

KAROLINA PYCIA, IRENEUSZ KAPUSTA

**WPLYW STOPNIA DOJRZAŁOŚCI ORAZ WIELKOŚCI DODATKU
ORZECHÓW LASKOWYCH I WŁOSKICH NA WŁAŚCIWOŚCI
FIZYKOCHEMICZNE I PRZECIWUTLENIAJĄCE WZBOGACONEGO
CHLEBA PSZENNEGO**

Streszczenie

Przykładem produktu, który można wzbogacać w składniki bioaktywne, jest chleb pszenny. Celem pracy była ocena wpływu wzbogacania chleba pszennego orzechami laskowymi i włoskimi o różnym stopniu dojrzałości. Orzechy laskowe i włoskie zostały zebrane w lipcu oraz we wrześniu. Udział zmielonych orzechów w mieszance wypiekowej wyniósł 2 % oraz 7 % w stosunku do masy mąki. Próbę kontrolną stanowił chleb niewzbogacony. Chleb wykonano metodą bezpośrednią z użyciem drożdży. W badaniach obliczono wydajność ciasta, upiek, stratę wypiekową całkowitą i wydajność pieczywa. Oznaczono objętość chleba, objętość właściwą, porowatość jego miękiszu, barwę w systemie CIE L*a*b* oraz parametry tekstury. Określono także właściwości przeciwutleniające chleba (metodą ABTS⁺, DPPH[•] oraz FRAP), ogólną zawartość związków polifenolowych oraz profil i zawartość polifenoli metodą chromatografii UPLC-PDA-ESI-MS. Wyniki poddano trójczynnikowej analizie wariancji.

Stwierdzono, że wzbogacenie chleba orzechami o różnym stopniu dojrzałości wpłynęło na jego właściwości fizykochemiczne i przeciwutleniające. Wydajność ciasta i wydajność chleba były większe przy większym dodatku orzechów. Największą objętością charakteryzowała się próba kontrolna, a wzbogacenie chleba orzechami skutkowało zmniejszeniem jego objętości. Najmniejszą objętością charakteryzował się chleb wzbogacony niedojrzałymi orzechami włoskimi zebranymi w lipcu. Miękiśz tego chleba charakteryzował się najmniejszą wartością parametru L* oraz był najtwardszy. Rodzaj orzechów oraz ich stopień dojrzałości wpływały istotnie na właściwości przeciwutleniające i zawartość polifenoli w chlebie. Wartości tych parametrów zmniejszały się w miarę zwiększania dojrzałości dodawanych orzechów, a chleby wzbogacone orzechami włoskimi odznaczały się istotnie większą zawartością polifenoli ogółem w porównaniu z próbą kontrolną oraz chlebami wzbogaconymi orzechami laskowymi. W profilu polifenoli badanych chlebów zidentyfikowano 12 związków.

Słowa kluczowe: chleb pszenny, orzechy, stopień dojrzałości, wzbogacanie, polifenole

Dr inż. K. Pycia, dr hab. I. Kapusta, prof. UR, Zakład Ogólnej Technologii Żywności i Żywnienia Człowieka, Instytut Technologii Żywności i Żywnienia, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, ul. A. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów. Kontakt: kpycia@ur.edu.pl

Wprowadzenie

Asortyment wyrobów piekarskich, w tym chleba, jest obecnie bardzo urozmaicony. Wiąże się to z zastosowaniem zmodyfikowanych receptur, wdrażaniem nowych rozwiązań w zakresie technologii produkcji czy też ze zmieniającymi się preferencjami konsumentów. Współcześni konsumenci świadomi związku pomiędzy jakością spożywanej żywności a własnym zdrowiem poszukują chleba, który będzie charakteryzował się nie tylko świeżością i smakowitością, ale również walorami prozdrowotnymi. Pieczywo jako element codziennej diety większości konsumentów może zatem pełnić funkcję nośnika składników odżywczych, ale także substancji bioaktywnych, kształtujących profil prozdrowotny. Takie pieczywo można zaliczyć do kategorii żywności funkcjonalnej [11]. Wartość odżywcza pieczywa podstawowego, powstałego na bazie mąki jasnej, niskowyciągowej jest zubożona z powodu deficytu błonnika pokarmowego, witamin, składników mineralnych oraz substancji bioaktywnych w mące. Aby zwiększyć wartość odżywczą takiego pieczywa, często część mąki pszennej zastępuje się dodatkami roślinnymi lub zwierzęcymi. W literaturze przedmiotu publikowane są dane dotyczące wpływu fortyfikacji chleba nasionami roślin oleistych [14], orzechami [1], mąką z nasion roślin strączkowych [19], serwatką [13] czy olejem i wytlókami z orzechów włoskich [26]. W badaniach własnych wzbogacano także chleb zmielonymi orzechami laskowymi i włoskimi, co wpłynęło bardzo korzystnie na walory prozdrowotne takiego pieczywa. Jak jednak wykazali Pycia i wsp. [24, 25], potencjał przeciwutleniający orzechów zależy od ich rodzaju oraz stopnia dojrzałości. Największym potencjałem przeciwutleniającym wynikającym z zawartości polifenoli ogółem charakteryzują się niedojrzałe orzechy, a właściwości te osłabiają się w miarę nabywania dojrzałości. Ponadto Pycia i wsp. [24, 25] wykazali, że niedojrzałe orzechy włoskie charakteryzują się znacznie większym potencjałem przeciwutleniającym w porównaniu z niedojrzałymi orzechami laskowymi. Interesującym zagadnieniem jest także wpływ fortyfikacji niedojrzałymi orzechami na jakość chleba pszennego.

Celem pracy była ocena wpływu rodzaju orzechów, stopnia ich dojrzałości oraz dawki orzechów na właściwości fizykochemiczne i przeciwutleniające wzbogaconego chleba pszennego.

Material i metody badań

Materiałem badanym były chleby pszenne wzbogacone orzechami laskowymi (L) i orzechami włoskimi (W), różniącymi się stopniem dojrzałości. W badaniach użyto orzechów laskowych odmiany Barceloński (Przesławice, małopolskie, Polska) oraz orzechów włoskich odmiany 'Resovia' (Urzejowice, podkarpackie, Polska) zebranych w miesiącu lipcu (L7, W7) oraz we wrześniu (L9, W9) 2017 roku. Do momentu analizy próbki przechowywano w warunkach zamrażalniczych (-18 °C). Następnie orzechy

wysuszone w liofilizatorze (Alpha model 1-2 LDplus, Donserv, Polska), usunięto części niejadalne oraz zmielono. Do wypieku chleba zastosowano mąkę pszenną typu 550 o wodochłonności 61 % oraz zawartości suchej masy 13,0 %. W analizowanych układach mąkę pszenną zastępowano niedojrzałymi orzechami laskowymi lub włoskimi w ilości 2 i 7 % w stosunku do naważki mąki. Próbę kontrolną stanowił chleb pszenny wykonany tylko na bazie mąki pszennej (0 %). Układy doświadczalne powtórzono trzykrotnie. Pieczywo wypiekano z ciasta prowadzonego metodą bezpośrednią z zastosowaniem drożdży [10, 23].

Ciasto przygotowywano z mąki pszennej, drożdży piekarskich (Lallemand, Polska) – 3 % w stosunku do masy mąki, chlorku sodu – 1 % w stosunku do masy mąki, wody oraz zmielonych niedojrzałych orzechów laskowych lub włoskich, przy użyciu miesiarki laboratoryjnej R4 (Mesko-AGD, Poland). Po wymieszeniu wszystkich składników ciasto poddawano fermentacji w ciągu 60 min, w temp. 30 °C, z jednoczesnym przebicciem po upływie 30 min. Następnie uformowane kęsy o masie 250 ± 1 g umieszczano w foremkach i fermentowano do optymalnego rozrostu kęsów. Wypiek chleba prowadzono w elektrycznym piecu modułowym (Sveba Dahlen, Szwecja) w temp. 230 °C, przez 30 min [23, 31].

Po upływie 24 h od wypieku określano parametry wypieku laboratoryjnego pieczywa, takie jak wydajność ciasta [%], wydajność pieczywa [%], całkowita strata piecowa [%] [22, 23, 31]. Ponadto mierzono objętość pieczywa [cm^3] aparatem Sa-Way, przy użyciu sypkich nasion prosa [23, 31]. Obliczano także objętość właściwą, czyli objętość pieczywa na 1g użytej mąki [cm^3/g] [17] oraz określano porowatość pieczywa przy użyciu skali Dallmana [5]. Oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach. Pomiar barwy miększu chleba wykonywano przy użyciu spektrofotometru (HunterLab, Stany Zjednoczone). Pomiary prowadzono w systemie CIE Lab (L^* , a^* , b^*) w odbiciu: geometria pomiarowa $d/8^\circ$, iluminant D65, zakres $400 \div 700$ nm, detektor odchyłony 10° , szczelina pomiaru 25 mm [23]. Obliczano także parametr obrazujący różnicę barwy ΔE [15]. Pomiary przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Analizę profilu teksturometrycznego (TPA) prowadzono przy użyciu teksturometru EZ Test EZ-LX (Shimadzu, Japonia) obsługiwanego przez oprogramowanie Trapezium X Texture Pl. Próbkę miększu ze środkowej części chleba w kształcie walca ($h = 27$ mm, $d = 32$ mm, $V = 22$ cm^3) ściskano dwukrotnie wzdłuż jego osi dyskiem ze stali nierdzewnej o średnicy 25 mm z prędkością 50 $\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$ do momentu uzyskania przez nią 50-procentowego odkształcenia. Określano takie parametry tekstury miększu chleba, jak: twardość [N], spoistość [-] i żujność [N]. Pomiary wykonano w czterech powtórzeniach.

Aktywność przeciwutleniającą badanego chleba oznaczano względem kationorodnika ABTS^{•+} [27], rodnika DPPH[•] [34] oraz metodą FRAP [3]. Zawartość polifenoli ogółem oznaczano metodą spektrofotometryczną z użyciem odczynnika Folina-

Ciocalteu'a [7]. Analizowany chleb suszono przy użyciu liofilizatora ALPHA 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Niemcy), który następnie ekstrahowano roztworem metanolu o stężeniu 80 %. Proces ekstrakcji prowadzono w łaźni ultradźwiękowej (Polsonic, Polska) przez 30 min, w temp. 25 °C. Aktywność przeciwutleniającą oznaczoną metodami ABTS^{•+}, DPPH[•] i FRAP wyrażano w µmolach TE/100 g s.m. (*Trolox Equivalent* – analog α-tokoferolu). Z kolei zawartość związków polifenolowych ogółem wyrażano w mg GAE/100 g s.m. (GAE – ekwiwalent kwasu galusowego). Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Analizę profilu związków polifenolowych wykonywano metodą ultrasprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detektorem mas (UPLC-PDA-ESI-MS) [12, 24, 25] przy użyciu ultrasprawnego chromatografu cieczowego Aquity (Waters, Micro-mass, Manchester, Wielka Brytania) sprzężonego z detektorem o matrycy diodowej (PDA), a także tandemowym detektorem mas w postaci podwójnego kwadrupola (TQD). Rozdział chromatograficzny prowadzono w kolumnie C18 BEH (50 °C) o wymiarach 100 mm × 2,1 mm z ziarnami o wielkości rzędu 1,7 µm (Waters). Jako eluent stosowano 0,1-procentowy wodny roztwór kwasu mrówkowego (eluent A) oraz 40-procentowy wodny roztwór acetonitrylu (eluent B). Objętość nastrzyku wykonywanego przez autosampler wynosiła 5 µl. Identyfikacji związków polifenolowych dokonano na podstawie analizy charakterystycznych widm maksimów absorpcji promieniowania UV-Vis oraz na podstawie stosunku masy do ładunku (m/z) otrzymanego dla pików pseudomolekularnych zarejestrowanych w trybie jonów ujemnych. Analizę ilościową prowadzono na podstawie krzywych wzorcowych. Do rejestracji oraz analizy danych używano oprogramowania Mass-Lynx 4.1 (Waters). Analizę wykonano w trzech powtórzeniach.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej obejmującej trójczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W celu określenia istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi wykonano test Duncana ($p < 0,05$). Dodatkowo pomiędzy parametrami charakteryzującymi właściwości orzechów obliczono wartości współczynników korelacji liniowej Pearsona, których istotność testowano przy $p < 0,01$. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica 13.3 (StatSoft, Polska).

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono wartości parametrów wypieku laboratoryjnego chleba wzbogaconego orzechami laskowymi i włoskimi o różnym stopniu dojrzałości. Stwierdzono, że dodatek do mąki pszennej zmielonych orzechów laskowych i włoskich o różnym stopniu dojrzałości wpłynął na zwiększenie wydajności ciasta. Średnia wydajność ciasta z 2- i 7-procentowym dodatkiem orzechów była większa odpowiednio o 2 % oraz 7 % od wydajności ciasta kontrolnego. Na wartość tego parametru wpływał rodzaj orzechów, stopień ich dojrzałości oraz poziom wzbogacenia ($p < 0,01$). Jedno-

wcześnie nie wykazano statystycznie istotnego wpływu rodzaju orzechów, stopnia dojrzałości, poziomu wzbogacenia oraz interakcji tych czynników na wartość straty piecowej. Na wartość straty piecowej całkowitej wpływał natomiast statystycznie istotnie stopień dojrzałości orzechów. Chleby wzbogacone orzechami zebranymi we wrześniu (L9, W9) charakteryzowały się bowiem większą wartością straty piecowej całkowitej. Z kolei wydajność chleba zależała statystycznie istotnie od rodzaju orzechów, stopnia dojrzałości, poziomu wzbogacenia, a interakcje tych czynników były nieistotne (tab. 1). Stwierdzono, że wzbogacanie chlebów orzechami wpłynęło na zwiększenie ich wydajności, przy czym wartość tego parametru była większa w przypadku chlebów wzbogaconych orzechami niedojrzałymi, czyli pozyskanymi w lipcu.

Tabela 1. Parametry wypieku laboratoryjnego badanych chlebów

Table 1. Parameters of laboratory baking of tested breads

| Próba Sample | Wydajność ciasta Dough yield [%] | Strata piecowa (upiek) Oven loos [%] | Strata piecowa całkowita Total oven loss [%] | Wydajność chleba Bread yield [%] |
|--|-------------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| Kontrolna Control | 165,51 ^a ± 1,12 | 10,87 ^a ± 0,34 | 17,06 ^{bc} ± 0,36 | 144,57 ^{ab} ± 0,63 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 2 % | | | | |
| L7 | 168,82 ^b ± 1,34 | 10,73 ^a ± 0,68 | 15,86 ^{abc} ± 0,19 | 146,66 ^{abc} ± 0,34 |
| L9 | 168,70 ^b ± 1,17 | 11,21 ^a ± 1,20 | 16,67 ^{abc} ± 0,48 | 145,24 ^{abc} ± 0,83 |
| W7 | 169,20 ^c ± 1,18 | 9,46 ^a ± 1,45 | 14,87 ^a ± 0,92 | 148,37 ^c ± 1,60 |
| W9 | 168,92 ^b ± 1,34 | 11,19 ^a ± 1,63 | 17,11 ^{bc} ± 1,30 | 144,48 ^{ab} ± 2,26 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 7 % | | | | |
| L7 | 177,17 ^d ± 1,25 | 9,92 ^a ± 1,09 | 15,33 ^{ab} ± 0,85 | 147,58 ^{bc} ± 1,47 |
| L9 | 177,80 ^d ± 0,95 | 10,62 ^a ± 0,23 | 16,57 ^{abc} ± 0,24 | 145,41 ^{abc} ± 0,42 |
| W7 | 177,65 ^d ± 1,31 | 10,64 ^a ± 1,45 | 15,01 ^a ± 1,03 | 148,13 ^c ± 1,80 |
| W9 | 177,97 ^d ± 0,87 | 11,47 ^a ± 0,91 | 17,70 ^c ± 0,41 | 143,44 ^a ± 0,72 |
| Trójczynnikowa ANOVA-p / Three-way ANOVA-p | | | | |
| Czynnik 1 / Factor 1 | p < 0,001 | 0,911 | 0,870 | p < 0,001 |
| Czynnik 2 / Factor 2 | p < 0,001 | 0,146 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 3 / Factor 3 | p < 0,001 | 0,978 | 0,947 | p < 0,001 |
| Czynnik 1 × czynnik 2 × czynnik 3 / Factor 1 × factor 2 × factor 3 | 0,876 | 0,638 | 0,984 | 0,985 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy p < 0,05 / Mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly at p < 0.05; Czynnik 1 / Factor 1 – rodzaj orzechów / type of nuts; Czynnik 2 / Factor 2 – stopień dojrzałości / maturity stage; Czynnik 3 / Factor 3 – poziom wzbogacenia / enrichment level; Czynnik 1 × czynnik 2 × czynnik 3 / Factor 1 × factor 2 × factor 3 – interakcje pomiędzy rodzajem orzechów, stopniem dojrzałości a poziomem wzbogacenia / interactions among type of nut, maturity stage and level of enrichment.

Wykazano statystycznie istotny wpływ rodzaju orzechów, stopnia ich dojrzałości oraz poziomu wzbogacenia na objętość chleba oraz związaną z nią objętość właściwą.

Największą objętością charakteryzował się chleb kontrolny (487 cm^3), a objętość chleba zmniejszała się w miarę zwiększania poziomu wzbogacania. Średnia objętość chleba z 2-procentowym dodatkiem orzechów wynosiła 419 cm^3 i była o ok. 16 % większa od średniej objętości chlebów wzbogaconych orzechami na poziomie 7 %. Równie interesujący jest także wpływ rodzaju orzechów oraz stopnia ich dojrzałości, gdyż chleby wzbogacone L7 i W7 charakteryzowały się statystycznie istotnie mniejszą objętością w porównaniu z chlebami wzbogaconymi orzechami L9 i W9. Po uwzględnieniu rodzaju orzechów w ramach tego samego stopnia dojrzałości należy zauważyć, że chleb wzbogacony orzechami (2 %) L i W zebranych w lipcu charakteryzował się mniejszą objętością odpowiednio o 70 cm^3 i 144 cm^3 w stosunku do próby kontrolnej. Spośród badanych prób najmniejszą objętością charakteryzował się natomiast chleb wzbogacony na poziomie 7 % orzechami W7. Przedstawione wyniki rzutują bezpośrednio na wartości objętości właściwej. Największą objętością właściwą charakteryzowała się bowiem próba kontrolna ($2,33 \text{ g/cm}^3$), najmniejszą zaś – chleb z 7-procentowym dodatkiem orzechów W7 (tab. 2). Objętość właściwa chleba zmniejszała się w miarę zwiększania poziomu wzbogacenia orzechami. W przypadku chlebów wzbogaconych na poziomie 2 %, te z dodatkiem orzechów laskowych charakteryzowały się większą objętością właściwą w porównaniu z chlebami z dodatkiem orzechów włoskich. Podobną tendencję obserwowano w przypadku chlebów wzbogaconych na poziomie 7 %, gdyż średnia wartość opisywanego parametru prób z dodatkiem L wynosiła $1,90 \text{ g/cm}^3$, a wzbogaconego W – $1,44 \text{ g/cm}^3$. Jest to zgodne z obserwacjami innych badaczy. Wzbogacenie chleba nasionami roślin oleistych [14], skórką z orzechów laskowych [2], mąką z orzechów włoskich [8], olejem i makuchami z orzechów włoskich [26] skutkowało istotnym zmniejszeniem objętości. W niniejszych badaniach wykazano, że największą porowatością charakteryzował się chleb kontrolny (tab. 2). Pory w mięksiszu były cienkościenne i równomiernie rozłożone. Natomiast proces wzbogacenia chleba orzechami laskowymi i włoskimi o różnym stopniu dojrzałości wpłynął negatywnie na porowatość mięksiszu. Najmniejszą porowatość stwierdzono w chlebie z 7-procentowym dodatkiem W7 oraz L7. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono silną ujemną korelację liniową pomiędzy objętością chleba a potencjałem przeciwutleniającym oznaczonym metodami ABTS⁺, DPPH^{*}, FRAP, a także zawartość polifenoli ogółem (odpowiednio: $r = -0,97$, $r = -0,98$, $r = -0,92$, $r = -0,94$, $p < 0,01$). Im większa zatem zawartość polifenoli w chlebie, tym mniejsza jego objętość. Zależność ta jest jednoznacznie związana z właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, jakie wykazują polifenole zawarte w orzechach, szczególnie tych niedojrzałych [20]. Potwierdzeniem są wyniki badań Gomeza i wsp. [8]. Cytowani badacze zauważyli również zmniejszenie objętości chleba na skutek jego suplementacji orzechami. Na skutek negatywnego działania polifenoli na drożdże ich aktywność znacznie obniża się, co niekorzystnie wpływa na proces fermentacji i ilość wydzielonego ditlen-

ku węgla. Zdaniem Anila [2] innym powodem zmniejszenia objętości chleba wzbogaconego surowcami roślinnymi może być zmniejszenie zawartości glutenu w mieszance wypiekowej na skutek zastąpienia części mąki innym surowcem, zwiększenie zawartości białek bezglutenowych lub w przypadku użycia surowca bogatego w błonnik – interakcje pomiędzy glutenem a błonnikiem. Z kolei Gujral i Singh [9] podają, że objętość pieczywa jest istotnie związana z dodatkiem tłuszczu. W miarę zwiększania zawartości tłuszczu w chlebie zmniejsza się bowiem ilość dostępnej wody. W związku z tym obniża się aktywność drożdży oraz utrudniony jest proces kleikowania skrobi [8].

Tabela 2. Parametry fizykochemiczne badanych chlebów

Table 2. Physicochemical parameters of breads tested

| Próba Sample | Objętość pieczywa Volume of bread [cm ³] | Objętość właściwa Specific volume [g/cm ³] | Współczynnik porowatości miękiszu według Dallmana Crumb porosity acc. to Dallman scale |
|--|--|---|---|
| Kontrolna Control | 487 ^h ± 7 | 2,33 ^e ± 0,04 | 100 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 2 % | | | |
| L7 | 417 ^d ± 6 | 1,97 ^c ± 0,03 | 80 |
| L9 | 475 ^g ± 5 | 2,28 ± 0,05 | 90 |
| W7 | 343 ^b ± 4 | 1,62 ^b ± 0,02 | 80 |
| W9 | 443 ^e ± 6 | 2,15 ^d ± 0,00 | 80 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 7 % | | | |
| L7 | 345 ^b ± 5 | 1,63 ^b ± 0,05 | 70 |
| L9 | 455 ^f ± 5 | 2,18 ^d ± 0,04 | 80 |
| W7 | 197 ^a ± 6 | 0,92 ^a ± 0,05 | 60 |
| W9 | 403 ^c ± 6 | 1,97 ^c ± 0,05 | 80 |
| Trójczynnikowa ANOVA-p / Three-way ANOVA-p | | | |
| Czynnik 1 / Factor 1 | p < 0,001 | p < 0,001 | - |
| Czynnik 2 / Factor 2 | p < 0,001 | p < 0,001 | - |
| Czynnik 3 / Factor 3 | p < 0,001 | p < 0,001 | - |
| Czynnik 1 × czynnik 2 × czynnik 3 / Factor 1 × factor 2 × factor 3 | p < 0,001 | p < 0,001 | - |

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

Wykazano, że barwa miękiszu chleba uległa wyraźnej zmianie w wyniku wzbogacenia orzechami. Po przeprowadzeniu analizy wariancji stwierdzono statystycznie istotny wpływ rodzaju orzechów, stopnia ich dojrzałości oraz poziomu wzbogacenia na wartość parametru L* świadczącego o jasności próbki. Największą wartością tego parametru charakteryzowała się próba kontrolna, a w wyniku wzbogacenia wartość L* ulegała istotnemu zmniejszeniu (tab. 3). Przy większym dodatku orzechów do chleba zmniejszyła się jasność miękiszu, gdyż średnia wartość L* chlebów z 2-procentowym

dodatkiem orzechów wynosiła 55,83, a z 7-procentowym – 46,96. Przy obydwu poziomach wzbogacenia chleby z dodatkiem orzechów włoskich charakteryzowały się niższą wartością parametru L^* niż chleby zawierające orzechy laskowe. W przypadku 2-procentowego dodatku orzechów wartość L^* chlebów z orzechami odpowiednio: L i W była mniejsza o ok. 9 i 30 % w porównaniu z próbą kontrolną, a przy 7-procentowym dodatku różnica była jeszcze większa, gdyż wartość L^* była mniejsza o 18 % (L) oraz o 46 % (W) w stosunku do próby kontrolnej. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów. Almorai [1] obserwował pociemnienie barwy miększu chleba pszennego, w którym część mąki pszennej zastąpiono mąką z orzechów włoskich. Cytowany autor zmianę tę tłumaczył głównie barwą orzechów. Podobnie inni autorzy odnotowali znaczne obniżenie wartości parametru L^* w stosunku do próby kontrolnej po dodaniu skórek z orzechów laskowych [2], nasion roślin oleistych do chleba pszenżytniego [14] czy oleju i makuchów z orzechów włoskich [26]. Na wartość parametrów a^* oraz b^* statystycznie istotnie wpływały wszystkie testowane czynniki. Największą wartością parametru b^* charakteryzowała się próba kontrolna, a najmniejszą – chleb z 2-procentowym dodatkiem W7. Z kolei próba kontrolna odznaczała się największą wartością parametru b^* , a chleb z 7-procentowym dodatkiem W7 (9,69) – najmniejszą. Jak podają Kowalczewski i wsp. [15], wartość parametru ΔE większa od 3 świadczy o tym, że różnicę między barwami próbki doświadczalnej i próbki kontrolnej można dostrzec wizualnie bez użycia metod instrumentalnych. W badaniach własnych wykazano, że największą wartością tego parametru charakteryzował się chleb wzbogacony na poziomie 7 % W7 (47,34), a najmniejszą – chleb z 2-procentowym dodatkiem orzechów laskowych zebranych we wrześniu. Stwierdzono także istotną korelację liniową pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a parametrami barwy L^* oraz ΔE (odpowiednio: $r = -0,79$, $r = 0,77$, $p < 0,01$). Na barwę chleba na pewno wpłynął skład chemiczny dodawanych orzechów, a szczególnie obecność barwników, takich jak karotenoidy oraz chlorofile. W przypadku orzechów niedojrzałych dominują barwniki chlorofilowe [20]. Chlorofile i karotenoidy to naturalne barwniki zlokalizowane w chloroplastach liści w formie kompleksu z chloroplastyną – specyficznym białkiem. Biorą one udział w procesach biosyntezy oraz nadają zieloną barwę roślinom. Chlorofile należą do najmniej trwałych barwników roślinnych. Naruszenie struktury tkankowej oraz zabiegi technologiczne polegające na działaniu podwyższonej temperatury powodują przemianę chlorofili w feofitynę, przy czym bardziej podatny na degradację jest chlorofil a, co skutkuje zmianą barwy w kierunku zielonożółtym [21]. Najsilniejszą zmianę barwy obserwowano zatem w przypadku chlebów z dodatkiem niedojrzałych orzechów włoskich, zawierających w zielonej okrywie (egzokarpie) szczególnie dużo chlorofilu, który w czasie pieczenia ulegał degradacji do brązowej feofityny. Jednak barwa jest wypadkową nie tylko rodzaju dodanych surowców, ale także przemian, jakie zachodzą w czasie wypieku. Należą do nich proces

karmelizacji cukrów oraz reakcja nieenzymatycznego ciemnienia Maillarda, której produktem są melanoidy odpowiedzialne za brązowienie skórki podczas wypieku. Stwierdzono, że zarówno melanoidy, jak i półprodukty procesu karmelizacji wykazują silne właściwości przeciwutleniające [30, 33]. Jak podają Zonani i wsp. [35], barwa chleba zależy od właściwości fizykochemicznych ciasta (zawartości wody, pH, zawartości cukrów, aminokwasów), parametrów wypieku (temperatury, wilgotności względnej, obiegu powietrza) oraz stosowanych dodatków technologicznych.

Tabela 3. Parametry barwy chlebów wzbogaconych orzechami laskowymi i włoskimi, o różnym stopniu dojrzałości

Table 3. Colour parameters of breads enriched with hazelnuts and walnuts, with different maturity stages

| Próba / Sample | L* | a* | b* | ΔE |
|--|----------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Kontrolna / Control | 69,24 ^h ± 1,47 | 1,51 ^a ± 0,07 | 18,14 ^h ± 0,13 | - |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 2 % | | | | |
| L7 | 61,75 ^f ± 0,48 | 2,43 ^d ± 0,10 | 13,25 ^{cd} ± 0,27 | 8,92 ^b ± 0,30 |
| L9 | 64,65 ^g ± 0,49 | 1,68 ^b ± 0,05 | 13,55 ^d ± 0,16 | 4,63 ^a ± 0,41 |
| W7 | 35,84 ^b ± 0,71 | 9,04 ⁱ ± 0,03 | 17,79 ^g ± 0,20 | 34,51 ^f ± 0,23 |
| W9 | 61,11 ^{ef} ± 0,62 | 3,24 ^e ± 0,02 | 12,95 ^c ± 0,03 | 9,74 ^c ± 0,50 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 7 % | | | | |
| L7 | 52,80 ^d ± 0,49 | 5,79 ^g ± 0,12 | 17,11 ^f ± 0,16 | 17,49 ^d ± 0,38 |
| L9 | 60,53 ^e ± 0,71 | 2,11 ^c ± 0,01 | 15,08 ^e ± 0,18 | 9,51 ^{bc} ± 0,33 |
| W7 | 22,81 ^a ± 0,07 | 5,17 ^f ± 0,06 | 9,69 ^a ± 0,03 | 47,34 ^g ± 0,07 |
| W9 | 51,73 ^c ± 0,59 | 6,30 ^h ± 0,21 | 12,16 ^b ± 0,47 | 19,23 ^e ± 0,39 |
| Trójczynnikowa ANOVA-p / Three-way ANOVA-p | | | | |
| Czynnik 1 / Factor 1 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 2 / Factor 2 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 3 / Factor 3 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 1 × czynnik 2 × czynnik 3 / Factor 1 × factor 2 × factor 3 | 0,203 | p < 0,001 | p < 0,001 | 0,544 |

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

W tab. 4. przedstawiono wartości parametrów opisujących profil tekstury badanych chlebów. Tekstura jest odzwierciedleniem właściwości reologicznych produktu. Najważniejszym jej parametrem, decydującym o jakości, trwałości i akceptowalności przez konsumentów chleba, jest twardość. Wykazano, że wszystkie testowane czynniki wpływały statystycznie istotnie na wartość tego parametru. Najmniejszą twardością charakteryzował się chleb niewzbogacony (3,59 N), a największą – chleb z 7-procentowym dodatkiem W7. Twardość chleba była większa wraz ze zwiększonym udziałem orzechów. Ponadto wykazano, że np. przy 2-procentowym dodatku średnia twardość chleba wzbogaconego W była o ponad 30 % większa w porównaniu z twardością chleba z L. Bardzo istotny był także stopień dojrzałości, np. 7-procentowy do-

datek orzechów włoskich zebranych w lipcu powodował zwiększenie twardości o ok. 150 % w porównaniu z chlebem wzbogaconym orzechami zebranymi we wrześniu. Zwiększenie twardości miękiszu pieczywa z dodatkiem orzechów może być spowodowane zmniejszeniem objętości pieczywa, a tym samym wzrostem gęstości na skutek dodatku do mąki pszennej zmielonych orzechów. W badaniach stwierdzono silnie istotną ujemną korelację liniową pomiędzy twardością a objętością i objętością właściwą chleba (odpowiednio: $r = -0,93$, $r = -0,94$, $p < 0,01$). Mniejsza objętość chleba przy tej samej masie bochenka skutkuje wystąpieniem zbitego, związłego miękiszu, który jest bardziej twardy w porównaniu z próbą kontrolną. Z danych literaturowych wynika, że twardość miękiszu zależy od zastosowanych dodatków. Kaszuba i wsp. [14] oraz Pycia i wsp. [26] stwierdzili, że wzbogacanie chleba zmielonymi nasionami roślin oleistych oraz olejem i makuchami z orzechów włoskich wpłynęło na zwiększenie twardości miękiszu. W przypadku zastąpienia mąki pszennej mąkami z nasion innych roślin zmiany mają różny charakter. Różyło i Laskowski [28] zauważyli bowiem zmniejszenie twardości miękiszu chleba, w którym mąkę pszenną zastąpiono w ilości 5 i 10 % mąką z amarantusa. Natomiast przy dodatku rzędu 15 i 20 % odnotowano wyraźny wzrost twardości. Z kolei zastąpienie mąki pszennej mąką owsianą lub ryżową

Tabela 4. Parametry tekstury chlebów wzbogaconych orzechami laskowymi i włoskimi o różnym stopniu dojrzałości

Table 4. Texture parameters of breads enriched with hazelnuts and walnuts of various maturity stages

| Próba Sample | Twardość Hardness [N] | Spójność Cohesiveness | Żujność Chewiness [N] |
|--|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Kontrolna / Control | 3,59 ^a ± 0,61 | 0,68 ^d ± 0,03 | 3,61 ^b ± 0,28 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 2 % | | | |
| L7 | 9,20 ^d ± 0,88 | 0,67 ^d ± 0,02 | 5,46 ^d ± 0,27 |
| L9 | 7,53 ^c ± 0,72 | 0,66 ^d ± 0,03 | 4,46 ^c ± 0,42 |
| W7 | 16,41 ^f ± 1,85 | 0,56 ^b ± 0,01 | 7,84 ^e ± 0,51 |
| W9 | 5,84 ^b ± 0,80 | 0,67 ^d ± 0,01 | 3,57 ^b ± 0,46 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 7 % | | | |
| L7 | 15,22 ^f ± 0,88 | 0,65 ^d ± 0,01 | 8,34 ^c ± 0,71 |
| L9 | 11,01 ^e ± 0,64 | 0,64 ^{cd} ± 0,01 | 3,70 ^b ± 0,10 |
| W7 | 39,20 ^g ± 1,12 | 0,52 ^a ± 0,02 | 16,74 ^f ± 0,47 |
| W9 | 15,89 ^f ± 1,29 | 0,62 ^c ± 0,02 | 1,99 ^a ± 0,15 |
| Trójczynnikowa ANOVA-p / Three-way ANOVA-p | | | |
| Czynnik 1 / Factor 1 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 2 / Factor 2 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 3 / Factor 3 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 1 × czynnik 2 × czynnik 3 / Factor 1 × factor 2 × factor 3 | p < 0,001 | 0,899 | p < 0,001 |

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

zawsze powoduje zwiększenie twardości [6]. Spójność miękiszu chleba istotnie zależała od rodzaju dodawanych orzechów, ich stopnia dojrzałości oraz poziomu wzbogacenia, natomiast w przypadku żujności istotne były także interakcje tych czynników ($p < 0,01$). Chleby wzbogacone na poziomie 7 % W9 oraz W7 charakteryzowały się odpowiednio najmniejszą i największą wartością żujności (tab. 4). Wykazano statystycznie istotną silną korelację liniową pomiędzy twardością a żujnością ($r = 0,99$, $p < 0,01$).

Wartości parametrów obrazujących potencjał przeciwutleniający analizowanych chlebów przedstawiono w tab. 5. Wykazano statystycznie istotny wpływ rodzaju orzechów, stopnia ich dojrzałości oraz poziomu wzbogacenia na potencjał przeciwutleniający chleba oznaczony metodami: z kationorodnikiem ABTS^{•+}, DPPH[•] oraz FRAP. Stwierdzono, że wzbogacenie chleba orzechami laskowymi i włoskimi, różniącymi się stopniem dojrzałości, wpłynęło statystycznie istotnie na zwiększenie jego potencjału przeciwutleniającego. Potencjał próby kontrolnej oznaczony metodami: z rodnikiem ABTS^{•+}, DPPH[•] oraz FRAP wynosił odpowiednio: 71,29, 80,95 oraz 14,16 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$ Natomiast W miarę zwiększenia poziomu wzbogacenia chleba orzechami obserwowano natomiast zwiększanie się wartości opisywanych parametrów. Średnia wartość potencjału przeciwutleniającego chleba wzbogaconego na poziomie 2 i 7 % wynosiła odpowiednio: 120,82 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$ oraz 173,93 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$ (ABTS^{•+}), 135,99 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$ oraz 203,10 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$ (DPPH[•]), 29,39 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$ oraz 80,78 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$ (FRAP). Istotny był także rodzaj orzechów. Stwierdzono, że chleby wzbogacone orzechami włoskimi charakteryzowały się większym potencjałem przeciwutleniającym. Wartość tego parametru w przypadku chleba wzbogaconego na poziomie 2 % orzechami laskowymi i włoskimi była większa odpowiednio o ok. 52 i 87 % (ABTS^{•+}). W przypadku wzbogacenia na poziomie 7 % różnice były jeszcze większe, gdyż średni potencjał przeciwutleniający chleba wzbogaconego L był większy o 74,26 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$, a wzbogaconego W – większy o 131,03 $\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g s.m.}$ od próby kontrolnej. Dowiedziono także, że wzbogacenie chleba orzechami zebranymi w lipcu wpłynęło znacznie bardziej na zwiększenie potencjału przeciwutleniającego w porównaniu z orzechami zebranymi we wrześniu. Wartość tego parametru w przypadku chleba z 2-procentowym dodatkiem orzechów włoskich zebranych w lipcu była o 36,99 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.m.}$ większa od chleba z dodatkiem orzechów laskowych. Z potencjałem przeciwutleniającym bezpośrednio wiąże się zawartość polifenoli ogółem. Najmniejszą wartością tego parametru charakteryzował się chleb niewzbogacony (4,50 mg GAE/100 g s.m.), a największą – chleb z 7-procentowym dodatkiem W7 (52,27 mg GAE/100 g s.m.). Wartość tego parametru zależała istotnie od wielkości poziomu wzbogacenia chleba. Średnia zawartość polifenoli w chlebach z 2-procentowym dodatkiem orzechów wynosiła bowiem 10,74 mg GAE/100 g s.m., a z 7-procentowym dodatkiem aż 29,35 mg GAE/100 g s.m. Istotny

był także rodzaj orzechów, gdyż przy tym samym poziomie wzbogacenia (2 %) oraz stopniu dojrzałości (7) chleb wzbogacony orzechami włoskimi charakteryzował się zawartością polifenoli większą o ponad 62 %. Silnie natomiast wpływał na zawartość polifenoli w chlebie stopień dojrzałości orzechów. Stwierdzono, że chleby wzbogacone orzechami L i W na poziomie 2 %, zebranych w lipcu, charakteryzowały się wyraźnie większą średnią zawartością polifenoli (odpowiednio o: 123 i 172 %) w porównaniu z pochodzącymi z września. Jak podają Pycia i wsp. [24, 25], stopień dojrzałości orzechów ma bardzo istotny wpływ na zawartość polifenoli. Wartość tego parametru w obu rodzajach orzechów istotnie zmniejszała się w miarę ich dojrzewania. W tym samym stadium dojrzałości (lipiec) to właśnie orzechy włoskie charakteryzowały się większą zawartością polifenoli niż laskowe. Pycia i wsp. [24] stwierdzili, że średnia zawartość polifenoli w 3 odmianach orzechów włoskich zebranych w lipcu wynosiła 1310,44 mg GAE/100 g s.m., natomiast w orzechach pozyskanych we wrześniu była znacznie mniejsza, gdyż wynosiła jedynie 716,88 mg GAE/100 g s.m. Analogiczną tendencję obserwowano w przypadku różnych odmian orzechów laskowych różniących się stopniem dojrzałości [25], niemniej jednak orzechy laskowe charakteryzują się mniejszą zawartością polifenoli ogółem. Średnia zawartość polifenoli w 6 odmianach orzechów laskowych zebranych w lipcu i we wrześniu wynosiła odpowiednio 845,91 mg GAE/100 g s.m. oraz 97,66 mg GAE/100 g s.m. Była zatem znacznie mniejsza od wartości tego parametru w przypadku orzechów włoskich zebranych w analogicznych okresach. Znajduje to odzwierciedlenie w wynikach uzyskanych w pracy. Chleby wzbogacone orzechami włoskimi charakteryzowały się większym potencjałem przeciwutleniającym niż te z orzechami laskowymi, a dodatkowo walory prozdrowotne polepszał dodatek orzechów niedojrzałych, zebranych w lipcu. Tendencja ta wynika ze składu chemicznego orzechów niedojrzałych. W badaniach stwierdzono istotną korelację liniową pomiędzy potencjałem przeciwutleniającym oznaczonym metodą z rodnikiem ABTS^{•+} a metodą DPPH[•], FRAP oraz zawartością polifenoli ogółem (odpowiednio: $r = 0,99$, $r = 0,97$, $r = 0,94$, $p < 0,01$). Stwierdzono także istotną korelację liniową pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a parametrami barwy L* oraz ΔE (odpowiednio: $r = -0,79$, $r = 0,77$, $p < 0,01$). Zawartość polifenoli ogółem statystycznie istotnie dodatnio korelowała z takimi parametrami tekstury, jak twardość oraz żujność (odpowiednio: $r = 0,87$, $r = 0,89$, $p < 0,01$). Z kolei ze spoistością zachodziła ujemna korelacja ($r = -0,69$). Potencjał przeciwutleniający chleba oraz zawartość polifenoli zależą od zawartości polifenoli w mące, dodanych składników fenolowych, innych składników bogatych w polifenole, związków o potencjale przeciwutleniającym wytworzonych podczas pieczenia (np. produkty reakcji Maillarda), produktów degradacji indukowanych termicznie lub powstających kompleksów fenolowo-polisacharydowych [18, 29, 30].

Tabela 5. Aktywność przeciwutleniająca i całkowita zawartość związków polifenolowych w chlebach wzbogaconych orzechami laskowymi i włoskimi o różnym stopniu dojrzałości

Table 5. Antioxidant activity and total content of polyphenols in hazelnut and walnut enriched breads of different maturity stage

| Próba Sample | ABTS ⁺⁺ | DPPH [*] | FRAP | Polifenole Polyphenols |
|--|--|----------------------------|----------------------------|--|
| | [μmol TE/100 g s.m.] [μmol TE/100 g d.m.] | | | [mg GAE/100 g s.m.] [mg GAE/100 g d.m.] |
| Kontrolna / Control | 71,29 ^a ± 0,61 | 80,95 ^a ± 4,62 | 14,16 ^a ± 0,46 | 4,50 ^a ± 1,20 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 2 % | | | | |
| L7 | 111,24 ^c ± 0,51 | 129,50 ^c ± 5,23 | 21,38 ^b ± 2,68 | 11,72 ^c ± 0,50 |
| L9 | 105,71 ^b ± 0,67 | 112,33 ^b ± 1,05 | 17,19 ^b ± 2,18 | 5,26 ^b ± 0,24 |
| W7 | 151,67 ^f ± 0,70 | 171,95 ^e ± 8,70 | 46,82 ^d ± 2,36 | 19,01 ^g ± 0,64 |
| W9 | 114,68 ^d ± 3,61 | 130,18 ^c ± 1,86 | 20,19 ^b ± 0,79 | 6,98 ^c ± 0,85 |
| Dodatek orzechów / Amount of nuts added – 7 % | | | | |
| L7 | 179,42 ^g ± 1,02 | 195,47 ^f ± 4,81 | 92,35 ^f ± 4,09 | 42,10 ^h ± 0,56 |
| L9 | 111,68 ^{cd} ± 1,29 | 127,68 ^c ± 2,72 | 29,39 ^c ± 1,28 | 9,28 ^d ± 0,72 |
| W7 | 281,33 ^h ± 3,07 | 329,41 ^g ± 8,11 | 149,48 ^g ± 4,31 | 52,27 ⁱ ± 1,22 |
| W9 | 123,32 ^e ± 1,08 | 159,84 ^d ± 6,13 | 51,90 ^e ± 0,84 | 13,75 ^f ± 0,43 |
| Trójczynnikowa ANOVA-p / Three-way ANOVA-p | | | | |
| Czynnik 1 / Factor 1 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 2 / Factor 2 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 3 / Factor 3 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,001 |
| Czynnik 1 × czynnik 2 × czynnik 3 / Factor 1 × factor 2 × factor 3 | p < 0,001 | 0,899 | 0,012 | 0,908 |

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

W tab. 6. i 7. przedstawiono polifenole zidentyfikowane metodą UPLC-PDA-MS/MS w badanych chlebach, a w tab. 8. i 9. zestawiono ich zawartość. W sumie w chlebach wzbogaconych orzechami laskowymi i włoskimi zidentyfikowano po 12 polifenoli, natomiast w próbie kontrolnej zidentyfikowano jedynie kwas ferulowy. W chlebach z dodatkiem L występowały m.in. katechina, glukozyd kwercetyny oraz pentozyd kwasu elagowego, czyli polifenole o silnym potencjale przeciwutleniającym. Z kolei w chlebach z dodatkiem orzechów włoskich zidentyfikowano przede wszystkim kwasy fenolowe, takie jak: galusowy, chlorogenowy, neochlorogenowy, syryngowy, kumarylo-chinowy. Wymienione związki charakteryzują się również bardzo silnym potencjałem przeciwutleniającym. Chleby z dodatkiem W charakteryzowały się ponad trzykrotnie większą zawartością polifenoli (22,25 μg/ml) w porównaniu z chlebariami z dodatkiem orzechów laskowych (6,31 μg/ml). Istotny był również stopień dojrzałości, gdyż największą zawartością polifenoli charakteryzował się chleb wzbogacony 7-procentowym dodatkiem orzechów włoskich (49,30 μg/ml g) i laskowych (11,88 μg/ml) zebranych w lipcu. Stwierdzono silną dodatnią korelację liniową pomiędzy zawartością polifenoli zidentyfikowanych metodą UPLC-PDA-MS/MS a zawarto-

ścią polifenoli ogółem i potencjałem przeciwutleniającym wyrażonym metodami ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP (odpowiednio: $r = 0,96$, $r = 0,94$, $r = 0,93$, $r = 0,95$, $p < 0,01$). Związki fenolowe są wtórnymi metabolitami warzyw i owoców. Odgrywają istotną rolę w fizjologicznych właściwościach roślin, kształtują cechy sensoryczne owoców, a przy tym wykazują ogromną pojemność przeciwutleniającą [4].

Tabela 6. Polifenole zidentyfikowane metodą UPLC-PDA-MS/MS w chlebach wzbogaconych orzechami laskowymi

Table 6. Polyphenols identified by UPLC-PDA-MS/MS method in breads enriched with hazelnuts

| Nr No | Związek / Compound | Rt | [M-H] ⁻ m/z | |
|----------|--|------|------------------------|----------|
| | | min | MS | MS/MS |
| 1 | Ester digalloilowy dimeru procyanidyny Digalloyl ester of procyanidin dimer | 2,42 | 881 | 577, 289 |
| 2 | (+) katechina / (+)catechin | 2,89 | 289 | 137 |
| 3 | Kwas kumarylo-chinowy Coumarylo-quinic acid | 3,49 | 337 | 191 |
| 4 | 8-C-ksylozyd-6-C-glukozyd apigeniny (wicenina 3) / Apigenin 8-C-xyloside-6-C-glucoside (vicenin 3) | 3,66 | 563 | 269 |
| 5 | 6-C-ksylozyd-8-C-glukozyd apigeniny (wicenina 1) / Apigenin 6-C-xyloside-8-C-glucoside (vicenin 1) | 3,88 | 563 | 269 |
| 6 | Kwas kawoilo-glukarowy Caffeoyl-glucaric acid | 4,12 | 371 | 179 |
| 7 | 3-O-glukozyd kwercetyny Quercetin 3-O-glucoside | 4,34 | 463 | 301 |
| 8 | Glukozyd kwasu 3,4-dikawowo-chinowego 3,4-Di-caffeoylquinic acid glucoside | 4,53 | 677 | 515, 353 |
| 9 | Glukozyd kwasu 3,5-dikawowo-chinowego 3,5-Di-caffeoylquinic acid glucoside | 4,89 | 677 | 515, 353 |
| 10 | 3-O-ramnozyd kwercetyny Quercetin 3-O-rhamnoside | 5,08 | 447 | 301 |
| 11 | Pentozyd kwasu elagowego Ellagic acid pentoside | 5,39 | 433 | 301 |
| 12 | Kwas ferulowy / Ferulic acid | 3,26 | 193 | - |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Rt – czas retencji / retention time; m/z – stosunek masy do ładunku / weight-to-load ratio; MS – spektroskopia mas / mass spectroscopy.

Tabela 7. Zawartość polifenoli zidentyfikowanych w chlebach wzbogaconych orzechami laskowymi [$\mu\text{g/ml}$]Table 7. Content of identified polyphenols in breads enriched with hazelnuts [$\mu\text{g/ml}$]

| Związek Compound | Rt [min] | Próba kontrolna Control sample | 2 % L7 | 7 % L7 | 2 % L9 | 7 % L9 |
|---------------------|-------------|-----------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 2,42 | - | 0,74 \pm 0,01 | 2,25 \pm 0,03 | 0,48 \pm 0,02 | 0,69 \pm 0,01 |
| 2 | 2,89 | - | 1,06 \pm 0,01 | 5,42 \pm 0,02 | 0,27 \pm 0,01 | 0,33 \pm 0,01 |
| 3 | 3,49 | - | - | 0,41 \pm 0,01 | 0,39 \pm 0,04 | - |
| 4 | 3,66 | - | 0,30 \pm 0,01 | 0,47 \pm 0,02 | 0,31 \pm 0,01 | - |
| 5 | 3,88 | - | 0,36 \pm 0,01 | 0,34 \pm 0,01 | - | 0,43 \pm 0,02 |
| 6 | 4,12 | - | 0,43 \pm 0,02 | 0,33 \pm 0,00 | - | 0,36 \pm 0,01 |
| 7 | 4,34 | - | - | 0,49 \pm 0,01 | - | 0,80 \pm 0,07 |
| 8 | 4,53 | - | 0,63 \pm 0,01 | 0,41 \pm 0,01 | 0,28 \pm 0,01 | 0,74 \pm 0,02 |
| 9 | 4,89 | - | 0,44 \pm 0,02 | 0,42 \pm 0,01 | 0,46 \pm 0,02 | - |
| 10 | 5,08 | - | - | 0,35 \pm 0,01 | - | - |
| 11 | 5,39 | - | 0,60 \pm 0,02 | 0,39 \pm 0,04 | 0,35 \pm 0,02 | 0,48 \pm 0,04 |
| 12 | 3,26 | 0,95 | 0,85 \pm 0,02 | 0,60 \pm 0,02 | 0,79 \pm 0,01 | 0,67 \pm 0,02 |
| Suma / Total | | - | 5,40 \pm 0,09 | 11,88 \pm 0,04 | 3,38 \pm 0,02 | 4,60 \pm 0,09 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Nazwy związków określone numerami znajdują się w tab. 6 / Names of compounds denoted by numbers can be found in Tab. 6; Rt – czas retencji / retention time.

Tabela 8. Polifenole zidentyfikowane metodą UPLC-PDA-MS/MS w chlebach wzbogaconych orzechami włoskimi

Table 8. Polyphenols identified by the UPLC-PDA-MS/MS method in breads enriched with walnuts

| Nr No | Związek / Compound | Rt | [M-H] ⁻ m/z | |
|----------|---|------|------------------------|---------------|
| | | min | MS | MS/MS |
| 1 | Kwas galusowy / Gallic acid | 1,34 | 169 | - |
| 2 | Kwas neochlorogenowy Neochlorogenic acid | 2,23 | 353 | 191 |
| 3 | Kwas kumarylo-chinowy Coumarilo-quinic acid | 2,72 | 337 | 191 |
| 4 | Kwas chlorogenowy Chlorogenic acid | 2,92 | 353 | 162 |
| 5 | Glukozyd kwasu kawowego Caffeic acid glucoside | 3,28 | 341 | 179 |
| 6 | Kwas syryngowy / Syringic acid | 3,44 | 197 | - |
| 7 | Kwas kumarylo-chinowy Coumarilo-quinic acid | 3,50 | 337 | 191 |
| 8 | Pentozyd kwasu elagowego Ellagic acid pentoside | 3,83 | 433 | 301 |
| 9 | Tetragalloyl-glukoza / Tetragalloyl-glucose | 4,45 | 787 | 635, 465, 169 |
| 10 | Izomer eukalbaniny A/kornuziny B Eucalbanin A/cornusiin B isomer | 4,81 | 1085 | 783, 633, 301 |
| 11 | Glansreginin A / Glansreginin A | 5,35 | 592 | 403, 343, 241 |
| 12 | Kwas ferulowy / Ferulic acid | 3,26 | 193 | - |

Objaśnienia jak pod tab. 6. / Explanatory notes as in Tab. 6.

Tabela 9. Zawartość polifenoli zidentyfikowanych w chlebach wzbogaconych orzechami włoskimi [µg/ml]

Table 9. Content of identified polyphenols in breads enriched with walnuts [µg/ml]

| Związek Compound | Rt [min] | 2 % W7 | 7 % W7 | 2 % W9 | 7 % W9 |
|---------------------|----------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 1 | 2,42 | 3,58 ± 0,06 | 6,41 ± 0,04 | 1,05 ± 0,02 | 2,14 ± 0,05 |
| 2 | 2,89 | 0,59 ± 0,01 | 4,86 ± 0,18 | 0,37 ± 0,04 | 2,10 ± 0,05 |
| 3 | 3,49 | 1,12 ± 0,01 | 9,88 ± 0,04 | 0,46 ± 0,01 | 5,50 ± 0,07 |
| 4 | 3,66 | 0,58 ± 0,00 | 1,28 ± 0,10 | 0,50 ± 0,02 | 0,50 ± 0,01 |
| 5 | 3,88 | 0,66 ± 0,01 | 1,52 ± 0,11 | 0,28 ± 0,02 | 0,56 ± 0,03 |
| 6 | 4,12 | 0,15 ± 0,01 | 4,08 ± 0,13 | 0,17 ± 0,03 | 1,85 ± 0,05 |
| 7 | 4,34 | 0,31 ± 0,01 | 3,37 ± 0,08 | 1,41 ± 0,03 | 1,18 ± 0,03 |
| 8 | 4,53 | 1,74 ± 0,05 | - | - | - |
| 9 | 4,89 | 1,61 ± 0,01 | 7,41 ± 0,10 | - | 4,09 ± 0,05 |
| 10 | 5,08 | 0,50 ± 0,04 | 1,72 ± 0,14 | 0,48 ± 0,03 | 1,17 ± 0,03 |
| 11 | 5,39 | - | 7,87 ± 0,17 | - | 2,74 ± 0,04 |
| 12 | 3,26 | 0,79 ± 0,02 | 0,54 ± 0,02 | 0,66 ± 0,01 | 0,49 ± 0,02 |
| Suma / Total | - | 11,78 ± 0,11 | 49,30 ± 0,19 | 5,60 ± 0,06 | 22,32 ± 0,07 |

Objaśnienia / Explanatory notes:

Nazwy związków określone numerami znajdują się w tab. 8. / The names of compounds identified by numbers can be found in Tab. 8; Rt – czas retencji / retention time.

Profil i zawartość polifenoli w badanym chlebie był wypadkową wielu czynników, takich jak skład chemiczny ziarna, technologia otrzymywania czy charakter dodawanych surowców. Jak podają Liyana-Pathirana i Shahidi [16], ziarno pszenicy zawiera kwasy fenolowe, saponiny, fitoestrogeny i flawonoidy. Do związków fenolowych o silnym działaniu przeciwutleniającym występujących w ziarnie pszenicy należą kwasy: ferulowy, wanilinowy, p-kumarowy. Większość tych cennych związków zlokalizowana jest w okrywie owocowo-nasiennej. W wyniku przemiału ziarna na mąkę część z tych substancji wraz z otrębami jest tracona, niewielka zaś część pozostaje w mące. Skuteczną metodą zwiększania podaży polifenoli w chlebie jest zatem jego wzbogacanie surowcami zasobnymi w te związki, a takimi są orzechy. W omawianym przypadku chleby wzbogacone orzechami zebrnymi w lipcu (nieodjrzałymi) charakteryzowały się znacznie wyższym potencjałem przeciwutleniającym. Silny potencjał przeciwutleniający niedojrzałych orzechów włoskich wynika ze składu chemicznego zielonej okrywy (egzokarpu), która występuje we wczesnych fazach dojrzałości. Stampar i wsp. [32] zidentyfikowali w zielonej okrywie niedojrzałych orzechów włoskich trzynaście związków o bardzo silnych właściwościach przeciwutleniających, m.in. kwasy: chlorogenowy, kawowy, ferulowy, synapowy, galusowy, elagowy, protokatechowy, syringowy, wanilinowy oraz katechinę, epikatechinę, mirycetynę i juglon (5-hydroksy-1,4-naftochinon). Podobnie Pycia i wsp. [24] stwierdzili w składzie polifenoli orzechów włoskich różniących się stopniem dojrzałości sześć pochodnych kwa-

su hydroksybenzoesowego, pięć pochodnych kwasu hydroksycynamonowego oraz pięć flawonoidów. Ponadto cytowani badacze rozpoznali siedem pochodnych/izomerów kwasów dikarboksylowych, pochodne kwasu elagowego oraz chinowego. Z kolei ci sami autorzy [25] zidentyfikowali w profilu orzechów laskowych różniących się stopniem dojrzałości łącznie 15 związków polifenolowych o silnych właściwościach przeciwutleniających. Dominującą grupę stanowiły związki zaliczane do tanin zarówno kondensujących, jak i hydrolizowanych. Pozostałe związki wchodzące w skład profilu należały do kwasów fenolowych oraz flawonoli. W grupie kwasów fenolowych występowały kwasy galusowy i chlorogenowy oraz pochodna kwasu kawowego. Z kolei grupę flawonoli tworzył heksozyd kwercetyny oraz heksozyd kemferolu. W obydwu rodzajach analizowanych orzechów cytowani autorzy stwierdzili istotne zmniejszenie się zawartości polifenoli w miarę dojrzewania orzechów. Tendencja ta ma odzwierciedlenie w badaniach własnych. Potencjał przeciwutleniający chlebów z dodatkiem W był większy niż z dodatkiem L, a wartość tego parametru malała wraz ze stopniem dojrzałości orzechów.

Wnioski

1. Stwierdzono, że rodzaj orzechów, stopień ich dojrzałości oraz poziom wzbogacenia miały istotny wpływ na właściwości fizykochemiczne i przeciwutleniające chleba pszennego.
2. Chleby wzbogacone orzechami włoskimi charakteryzowały się mniejszymi wartościami: objętości, parametru L* i twardości miękkiszu w porównaniu z chlebami z dodatkiem orzechów laskowych. Wartości tych parametrów były wyższe w chlebach z dodatkiem orzechów dojrziałych.
3. Najsilniejszym potencjałem przeciwutleniającym i największą zawartością polifenoli charakteryzowały się chleby wzbogacone orzechami włoskimi, zwłaszcza pozyskanymi w lipcu.
4. Profil zidentyfikowanych związków polifenolowych w chlebach oraz ich zawartość zależała od rodzaju dodawanych orzechów oraz stopnia ich dojrzałości.

Badania sfinansowane w ramach dotacji Uniwersytetu Rzeszowskiego na prowadzenie działalności naukowej w 2020 roku.

Literatura

- [1] Almoraie N.M.: The effect of walnut flour on the physical and sensory characteristics of wheat bread. *Int. J. Food Sci.*, 2019, #5676205. DOI: 10.1155/2019/5676205.
- [2] Anil M.: Using of hazelnut testa as a source of dietary fiber in breadmaking. *J. Food Eng.*, 2007, 80, 61-67.

- [3] Benzie I.F.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 1996, 239, 70-76.
- [4] Bravo L.: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 2009, 56, 317-333.
- [5] Dallmann H.: Porentabelle. 4. Auflage. Verlag Moritz Schafer, Detmold 1981.
- [6] Dziki D., Siastała M., Laskowski J.: Zmiany właściwości fizycznych pieczywa pszenne pod wpływem dodatku mąki sojowej. *Acta Agrophysica*, 2010, 15 (1), 91-100.
- [7] Gao X., Ohlander M., Jeppson N., Björk L., Trajkovski V.: Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 48 (5), 1485-1490.
- [8] Gomez M., B. Oliete B., Caballero P.A., Ronda F., Blanco C.A.: Effect of nut paste enrichment on wheat dough rheology and bread volume. *Food Sci. Technol. Int.*, 2008, 14 (1), 57-65.
- [9] Gujral H.S., Singh N.: Effect of additives on dough development, gaseous release and bread making properties. *Food Res. Int.*, 1999, 32, 691-697.
- [10] Jakubczyk T., Haber T.: Analiza zbóż i przetworów zbożowych. Wyd. SGGW, Warszawa 1983.
- [11] Jędrzejczyk H., Hoffmann M.: Tendencje w produkcji wyrobów piekarniczych o podwyższonej wartości odżywczej. *Postępy Techniki Przetw. Spoż.*, 2008, 1, 48-54.
- [12] Kapusta I., Cebulak T., Oszmiański J.: Characterization of Polish wines produced from the interspecific hybrid grapes grown in southeast Poland. *Eur. Food Res. Technol.*, 2018, 244 (3), 441-455.
- [13] Karolini-Skaradzińska Z., Czubaszek A., Łuczak D., Frączak A.: Jakość ciasta i pieczywa pszenne z dodatkiem serwatki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 6 (73), 46-57.
- [14] Kaszuba J., Pycia K., Wiśniewski R., Jaworska G., Kuźniar P.: Wpływ udziału nasion wybranych roślin oleistych na jakość chleba pszenżytniego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2017, 4 (113), 90-102.
- [15] Kowalczewski P.L., Walkowiak K., Masewicz Ł., Duda A., Poliszko N., Różańska M.B., Jeżowski P., Tomkowiak A., Mildner-Szkudlarz S., Baranowska H.M.: Wheat bread enriched with raspberry and strawberry oilcakes: Effects on proximate composition, texture and water properties. *Euro. Food Res. Technol.*, 2019, 245, 2591-2600.
- [16] Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F.: The antioxidant potential of milling fractions from breadwheat and durum. *J. Cereal Sci.*, 2007, 45, 238-247.
- [17] Makinde F.M., Akinoso R.: Physical, nutritional and sensory qualities of bread samples made with wheat and black sesame (*Sesamum indicum* Linn) flours. *Int. Food Res. J.*, 2014, 21 (4), 1635-1640.
- [18] Michalska A., Amigo-Benavent M., Zielinski H., del Castillo M.D.: Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *J. Cereal Sci.*, 2008, 48, 123-132.
- [19] Nwosu U.L., Elochukwu C.U., Onwurah C.O.: Physical characteristics and quality of bread produced from wheat African oil bean flour blends. *Afr. J. Food Sci.*, 2014, 8 (6), 351-355.
- [20] Persic M., Mikulic-Petkovsek M., Slatnar A., Solar A., Veberic R.: Changes in phenolic profiles of red-colored pellicle walnut and hazelnut kernel during ripening. *Food Chem.*, 2018, 252, 349-355.
- [21] Polak R., Dziki D., Krzykowski A., Rudy S., Różyło R.: Wpływ parametrów sublimacyjnego suszenia na retencję chlorofili i karotenoidów w suszach z liści selera zwyczajnego (*Apium graveolens* L.). *Motrol. Commission Motorization Energetics Agricul.*, 2014, 16, 1, 105-112.
- [22] Pühr D.P., D'Appolonia B.L.: Effect of baking absorption on bread yield, crumb moisture, and crumb water activity. *Cereal Chem.*, 1992, 69 (5), 582-586.
- [23] Pycia K., Jaworska G., Telega J., Sudoł I., Kuźniar P.: Effect of adding potato maltodextrins on baking properties of triticale flour and quality of bread. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2017, 96, 199-204.

- [24] Pycia K., Kapusta I., Jaworska G.: Impact of the degree of maturity of walnuts (*Juglans regia* L.) and their variety on the antioxidant potential and the content of tocopherols and polyphenols. *Molecules*, 2019, 24(16), #2936. DOI: 10.3390/molecules24162936.
- [25] Pycia K., Kapusta I., Jaworska G.: Changes in antioxidant activity, profile, and content of polyphenols and tocopherols in common hazel seed (*Corylus avellana* L.) depending on variety and harvest date. *Molecules*, 2020, 25(1), #43. DOI: 10.3390/molecules25010043.
- [26] Pycia K., Kapusta I., Jaworska G.: Walnut oil and oilcake affect selected the physicochemical and antioxidant properties of wheat bread enriched with them. *J. Food Process. Pres.*, 2020, 44(8), #e14573. DOI: 10.1111/jfpp.14573.
- [27] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26, 1231-1237.
- [28] Różyło R., Laskowski J.: Wpływ dodatku produktów z amarantusa na cechy tekstury miękkiszu pieczywa. *Acta Agrophysica*, 2008, 11 (2), 499-508.
- [29] Rupasinghe H.P.V., Wang L., Huber G.M., Pitts N.L.: Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chem.*, 2008, 107, 1217-1224.
- [30] Sivam A., Sun-Waterhouse D., Quek S.Y., Perera C.O.: Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: A review. *J. Food Sci.*, 2010, 75 (8), 163-174.
- [31] Sobczyk A., Pycia K., Stankowski S., Jaworska G., Kuźniar P.: Evaluation of the rheological properties of dough and quality of bread made with the flour obtained from old cultivars and modern breeding lines of spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*). *J. Cereal Sci.*, 2017, 77, 35-41.
- [32] Stampar F., Solar A., Hudina M., Veberic R., Colaric M.: Traditional walnut liqueur-cocktail of phenolics. *Food Chem.*, 2006, 95 (4), 627-631.
- [33] Tsai P.-J., Yu T.-Y., Chen S.-H., Liu C.-C., Sun Y.-F.: Interactive role of colour and antioxidant capacity in caramels. *Food Res. Int.*, 2009, 42, 380-386.
- [34] Yen G.C., Chen H.Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 27-32.
- [35] Zanoni B., Peri C., Bruno D.: Modelling of browning kinetics of bread crust during baking. *LWT-Food Sci. Technol.*, 1995, 28 (6), 604-609.

**EFFECT OF HAZELNUT AND WALNUT MATURITY STAGE AND OF AMOUNT
OF THEIR ADDITIVE ON PHYSICOCHEMICAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES
OF ENRICHED WHEAT BREAD**

S u m m a r y

Wheat bread is an example of a product that can be enriched with bioactive ingredients. The objective of the research study was to assess the effect of enriching wheat bread with hazelnuts and walnuts of various maturity stages. Hazelnuts and walnuts were harvested in July and September. In the baking mix the ground nuts constituted 2 % and 7 % of the flour amount. The control sample was non-enriched bread. The bread was made using a direct method with yeast. Under the research study the following was calculated: dough efficiency, baking, total baking loss and bread efficiency. There were determined: bread volume, specific volume, crumb porosity, colour in the CIE L*a*b* system and texture parameters. Also determined were antioxidant properties of bread (using ABTS⁺, DPPH, and FRAP methods), total content of polyphenolic compounds, profile and content of polyphenols using an UPLC-PDA-ESI-MS method. A three-way ANOVA was used to analyse the results.

It was found that enriching the bread with nuts of different maturity stages impacted its physicochemical and antioxidant properties. The higher amount of nuts added, the higher the dough efficiency and the bread efficiency were. The control sample was characterised by the highest volume, and enriching the bread with nuts resulted in a reduction in its volume. The smallest volume was characterized by the bread enriched with unripe walnuts harvested in July. The crumb of this bread was characterised by the lowest L^* value and it was the hardest. The type of nuts and their maturity stage had a significant effect on the antioxidant properties and content of polyphenols in bread. The values of those parameters decreased with the increasing maturity of the nuts added, and the breads enriched with walnuts were characterised by a significantly higher content of total polyphenols compared to the control sample and to those enriched with hazelnuts. Twelve compounds were identified in the profile of polyphenols of the breads tested.

Key words: wheat bread, nuts, maturity stage, enrichment, polyphenols ☒