zastąpienia mleka w recepturze chlebów bezglutenowych napojami roślinnymi. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu dodatku napojów roślinnych na jakość pieczywa bezglutenowego. Do wypieku użyto mleka, napoju sojowego, migdałowego oraz ryżowego. Chleby bezglutenowe poddano ocenie sensorycznej. Badano również masę, masę właściwą, objętość, wilgotność, teksturę oraz barwę chlebów.

Wyniki i wnioski. Zauważono, iż rodzaj zastosowanego napoju wpływa zarówno na smak, zapach jak i na strukturę i teksturę. Chleby, w których zastosowano zamienniki mleka posiadają mniej wyczuwalny smak chlebowy oraz dodanych drożdży. Natomiast w ocenie pożądalności sensorycznej najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku chleba bezglutenowego z dodatkiem napoju sojowego. Stwierdzono, że zastosowanie napojów roślinnych nie wpływa istotnie na masę po wypieku, masę właściwą oraz wilgotność. Zastosowanie napojów roślinnych do otrzymywania chlebów bezglutenowych może być alternatywą dla osób stosujących dietę wegańską.

Słowa kluczowe: pieczywo bezglutenowe, napoje roślinne, tekstura, analiza sensoryczna ☒

ŁUKASZ BYCZYŃSKI, ROBERT DULIŃSKI

WPLYW DODATKU ALG DO PIECZYWA ŻYTNIEGO NA ZAWARTOŚĆ I BIODOSTĘPNOŚĆ *IN VITRO* WYBRANYCH MIKRO- I MAKROELEMENTÓW

Streszczenie

Wprowadzenie. Na potrzeby przemysłu paliwowego opracowano wydajne sposoby upraw mikroglonów w fotobioreaktorach lub w otwartych zbiornikach recyrkulacyjnych. Zmniejszenie światowego zapotrzebowania na paliwa powoduje, że wytwarzanie biopaliw trzeciej generacji staje się mniej opłacalne. Producenci alg poszukują dla nich alternatywnych zastosowań i wiążą duże nadzieje z przemysłem spożywczym. Biomasa z alg jest doskonałym źródłem składników żywności – jest bogata w łatwo przyswajalne i dobrze zbilansowane białko oraz charakteryzuje się wysoką zawartością makro- i mikroelementów występujących w łatwo przyswajalnych formach w postaci związków kompleksowych lub metaloorganicznych. W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki doświadczenia mającego na celu zbadanie wpływu dodatku do pieczywa żytniego mikroalg w różnych postaciach (*Arthrospira platensis* oraz *Ascophyllum nodosum* – suszona, granulowana i wędzona) na zawartość azotu, fosforu, żelaza oraz jodu. W celu zbadania biodostępności wymienionych pierwiastków, wyprodukowane pieczywo poddano symulowanemu procesowi trawienia w warunkach *in vitro*. Otrzymane dializaty oraz próbki pieczywa poddane mineralizacji wykorzystano do przeprowadzenia analiz zawartości wymienionych makro- i mikroelementów metodami spektrofotometrycznymi.

Wyniki i wnioski. Uzyskane wyniki wskazują na istotny statystycznie wpływ dodatku alg na wzrost poziomu omawianych pierwiastków. Największe różnice w zawartości analizowanych makro- i mikroelementów w stosunku do chleba bez dodatków otrzymano dla prób zawierających suszoną spirulinę (*Arthrospira platensis*) oraz *Ascophyllum nodosum* w postaci granulatu. Wprowadzone do żytniego pieczywa mikroalgi zapewniły również wzrost biodostępności żelaza oraz jodu.

Słowa kluczowe: mikroelementy, makroelementy, pieczywo, biodostępność

Wprowadzenie

W ciągu ostatnich dwóch dekad wzrosło zainteresowanie stosowaniem alg w technologii żywności. Wynika to w głównej mierze z opracowania wydajnych spo-

Dr Ł. Byczyński, ORCID: 0000-0001-8221-7120, dr hab. prof. URK. R. Duliński ORCID: 0000-0002-0370-2556, Katedra Biotechnologii i Ogólnej Technologii Żywności, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149, Kraków; Kontakt: byczyński.lukasz@urk.edu.pl

sobów upraw mikroglonów w fotobioreaktorach lub otwartych zbiornikach recyrkulacyjnych na potrzeby przemysłu paliwowego. Wraz ze spadkiem cen ropy otrzymywanie biopaliw trzeciej generacji staje się mniej opłacalne, dlatego producenci biomasy algowej poszukują dla nich alternatywnych zastosowań. Biomasa algowa jest doskonałym źródłem składników żywności – jest bogata w łatwo przyswajalne i dobrze zbilansowane białko, posiada korzystny profil kwasów tłuszczowych, obfituje w polisacharydy pobudzające perystaltykę jelit. Ponadto charakteryzuje się wysoką zawartością mikro- i makroelementów (cynk, jod, brom, żelazo, miedź, fosfor, magnez) występujących w łatwo przyswajalnych formach w postaci związków kompleksowych lub metaloorganicznych [7, 18]. Warto jednak tutaj zaznaczyć, że w obrębie tego samego gatunku alg ich skład chemiczny nie jest stały i zależy od czynników warunkujących wzrost, takich jak: temperatura, pH, oświetlenie, zawartość minerałów w pożywce, stężenie dwutlenku węgla [2].

Opracowanie nowych produktów spożywczych opartych na algach lub otrzymanych z nich komponentach stanowi interesujące, lecz trudne w realizacji wyzwanie, jednak już teraz można wykorzystać algi jako dodatek do żywności. Wzbogacanie żywności, czyli fortyfikacja, polega na dodawaniu składników odżywczych do produktu, bez względu na to, czy były one tam obecne naturalnie, czy też nie. Takie wzbogacanie może mieć na celu korygowanie (fortyfikacja wyrównawcza) oraz zapobieganie niedoborom składników występujących w danej populacji (fortyfikacja polepszająca) [16, 17]. Wyniki badań żywieniowych przeprowadzonych w różnych krajach wykazały, że podaż niektórych mikroelementów (np. Fe i I) jest niewystarczająca i w niektórych populacjach nie spełnia zaleceń [23]. Za osoby zagrożone niedoborami uważa się kobiety w okresie ciąży, ludzi na restrykcyjnych dietach oraz dzieci i osoby starsze.

Pieczycwo obfituje głównie w przyswajalne węglowodany oraz błonnik pokarmowy, natomiast aminokwasy zawarte w pieczywie, chociaż charakteryzują się wysoką przyswajalnością, to jednak ich profil nie jest korzystny z uwagi na małą ilość aminokwasów egzogennych. Ponadto podczas wypieku ilość aminokwasów ulega zmniejszeniu – powstają produkty reakcji Maillard'a podczas łączenia się amin z cukrami. Z tego względu podejmowane są działania mające na celu wzbogacenie produktu finalnego w białka zwierzęce i tym samym aminokwasy ograniczające, głównie za sprawą dodatku mleka i jego przetworów na etapie wyrabiania ciasta [12]. Niektóre algi, szczególnie niebiesko-zielona cyjanobakteria – spirulina (*Arthrospira sp.*), charakteryzują się korzystnym profilem, z wysoką ilością aminokwasów egzogennych oraz dużą procentową zawartością samego białka [15]. Stąd fortyfikacja pieczywa algami wydaje się być korzystna, zwłaszcza w obliczu wzrastającej popularności żywności wegańskiej oraz typu fit.

Pieczycwo jest istotnym źródłem związków mineralnych ze względu nie tylko na skład, ale również dostępność i powszechność konsumpcji. Większą zawartością pier-

wiastków charakteryzują się pieczywa ciemne lub razowe, a to dlatego, że składniki mineralne występują głównie w okrywie nasion zbóż. Stąd też mąki o wysokim prze-miale i wysokooczyszczone cechuje mniejsza zawartość składników mineralnych [24]. Mimo wysokiej zawartości związków mineralnych w mąkach nisko oczyszczonych ich dostępność jest ograniczona ze względu na dużą zawartość składników antyodżywczych, głównie fitynianów oraz różnych frakcji błonnika. Dopiero na etapie fermentacji ciasta możliwe jest zwiększenie biodostępności tych składników pieczywa. Z uwagi na obecność zakwasu podczas fermentacji ciasto zyskuje korzystne cechy reologiczne, a dzięki wzrostowi kwasowości i wypieraniu tlenu – zmniejsza się ilość niekorzystnych mikroorganizmów gnilnych. Zwłaszcza fermentacja mąki żytniej zapewnia wzrost poziomu witamin (głównie niacyny i ryboflawiny) oraz aminokwasów egzogennych (lizyny, metioniny i tryptofanu). Ponadto fermentacja mlekowa przyczynia się do zmniejszenia zawartości składników antyżywnościowych – głównie fitynianów, które tworzą kompleksy z makro- i mikroelementami [6].

Algi zyskują popularność w przemyśle spożywczym, głównie jako niekonwencjonalne źródło białka oraz substraty do otrzymywania naturalnych barwników (chlorofile, fikocyjaniny, β -karoten, astaksantyna) [22]. Jednak biomasa alg obfituje również w fosfor, a algi morskie bogate są w jod i żelazo. Udowodniono już, że glony stanowią wartościowy dodatek do pasz, który odpowiada za zwiększenie związków odżywczych w jajach, mleku czy mięsie [5]. Również ryby karmione algami wykazywały szybszy wzrost i wyższą zawartość wartościowych składników odżywczych oraz białka w ich mięsie [3]. Podejmowano także próby wprowadzania glonów do pieczywa, makaronu czy ciastek, jednak nie zbadano kompleksowo przyswajalności makro- i mikroelementów z takich produktów [1, 20].

Celem niniejszej pracy było określenie i porównanie zawartości wybranych mikro- i makroelementów w pieczywie żytnim wzbogaconym w algi w różnych postaciach (suszone, granulowane lub w postaci proszku) oraz ocena ich biodostępności w modelu symulującym układ pokarmowy człowieka.

Material i metody badań

Material do badań

Biomasę makroalgi morskiej (*Ascophyllum nodosum*) zakupiono w Seaweed & Co Ltd. (Wielka Brytania), a mikroalgi (*Spirulina platensis*) w Ecoduna GmbH, (Szal-lasweg 2, 2460 Bruck/Leitha, Austria). Natomiast sól algowa (AlgySalt[®]) pochodziła z firmy Setalg we Francji. Sól ta zawiera około 10-krotnie mniej sodu niż sól kuchenna, a pozyskuje się ją z ekstraktów morskich wodorostów różnych gatunków. Producent deklaruje, że może ona odtwarzać właściwości organoleptyczne i technologiczne chlorku sodu bez metalicznych posmaków oraz umożliwia zastąpienie soli w proporcji

1:1 w szerokiej gamie produktów, od mięsnych i owoców morza do dań gotowych, zup, sosów i przekąsek.

Przygotowanie ciasta

Pieczywo żytnie przygotowano w tradycyjnej piekarni „Prawdziwy Chleb” (P.P.H.U. Agnieszka Gajda-Sokołowska, 95-081 Dłutów, Stoczki-Porąbki 4). Surowcami do produkcji ciasta były: zakwas żytni, mąka żytnia typu 500 pochodząca z lokalnego młyna zbożowego (Jerzy Łaskiewicz i Synowie sp.j.), sól oraz woda. Surowce algowe wprowadzono w ilościach przedstawionych w tabeli 1, na etapie mieszenia ciasta. Z ręcznie wymieszanego ciasta formowano kęsy o masie około 1 kg, które umieszczano w metalowych formach i komorze fermentacyjnej o temperaturze 35,5 °C i stałej wilgotności. Po 180 minutach ciasta przenoszono do tradycyjnego pieca opalanego drewnem, rozgrzanego do temperatury 200 – 250 °C, gdzie pozostawały przez 30

Tabela 1. Zawartość preparatów algowych we wzbogaconym pieczywie żytnim (g/1000 g ciasta)

Table 1. The content of algae preparations in enriched rye bread (g/1000 g dough)

Próby – Pieczywo Samples - Breads	Dodatek do chleba / Additive to bread (g/1000 g)					
	Wędzona morska alga Smoked marine algae (<i>Ascophyllum nodosum</i>) ²	Suszona morska alga Dried marine algae (<i>Ascophyllum nodosum</i>) ²	Granulowana morska alga Granulated marine algae (<i>Ascophyllum nodosum</i>) ³	Suszona spirulina Dried spir- ulina (<i>Arthrospira platensis</i>)	Sól algowa Algae salt	Sól Salt NaCl
Pieczywo 1 Bread 1	0,0	0,0	0,0	0,0	18,0	0,0
Pieczywo 2 Bread 2	5,0	5,0	0,0	50,0	10,0	0,0
Pieczywo 3 Bread 3	10,0	0,0	0,0	50,0	9,0	0,0
Pieczywo 4 Bread 4	0,0	10,0	20,0	50,0	0,0	10,0
Pieczywo 5 Bread 5	25,0	10,0	10,0	40,0	0,0	0,0
Pieczywo 6 Bread 6	0,0	15,0	10,0	10,0	0,0	10,0
Pieczywo 7 ¹ Bread 7 ¹	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,0

Objaśnienia / Explanatory notes:

¹ 7 to próba kontrolna - bez dodatku biomasy algowej / Bread 7 is the control sample, without algae biomass addition,

² alga sproszkowana (drobiny 0,1 mm) / powdered algae (particles 0.1 mm), ³ granulata (0,4 mm) / granulate (0.4 mm).

minut. Upieczone chleby w ciągu 24 godzin dostarczano do laboratorium, gdzie po wysuszeniu do stałej masy (w suszarce z termoobieganiem, temp. 50 °C) zmineralizowano oraz poddawano trawieniu *in vitro*.

Oznaczanie zawartości suchej masy

Zawartość suchej masy w badanych próbkach wyznaczano z użyciem wagosuszar-ki laboratoryjnej RadWag WPS 110S. Pieczywo 24 godziny po wypieku, w postaci oddzielonego od skórki miększu, naważono w ilości około 3 gramów i umieszczano na szalce urządzenia. Pomiarów dokonywano przy następujących parametrach: temperatura 120 °C, czas 5-7 minut, próbkowanie 15 s. Każdą próbkę badano czterokrotnie. Obliczając procentową zawartość suchej masy, korzystano z wzoru: s.m. (%) = (aktualna masa próbki/ początkowa masa próbki) · 100 %.

Przygotowanie mineralizatów

W celu oznaczenia w próbkach zawartości fosforu, azotu oraz jodu, poddano je mineralizacji w aparacie Hach Digesdahl Digestion Apparatus (Hach Comp., USA), gdzie podczas reakcji kwasu siarkowego z perhydrolem powstaje kwas peroksymono-siarkowy (kwas caro) H₂SO₅, który jest silnym utleniaczem materiału węglowego.

Naważki pieczywa (około 0,5 g) przenoszono do kolbek mineralizacyjnych, zalewano 4 ml stężonego kwasu siarkowego i umieszczano w zestawie do spalania. Temperaturę płyty grzewczej ustawiano na 280 °C i włączano pompkę wodną. Próbkę zwęglano w kwasie przez 4 minuty, a następnie poprzez chłodnicę i lejek kapilarny stopniowo wprowadzano 15 cm³ 30-procentowego roztworu nadtlenu wodoru. Mineralizację w tych warunkach kontynuowano do momentu aż płyn stawał się klarowny i przestawał wrzeć. Po schłodzeniu dodano 20 cm³ 5 M roztworu wodorotlenku sodu, ilościowo przeniesiono do zlewki i wyregulowano pH do wartości 3,0. Całość przeniesiono do kolbki miarowej i dopełniono do 100 cm³ wodą dejonizowaną. Tak przygotowany mineralizat przechowywano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, a następnie w 4 °C do momentu analizy. Każdą próbkę wykonano w trzech powtórzeniach.

Oznaczanie zawartości fosforu

Zawartość fosforu w dializacie i próbkach zmineralizowanych oznaczano w reakcji jonów ortofosforanowych (V) zawartych w badanym materiale z 1 cm³ molibdenianu (VI) amonu w kwaśnym środowisku. W wyniku tej reakcji powstaje sól, którą po 5 minutach zredukowano do błękitu molibdenowego przez dodatek 1 cm³ metolu. Po 15 minutach do próbek wprowadzano 3 cm³ wody i odczytywano absorbancję przy długości fali 660 nm (SPEKOL 1500, AnalytikJena AG, Niemcy). Zawartość fosforu obliczono z krzywej wzorcowej sporządzonej z wykorzystaniem roztworu KH₂PO₄ (cz.d.a., POCH, Polska).

Oznaczanie zawartości azotu

Zawartość azotu w próbkach pieczywa oznaczono metodą z odczynnikiem Nesslerera. Po mineralizacji azot organiczny występuje w postaci jonu amonowego. Do 2 cm³ próbki (odpowiednio rozcieńczonej) dodawano 1 cm³ 1-procentowej gumy arabskiej oraz 1 cm³ odczynnika Nesslerera. Wówczas jony amonowe reagowały z jodkiem potasu oraz jodkiem rtęci (II) pochodzącym z odczynnika i tworzyły trudno rozpuszczalny związek, który przy niewielkich stężeniach pozostaje w trwałym rozproszeniu dzięki gumie arabskiej. Absorbancję przy 430 nm odczytywano po upływie 10 minut od dodania odczynnika. Zawartość azotu obliczono z wykorzystaniem krzywej wzorcowej opracowanej z użyciem roztworu NH₄Cl (cz.d.a., POCH, Gliwice).

Oznaczenie zawartości jodu

Zawartość jodu całkowitego oznaczano metodą jodoskrobiową, w której jod tworzy niebieski związek adsorpcyjny ze skrobią. Do kolbek miarowych o pojemności 25 cm³ pobierano 10 – 20 cm³ klarownego, bezbarwnego i obojętnego roztworu badanego, a następnie zakwaszono 1 cm³ 1M roztworu H₂SO₄ i dodawano 0,1 cm³ wody bromowej w celu utlenienia jonów jodkowych do jodanowych. Nadmiar bromu usunięto przez związanie z fenolem (0,1 cm³ fenolu w 10-procentowym roztworze lodowatego kwasu octowego). Następnie dodawano 1 cm³ świeżo przygotowanego 0,5-procentowego roztworu KI – otrzymane jodany w środowisku kwaśnym, po dodaniu jonów jodkowych były przekształcane w jod cząsteczkowy zgodnie z reakcją:



Na koniec wprowadzano 1 cm³ 1-procentowej skrobi rozpuszczalnej w 50-procentowej glicerynie. Kolbki miarowe uzupełniano wodą dejonizowaną do 25 cm³, mieszano i pozostawiano na 30 minut. Po tym czasie dokonano pomiarów spektrofotometrycznych przy 590 nm wobec wody dejonizowanej. Zawartość jodu obliczono z pomocą krzywej wzorcowej sporządzonej z wykorzystaniem roztworu KI (cz.d.a., POCH, Polska).

Oznaczanie zawartości żelaza

Zawartość żelaza oznaczono metodą z 1,10-fenantroliną. Do kolbki o pojemności 50 cm³ wprowadzono 10 cm³ próbki zawierającej maksimum 100 µg żelaza, w celu redukcji żelaza Fe³⁺ do Fe²⁺ aplikowano 2 cm³ 10 procentowego roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy oraz 5 cm³ 10- procentowego roztworu cytrynianu sodu. Następnie do próbek dodano 5 cm³ 0,25 procentowego roztworu 1,10-fenantroliny w 0,1 M roztworze HCl. Zawartość kolbek uzupełniono wodą dejonizowaną do 50 cm³ i dokładnie wymieszano. Intensywność powstałego pomarańczowego zabarwienia jest proporcjonalna do zawartości żelaza. Próbki inkubowano przez 10 minut, a następnie

zmierzono absorbancję roztworu przy długości fali równej $\lambda = 512$ nm. Zawartość żelaza w badanych próbkach obliczono z pomocą krzywej wzorcowej sporządzonej z wykorzystaniem roztworu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cz.d.a., Chempur, Polska).

Metoda in vitro – model układu pokarmowego

Dla oznaczenia biodostępności mikro- i makroelementów badane pieczywo poddano symulacji trawienia przy zastosowaniu modelu *in vitro* opisanego w pracy Starzyńskiej-Janiszewskiej i wsp. [21].

Do strzykawek z obcięzonymi końcami naważono 0,5 g zhomogenizowanego materiału, dodawano 1 cm³ wody redestylowanej i zamieszano (stosunek 1:2 – jak w jamie ustnej). Następnie próbki zakwaszono do pH 2, dodając 0,5 M roztworu HCl oraz 0,2 cm³ roztworu pepsyny 6 mg/cm³ (P6887, Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) i wodę redestylowaną w ilości zapewniającej objętość równą 2 cm³ (stosunek 1:4 – jak w żołądku). Po wymieszaniu składników strzykawki zaklejano parafilmem i umieszczano w łaźni wodnej (Lauda Ecoline E200) o temperaturze 37 °C na 2 godziny. Po tym czasie wprowadzono 1 M roztwór NaHCO_3 w ilości zapewniającej pH 7 oraz 0,5 cm³ roztworu pankreatyny (9 mg/cm³, (P-7545, Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy; 8×, United States Pharmacopeia) i wodę redestylowaną do objętości równej 2 cm³ (stosunek 1:8 – jelito). Zawartość strzykawek wymieszano, przeniesiono do woreczków dializacyjnych (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy; 25 mm × 90 mm, MWCO 12000), zamknięto klipsami i umieszczano w plastikowych kolbach stożkowych zawierających 50 cm³ buforu imidazolowego o pH 7. Kolby umieszczono w łaźni wodnej z wytrząsaniem (GFL 1092, 40 obrotów/minutę) i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 2 godziny. Otrzymany dializat posłużył do dalszych analiz.

W niniejszej pracy „biodostępność *in vitro*” zdefiniowano jako stosunek zawartości pierwiastków w dializacie do całkowitej ich zawartości w materiale wyjściowym wyrażony w % (g/g).

Analiza statystyczna

Dane eksperymentalne były poddawane jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) w celu wykrycia istotnych różnic między średnimi wyrażonych jako średnia ± odchylenie standardowe (SD). Różnice między wartościami średnimi zostały zweryfikowane przez test NIR przy $p \leq 0.05$ za pomocą oprogramowania Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia, USA).

Wyniki i dyskusja

Analizy mineralizatów próbek chlebów pozwoliły wykazać statystycznie istotny wpływ wzbogacenia algami na poziom wszystkich badanych pierwiastków. We wszystkich typach pieczywa, do których wprowadzono glony, obserwowano wzrost ilości azotu w stosunku do próby kontrolnej (1130 mg/100 g), jednak w pieczywie 6,

był on niewielki (1174 mg) i nieistotny statystycznie. Do tego pieczywa wprowadzono najmniejszą ilość suszonej spiruliny (10 g/kg ciasta). W przypadku pozostałych prób, gdzie wprowadzono od 40 do 50 g spiruliny – ilość azotu wzrastała o 18 do 36 % w stosunku do próby kontrolnej. Pieczywo 4, o najwyższej ilości azotu zawierało oprócz spiruliny, największą ilość granulowanej algi *Ascophyllum nodosum*. Natomiast pieczywo 1 – z dodatkiem soli algowej, charakteryzowało się najniższą zawartością azotu i nie różniło się istotnie do próby kontrolnej (pieczywo 7). Ilość azotu odzwierciedla poziom białka w pieczywie. Stosując przelicznik o wartości 5,83, charakterystyczny dla wszystkich typów mąki żytniej [9], można oszacować poziom białka w badanym pieczywie. Otrzymane wartości oscylują w zakresie od 6,35 do 8,98 g białka na 100 g chleba. Dla próby kontrolnej (7) poziom białka jest zbliżony do pieczywa żytniego pełnoziarnistego (6,8 g/100 g), przedstawionego w pracy Kawki [13]. Najwyższą zawartość białka stwierdzono natomiast w przypadku prób od 2 do 5, gdzie wprowadzono najwięcej mikroalg. Podobne zależności zaobserwowali Burcu i wsp. [4], którzy do pieczywa wprowadzili 10-procentowy dodatek spiruliny oraz Batista i wsp. [1], którzy suplementowali mikroalgami pszenne ciasteczka.

Podobne zależności, jak w przypadku azotu, zaobserwowano dla fosforu, gdzie najniższy poziom tego pierwiastka oznaczono również w pieczywie 1 oraz 6 i wartości te nie odbiegały istotnie od próbki kontrolnej (pieczywo 7). Tak, jak w przypadku azotu, najwyższą ilość fosforu zaobserwowano w przypadku pieczywa 4 (wzrost o 49 %), w dalszej kolejności znalazły się próby 3, 2 i 5. Według Przygody i wsp. [19] w pieczywie jasnym, żytnim fosfor występuje w ilości 68 mg/100 g, co jest wartością zbliżoną do badanego pieczywa kontrolnego (próba 7).

Można tym samym stwierdzić, że w przypadku azotu i fosforu najistotniejszy okazał się dodatek suszonej spiruliny (*Arthrospira platensis*) i granulowanej algi morskiej, natomiast wpływ wędzonej i suszonej *Ascophyllum nodosum* był istotnie mniejszy. Z kolei sól algowa nie miała żadnego wpływu na ilość azotu i fosforu w badanym pieczywie.

Nieco inaczej wyglądają wyniki poziomu żelaza w badanym pieczywie. Dodatek soli algowej w ilości 18 g/kg ciasta (próba 1) prawie dwukrotnie zwiększył poziom tego pierwiastka w pieczywie. Natomiast wprowadzenie do pieczywa suszonej spiruliny (*Arthrospira platensis*) skutkowało dwukrotnym zwiększeniem ilości żelaza w przypadku próby 6 oraz 4 ÷ 4,5 krotnym zwiększeniem w chlebach od 2 do 5. Najwyższą ilość żelaza odnotowano w pieczywie 4, które zawierało również dodatek granulowanej i suszonej algi *Ascophyllum nodosum*, jednak różnice między pieczywem 2, 3 i 4 nie były istotne statystycznie. Istotnie mniej żelaza niż w tych próbach zaobserwowano w chlebie 5, zawierającym 25 g/kg wędzonej algi morskiej oraz o 10 g/kg mniej spiruliny. Podobne zakresy zawartości żelaza (od 1,34 do 2,6 mg/100 g) w swoich badaniach otrzymali Grembecka i wsp. [10]. Natomiast w badaniach Burcu i wsp.

[4] dla pieczywa z 10-procentowym dodatkiem spiruliny zawartość żelaza wzrastała ponad czterokrotnie w stosunku do próby kontrolnej do poziomu 4,1 mg żelaza w 100 g produktu.

Z kolei zmierzony w badanych próbach poziom jodu wskazuje, że największą jego zawartością charakteryzowało się pieczywo 3 – było to o ponad 10 μg więcej, niż w pieczywie kontrolnym numer 7. Próby 2, 4, 5, i 6 również charakteryzowały się istotnie wyższą (o $5 \div 6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) zawartością jodu w stosunku do próby kontrolnej. Zawartość jodu w pieczywie 1 z dodatkiem soli algowej (59,72 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$) nie różniła się istotnie od wartości próby bez dodatków (60,27 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$), zawierającej jedynie chlorek sodu. Pieczywo bez dodatku soli (próba 5) a z wysoką zawartością wędzonej algi morskiej *Ascophyllum nodosum* wykazywało wyższą o około o 5 μg zawartość jodu niż pieczywo 1 oraz 7. Można stąd wnioskować, że tego typu dodatek można wykorzystać w zastępstwie soli jodowanej.

Tabela 2. Zawartość wybranych makro- i mikroelementów w pieczywie żytnim wzbogaconym w algi
Table 2. Contents of selected micro- and macroelements in rye bread enriched with algae

Nazwa próby Name of sample	N g/100 g	P mg/100 g	Fe mg/100 g	I ug/100 g
Pieczywo 1 Bread 1	1,088 ^a ± 0,027	52,21 ^a ± 4,59	1,46 ^b ± 0,25	59,72 ^a ± 1,66
Pieczywo 2 Bread 2	1,372 ^{cd} ± 0,035	72,28 ^{bc} ± 4,48	3,63 ^d ± 0,23	66,63 ^b ± 1,10
Pieczywo 3 Bread 3	1,415 ^d ± 0,035	78,75 ^{cd} ± 5,30	3,57 ^d ± 0,18	70,43 ^c ± 1,16
Pieczywo 4 Bread 4	1,538 ^e ± 0,031	83,59 ^d ± 3,77	3,72 ^d ± 0,23	64,99 ^b ± 1,57
Pieczywo 5 Bread 5	1,332 ^c ± 0,036	69,18 ^b ± 5,97	3,07 ^c ± 0,19	65,31 ^b ± 1,59
Pieczywo 6 Bread 6	1,174 ^b ± 0,045	57,65 ^a ± 5,44	1,77 ^b ± 0,14	65,61 ^b ± 1,12
Pieczywo 7 Bread 7	1,130 ^{ab} ± 0,036	56,27 ^a ± 5,78	0,79 ^a ± 0,17	60,27 ^a ± 1,44

Objaśnienia / Explanatory notes:

Charakterystyka próbek zgodnie z tab. 1. / Profile of samples according to Tab. 1.

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviations; n = 3; a, b, c, d – 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 $p \leq 0.05$.

Zawartość badanych mikro- i makroelementów zbadano również w dializatach otrzymanych po symulacji trawienia pieczywa w warunkach *in vitro*. Otrzymane war-

tości posłużyły do obliczenia biodostępności tych pierwiastków, a wyniki zaprezentowano w tabeli 3. Biodostępność azotu w próbach 1, 2, 5 oscylowała wokół 50 % i była zbliżona do próby kontrolnej (52 %). Pieczywo 3 i 4, cechowało się niższą biodostępnością azotu 45 ÷ 46 %. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem zawartości azotu i spiruliny w chlebie spadała jego biodostępność (próby 3 i 4), natomiast pieczywo 6 z najniższym dodatkiem spiruliny (10 g) oraz dużą (15 g) dawką suszonej algi *Asco-phyllum nodosum*, charakteryzowało się najwyższą względną zawartością azotu w dializacie (prawie 61 %).

Biodostępność fosforu, najwyższa okazała się być dla próbki kontrolnej (81%) oraz pieczywa 2 (82 %). Pozostałe próby nie różniły się istotnie i otrzymane wartości oscylowały w zakresie od 55 do 63 %.

Tabela 3. Biodostępność *in vitro* wybranych makro- i mikroelementów w pieczywie żytnim wzbogaconym w algi

Table 3. *In vitro* bioavailability of selected micro- and macroelements in rye bread enriched with algae

Nazwa próby Name of sample	Biodostępność [%] / Bioavailability [%]			
	N	P	Fe	I
Pieczywo 1 Bread 1	50,04 ^{abc} ± 3,23	61,12 ^a ± 4,92	29,71 ^c ± 3,36	45,60 ^a ± 1,98
Pieczywo 2 Bread 2	50,75 ^{bc} ± 2,72	82,66 ^b ± 3,17	31,49 ^c ± 4,00	60,47 ^b ± 1,50
Pieczywo 3 Bread 3	46,12 ^{ab} ± 1,94	62,68 ^a ± 4,41	20,18 ^{ab} ± 2,82	59,52 ^b ± 2,31
Pieczywo 4 Bread 4	45,43 ^a ± 1,93	55,15 ^a ± 6,29	29,62 ^c ± 4,74	61,00 ^b ± 2,27
Pieczywo 5 Bread 5	50,25 ^{abc} ± 3,54	57,01 ^a ± 7,66	40,83 ^d ± 5,12	68,44 ^c ± 2,60
Pieczywo 6 Bread 6	60,91 ^d ± 3,31	54,46 ^a ± 6,31	24,48 ^{bc} ± 4,39	75,23 ^d ± 1,63
Pieczywo 7 Bread 7	52,22 ^c ± 2,15	80,55 ^b ± 6,63	16,67 ^a ± 5,12	62,64 ^b ± 2,08

Objaśnienia / Explanatory notes:

Charakterystyka próbek zgodnie z tab. 1. / Profile of samples according to Tab. 1.

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / The table shows mean values ± standard deviations; n = 3; a, b, c, d – 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 $p \leq 0.05$.

Wszystkie wprowadzone do pieczywa dodatki zwiększały biodostępność żelaza. Najmniej z 17 % do 20 ÷ 25 % (odpowiednio próby 3 i 6), a najwięcej – do 30 ÷ 40 % (próby 1, 2, 4 i 5). Najgorsze rezultaty uzyskano w przypadku pieczywa 3 (20 %),

a najlepsze w próbie 5 (prawie 41 %), która zawierała najwięcej dodatków algowych (75 g/kg ciasta). Frontela i wsp., [8] wykazali w swoich badaniach, że w przypadku chleba pełnoziarnistego biodostępność żelaza wynosi 26 %. Z kolei Burcu i wsp. [4] wykazali wzrost biodostępności żelaza do 47,24 % w pieczywie wzbogaconym w spirulinę.

Biodostępność jodu była zróżnicowana – najniższą wartością (46 %) cechowało się pieczywo 1 z dodatkiem soli algowej. Biodostępność w okolicach 60 ÷ 62 % charakteryzowała pieczywo kontrolne oraz próby 2, 3 i 4. Najwyższą biodostępność jodu odnotowano w przypadku pieczywa 5 i 6 (odpowiednio 68 i 75 %).

Otrzymane wyniki wskazują, że dodatek mikroalg wpłynął korzystnie na zawartość oraz biodostępność badanych pierwiastków. Najwyraźniej uwidaczniało się to w próbach, w których ilość wprowadzonych glonów była najwyższa.

Wnioski

1. Badane pieczywo z dodatkiem alg charakteryzowało się zwiększoną zawartością azotu, fosforu, żelaza i jodu, zwłaszcza w próbach z dodatkiem wyższych dawek biomasy alg, czyli 50 g *Arthrospira platensis* oraz 10 ÷ 25 g *Ascophyllum nodosum* na kilogram ciasta.
2. Biodostępność badanych pierwiastków okazała się zróżnicowana. W próbach o wysokiej zawartości azotu jego biodostępność spadała o 5 ÷ 6 %, a przy niższej zawartości wzrastała o około 8 %. Biodostępność fosforu okazała się niższa od próby kontrolnej z wyjątkiem pieczywa 2. Biodostępność żelaza wzrastała we wszystkich próbach. Natomiast w przypadku jodu, jego biodostępność z soli algowej okazała się niższa niż z pieczywa kontrolnego, a w pieczywie 5 i 6 wyższa.
3. Modyfikacja oryginalnej receptury na tradycyjne pieczywo umożliwiła otrzymanie nowego funkcjonalnego produktu piekarniczego.

Podziękowania

Autorzy dziękują Pani Agnieszce Gajdzie-Sokołowskiej oraz Panu Hubertowi Sokołowskiemu prowadzącym piekarnię „Prawdziwy chleb” za przygotowanie partii eksperymentalnego pieczywa. Autorzy dziękują również Panu Adrianowi Karbowskiemu za dostarczone preparaty algowe.

Projekt finansowany z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach dotacji na działalność statutową.

Literatura

- [1] Batista A. P., Nicolai A., Fradinho P., Fragoso S., Bursic I., Rodolfi L., Biondi N., Tredici M. R., Sousa I., Raymundo A.: Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physi-

- cal and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Res.*, 2017, 26, 161-171.
- [2] Becker W.: *Microalgae in Human and Animal Nutrition*. W: Richmond A.(red.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Wiley-Blackwell U.K., 2013, pp 312-351.
- [3] Bin Dohaish E., Al Dhahri, M., Omar, H.: Potential application of the blue-green alga (*Spirulina platensis*) as a supplement in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2018, 16(6), 7883-7902.
- [4] Burcu A., Ezgi A., Oya I., Gülsün Ö., Ebru K., Miray E., Leyla U.: Nutritional and physicochemical characteristics of bread enriched with microalgae *Spirulina platensis*. *Int. J. Eng. Res. Appl.*, 2016, 6, (12), 30-38.
- [5] Chojnacka K., Saeid, A., Michalak I.: Możliwości zastosowania biomasy alg w rolnictwie. *Chemik*, 2012, 66 (11), 1235-1248.
- [6] Diowksz A.: Pozycja pieczywa w diecie. *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, 2012, 10, 16-17.
- [7] Fleurence J.: Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential use. *Trends Food Sci. Tech.*, 1999, 10, 25-28.
- [8] Frontela C., Ros G., Martínez C.: Phytic acid content and "in vitro" iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing. *J. Cereal Sci.*, 2011, 54, 173-179.
- [9] Greenfield H., Southgate D.A.T.: *Food composition data: production, management and use*. 2nd ed. FAO, Food & Agriculture Org of UN., USA, 2003.
- [10] Grembecka M., Kusiuk A., Szefer P.: Zawartość magnezu, fosforu, cynku i żelaza w różnych gatunkach pieczywa. *Bromat. Chem. Toksykol. – XL*, 2007, 4, 319 – 323
- [10] Hemalatha S., Platel K., Srinivasan K.: Influence of heat processing on the bioaccessibility of zinc and iron from cereals and pulses consumed in India. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2007, 21, 1-7.
- [11] Jędrzejczyk H., Hoffmann M.: Substancje polepszające jakość pieczywa. Część II. Polepszacze naturalne w produkcji pieczywa. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*. 2006, 16 (1), 58-62.
- [12] Kawka A.: Możliwości wzbogacania wartości odżywczej, dietetycznej i funkcjonalnej pieczywa. W: *Żywność wzbogacana i nutraceutyki – pod red. P. Gębczyńskiego i G. Jaworskiej*. PTTŻ, Oddz. Małopolski, Kraków 2009, ss. 109-122.
- [13] Kawka A.: Współczesne trendy w produkcji piekarskiej – wykorzystanie owsa i jęczmienia jako zbóż niechlebowych, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 3 (70), 25 –43.
- [14] Kim S.K., Kang, K.H.: Medicinal effects of peptides from marine microalgae. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2011, 64, 313-323.
- [15] Kolanowski W.: Wzbogacanie żywności. W: *Żywność wygodna i funkcjonalna pod red. F. Świderskiego*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2019, 229-245.
- [16] Kozłowska-Strawska J., Badora A., Chwil S.: Żywność funkcjonalna i tradycyjna – właściwości i wpływ na postawy konsumentów. *Probl Hig. Epidemiol.*, 2017, 98 (3), 212-216.
- [17] Lamer-Zarawska E.: Rośliny w kosmetyce w kosmetologii przeciwstarzeniowej. *Post. Kosm.*, 2012, 1, 33.
- [18] Przygoda B., Kunachowicz H., Nadolna I, Iwanow K.: Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2019.
- [19] Şahin O.I.: Functional and sensorial properties of cookies enriched with spirulina and dunaliella biomass. *J Food Sci. Technol.*, 2012, 57, 3639–3646 (2020).
- [20] Starzyńska-Janiszewska A., Stodolak B., Duliński R., Bączkiewicz M., Mickowska B., Wikiera A., Byczyński Ł.: Effect of solid-state fermentation tempe type on antioxidant and nutritional parameters of buckwheat groats as compared with hydrothermal processing. *J. Food Process. Preserv.*, 2016, 40 (2), 298-305.
- [21] Stolarzewicz I., Kapturowska A., Białecka-Florjańczyk E.: Mikrobiologiczne źródła barwników w technologii żywności. *Post. Mikrobiol.* 2012, 51(3), 167-176.

- [22] Suliburska J., Krejpcio Z., Kołaczyk N.: Evaluation of the content and the potential bioavailability of iron from fortified with iron and non-fortified food products. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.* 2011, 10 (2), 239-243.
- [23] Ziemiański S.: *Normy żywienia człowieka. Fizjologiczne podstawy.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001.

THE EFFECT OF THE ADDITION OF ALGAE TO RYE BREAD ON THE CONTENT AND *IN VITRO* AVAILABILITY OF SELECTED MICRO- AND MACROELEMENTS

S u m m a r y

Background. Efficient methods of cultivating microalgae have been developed for the fuel industry in photobioreactors or open recirculation tanks. Reduced world fuel demand makes the production of third-generation biofuels less profitable. Algae producers are looking for alternative applications for them and have high hopes for the food industry. Algae biomass is an excellent source of food ingredients – it is rich in easily digestible and well-balanced protein and is characterized by a high content of macro- and microelements occurring in easily digestible forms as complex or organometallic compounds. The presented study shows the results of an experiment aimed at examining the effect of adding microalgae in various forms (*Arthrospira platensis* and *Ascophyllum nodosum* - dried, granulated and smoked) to rye bread on the nitrogen, phosphorus, iron and iodine content. In order to test the bioavailability of these elements, the produced bread was subjected to a simulated *in vitro* digestion process. The dialysates and mineralized bread samples obtained were used to analyze the content of the above-mentioned macro- and microelements using spectrophotometric methods.

Results and conclusion. The results obtained indicate a statistically significant effect of the addition of algae on an increase in the level of the elements discussed. The largest differences in the content of the analyzed macro- and microelements compared to the bread without additives were observed for the samples containing dried spirulina (*Arthrospira platensis*) and *Ascophyllum nodosum* in the form of granules. The microalgae introduced into the rye bread also increased the bioavailability of iron and iodine.

Key words: algae, microelements, macroelements, bread, bioavailability ☒

GRAŻYNA MORKIS

PROBLEMATYKA ŻYWNOŚCIOWA W USTAWODAWSTWIE POLSKIM I UNIJNYM

Publikujemy kolejny przegląd aktów prawnych, które ukazały się w Dzienniku Ustaw RP oraz Dzienniku Urzędowym UE. Poniższe zestawienie zawiera akty prawne dotyczące szeroko omawianej problematyki żywnościowej wg stanu na dzień 30 czerwca 2022 r.

Polskie akty prawne

1. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 23 marca 2022 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o przekształceniach własnościowych w przemyśle cukrowniczym. (Dz. U. 2022 r., poz. 765).
Obwieszczenie zawiera jednolitego tekstu ustawy z dn. 26 sierpnia 1994 r. przekształceniach własnościowych w przemyśle cukrowniczym.
2. Obwieszczenie Ministra Klimatu i Środowiska z dn. 14 marca 2022 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie wzoru wniosku o wydanie zezwolenia na wprowadzenie do obrotu produktu GMO. (Dz. U. 2022 r., poz. 759).
W załączniku do niniejszego obwieszczenia została ogłoszony jednolity tekst rozporządzenia Ministra Środowiska z dn. 27 października 2015 r. w sprawie wzoru wniosku o wydanie zezwolenia na wprowadzenie do obrotu produktu GMO.
3. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 5 kwietnia 2022 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie wymagań, które powinien spełniać projekt technologiczny zakładu, w którym ma być prowadzona działalność w zakresie produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego. (Dz. U. 2022 r., poz. 862).
Zmiany wprowadzone w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 18 marca 2005 r. w sprawie wymagań, które powinien spełniać projekt technologiczny zakładu, w którym ma być prowadzona działalność w zakresie produkcji

- produktów pochodzenia zwierzęcego dotyczą projektu technologicznego rzeźni, która przy uboju zwierząt w gospodarstwie będzie korzystać z jednostki mobilnej.
4. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dn. 25 kwietnia 2022 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o rybactwie śródlądowym. (Dz. U. 2022 r., poz. 883).
Obwieszczenie zawiera jednolity tekst ustawy z dn. 18 kwietnia 1985 r. o rybactwie śródlądowym.
Ustawa ta określa zasady i warunki ochrony, chowu, hodowli i połowu ryb w powierzchniowych wodach śródlądowych.
 5. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 13 kwietnia 2022 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. 2022 r., poz. 917).
Dokonano zmian w rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 29 lipca 2003 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej dżemów, konfitur, galaretek, marmolad, powideł śliwkowych oraz słodzonego przecieru z kasztanów jadalnych. Dotyczą one powideł śliwkowych.
 6. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dn. 22 kwietnia 2022 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie opłat za czynności wykonywane przez organy Państwowej Inspekcji Sanitarnej w ramach urzędowych kontroli żywności (Dz. U. 2022 r., poz. 1130).
Został ogłoszony jednolity tekst rozporządzenia Ministra Zdrowia z dn. 5 października 2017 r. w sprawie opłat za czynności wykonywane przez organy Państwowej Inspekcji Sanitarnej w ramach urzędowych kontroli żywności.
 7. Rozporządzenie Ministra Finansów z dn. 24 czerwca 2022 r. w sprawie przedłużenia okresu ważności znaków akcyzy naniesionych na opakowania jednostkowe wyrobów winiarskich (Dz. U. 2022 r., poz. 1357).
Przedłużony został do 31 grudnia 2023 r. okres ważności znaków akcyzy, których wzory zostały określone w rozporządzeniu Ministra Finansów z dn. 7 czerwca 2019 r. w sprawie oznaczania wyrobów akcyzowych znakami akcyzy.
 8. Ustawa z dn. 23 czerwca 2022 r. o rolnictwie ekologicznym i produkcji ekologicznej (Dz. U. 2022 r., poz. 1370).
Ustawa określa szczegółowo zadania oraz właściwości organów i jednostek w zakresie produkcji ekologicznej.

Unijne akty prawne

1. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2022/196 z dn. 28 kwietnia 2022 r. zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) 2017/2470 w odniesieniu do w warunków stosowania nowej żywności „galaktooligosacharydy”. (Tekst mający znaczenie dla EOG). (DZ.U. UE L 2022 r., 126,s.10).
Załącznik do przedmiotowego rozporządzenia zawiera warunki stosowania „glaktooligosacharydy” – nowej żywności, na którą wydano zezwolenie.
2. Rozporządzenie Komisji (UE) 2022/860 z dn. 1 czerwca 2022 r. zmieniające załącznik III do rozporządzenia (WE) nr 1925/2006 r. Parlamentu Europejskiego i Rady Europy w odniesieniu do monaklin ze sfermentowanego czerwonego ryżu. (Tekst mający znaczenie dla EOG). (DZ.U. UE L 2022 r., 151, s. 37).
Zmieniony załącznik do rozporządzenia (WE) nr 1925/2006 r. Parlamentu Europejskiego i Rady Europy w odniesieniu do monaklin ze sfermentowanego czerwonego ryżu zawiera warunki stosowania oraz wymagania dodatkowe dla: „monokliny ze sfermentowanego czerwonego ryżu” jako substancji podlegających ograniczeniom.
3. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2022/965 z dn. 21 czerwca 2022 zezwalające na wprowadzenie na rynek ziaren jadalnej odmiany *Jatropha curcas* L. jako nowej żywności oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) 2017/2470. (Tekst mający znaczenie dla EOG). (DZ.U. UE L 2022 r., 166, s. 118).
Wyłącznie przedsiębiorstwo „JaroSolutions GmbH” jest upoważnione do wprowadzenia na rynek Unii nowej żywności pod nazwa „ziarna jadalnej odmiany *Jatropha curcas* L”. W załączniku do rozporządzenia określono warunki jej stosowania, etykietowania i ochrony danych.
4. Rozporządzenie Komisji (UE) 2022/1023 z dn. 28 czerwca 2022 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady Europy (WE) nr 1333/2008 oraz załącznik do rozporządzenia Komisji (UE) nr 231/2012 w odniesieniu do stosowania lecytyny owsianej w wyrobach kakaowych i czekoladowych objętych dyrektywą 2000/36/WE Parlamentu Europejskiego i Rady. (Tekst mający znaczenie dla EOG). (DZ.U. UE L 2022 r., 172, s. 5).
W załączniku I wprowadzono zmianę polegającą na dodaniu do pozycji dodatki do żywności E 322 pozycję „E 322a Lecytyna owsiana 20 000”.
W załączniku II dodano definicję i wymagania dotyczące „E 322a Lecytyny owsianej 20 000”.
5. Rozporządzenie Komisji (UE) 2022/1037 z dn. 29 czerwca 2022 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady Europy (WE) nr 1333/2008 oraz załącznik do rozporządzenia Komisji (UE) nr 231/2012 w odniesieniu do stosowania glikolipidów jako środków konserwujących w napojach. (Tekst mający znaczenie dla EOG). (DZ.U. UE L 2022 r., 173, s. 52).

Wprowadzone w załączniku I do rozporządzenia dotyczą dodania „E 246 Glikolipidy” do pozycji „dodatki inne niż barwniki i substancje słodzące”, „piwo i napoje słodowe”.

W załączniku II do rozporządzenia dodano pozycje zawierająca definicje i wymagania dotyczące „E 246 Glikolipidy”. ☒

JUBILEUSZ PRACY NAUKOWO-DYDAKTYCZNEJ PANA PROF. DR HAB. TADEUSZA SIKORY



Prof. dr hab. Tadeusz Sikora urodził się 21 stycznia 1950 r. w Dobrzycy (obecnie woj. zachodniopomorskie). Szkołę Podstawową i Liceum Ogólnokształcące ukończył w Nowym Żmigrodzie, pow. jasielski. Jest absolwentem kierunku Towaroznawstwo Wyższej Szkoły Ekonomicznej w Krakowie. Studia ukończył w 1974 r. obroną pracy magisterskiej pt.: „Zmiany jakościowe w sokach warzywnych w opakowaniach szklanych w okresie ich przechowywania” wykonanej pod kierunkiem doc. Leonarda Litewki. Pracę dydaktyczno-naukową rozpoczął 1 października 1975 r. w Zakładzie Technologii Ogólnej Instytutu Towaroznawstwa, przechodząc wszystkie szczeble kariery zawodowej i naukowej – od asystenta stażysty do profesora zwyczajnego, następnie w 1977 r. przeszedł do pracy w Zakładzie Towaroznawstwa Spożywczego, którym kierował doc. dr Tadeusz Gołębiowski. Na początku lat osiemdziesiątych XX w. przygotował rozprawę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Tyszkiewicza nt.: „Czynniki określające jakość mięsa jagnięcego na przykładzie mieszańców owcy pogórza”, którą obronił w 1984 r. przed Radą Naukową Instytutu Towaroznawstwa Akademii Ekonomicznej w Krakowie uzyskując stopień doktora nauk towaroznawczych. Efektem dalszych badań była rozprawa habilitacyjna nt.: „Jakość i stopień chemicznego skażenia mięsa i organów wewnętrznych testowych zwierząt rzeźnych z krakowskiej strefy ekologicznie zagrożonej”. Kolokwium habilitacyjne miało miejsce na Wydziale Rolniczym z Oddziałem Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Krakowie w 1994 r. na którym dr Tadeusz Sikora otrzymał stopień naukowy doktora habilitowanego nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia. Tytuł naukowy profesora nauk rolniczych otrzymał w 2000 r., a od 1.09.2004 r. został zatrudniony na stanowisku profesora zwyczajnego.

Dnia 1.10.1995 r. objął kierownictwo Samodzielnego Zakładu Towaroznawstwa Ogólnego i Zarządzania Jakością w Instytucie Towaroznawstwa Akademii Ekono-

micznej w Krakowie (obecnie jest to Katedra Zarządzania Jakością w Instytucie Nauk o Jakości i Zarządzania Produktem Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie), którą kierował do 30.09.2020 r. Od 1.10.2020 r. przeszedł do pracy w Katedrze Zarządzania Procesowego.

W okresie kierowania Katedrą Zarządzania Jakością podejmował współpracę z ośrodkami zagranicznymi, między innymi z Akademią Handlową we Lwowie, Państwowym Uniwersytetem Handlowo-Ekonomicznym w Kijowie, czy Uniwersytetem w Kragujewcu (Serbia). Nawiązał także współpracę z Europejską Organizacją Jakości (EOQ) oraz brał udział w pracach zespołu Ekspertów Zewnętrznych Narodowego Programu Foresight 2020.

Profesor Tadeusz Sikora był w latach 2002-2011 kierownikiem Studium Podyplomowego „Systemowe Zarządzania Jakością” działającego przy Katedrze Zarządzania Jakością. Z inicjatywy i pod Jego kierunkiem rozpoczęła się realizacja konferencji organizowanych przez Katedrę z cyklu „Jakość w gospodarce rynkowej”. W bieżącym roku odbędzie się XI krajowa i III międzynarodowa konferencja z tego cyklu, która będzie jednocześnie okazją do świętowania 50-lecia Katedry Zarządzania Jakością, która przez ostatnie 25 lat rozwijała się pod opieką Pana Profesora.

Jest autorem, współautorem lub redaktorem 29 monografii, podręczników lub książek oraz autorem lub współautorem ponad 170 artykułów naukowych, 45 rozdziałów w monografiach, 85 rozdziałów w materiałach konferencyjnych i około 150 artykułów popularno-naukowych.

Był promotorem w 20 zakończonych przewodów doktorskich na Wydziale Towaroznawstwa Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie i drugim promotorem doktoratu na Wydziale Zarządzania i Komunikacji Społecznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Był recenzentem w 66 postępowaniach awansowych, w tym: 21 doktoratów, 19 habilitacji, 13 wydawniczych habilitacji, 12 opinii w postępowaniu na tytuł i I na stanowisko profesora zwyczajnego. W działalności dydaktycznej prowadził zajęcia ze studentami z wielu przedmiotów realizowanych na kierunku Towaroznawstwa i ZIP. Pod jego kierunkiem zostało wykonanych: 366 prac magisterskich i 109 inżynierskich, był również promotorem 208 prac dyplomowych na Studiach Podyplomowych (UEK, UP we Wrocławiu, UJ).

Zainteresowania naukowe prof. Tadeusza Sikory koncentrują się głównie wokół problematyki zarządzania jakością i bezpieczeństwem w sektorze żywnościowym. Jest jedną z pierwszych osób w Polsce, która zajęła się tą problematyką i niekwestionowanym autorytetem w tym zakresie. Był, między innymi, konsultantem ds. jakości w programie: „Quality Management Dairy Sector” (Project PHARE P 9312-05-01), partnerem w programach takich jak: Erasmus Intensive Programme in Agri-Business Management with Emphasis in Food Industry Enterprises, Improvement of Partnership

with Enterprises by Enhancement of a Regional Quality Management Potentials in WBC (Project: 543662-TEMPUS-1-2013-1-ME-TEMPUS-JPHES).

Aktywie działał również w organizacjach naukowych i towarzystwach był, między innymi, członkiem Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN, członkiem Rady Gospodarki Żywnościowej przy Ministrze Rolnictwa i Rozwoju Wsi, v-prezesem Klubu POLSKIE FORUM ISO 9000, v-prezesem Zarządu Polskiego Stowarzyszenia Jakości Zarządzania POLISOLAB, przewodniczącym Komitetu Chroniącego Bezstronność TÜV Rheinland Polska, v-prezesem, a następnie prezesem Zarządu Głównego PTTŻ. Od 2013 r. jest członkiem Rady Naukowej Polskiej Federacji Producentów Żywności, a w 2020 r. został powołany przez Ministerstwo Rozwoju na członka Sektorowej Rady do spraw Kompetencji – Sektor żywności wysokiej jakości. Prof. Tadeusz Sikora aktywnie działał także w Polskim Towarzystwie Technologów Żywności, był prezesem Oddziału Małopolskiego, wiceprezesem Zarządu Głównego oraz prezesem PTTŻ. Był pomysłodawcą i redaktorem kwartalnika „Żywność. Technologia. Jakość” (obecnie: „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość”), który jest organem naukowym PTTŻ, a także redaktorem naczelnym Wydawnictwa Naukowego. Aktywnie działał również w Polskim Towarzystwie Towaroznawczym (PTT), pełniąc między innymi funkcję prezesa Oddziału Krakowskiego; członka Zarządu Głównego i Rady Naukowej przy ZG PTT, oraz przewodniczącym Głównej Komisji Rewizyjnej. Był także rzeczoznawcą PTT w zakresie kontroli i oceny jakości towarów.

Profesor Tadeusz Sikora jest laureatem Małopolskiej Nagrody Jakości (2008) i Polskiej Indywidualnej Nagrody Jakości im. Prof. Edwarda Kindlarskiego w kategorii nauka (2010). Odznaczony został: Złotym Krzyżem Zasługi (1999), Medalem Komisji Edukacji Narodowej (2000), Krzyżem Kawalerskim OOP (2012), Złotą Odznaką PTTŻ (2010), medalem „Zasłużony dla Wydziału Nauk o Żywności” Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (2007), medalem Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. Gen. Karola Kaczkowskiego (2009), medalem Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie (2011), medalem im. Profesora Franciszka Nowotnego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (2014), odznaką Honorową za Zasługi dla SGGW (2017), medalem 75-lecia i 80-lecia Akademii Ekonomicznej w Krakowie (2001, 2005) i medalem 90-lecia Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie (2015). W 2006 r. Walne Zebranie Delegatów PTTŻ nadało prof. Tadeuszowi Sikorze godność Członka Honorowego Towarzystwa.

W dniu 9 listopada 2019 r. Profesor otrzymał godność Honorowego Profesora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

*dr hab. Joanna Dziadkowiec, prof. UEK
Katedra Zarządzania Jakością
Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie*



W dniach 19-20. maja 2022 r. w Poznaniu miała miejsce kolejna, już XXVI Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PPTŻ pod hasłem „Żywność dzisiaj – lokalna czy globalna? Tradycyjna czy innowacyjna?” oraz IXth International Session of Young Scientific Staff ‘Food nowadays – local or global? traditional or innovative?’. Poznańskie spotkanie Młodych Naukowców zostało objęte patronatem honorowym JM Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, prof. dr hab. Krzysztofa Szoszkiewicza oraz Pani Dziekan Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, prof. UPP dr hab. Bożeny Danyluk.

Wydarzenie to jest kontynuacją corocznych sesji skupiających Adeptów nauk żywieniowych z całej Polski, oraz z zagranicy. Każdy, kto zna proponowany przez SMKN PTTŻ wymiar spotkań, wie doskonale jak niezwykle są te dwa majowe dni spędzane wspólnie, w gronie Młodych Naukowców, pod okiem wybitnego grona doświadczonych Naukowców. Komitet Naukowy w składzie: prof. dr hab. Joanna Stadnik (UP Lublin), prof. dr hab. Agnieszka Kita (UP Wrocław), prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska (SGGW Warszawa), prof. dr hab. Małgorzata Nogala-Kałucka (UP Poznań), prof. dr hab. Lesław Juszcak (URK Kraków), prof. dr hab. Tadeusz Sikora (UEK Kraków), dr hab. Bożena Danyluk, prof. UPP (UP Poznań), dr hab. Małgorzata Dżugan, prof. UR (UR Rzeszów), dr hab. Małgorzata Gumienna, prof. UPP (UP Poznań), dr hab. Katarzyna Marciniak-Łukasiak (SGGW Warszawa), dr hab. Magdalena Montowska, prof. UPP (UP Poznań), dr hab. Dorota Piasecka-

Kwiatkowska, prof. UPP (UP Poznań), doc. Ing. Petr Česla, PhD Assoc. Prof. (University of Pardubice, Czech Republic), bacznie czuwał nad poziomem obrad i wielokrotnie wspierał Młodych swoim doświadczeniem i merytorycznymi spostrzeżeniami podczas wystąpień. Tematycznie tegoroczna Sesja skupiła się wokół dynamicznych zmian zachodzących na rynku żywnościowym, w efekcie zmian społecznych, na płaszczyźnie postępującej globalizacji i innowacyjności rynku żywnościowego.

Poznań przywitał niemal 100 Uczestników bardzo słonecznie i ciepło. Już w środę 18. maja Organizatorzy zainicjowali cykl warsztatów: „Czy geny mogą warunkować odczuwanie smaku?”, „Zastosowanie sztucznej inteligencji w badaniach żywności”, „Zastosowanie systemów decyzyjnych w badaniach żywności – inżynieria oprogramowania przy użyciu diagramów UML”. Popołudnie zaś spędzono integracyjnie przy ognisku w pięknym Ogrodzie Dendrologicznym Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Pierwszego dnia Sesji, tj. dnia polskojęzycznego, Uczestnicy z rogalami świętomarcińskimi w dłoniach, wysłuchali referatów w trzech sesjach plenarnych oraz w ramach sesji plakatowej, a wieczorem wzięli udział w uroczystej Kolacji Bankietowej.

Obrady uświetnili swoimi wykładami zaproszeni prelegenci: Prezes Zarządu Polskiej Izby Produktu Regionalnego i Lokalnego Pan Krystian Kuśnierek z wykładem „Wielkopolskie produkty tradycyjne”), Pani Izabela Wojdyła z firmy Pyszoty z wykładem „Kosmiczne posiłki dla dzieci - żywność liofilizowana”, oraz prof. UPP dr hab. Wawrzyniec Czubak z wykładem „Wspólna Polityka Rolna 2023-2027 – wyzwania i szanse polskiego rolnictwa i przetwórstwa”.

Wzorem ubiegłej Sesji, podczas obrad Pani Prezes PTTŻ prof. dr hab. Joanna Stadnik wręczyła zasłużoną statuetkę za najlepszą pracę doktorską z zakresu nauk o żywności obronioną w 2021 roku, przyznaną w konkursie organizowanym przez Polskie Towarzystwo Technolog Żywności. Nagrodzono pracę doktorską dr inż. Katarzyny Pobiedy pt. „Studia nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową powłok pullulanowo-propolisowych na wybranym surowcu roślinnym”, zrealizowaną pod okiem prof. dr hab. Małgorzaty Gniewosz i dr inż. Karoliny Kraśniewskiej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Instytutu Nauk o Żywności SGGW w Warszawie. Serdeczne gratulacje!

Drugi dzień Konferencji stanowiły po raz 9. anglojęzyczne sesje referatowe i posterowe, na których goszczono m.in. Uczestników z Estonii, Czech, Słowacji, Ukrainy. Sesje otwierały dwa wykłady plenarne: prof. dr hab. Anny Gramzy-Michałowskiej z Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu UPP pt. ‘Tradinnovation in food development’, oraz dr Tetiany Stepanovej, Assos. Prof. z Sumy National Agrarian University, pt. ‘Modern aspects of cultivated mushrooms use in the technology of sausages’.

W trakcie dwudniowych obrad wygłoszono 39 referatów i zaprezentowano 30 plakatów, spośród których Komitet Naukowy tradycyjnie już wyłonił Laureatów w ramach konkursu doniesień. W ramach poszczególnych sesji nagrody przyznano:

A) w kategorii referaty polskojęzyczne:

1. miejsce: Marcelinie Karbowiak (SGGW w Warszawie) – „Wpływ stopnia inaktywacji cieplnej komórek *Lactobacillus* spp. na ich hydrofobowość oraz zdolności autoagregacyjne i adhezyjne”
 2. miejsce: Katarzynie Wierzchowskiej (SGGW w Warszawie) – „Olej mikrobiologiczny - zrównoważona alternatywa dla konwencjonalnych tłuszczów roślinnych?”
- wyróżnienie: Natalii Kasalka-Czarnej (UP w Poznaniu) – „Wpływ metody i czasu przechowywania na procesy agregacji i degradacji białek mięsa dzika”.

B) w kategorii plakaty polskojęzyczne:

1. miejsce: Agnieszce Tkaczyńskiej (UP we Wrocławiu) – „Ciemnienie enzymatyczne ziemniaków odmian o czerwonym i fioletowym miąższu”
2. miejsce: Agacie Osos, Patrycji Jankowskiej (UP w Poznaniu) – „Makaron wzbogacony w minikiwi (*Actinidia deliciosa*): właściwości fizykochemiczne, struktura i akceptacja konsumentów”

wyróżnienie: Agnieszce Piekara (UP we Wrocławiu) – „Produkty z pogranicza na polskim rynku suplementów diety”.

C) w kategorii referaty anglojęzyczne:

1. miejsce: Marcellus Arnold (UP w Poznaniu) – „Polish gingerbread fortified with eggshell powder as an innovative product to reduce the risk of osteoporosis”.
2. miejsce: Monica Nabil Gayed Ibrahim (Estonian University of Life Sciences, Estonia) – „The effect of the duration of oat-drink processing with a neutral or acidic protease on its nutritional value”.

wyróżnienie: Oldze Świder (IBPRS-PIB w Warszawie) – „Improving fermented food safety – application of non-aminobiogenic starter cultures in a model cucumber fermentation system”.

D) w kategorii postery anglojęzyczne:

1. miejsce: Mahbuba Islam (UP w Poznaniu) – „Thermo-oxidative stability of cold pressed hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oils from cultivar of Greater Poland region”.
2. miejsce: Kamilowi Haładyn (UP we Wrocławiu) – „Optimization of the process of extraction and isolation of carotenoid compounds on the example of rosehip fruits”.

wyróżnienie: Štěpán Marhons (University of Chemistry and Technology, Prague, Czechy) – „Effect of temperature on microbial transglutaminase milk treatment”.

E) Nagrody publiczności wręczono:

- za najlepszy plakat: Agacie Osoś, Patrycji Jankowskiej (UP w Poznaniu) „Makaron wzbogacony w minikiwi (*Actinidia deliciosa*): właściwości fizykochemiczne, struktura i akceptacja konsumentów”
- za najlepszy referat: Marcellus Arnold (UP w Poznaniu) – „Polish gingerbread fortified with eggshell powder as an innovative product to reduce the risk of osteoporosis”.

W tym miejscu serdecznie podziękowania kierujemy do całego Komitetu Organizacyjnego Konferencji, który starał się zachować znaną Młodemu Naukowcom atmosferę otwartości i współpracy: dr inż. Monice Beszterdzie, dr inż. Paulinie Bielskiej, dr inż. Marii Różańskiej, dr inż. Łukaszowi Tomczykowi, mgr Agacie Zarembie, mgr inż. Oskarowi Szczepaniakowi. Pracownice poznańskiego Komitetu przewodniczyła Przewodnicząca Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ dr inż. Monika Przeor.

Wszystkim Uczestnikom dziękujemy za obecność, Komitetowi Naukowemu – za niezawodne wsparcie, zaś Laureatom nagród - serdecznie gratulujemy!

Kolejna Sesja Młodej Kadry Naukowej już za rok, a goście Młodych będzie Oddział Warszawski.

Cykliczne Sesje Młodej Kadry Naukowej zawsze proponują ciekawą formułę spotkań i pozwalają podtrzymać niezwykle charakter znajomości nawiązywanych między przedstawicielami różnych ośrodków naukowych. Oby następne spotkanie, w maju 2023 roku w Warszawie było dla Młodych Naukowców kolejnym znaczącym krokiem we własnym rozwoju i przyczyniało się poszanowania wzajemnych osiągnięć w naukach żywieniowych.

dr inż. Monika Przeor

Przewodnicząca Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ

Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Z ŻAŁOBNEJ KARTY

PROFESOR DR HAB. IRENA GÓRSKA (1929-2024)



Profesor dr hab. Irena Górka urodziła się 24 lipca 1929 roku w Łachwie na dzisiejszych terenach Białorusi. Po wojnie wraz z rodziną zamieszkała w Milanowie na Lubelszczyźnie, gdzie Jej ojciec był jedynym, w tamtym czasie, w powiecie parczewskim lekarzem weterynarii. W 1949 roku, po ukończeniu Liceum Ogólnokształcącego w Lublinie, rozpoczęła studia pierwszego stopnia na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Marii Skłodowskiej-Curie w Lublinie, natomiast studia drugiego stopnia ukończyła na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego uzyskując tytuł magistra zoologii. Pierwszą pracę podjęła na Akademii Medycznej we Wrocławiu w Zakładzie Anatomii Patologicznej, pełniąc funkcję asystenta naukowego w zespole prof. Zygmunta Alberta. W 1959 roku została zatrudniona w Zakładzie Badawczym Surowców Zwierzęcych, wrocławskiej filii Instytutu Zootechniki w Krakowie, gdzie pracowała przez trzy lata. W 1962 roku podjęła pracę na stanowisku starszego asystenta w ówczesnej Wyższej Szkole Rolniczej we Wrocławiu, wiążąc się z tą uczelnią do końca swojej kariery zawodowej. Początkowo związana była z Wydziałem Zootechniki Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu podejmując pracę w Katedrze Obrotu i Oceny Surowców Zwierzęcych, która później weszła w strukturę organizacyjną Oddziału Technologii Rolno-Spożywczej, a od 1977 r. Wydziału Technologii Żywności.

W swoich badaniach naukowych otworzyła ścieżkę badań nad histologią i strukturą mięsa w aspekcie produktu żywieniowego. Stopień doktora nauk rolniczych uzyskała w 1962 r. na Wydziale Zootechnicznym ówczesnej Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu, na podstawie rozprawy pt. „Badania histometryczne i histochemiczne tkanki mięśniowej cieląt z różnych warunków żywieniowych” natomiast rozprawa habilitacyjna (1974 r.) dotyczyła ultrastrukturalnych i histochemicznych zmian w mięsie zajęczym w okresie pośmiertnym i podczas magazynowania w mroźni. Tytuł naukowy profesora otrzymała w 1991 r.

Odbyła staże naukowe w Moskiewskim Technologicznym Instytucie Przemysłu Mięsnego i Mleczarskiego oraz Wszechzwiązkowym Naukowo-Badawczym Instytucie Przemysłu Mięsnego (1985 r.), a w 1987 r. w Leningradzkim Technologicznym Instytucie Przemysłu Chłodniczego. Była członkiem Kolegium Redakcyjnego ds. Wydawnictw i redaktorem merytorycznym Zeszytów Naukowych AR we Wrocławiu serii „Technologia Żywności” (1981–1987), członkiem senatu Akademii Rolniczej we Wrocławiu (1987–1999), prodziekanem (1981–1987), a później dziekanem Wydziału Technologii Żywności (1987–1993). Była też członkiem Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN, Zespołu Ekspertów ds. Technologii Żywności i Żywienia Człowieka przy MEN, Sekcji Technologii Żywności i Żywienia KBN. Była również od początku powstania Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności członkiem wrocławskiego oddziału PTTŻ.

Jej specjalnością naukową była technologia mięsa, ze szczególnym uwzględnieniem ubocznych niekonwencjonalnych surowców rzeźnych, w kontekście ich charakterystyki histologicznej, przydatności i parametryzacji żywieniowej. Wyniki prac prezentowała na wielu krajowych i międzynarodowych kongresach naukowych. Była współautorką dwóch skryptów oraz 98 publikacji naukowych. Recenzowała siedem wniosków na tytuł profesora zwyczajnego, jedną rozprawę habilitacyjną i pięć doktorskich. Była recenzentką wielu prac wydawniczych, 23 projektów badawczych KBN. Była kierownikiem dwóch tematów badawczych w ramach Programów Badawczych Międzyresortowych (1981–1985) i Centralnego Programu Badań Podstawowych (1986–1990), grantu promotorskiego KBN (1997), współautorem projektu badawczego KBN (1992–1994).

Profesor Irena Górka była bardzo cenionym dydaktykiem i wychowawcą wielu pokoleń pracowników naukowych i studentów, którzy pamiętają Ją jako osobę wymagającą, ale życzliwą, o wysokiej kulturze osobistej. Była promotorką w dwóch rozpraw doktorskich i 82 prac magisterskich. Pod jej kierunkiem siedem osób z kraju odbyło staże naukowe.

W uznaniu Jej zasług prof. Irena Górka została odznaczona Złotym Krzyżem Zasługi, Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, Medalem Komisji Edukacji Narodowej, medalem „Za Zasługi dla Akademii Rolniczej we Wrocławiu”. Wyróżniona była też 19. nagrodami JM Rektora.

W dniu 24 kwietnia 2022 roku odeszła od nas wybitna uczona, przyjaciółka i autorytet dla wielu z nas.

TECHNOLOG ŻYWNOSCI

INFORMATOR POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI

Rok 32 Nr 2

czerwiec 2022

ZARZĄDU GŁÓWNEGO PTTŻ XII KADENCJI

Dnia 20 czerwca 2022 r. odbyło się zebranie Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności XII kadencji w formie zdalnej. Spotkanie otworzyła Prezes Zarządu Głównego prof. Joanna Stadnik i przedstawiła sprawozdanie z działalności Prezydium ZG PTTŻ w okresie styczeń - czerwiec 2022 r. Następnie podjęto dyskusję nad przyjęciem sprawozdań merytorycznego oraz finansowego z działalności PTTŻ za rok 2021. W dalszej kolejności podjęto dyskusję nad powołaniem nowej struktury Towarzystwa: Sekcji Chemii i Technologii Mleka. Następnie Pani Prezes przekazała aktualne informacje związane z rejestracją Towarzystwa w Krajowym Rejestrze Sądowym. Następnie przedstawiono informacje o dofinansowaniu działalności popularyzującej naukę w roku 2022 r. W dalszej części zebrania, przedstawiciele poszczególnych oddziałów i sekcji Towarzystwa przedstawili plany działalności na rok 2022 wraz z informacjami o wpłacanych składkach. Następnie powołano Kapitułę konkursu na najlepszą pracę doktorską oraz Komisję oceniającą w konkursie na najlepszą publikację w czasopiśmie Żywność. Nauka. Technologia. Jakość na kadencję 2022-2025.

WAŻNIEJSZE KRAJOWE I ZAGRANICZNE KONFERENCJE NAUKOWE W ROKU 2022

Czerwiec

- 9 - 10 KRAKÓW = XI Krajowa i III Międzynarodowa Konferencja Naukowa pt. „Jakość przyszłości, przyszłość jakości”**
Organizator: Katedra Zarządzania Jakością Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie
Kontakt: dr hab. Joanna Dziadkowiec, prof. UEK
e-mail: qffq@uek.krakow.pl, balonu@uek.krakow.pl
Tel. (012) 293-55-83, (012) 293-55-89
- 9 - 10 POZNAŃ = III Wielkopolska Konferencja Nauka Gospodarce pt. „Partnerstwo nauki i przemysłu źródłem rozwoju”**

Organizatorzy: Oddział Wielkopolski PTTŻ, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
Informacje: <http://pttzow.up.poznan.pl/konferencja>
Kontakt: NaukaGospodarce@up.poznan.pl; tel. (61) 848-72-97

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

Wrzesień

27 - 30 WROCLAW = 1st European Conference on Applied Animal Sciences (ECAAS)

Informacje: <https://www.ecaas-congress.com>
Kontakt: Marcjanna Wrzecińska, tel. 518-805-704
e-mail: marcjanna.wrzecinska@zut.edu.pl ; congress.ecaas@gmail.com

Październik

5 - 6 Zurich, Switzerland = 26th International Conference on Food Technology and Processing

Organizator: Conference Series LLC Ltd
Informacje: <https://foodtechnology.insightconferences.com>
Kontakt: foodtechnology@brainstormingmeetings.com; tel. +44 2033180199

26 - 27 KRAKÓW = XIV 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: cmq@uek.krakow.pl ; tel. (12) 293-55-99

Listopad

17 - 18 CZĘSTOCHOWA = IX Ogólnopolska Konferencja Naukowa z cyklu Żywność – Żywienie – Dietetyka nt. „Żywienie dzieci w/po pandemii”

Organizatorzy: Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy im. Jana Długosza w Częstochowie, Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Komitet Nauk o Żywności i Żywieniu PAN

Informacje: <http://www.dietkonf.ujd.edu.pl>

Kontakt: dr n. farm. Wojciech Woszczyk

e-mail: dietkonf@ujd.edu.pl

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI

Przy Zarządzie Głównym: **TCHIBO – WARSZAWA Sp. z o.o. Marki, HORTIMEX Sp. z o.o. Konin, BUNGE POLSKA Sp. z o.o. Karczew.**

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

KOMUNIKATY

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

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