



ŻYWNOSĆ

Nauka Technologia Jakość

FOOD

Science Technology Quality

Nr 4 (83)

Kraków 2012

Rok 19

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Tadeusz Sikora; tel./fax. 12 293-50-54; e-mail: sikorat@uek.krakow.pl

Sekretarz redakcji: dr Ewa Ślawska; tel. 12 662-48-30; e-mail: wnptt@wp.pl

Redaktorzy: prof. dr hab. Włodzimierz Grajek (biotechnologia), prof. dr hab. Grażyna Jaworska (żywność pochodzenia roślinnego), prof. dr hab. Danuta Kolożyn-Krajewska (mikrobiologia, bezpieczeństwo i higiena żywności, żywność pochodzenia zwierzęcego), prof. dr hab. Bogusław Król (analiza i ocena żywności), prof. dr hab. Krzysztof Krygier (technologia tłuszczów, żywność funkcjonalna), prof. dr hab. Mieczysław Pałasiński (technologia węglowodanów), prof. dr hab. Tadeusz Sikora (jakość i bezpieczeństwo żywności, zarządzanie jakością, żywność pochodzenia zwierzęcego i towaroznawstwo żywności), prof. dr hab. Stefan Ziarka (technologia mleczarstwa, zarządzanie jakością)

Redaktor statystyczny: dr Antoni Goryl

Stali współpracownicy: dr inż. Anna Florek-Paszkowska (Kraków), prof. dr hab. Jacek Kijowski (Poznań), dr Grażyna Morkis (Warszawa), prof. dr hab. Maria Soral-Śmietana (Olsztyn)

Rada Naukowa: prof. dr Antoni Rutkowski (przewodniczący), dr hab. Kazimierz Dąbrowski (sekretarz), prof. dr hab. Barbara Baraniak, prof. dr hab. Nina Barytko-Pikielna, prof. dr hab. Włodzimierz Bednarski, prof. dr hab. Józefa Chrzanowska, prof. dr hab. Janusz Czapski, prof. dr hab. Zbigniew Czarnecki, prof. dr Henryk Daun (USA), prof. dr hab. Teresa Fortuna, prof. dr hab. Mariola Friedrich, prof. dr hab. Jan Gawęcki, prof. dr hab. Stanisław Gwiazda, prof. dr Jerzy Jankun (USA), dr Józef Korolczuk (Francja), prof. dr hab. Henryk Kostyra, prof. dr hab. Andrzej Lenart, prof. dr hab. Zdzisława Libudzisz, prof. dr Marian Nacz (Kanada), prof. dr hab. Małgorzata Nogala-Kałucka, prof. dr hab. Jan Oszmiański, prof. dr Jan Pokorný (Czechy), prof. dr Roman Przybylski (Kanada), prof. dr hab. Piotr Przybyłowski, dr hab. Bogusław Staniewski, prof. UWM, dr Alina Surmacka-Szcześniak (USA), prof. dr hab. Krzysztof Surówka, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, dr Andrzej Sośnicki (USA), prof. dr hab. Zdzisław Targoński, prof. dr hab. Tadeusz Trziszka, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz, prof. dr hab. Erwin Wąsowicz, prof. dr hab. Dorota Witrowa-Rajchert, dr John Wojciak (Kanada), prof. dr hab. Maria Wojtatowicz

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

WYDAWCA:

POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI
WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994 - 1999 wydawcą kwartalnika był Oddział Małopolski PTTŻ

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2012
Printed in Poland

Wydawanie publikacji dofinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

ISSN 1425-6959

Czasopismo w postaci wydrukowanej jest wersją główną (pierwotną)

ADRES REDAKCJI:

30-149 KRAKÓW, ul. Balicka 122

Nakład: 600 egz.

SKŁAD I DRUK:



Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków
tel./fax (012) 280-71-51; www.akapit.krakow.pl
e-mail: wn@akapit.krakow.pl

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość

Organ naukowy PTTŻ – dwumiesięcznik

Nr 4 (83)

Kraków 2012

Rok 19

SPIS TREŚCI

Od Redakcji.....	3
JOLANTA KRZYCZKOWSKA, EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK: Biotechnologiczna synteza związków powierzchniowo czynnych i przykłady ich praktycznego zastosowania.....	5
ANDRZEJ CENDROWSKI, STANISŁAW KALISZ, MARTA MITEK: Właściwości i zastosowanie owoców róży w przetwórstwie spożywczym.....	24
JAROSŁAWA RUTKOWSKA, AGATA ADAMSKA, MAGDALENA PIELAT, MAŁGORZATA BIAŁEK: Porównanie składu i właściwości owoców dzikiej róży <i>Rosa rugosa</i> utrwalanych metodami liofilizacji i suszenia konwencjonalnego.....	32
BARBARA SOKOŁOWSKA, JOLANTA NIEZGODA, MARTA CHOTKIEWICZ: Wpływ nizyny i lizozymu na wzrost szczepów <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> oraz możliwość zastosowania tych związków jako biokonserwantów w soku jabłkowym.....	44
TOMASZ TARKO, ALEKSANDRA DUDA-CHODAK, ANNA BEBAK: Aktywność biologiczna wybranych wyłtoków owocowych oraz warzywnych.....	55
MAGDALENA MICHALCZYK, DANIEL KUCZEWSKI: Zmiany zawartości składników o charakterze prozdrowotnym w przechowywanych sorbetach z owoców jagodowych.....	66
URSZULA ŻŁOTEK, WIESŁAW WÓJCIK: Wpływ powlekania chitozanem korzeni pietruszki (<i>Petroselinum hortense</i>) na wybrane ich cechy podczas przechowywania.....	75
DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, ANASTASIA V. SIDARENKA, GALINA I. NOVIK: Wzrost i przeżywalność bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i> w napoju sojowym.....	86
HANNA BORUCZKOWSKA, TOMASZ BORUCZKOWSKI, WACŁAW LESZCZYŃSKI, EWA TOMASZEWSKA-CIOSK, JOANNA MIEDZIANKA, WIOLETTA DROŹDŻ, PIOTR REGIEC: Otrzymywanie estru skrobi i kwasu oleinowego oraz jego właściwości.....	98
ZOFIA KAROLINI-SKARADZIŃSKA, ANNA CZUBASZEK, MAŁGORZATA STANISŁAWSKA, PAWEŁ SZEWCÓW: Zmiany właściwości wypiekowych mąki pszennej pod wpływem dodatku maltodekstryn.....	108
JOANNA BARŁOWSKA, WITOLD CHABUZ, JOLANTA KRÓL, MAGDALENA SZWAJKOWSKA, ZYGMUNT LITWIŃCZUK: Wartość odżywcza i przydatność technologiczna mleka produkowanego w systemie intensywnym i tradycyjnym w trzech rejonach wschodniej Polski.....	122
JAN MICIŃSKI, JANINA POGORZELSKA, ANNA KALICKA, IRENEUSZ M. KOWALSKI, JÓZEF SZAREK: Zawartość kwasów tłuszczowych w mleku krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej z uwzględnieniem ich wieku i fazy laktacji.....	136
MAŁGORZATA DAREWICZ, PIOTR MINKIEWICZ, MARTA DZIUBA, TOMASZ PANFIL: Zastosowanie drugich i czwartych pochodnych widm UV do identyfikacji niskocząsteczkowej frakcji produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę.....	151
ANETA BRODZIAK: Właściwości żelujące i tekstura żeli otrzymanych z białek serwatkowych pochodzących z mleka krów różnych ras.....	161
ZYGMUNT LITWIŃCZUK, TOMASZ GRODZICKI, JOANNA BARŁOWSKA, MARIUSZ FLOREK: Wpływ genotypu i rodzaju mięśnia na profil kwasów tłuszczowych i zawartość cholesterolu w mięsie młodego bydła rzeźnego.....	175
ZOFIA SOKOŁOWICZ, JÓZEFA KRAWCZYK, EUGENIUSZ HERBUT: Jakość jaj z chowu ekologicznego w pierwszym i drugim roku użytkowania niosek.....	185
MARIOLA FRIEDRICH, MAGDALENA KUCHLEWSKA: Ocena wpływu wybranej mieszaniny dodatków do żywności na wskaźniki przemian węglowodanowo-lipidowych.....	195
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Interakcje składników żywności.....	211
GRAŻYNA MORKIS: Problematyka żywnościowa w ustawodawstwie polskim i unijnym.....	214
ANNA FLOREK-PASZKOWSKA: Nowe książki.....	216
Twórcy polskiej nauki o żywności.....	220
Z ŻAŁOBNEJ KARTY: Prof. dr hab. inż. Jerzy Warchalewski 1940 - 2012.....	225
Technolog Żywności.....	228

Zamieszczone artykuły są recenzowane

Czasopismo jest referowane przez: Chemical Abstracts Service, IFIS, Scopus, Journal Citation Reports / Science Edition; Citation Index Expanded

FOOD. Science. Technology. Quality

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

No 4 (83)

Kraków 2012

Vol. 19

CONTENTS

From the Editor.....	3
JOLANTA KRZYCZKOWSKA, EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK: Biotechnological synthesis of surface active compounds and examples of their practical applications.....	5
ANDRZEJ CENDROWSKI, STANISŁAW KALISZ, MARTA MITEK: Properties and application of rose hips in food processing.....	24
JAROSŁAWA RUTKOWSKA, AGATA ADAMSKA, MAGDALENA PIELAT, MAŁGORZATA BIAŁEK: Comparison of composition and properties of <i>Rosa rugosa</i> fruits preserved using conventional and freeze-drying methods.....	32
BARBARA SOKOŁOWSKA, JOLANTA NIEZGODA, MARTA CHOTKIEWICZ: Effect of nisin and lysozyme on growth of <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> strains and potential to use those compounds as bio-preservatives in apple juice.....	44
TOMASZ TARKO, ALEKSANDRA DUDA-CHODAK, ANNA BEBAK: Biological activity of selected fruit and vegetable pomaces.....	55
MAGDALENA MICHALCZYK, DANIEL KUCZEWSKI: Quantitative changes in health-promoting components in stored sorbets obtained from berry fruits.....	66
URSZULA ŻŁOTEK, WIESŁAW WÓJCIK: Effect of coating parsley roots (<i>Petroselinum Hortense</i>) with chitosan film on selected characteristics thereof during storage.....	75
DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, ANASTASIA V. SIDARENKA, GALINA I. NOVIK: Growth and survival of <i>Bifidobacterium</i> in soy beverage.....	86
HANNA BORUCZKOWSKA, TOMASZ BORUCZKOWSKI, WACŁAW LESZCZYŃSKI, EWA TOMASZEWSKA-CIOSK, JOANNA MIEDZIANKA, WIOLETTA DROŹDŹ, PIOTR REGIEC: The obtaining of starch – and oleic acid – based ester and its properties.....	98
ZOFIA KAROLINI-SKARADZIŃSKA, ANNA CZUBASZEK, MAŁGORZATA STANISŁAWSKA, PAWEŁ SZEWCÓW: Changes in baking properties of wheat flour impacted by maltodextrins added.....	108
JOANNA BARŁOWSKA, WITOLD CHABUZ, JOLANTA KRÓL, MAGDALENA SZWAJKOWSKA, ZYGMUNT LITWIŃCZUK: Nutritional value and technological suitability of milk produced in intensive and traditional systems in 3 regions of eastern Poland.....	122
JAN MICIŃSKI, JANINA POGORZELSKA, ANNA KALICKA, IRENEUSZ M. KOWALSKI, JÓZEF SZAREK: Concentent of selected fatty acids in milk from polish holstein-friesian cows with regard to their age and stage of lactation.....	136
MAŁGORZATA DAREWICZ, PIOTR MINKIEWICZ, MARTA DZIUBA, TOMASZ PANFIL: Application of second and fourth derivatives of uv spectra to identify low molecular weight products of β -casein hydrolysis by plasmin.....	151
ANETA BRODZIAK: Gelling properties and texture of gels obtained from whey proteins derived from milk of different cow breeds.....	161
ZYGMUNT LITWIŃCZUK, TOMASZ GRODZICKI, JOANNA BARŁOWSKA, MARIUSZ FLOREK: Effect of genotype and muscle type on fatty acids profile and cholesterol content in meat of young slaughter cattle.....	175
ZOFIA SOKOŁOWICZ, JÓZEFA KRAWCZYK, EUGENIUSZ HERBUT: Quality of eggs from organically reared laying hens during their first and second year of production.....	185
MARIOLA FRIEDRICH, MAGDALENA KUCHLEWSKA: Assessing the effect of selected mixture of food additives on carbohydrate-lipid metabolism.....	195
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA: Interactions among food components.....	211
GRAŻYNA MORKIS: Food problems in Polish and EU legislation.....	214
ANNA FLOREK-PASZKOWSKA: Book reviews.....	216
Creators of the Polish food science.....	220
Contemporary Terms: Professor dr eng. Jerzy Warchalewski 1940 - 2012.....	224
The Food Technologist.....	228

Only reviewed papers are published

*Covered by: Chemical Abstracts Service, and IFIS, and Scopus,
Journal Citation Reports / Science Edition; Citation Index Expanded*

OD REDAKCJI

Szanowni Czytelnicy,

przekazujemy Państwu nr **4 (83)** naszego czasopisma, a w nim obok stałych działów, przede wszystkim wiele interesujących i wartościowych artykułów z różnych ośrodków naukowych w kraju.

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego opublikowało nową listę czasopism punktowanych. Miło nam poinformować, że nasz dwumiesięcznik jest na liście A z liczbą 15 punktów. Jest to sukces wszystkich: Autorów, Recenzentów, życzliwego wsparcia przez Radę Naukową i pracę Redakcji.

Pragnę podziękować wszystkim, którzy pracą i życzliwością przyczynili się do tego sukcesu. Teraz naszym wspólnym zadaniem jest co najmniej utrzymanie osiągniętego poziomu.

W związku z nowymi kryteriami oceny czasopism naukowych, przedstawionych przez MNiSzW, dostosowaliśmy również nasze wymagania redakcyjne do tych kryteriów. Uprzejmie prosimy Autorów o dokładne zapoznanie się z tymi wymaganiami na stronie <http://www.pttz.org/zyw/index.html>

Nasz apel jest stale aktualny: **cytujmy polskich autorów publikujących w „Żywności”** w artykułach kierowanych do czasopism zagranicznych! Zwracamy także większą uwagę na cytowanie wcześniej opublikowanych artykułów w „Żywności”, w opracowaniach nadsyłanych do redakcji.

Kraków, sierpień 2012 r.

Redaktor Naczelny



Tadeusz Sikora

JOLANTA KRZYCZKOWSKA, EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK

BIOTECHNOLOGICZNA SYNTEZA ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH I PRZYKŁADY ICH PRAKTYCZNEGO ZASTOSOWANIA

Streszczenie

Surfaktanty, czyli substancje powierzchniowo czynne, są ważną grupą związków chemicznych, badanych i stosowanych w przemyśle i laboratoriach chemicznych. Obecnie obserwuje się tendencję do produkcji surfaktantów ze źródeł odnawialnych i biodegradowalnych. Taką grupę stanowią biosurfaktanty, które w porównaniu z surfaktantami syntetycznymi cechują się mniejszą toksycznością i lepszą środowiskową kompatybilnością. Biosurfaktanty mogą być otrzymywane metodą biotransformacji lub poprzez fermentację z udziałem bakterii, drożdży czy grzybów.

W niniejszym artykule dokonano krótkiej charakterystyki biosurfaktantów, omówiono biotechnologiczne metody ich syntezy, a także przedstawiono wybrane kierunki praktycznego zastosowania związków powierzchniowo czynnych.

Słowa kluczowe: biosurfaktanty, związki powierzchniowo czynne, biosynteza, mikroorganizmy, zastosowanie biosurfaktantów

Wprowadzenie

Dzięki bioprocessom stosowanym w biotechnologii przemysłowej można uzyskać m.in.: specyficzne związki chemiczne, optycznie czynne aminokwasy, środki zapachowe i smakowe, chiralne prekursory farmaceutyków, witaminy, półsyntetyczne antybiotyki, detergenty, biopestycydy czy biopolimery. Zastosowanie enzymów lub biokatalizatorów nowej generacji (np. abzymów, enzymów modyfikowanych chemicznie) pozwala na prowadzenie procesów, które są niemożliwe do wykonania klasycznymi metodami syntezy organicznej. Duże możliwości stwarza też wykorzystanie drobnoustrojów jako producentów substancji chemicznych. Postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej, szczególnie w technice rekombinacji genów, umożliwia dokonywa-

nie szeregu zmian genetycznych w mikroorganizmach, pozwalających m.in. na uzyskiwanie zwiększonej wydajności syntezy pożądaných produktów.

Wśród szerokiej gamy związków syntetyzowanych przez drobnoustroje na uwagę zasługują surfaktanty, które ze względu na swoje właściwości i możliwości praktycznego zastosowania są przedmiotem szczególnego zainteresowania biotechnologów. W niniejszym artykule dokonano krótkiej charakterystyki związków powierzchniowo czynnych, biotechnologicznych metod ich syntezy, a także omówiono wybrane kierunki praktycznego zastosowania biosurfaktantów.

Budowa, właściwości i klasyfikacja biosurfaktantów

Biosurfaktanty definiowane są jako powierzchniowo czynne związki, produkowane przez mikroorganizmy, bądź otrzymywane metodami syntezy enzymatycznej, zdolne do obniżania napięcia powierzchniowego oraz napięcia na granicy faz [28]. O właściwościach tych cząsteczek decyduje ich specyficzna amfiliowa budowa – obecność części hydrofilowej i hydrofobowej [33]. W cząsteczkach biosurfaktantów część hydrofilową stanowi zazwyczaj fragment sacharydowy lub aminokwasowy, a hydrofobową – element kwasu tłuszczowego, a czasami układu steroidowego [21]. Według Rosenberg i Ron [40, 41] biosurfaktanty można podzielić na dwie zasadnicze grupy:

- związki o stosunkowo małej masie cząsteczkowej, do których zalicza się: glikolipidy, lipopeptydy, fosfolipidy czy neutralne lipidy,
- substancje wielkocząsteczkowe, wśród których przeważają związki polimerowe: emulsan, biodispersan, liposan oraz tak zwane specyficzne biosurfaktanty, np. całe komórki niektórych drobnoustrojów (*Cyanobacteria* spp.) [33].

Wśród glikolipidów przeważają związki składające się z cząsteczki mono- (ramnoza) lub disacharydu (soforoza) połączonej wiązaniem glikozydowym z kwasem hydroksytłuszczowym, który może być dodatkowo zestryfikowany kwasem 3-hydroksytłuszczowym w ramnolipidach, lub 17-hydroksytłuszczowym w soforolipidach. Trehalolipidy natomiast mają strukturę estrów trehalozy i kwasu mykolowego (2-alkilo-3-hydroksytłuszczowego). Lipopeptydy są cząsteczkami cyklicznymi, zbudowanymi z łańcucha oligopeptydowego i kwasu 3-hydroksytłuszczowego, zaś fosfolipidy to związki, które obok reszt kwasów tłuszczowych zawierają również reszty kwasu fosforowego(V). Biosurfaktanty polimerowe mają najczęściej strukturę lipopolisacharydu (emulsan, biodispersan) lub mannoprotein. Przykłady biosurfaktantów i produkujących je mikroorganizmów przedstawiono w tab. 1., a wzory wybranych biosurfaktantów na rys. 1.

Biosurfaktantami otrzymywanymi w wyniku biotransformacji są najczęściej monoacyloglicerole oraz estry kwasów tłuszczowych i monosacharydów lub polioli [49, 50, 57].

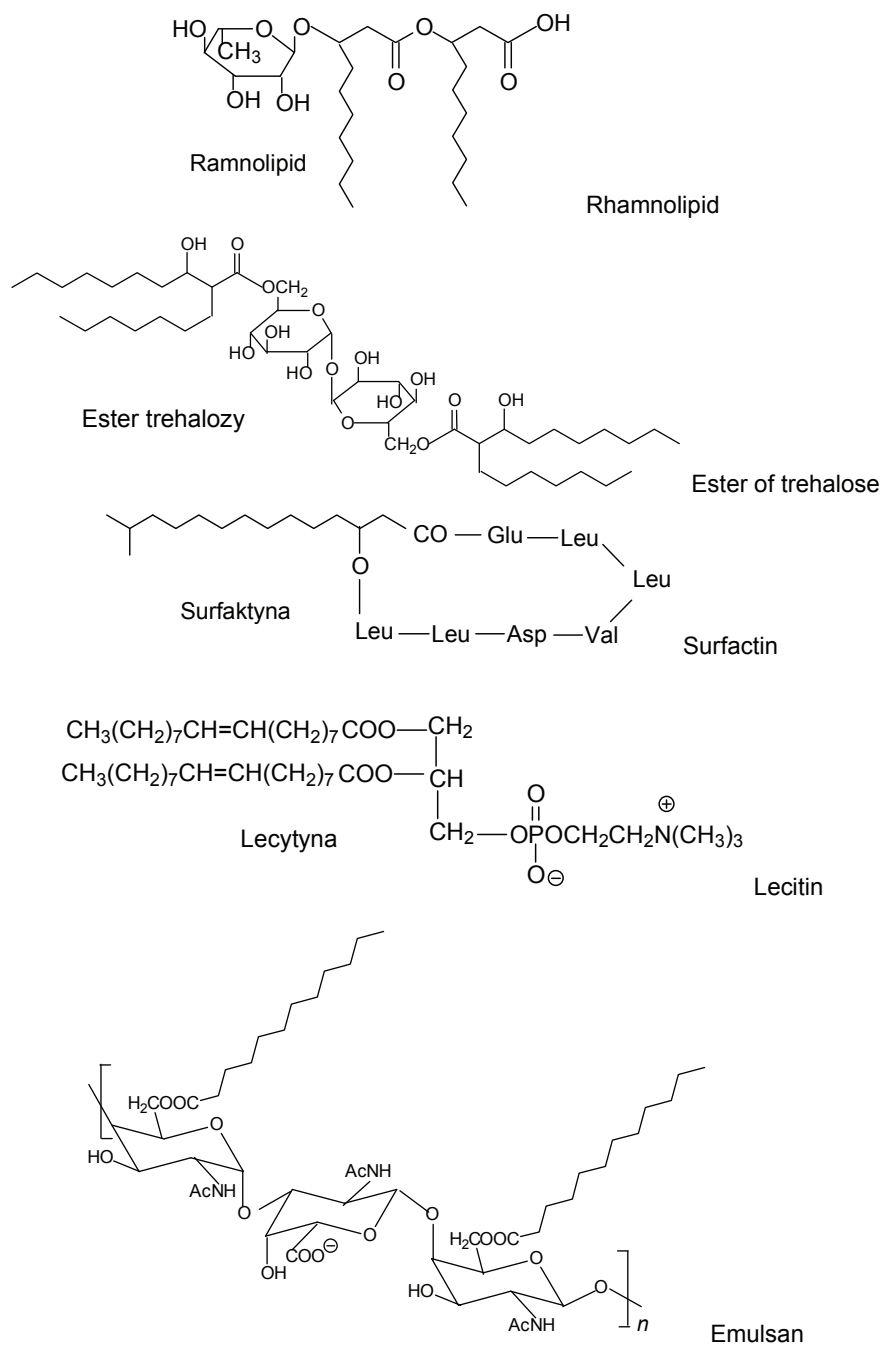
Tabela 1

Ważniejsze grupy biosurfaktantów i produkujące je mikroorganizmy.
Major groups of bio-surfactants and micro-organisms that produce them.

Glikolipidy / Glycolipids	
Ramnolipidy / Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , <i>Serratia rubidea</i>
Soforolipidy / Sophorolipids	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. apicola</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>Torulopsis magnoliae</i> , <i>C. riidocensis</i>
Trehalolipidy / Trehalolipids	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia erythropolis</i>
Lipopeptydy / Lipopeptides	
Surfaktyna / Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Wiskozyna / Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc mesenteriods</i>
Fosfolipidy / Phospholipids	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Aspergillus</i> sp.
Lipidy neutralne / Neutral lipids	<i>Arthrobacter parrafineus</i> , <i>Corynebacterium lepus</i>
Biosurfaktanty polimerowe / Polymeric bio-surfactants	
Emulsan / Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Acinetobacter venetianus</i>
Liposan / Liposan	<i>Candida lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i>
Antybiotyki / Antibiotics	
Gramicydyna / Gramicidin	<i>Brevibacterium brevis</i>
Polimyksyna / Polymyxin	<i>Bacillus polymyxa</i>

Opracowanie własne na podstawie: / Author's own study based on: [13, 37, 40, 42]

Surfaktanty wytwarzane biotechnologicznie wykazują typowe właściwości powierzchniowo czynne i mogą pełnić zarówno rolę emulgatorów, jak i deemulgatorów, rozpuszczalników, detergentów, czynników zwilżających czy zmniejszających lepkość. W odróżnieniu jednak od odpowiedników syntetycznych cechują się one mniejszą toksycznością, większą biodegradowalnością, lepszą środowiskową kompatybilnością i wyższą stabilnością przy ekstremalnych wartościach pH, temperatury i zasolenia środowiska [28, 44]. Ponadto surfaktanty pochodzenia biologicznego wykazują stosunkowo niskie wartości krytycznego stężenia micelnego (CMC), wysoką skuteczność solubilizacji, cechuje je niski koszt wytwarzania przy masowej produkcji oraz możliwość produkcji *in situ* [23]. Dodatkowo większość biosurfaktantów ma różnorodną aktywność biologiczną. Znane są w literaturze przykłady biosurfaktantów o właściwościach przeciwnowotworowych czy przeciwdrobnoustrojowych [13, 22].



Rys. 1. Przykłady biosurfaktantów produkowanych przez mikroorganizmy.

Fig. 1. Examples of bio-surfactants produced by micro-organisms.

Skuteczność biosurfaktantów determinowana jest ich zdolnością do obniżania napięcia powierzchniowego oraz napięcia na granicy faz. Przyjmuje się, że dobry surfaktant to taki, który jest zdolny do obniżenia napięcia powierzchniowego wody z wartości 72 do 35 mN/m oraz napięcia między fazami: woda/*n*-heksadekan z wartości 40 do 1 mN/m. Efektywny surfaktant cechuje się również niskim krytycznym stężeniem micelizacji CMC (*ang. critical micelle concentration*). Przyjmuje się, że skuteczne proguowe stężenie biosurfaktantów, przy którym obecne są agregaty ich cząsteczek, powinno wynosić w granicach od 1 do 200 mg/dm³ [29, 33].

Otrzymywanie biosurfaktantów

Biosurfaktanty mogą być bezpośrednio syntetyzowane przez mikroorganizmy (np. sferolipidy przez *Candida bombicola* czy ramnolipidy przez *Pseudomonas aeruginosa*) lub otrzymywane w wyniku reakcji enzymatycznej metodą biotransformacji. Można je również wydzielać bezpośrednio z niektórych produktów pochodzenia roślinnego (np. lecytynę z nasion soi) [54].

Synteza biosurfaktantów przez mikroorganizmy

Sekrecja surfaktantów wytwarzanych przez drobnoustroje uzależniona jest od wykazywanych przez nie właściwości. W przeważającej części biosurfaktanty syntetyzowane są wewnątrz komórek mikroorganizmów, gdzie pełnią rolę składników odżywczych, umożliwiają adsorpcję genów czy sekwestrację związków toksycznych [51]. Część związków powierzchniowo czynnych wydzielana jest również na zewnątrz komórek. Niewielkie ilości biosurfaktantów mogą być gromadzone także na powierzchni drobnoustrojów, dotyczy to głównie związków stanowiących lipidy ściany komórkowej oraz biosurfaktantów pozakomórkowych zdolnych do adsorpcji na powierzchni komórki [19, 51]. Dobrym przykładem są bakterie z rodzaju *Myxococcus*, u których surfaktanty wydzielane są miejscowo, przez co wytwarza się asymetryczna siła napięcia powierzchniowego, umożliwiająca przemieszczanie się komórek [27].

Synteza biosurfaktantów powiązana jest z fazami wzrostu mikroorganizmów, a te uzależnione są od warunków procesu hodowli, od zawartości składników odżywczych w podłożu, zawartości komórek w medium hodowlanym i ilości wytwarzanych przez nie produktów ubocznych [14].

Czynniki wpływające na wydajność syntezy biosurfaktantów

Badania naukowe potwierdzają, że podłoże zastosowane w hodowli mikroorganizmów (zawierające właściwe źródło węgla i azotu) oraz odpowiednio dobrane warunki wzrostu (temperatura namnażania drobnoustrojów i pH podłoża) mają istotny wpływ na typ syntetyzowanych biosurfaktantów oraz osiąganą wydajność [6, 14]. Przy wzro-

ście drobnoustrojów w optymalnych warunkach widoczna jest wyraźna zależność pomiędzy ich namnażaniem, wykorzystaniem substratów z podłoża a syntezą biosurfaktantów. Taką relację obserwowano m.in. w syntezie ramnolipidów przez *Pseudomonas* spp., w produkcji glikopeptydów przez *Pseudomonas fluorescens*, związków aktywnych powierzchniowo syntetyzowanych przez *Bacillus cereus* IAF 346 czy w produkcji biodispersanu z udziałem szczepu IAF-343 *Bacillus* spp. [14].

Źródło węgla

W syntezie biosurfaktantów wykorzystywane są zróżnicowane źródła węgla. Większość związków powierzchniowo czynnych produkowana jest przy udziale substratów węglowodorowych. Obecność w podłożu węglowodorów sprzyja m.in. syntezie soforolipidów przez drożdże *Torulopsis magnoliae*, trehalolipidów wytwarzanych przez *Rhodococcus erythropolis* czy glikolipidów produkowanych przez *Pseudomonas aeruginosa* SB-30 [6]. Również rozpuszczalne w wodzie substraty, takie jak: glicerol, glukoza, mannitol czy etanol wykorzystywane są w produkcji biosurfaktantów. Szczególnie korzystne oddziaływanie tych związków odnotowano w syntezie ramnolipidów produkowanych przez *Pseudomonas* spp. [14]. W przypadku bakterii *Bacillus subtilis* MTCC 2423 nie tylko glukoza i sacharoza, ale również cytrynian i pirogronian sodu były efektywnymi induktorami biosyntezy surfaktantów [25].

Wytwarzanie związków powierzchniowo czynnych możliwe jest także w obecności w podłożu komponentów lipidowych. Olej sojowy jest dobrym induktorem soforolipidów syntetyzowanych przez drożdże *Candida bombicola*. W jego obecności możliwe jest wytworzenie nawet 0,35 g biosurfaktantu na gram użytego substratu [29]. *Candida bombicola* może być również stymulowana w kierunku syntezy innych glikolipidów. Dodatek oliwy do podłoża, z 10 % zawartością glukozy, umożliwia osiągnięcie nawet 80 g glikolipidów w dm³ podłoża. Stuver i wsp. [46], stosując podłoże glukozowe z dodatkiem oleju słonecznikowego, osiągnęli jeszcze wyższą wydajność syntezy tych biosurfaktantów – powyżej 90 g/dm³ w hodowli drożdży *Torulopsis apicola*.

Ze względu na to, że coraz więcej uwagi poświęca się zagadnieniom ochrony środowiska, wiele badań nad syntezą surfaktantów dotyczy wykorzystania surowców odpadowych. Możliwość produkcji związków powierzchniowo czynnych przy jednoczesnym zagospodarowaniu produktów ubocznych jest korzystna zarówno w aspekcie ekologicznym, jak i ekonomicznym. Udowodniono, że w ten sposób możliwa do osiągnięcia jest nawet 50 % redukcja kosztów wytworzenia produktu finalnego [24].

Spośród surowców odpadowych w syntezie surfaktantów wykorzystywano m.in.: serwatkę, wodę będącą pozostałością po procesie suszenia torfu, otręby pszenne i okarę oraz produkt uboczny z ekstrakcji oliwy z oliwek [24]. Dobrą wydajność syntezy ramnolipidów na podłożu serwatkowym osiągnięto m.in. z udziałem bakterii *Pseudo-*

monas aeruginosa. Woda stanowiąca surowiec odpadowy w procesie suszenia torfu, zawierająca znaczące ilości glukozy, galaktozy i ksylozy była dobrym podłożem do wzrostu bakterii *Bacillus subtilis*, syntetyzujących surfaktanty charakteryzujące się stosunkowo małym krytycznym stężeniem micelizacji (CMC) – 8 mg/dm³ [24, 26]. Efektywna synteza m.in. ituryny i surfaktyny z udziałem szczepu NB 22 *Bacillus subtilis* była możliwa również z wykorzystaniem okary – produktu odpadowego, powstającego w przemysłowym procesie wytwarzania tofu. Odpad po procesie ekstrakcji oliwy z oliwek (OOME – *olive oil mill effluent*), stanowiący istotny problem w krajach śródziemnomorskich, okazał się dość dobrym podłożem, sprzyjającym produkcji ramnolipidów przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Spośród 22 szczepów tego rodzaju 15 wykazywało dobry wzrost i możliwość produkcji biosurfaktantów, cechujących się zdolnością obniżania napięcia powierzchniowego z poziomu 40 mN/m do ok. 30 mN/m oraz zmniejszania napięcia na granicy faz z wartości 21 mN/m do 5 mN/m [24, 26]. W syntezie biosurfaktantów z powodzeniem wykorzystywano, jako hydrofobowe źródło węgla, również kondensat podezdoryzacyjny – produkt odpadowy przemysłu tłuszczowego. Stosując podłoże, w którym na 1 g kondensatu przypadało 3 g glukozy i 0,05 g ekstraktu drożdżowego Gumienna i wsp. [18] osiągnęli, z udziałem drożdży *Candida bombicola*, wydajność rzędu 118 g soforolipidów na 1 dm³ podłoża.

Przykładowe wydajności syntez biosurfaktantów, przy zastosowaniu w hodowli mikroorganizmów surowców odpadowych przedstawiono w tab. 2.

T a b e l a 2

Surowce odpadowe stosowane w mikrobiologicznej syntezie biosurfaktantów.
Waste raw materials applied to micro-biological synthesis of bio-surfactants.

Surowce odpadowe Waste Raw Materials	Typ biosurfaktantu Bio-surfactant type	Szczep mikroorganizmu Micro-organism strain	Wydajność [g/dm ³] Max yields [g/dm ³]	Źródło References
Olej odpadowy po procesie smażenia Waste frying oil	Ramnolipidy Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB	2,7	[20]
Odpady porafinacyjne z procesu rafinacji olejów Oil refinery wastes	Glikolipidy Glycolipids	<i>Candida antarctica</i> , <i>Candida apicola</i>	10,5 13,4	[5]
Odpady gorzelnicze Distillery wastes	Ramnolipidy Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2	0,92	[15]
Surowiec odpadowy po procesie produkcji tapioki Cassava flour wastewater	Lipopeptydy Lipopeptide	<i>Bacillus subtilis</i>	2,2 - 3,0	[34]

Źródło azotu

W regulacji syntezy biosurfaktantów istotne znaczenie ma również odpowiednio dobrane źródło azotu. Bakterie *Arthrobacter parafineus* są wydajnym producentem związków powierzchniowo czynnych w obecności soli amonowych i mocznika. Poziom syntezy biosurfaktantów z udziałem tego gatunku może być podwyższony poprzez dodatek aminokwasów, w tym szczególnie kwasu asparaginowego, glutaminowego lub glicyny [14]. W syntezie ramnolipidów przez *Pseudomonas* 44T1 skuteczna jest obecność azotanu sodu. Korzystny wpływ tej soli oraz azotanu amonu odnotowano również w badaniach nad intensywnością namnażania i syntetyzowania biosurfaktantów przez *Pseudomonas fluorescens* [1]. Sole kwasu azotowego sprzyjają także produkcji biosurfaktantów przez drobnoustroje *Corynebacterium lepus*, które najwyższą wydajność osiągają w fazie wzrostu logarytmicznego [6]. Azotan potasu to najkorzystniejsze źródło azotu również w przypadku syntezy surfaktantów przez drożdże *Rhodotorula glutinis* IIP30 [42].

Dodatek azotu może jednak również ograniczać syntezę związków powierzchniowo czynnych. Takie działanie udowodniono m.in. w syntezie biosurfaktantów z udziałem bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* szczep SFC-D czy drożdży *Candida tropicalis* IIP-4 [2]. W przypadku *Pseudomonas aeruginosa* maksymalny poziom produkcji ramnolipidów możliwy był dopiero przy ograniczeniu źródła azotu i zachowaniu stosunku masowego substratów węglowych i azotanowych w granicach 16 : 1 - 18 : 1 [17].

Czynniki środowiskowe

Spośród czynników fizykochemicznych wartość pH podłoża jest głównym elementem decydującym m.in. o syntezie soforolipidów przez drożdże *T. bombicola* czy ramnolipidów przez bakterie *Pseudomonas* spp. O ile w przypadku wyżej wymienionych drożdży wydajna synteza surfaktantów, przy zachowaniu ich pożądanych właściwości, możliwa jest w granicach pH podłoża 6 - 9, o tyle w przypadku bakterii efektywna produkcja ramnolipidów obserwowana jest w dużo węższym zakresie kwasowości (pH w przedziale 6,0 - 6,5). Przekroczenie poziomu pH 7 sprawia, że wydajność drastycznie maleje [14, 29]. Utrzymanie wartości pH w granicach 7,0 - 9,0 pożądane jest w procesie namnażania i syntezy biosurfaktantów przez bakterie *Bacillus licheniformis* F2.2. W przypadku tego szczepu zmniejszenie pH do poziomu 4,0 - 4,5 powoduje utratę właściwości obniżania napięcia powierzchniowego przez wytwarzane związki [48].

Temperatura i poziom natlenienia pożywki stanowią również istotny parametr w syntezie surfaktantów. Zaobserwowano, że intensywność napowietrzania podłoża była podstawowym elementem w optymalizacji produkcji związków powierzchniowo czynnych przez bakterie *Bacillus subtilis* [2]. Yakimov i wsp. [55], prowadząc badania

nad syntezą biosurfaktantów przez *Bacillus licheniformis* BAS50 w warunkach tlenowych i beztlenowych, zaobserwowali, że natlenianie podłoża przyczynia się do skrócenia lag fazy, podwyższenia plonu biomasy komórkowej i wydajności syntezy. Korzystnie działa na zdolność wytworzonych biosurfaktantów do obniżania napięcia powierzchniowego. O ile w przypadku hodowli beztlenowej w fazie logarytmicznej możliwe było obniżenie wartości napięcia powierzchniowego do 35 mN/m o tyle przy hodowli tlenowej wartość ta zmniejszyła się do 28,3 mN/m.

Optymalizacja temperatury hodowli mikroorganizmów ma również istotne znaczenie. Stwierdzono bowiem, iż zróżnicowanie temperatury podczas hodowli może przyczyniać się do zmiany składu syntetyzowanych przez mikroorganizmy surfaktantów [14]. Taką zależność temperaturową odnotowano m.in. w syntezie ituryny A oraz surfaktyny przez bakterie *Bacillus subtilis* RB14. Podczas hodowli na tym samym podłożu, w temperaturze 25°C bakterie syntetyzowały iturynę A, zaś w 37°C surfaktynę [35].

Modyfikacje genetyczne

Stworzenie optymalnych warunków hodowli nie jest jedynym możliwym rozwiązaniem prowadzącym do efektywnej produkcji związków powierzchniowo czynnych. Z uwagi na to, że procesy biotechnologiczne z zastosowaniem mikroorganizmów wyizolowanych bezpośrednio ze środowiska naturalnego przebiegają na ogół z wydajnością niewystarczającą, aby ich użycie na skalę przemysłową było opłacalne ekonomicznie, w ostatnich latach intensyfikację syntezy surfaktantów prowadzi się poprzez liczne modyfikacje genetyczne. Modyfikację genotypu szczepu macierzystego, wyizolowanego z próbki środowiskowej i scharakteryzowanego taksonomicznie prowadzi się najczęściej metodą mutagenyzy indukowanej *in vivo* bądź fuzji protoplastów komórek szczepów pochodzących od genetycznie różniących się przodków. Doskonalenie mikroorganizmów za pomocą mutagenyzy możliwe jest poprzez wykorzystanie transpozonów, *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny, radiacji czy selekcji dokonywanej na podstawie odporności na jonowe detergenty, takie jak bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB) [12].

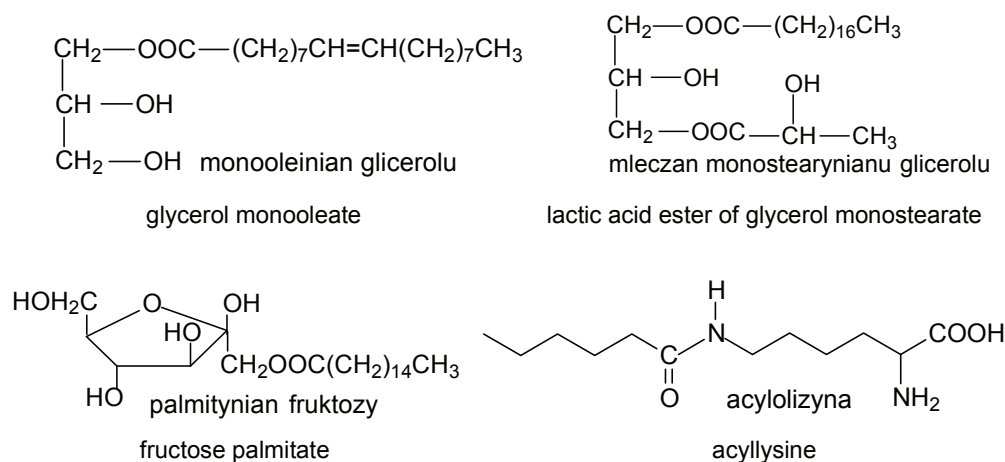
Genetyczną regulację syntezy biosurfaktantów prowadzono najczęściej z udziałem bakterii rodzaju *Bacillus* oraz *Pseudomonas* [12, 47]. Taki wybór wynikał zarówno ze znajomości genomu (*Pseudomonas*), jak i możliwości aplikacyjnymi konkretnych biosurfaktantów (np. lipopeptydów). Biosynteza lipopeptydów przez bakterie z rodzaju *Bacillus* wzbudza szczególne zainteresowanie ze względu na możliwość ich zastosowania jako potencjalnych antybiotyków. Szczep *Bacillus subtilis* MI 113 modyfikowano w kierunku wydajnej syntezy surfaktyny (rys. 1) (cyklicznego lipopeptydu o aktywności antybiotyku). Po wprowadzeniu do bakterii plazmidu zawierającego gen *lpa-14* możliwe było osiągnięcie nawet 8-krotnie wyższej wydajności. Mutageniza,

przy zastosowaniu czynnika chemicznego *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny dla tego samego gatunku (szczep SD901) skutkowało nawet 25-krotnie wyższym poziomem syntetyzowanej surfaktyny (ok. 50 g/dm³) [28]. W przypadku Gram-ujemnych bakterii *Pseudomonas aeruginosa* modyfikacja dotyczyła m.in. poprawy wydajności syntezy ramnolipidów na podłożach odpadowych, głównie serwatkowych. Osiągnięto to poprzez wprowadzenie genu *lacZY* z *Escherichia coli* do genomowego DNA *Pseudomonas aeruginosa* [28].

Modyfikacje genetyczne prowadzono również w przeciwnym kierunku, m.in. celem inaktywacji genu *swrW* kodującego syntazę serrawetyny W1, aktywnego powierzchniowo egzolipidu wytwarzanego przez pałeczki *Serratia marcescens*. Modyfikacja ta stosowana była z uwagi na fakt, że proces wytwarzania serrawetyny W1 utrudniał wydzielanie równolegle syntetyzowanego 2,3-butanodiolu (związku stanowiącego istotę tej syntezy), ze względu na nadmierne pienienie się środowiska reakcji [58].

Biotransformacyjne metody syntezy biosurfaktantów

Obok możliwości wytwarzania biosurfaktantów podczas fermentacji z udziałem wielu gatunków mikroorganizmów, duży potencjał tkwi także w produkcji tych związków poprzez biotransformację. Użycie wyizolowanych enzymów pozwala na otrzymanie szeregu związków powierzchniowo czynnych (rys. 2), o pożądanych właściwościach fizykochemicznych.



Rys. 2. Przykłady biosurfaktantów otrzymywanych w reakcjach enzymatycznych.

Fig. 2. The examples of bio-surfactants produced using enzymatic reactions.

Wśród biosurfaktantów otrzymywanych metodami enzymatycznymi wyróżnić można monoacyloglicerole i ich pochodne, w tym octany (E 471), mleczany (E 472a) i cytryniany (E 472b) monoacylogliceroli – związki wykazujące właściwości detergentowe i mające zdolność do tworzenia w wodnych roztworach struktur micelarnych. Enzymatyczna synteza tych związków polega na estryfikacji i transestryfikacji kwasów tłuszczowych lub na glicerolizie tłuszczów i olejów, w temperaturze pokojowej, z udziałem lipaz 1,3-specyficznych [43].

Podczas biotransformacji możliwe jest otrzymanie estrów kwasów tłuszczowych i związków polihydroksylowych – przede wszystkim mono- i disacharydów, a także sorbitolu, ksylitolu i kwasu askorbinowego [39]. Estry sacharydów należą do biosurfaktantów o rosnącym znaczeniu praktycznym. Związki te wykazują właściwości prebiotyczne, co w sposób szczególny predysponuje je jako składniki żywności [3].

Badania nad syntezą estrów kwasów tłuszczowych i sacharydów prowadzone są na szeroką skalę i dotyczą m.in. doboru: środowiska reakcji, proporcji molowych substratów, właściwych parametrów procesu. Szczególnie dobór odpowiedniego rozpuszczalnika stanowi problem. Środowisko wodne jest nieodpowiednie do syntezy estrów (hydroliza), a użycie w reakcjach rozpuszczalników organicznych jest limitowane rozpuszczalnością sacharydów [50]. Przyjmuje się, że do całkowitego rozpuszczenia cukrów używanych w syntezie niejonowych surfaktantów konieczne jest zastosowanie nawet 500-krotnego nadmiaru rozpuszczalnika organicznego [49]. W celu zapewnienia większych wydajności syntezy istotne jest dobranie takiego rozpuszczalnika, który nie tylko dobrze rozpuszcza substraty, ale jednocześnie zapewnia małą rozpuszczalność produktu, umożliwiając jego krystalizację i osiągnięcie równowagi reakcji [56]. Dodatkowo zastosowane środowisko reakcji nie może negatywnie wpływać na aktywność i selektywność stosowanych w procesie lipaz.

Šabeder i wsp. [49], pracując nad syntezą palmitynianu fruktozy z udziałem immobilizowanej lipazy Novozym 435, przebadali cztery rozpuszczalniki: 2-metylo-2-butanol, *tert*-butanol, aceton oraz butanon (keton etylowo-metylowy). Największe przereagowanie osiągnięto właśnie w obecności tego ostatniego: 72-godzinna estryfikacja w temp. 40 °C w obecności butanonu umożliwiła 82 % przereagowanie, a w przypadku pozostałych rozpuszczalników wartości te wahały się w granicach odpowiednio: 69 % w obecności acetonu, 64 % – *tert*-butanolu i 61 % – 2-metylo-2-butanolu. Otrzymane wyniki były zbliżone do rezultatów zespołu Yana i wsp. [56], którzy w syntezie monoestrów kwasów tłuszczowych i β -D(+)-glukozy w obecności immobilizowanej lipazy *Candida antarctica*, spośród zastosowanych rozpuszczalników: heksanu, acetonu, butanonu, metanolu i etanolu, za najlepsze uznali: aceton i butanon. Rozpuszczalność glukozy w tych środowiskach była wystarczająca i sięgała poziomu 0,08 mg/cm³ w obecności butanonu oraz 0,35 mg/cm³ przy zastosowaniu acetonu. Aceton okazał się również korzystnym rozpuszczalnikiem w syntezie palmi-

tynianu glukozy, prowadzonej w temperaturze 60 °C w obecności lipazy *Candida antarctica* B. Osiągano wówczas 87 % wydajność [7]. W skali laboratoryjnej, z powodzeniem acylowano cukry także przy użyciu takich rozpuszczalników, jak pirydyna czy dimetyloformamid. Z uwagi jednak na swoją toksyczność substancje te nie znalazły zastosowania w syntezach przemysłowych [50].

Na środowisko syntezy estrów, a zarazem na wydajność ich tworzenia wpływają także fizykochemiczne właściwości oraz proporcje molowe stosowanych substratów. Cao i wsp. [8], prowadząc acylowanie glukozy przy użyciu kwasu palmitynowego i jego pochodnych (w tym estru metylowego, winylowego, tripalmityny i bezwodnika), największą wydajność, sięgającą poziomu 80 %, uzyskali stosując palmitynian winylu. Podyktowane jest to nieodwracalnym etapem tautomeryzacji uwalnianego alkoholu winylowego do acetaldehydu. Wykorzystując lipazę N-435 Ward i wsp. [52] przeprowadzili estryfikację dziesięciu kwasów tłuszczowych (laurynowego, mirystynowego, palmitynowego, stearynowego, arachidowego, behenowego, oleinowego, arachidonowego, eikozapentaenowego i dokozaeksaenowego) 1,2-*O*-izopropylideno-D-ksylofuranozą. Przy zastosowaniu substratów w stosunku molowym 1 : 1, wydajność reakcji kształtowała się na poziomie średnio od 32 % w przypadku kwasu behenowego do 90 % – kwasu laurynowego. Na podstawie tych badań wnioskowano, że reakcje z zastosowaniem nienasyconych kwasów tłuszczowych cechują się większą wydajnością.

W kontekście osiągania największych wydajności syntezy estrów sacharydów, przy zastosowaniu zróżnicowanych stężeń molowych substratów Yoo i wsp. [57] wykazali, że w syntezie oleinianu ksylitolu korzystne jest użycie substratów (cukier/kwas tłuszczowy) w stosunku molowym 3 : 1. W zastosowanych przez autorów warunkach zapewniało to przereagowanie rzędu 98 %. Zupełnie odmienne rezultaty opisują Antczak i wsp. [3]. Autorzy podają, że optymalna wartość stosunku molowego substratów, warunkująca maksymalną wydajność wielu syntetyzowanych estrów sacharydów wynosi 1 : 4 (cukier/kwas tłuszczowy). Należy zatem pamiętać, że każda zaplanowana biosynteza konkretnego surfaktantu wymaga indywidualnego dopracowania warunków środowiskowych, doboru właściwych substratów i ich stężeń oraz przetestowania różnych katalizatorów.

Biotransformacje z udziałem lipaz umożliwiają syntetyzowanie nie tylko estrów sacharydów, ale również estrów aminokwasów i amidów. Związki te cechują się dobrymi właściwościami emulgującymi, a także aktywnością przeciwdrobnoustrojową i znajdują zastosowanie w medycynie, kosmetyce czy żywieniu. Z udziałem lipaz z powodzeniem syntetyzowano oleilo-L-homoserynę [32]. Biosurfaktant ten wykazywał dobre właściwości emulgujące i był skuteczny w stabilizacji emulsji typu o/w. Sposobem biotransformacji prowadzono także m.in. acylację grupy aminowej aminokwasów amidowych, z zastosowaniem wolnych kwasów tłuszczowych lub ich estrów

metylowych. Wydajność tych procesów sięgała poziomu 50 %. Produkty reakcji były następnie ilościowo przekształcane pod wpływem karboksyeptydazy Y w *N*-acylowane aminokwasy. Przy udziale lipazy *Mucor miehei* syntetyzowano również *N*-acylolizynę. Proces prowadzono przez 7 dni w temperaturze 90 °C, stosując jako substraty wolne aminokwasy i olej roślinny [43].

Podczas syntezy enzymatycznej otrzymywane są również fosfolipidy – surfaktanty szczególnie stosowane w medycynie i kosmetyce. Naturalnie występujące fosfolipidy były z sukcesem modyfikowane m.in. przez lipazy z drożdży *Candida cylindracea* i grzybów *Rhizopus delemar*. Przy udziale drożdżowej fosfolipazy D (PLD), kodowanej w genie *spo14*, możliwa była wysoko wydajna synteza fosfatydyloseryny i fosfatydyloglicerolu – fosfolipidów wytwarzanych naturalnie w niewielkich ilościach. Substratami w tych reakcjach były lecytyna (fosfatydylocholina) i odpowiednio: seryna bądź glicerol [43].

Innymi przykładami mikrobiologicznych syntez pożądaných surfaktantów mogą być transformacje *n*-alkanów do kwasów α,ω -dikarboksylowych, prowadzone z 70 % wydajnością przez mutanty *Candida tropicalis* bądź konwersja kwasu oleinowego do rycynowego przez bakterię glebową BMD-120 [14].

Zastosowanie biosurfaktantów

Z uwagi na różnorodne właściwości fizykochemiczne, małą toksyczność i szybką biodegradowalność biosurfaktanty znalazły szerokie zastosowanie przemysłowe. Związki te są coraz powszechniej wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, w produkcji detergentów, w przemyśle spożywczym, rolniczym, włókienniczym, celulozowym i papierniczym oraz petrochemicznym [4, 31, 45].

Dzięki właściwościom przeciwdrobnoustrojowym biosurfaktanty od wielu lat stosowane są jako antybiotyki. Przykładem są polimyksyny czy gramicydyny. Przeciwdrobnoustrojową aktywność wykazują m.in. ramnolipidy produkowane przez *P. aeruginosa* i większość lipopeptydów wytwarzanych przez rodzaj *Bacillus*. Coraz więcej badań wskazuje na biosurfaktanty, jako czynniki przeciwnowotworowe. Rola glikolipidów w hamowaniu rozwoju raka płuc, mózgu czy białaczki została potwierdzona przez wielu badaczy [4, 22]. Biosurfaktanty, z uwagi na zdolność obniżania napięcia powierzchniowego na granicy faz, mogą chronić różnego rodzaju powierzchnie przed przyleganiem do nich mikroorganizmów, co w medycynie ma istotne znaczenie. Zaobserwowano, że surfaktanty wydzielane przez probiotyczny szczep *Streptococcus thermophilus* hamują adhezję drożdży *Candida albicans* do silikonowych powierzchni, a biosurfaktant wytwarzany przez *Lactobacillus acidophilus* hamuje adhezję do silikonu nie tylko *Candida albicans*, ale również bakterii uropatogennych [22]. Podobne właściwości wykazuje biosurfaktant wytwarzany przez *Pseudomonas fluorescens* w stosunku do bakterii *Listeria monocytogenes* LO28 [44].

W przemyśle kosmetycznym, biosurfaktanty, dzięki swym przeciwdrobnoustrojowym właściwościom, stosowane są m.in. w produkcji: dezodorantów, past do zębów, płynów do soczewek kontaktowych, produktów przeciwtrądzikowych czy przeciwłupieżowych. Związki te są istotnymi składnikami również kremów i maseczek, w których pełnią rolę emulgatorów, środków dyspergujących czy zwilżających. Sforolipidy produkowane przez drożdże *Candida apicola* i *Candida bombicola* są przemysłowo wykorzystywane jako związki zwilżające przez koncern Kao Co. Ltd. w kosmetykach z serii Sofina [26].

Związki powierzchniowo czynne to składniki proszków i płynów do prania oraz środków do mycia naczyń. Dodatek biosurfaktantów w tych produktach umożliwia zmniejszenie stężenia stosowanego środka chemicznego. Ponadto, biodegradowalność biosurfaktantów i enzymów sprawia, że produkty je zawierające mogą mieć status „bio”. Biosurfaktanty (bioemulgatory) są dodawane również m.in. do rozpuszczalników chlorowanych, powszechnie stosowanych do czyszczenia płyt elektronicznych [41].

W przemyśle spożywczym biosurfaktanty stosowane są przede wszystkim jako emulgatory sosów i majonezów. Bioemulgator syntetyzowany przez drożdże *Candida utilis* stosowany jest m.in. w dressingach sałatkowych [4]. Surfaktanty wytwarzane mikrobiologicznie używane są również przy produkcji: margaryn, lodów, kremów cukierniczych, czekolad czy polew do ciast. Szczególną rolę pełnią tu estry sacharydów, które podczas produkcji margaryn umożliwiają tworzenie doskonałych emulsji typu w/o, poprawiają ich dyspersję, stabilizują właściwości kremów i bitej śmietany w spray'u, dodane do lodów poprawiają ich puszystość i zapobiegają wydzielaniu się tłuszczu podczas zamrażania [3]. W produktach mięsnych rola biosurfaktantów sprowadza się do polepszania właściwości reologicznych oraz sensorycznych finalnego wyrobu, poprzez poprawę stopnia związania wody technologicznej, lepsze zemulgowanie tłuszczu i jego równomierną i trwałą dyspersję przestrzenną w masie gotowego przetworu [4].

Interesujące wydaje się zastosowanie biosurfaktantów w rolnictwie. Dzięki aplikacji surfaktantów m.in. w środkach ochrony roślin, możliwa jest lepsza rozpuszczalność hydrofobowych pestycydów. Dodatkowo wytworzenie mikroemulsji ułatwia penetrację środka chemicznego poprzez znacznie większe pole powierzchni kontaktu. Środki ochrony roślin zawierające surfaktanty charakteryzują się ponadto dużą skutecznością działania biologicznego przy zmniejszonym ryzyku stosowania [4].

Pozytywne efekty stosowania biosurfaktantów zauważalne są również w przemyśle tekstylnym. Ich stosowanie zapewnia tkaninom lepszą trwałość w trakcie prania, zwiększa ich odporność na otarcia oraz pozwala osiągnąć większą gładkość tkaniny [4].

Istotnym aktualnie obszarem zastosowań biosurfaktantów jest przemysł wydobywczy ropy naftowej. Wprowadzanie do złóż roztworów surfaktantów i w efekcie obniżanie napięcia powierzchniowego pomiędzy ropą naftową a skałą przyczynia się do wydobycia większej jej ilości [16]. Biosurfaktanty wykorzystywane są także na szeroką skalę w remediacji i detoksyfikacji gruntów. W konwencjonalnym podejściu zanieczyszczenia usuwane są nieefektywnie, przy zaangażowaniu znacznej energii i kosztów. Przemycanie złoże roztworami biosurfaktantów, prowadzone *in situ*, powoduje znaczne obniżenie napięcia międzyfazowego i powierzchniowego pomiędzy zanieczyszczeniem i gruntem oraz umożliwia zmniejszenie sił kapilarnych odpowiedzialnych za zatrzymanie zanieczyszczeń w porach gruntu. Cały układ staje się wówczas bardziej mobilny i oderwanie zanieczyszczeń hydrofobowych od cząstek gleby jest dużo łatwiejsze [38]. Zachodzący proces solubilizacji intensyfikuje rozpuszczanie polarnych i niepolarnych związków chemicznych [53]. Prace w tym obszarze koncentrują się w głównej mierze na usuwaniu policyklicznych węglowodorów aromatycznych, polichlorowanych bifenyli czy chlorowcopochodnych węglowodorów nasyconych [30, 37].

Aktualnie prowadzone są liczne badania nad odpowiednim doбором i przygotowaniem zespołów współdziałających ze sobą mikroorganizmów – konsorcjów mikroorganizmów, wyspecjalizowanych w rozkładzie węglowodorów naftowych. Celem poprawy transportu tych węglowodorów do komórek mikroorganizmów i ich biodostępności analizowany jest dodatek związków powierzchniowo czynnych. Owsianiak i wsp. [36] na przykładzie konsorcjum mikroorganizmów wyizolowanych z ropy naftowej badali wpływ dodatku biosurfaktanta na stopień biodegradacji mieszaniny diesla i biodiesla. Przy wprowadzeniu do podłoża ramnolipidów w ilości 150 mg/dm^3 , stosując w mieszaninie 10, 30 i 50 % dodatek biodiesla obserwowano, że biosurfaktanty działają efektywnie jedynie przy niskiej (10 %) jego zawartości. Zbliżone badania prowadził również zespół Chrzanowskiego i wsp. [9]. Autorzy oceniali wpływ dodatku dostępnych handlowo ramnolipidów JBR425 na tempo biodegradacji diesla i mieszaniny B20 (20 % biodiesla i 80 % diesla (v/v)) przez konsorcjum bakterii pochodzących z zaolejonej gleby. Na podstawie badań zaobserwowano, że w warunkach tlenowych obecność ramnolipidów w ilości 150 mg/dm^3 korzystnie oddziałuje na degradację mieszaniny B20, natomiast nie wpływa na tempo rozkładu czystego diesla. Chrzanowski i wsp. [11] stosowali również dodatek ramnolipidów do modelowej mieszaniny węglowodorów i fenolu, 4-chlorofenolu oraz 2,4-dichlorofenolu. Ich badania potwierdziły, że ramnolipidy wchodzące w interakcję z chlorowcopochodnymi fenolu zmniejszały ich toksyczność, prowadziły do solubilizacji hydrofobowych związków, a w konsekwencji stymulowały proces biodegradacyjny.

W pracach nad dodatkiem biosurfaktantów potwierdzono również ich wpływ na zmiany w hydrofobowości komórek bakteryjnych [36]. Obecnie na szeroką skalę pro-

wadzone są analizy funkcji ramnolipidów z perspektywy kolonizowania otoczenia, tworzenia i rozpadu biofilmów bakteryjnych oraz specyficznej aktywności wobec innych organizmów [10].

Podsumowanie

Biotechnologiczna synteza surfaktantów – przyjazna środowisku i człowiekowi – stanowi alternatywę dla typowych procesów chemicznych. Biosurfaktanty mają duży potencjał aplikacyjny, a ich zwiększająca się produkcja i zużycie dowodzą, że istnieje zapotrzebowanie na tę grupę substancji. Związki powierzchniowo czynne, otrzymywane przy zastosowaniu mikroorganizmów mających status GRAS, np. bakterii z rodzaju *Lactobacillus* czy drożdży, mogą być stosowane w branży spożywczej i medycznej. Perspektywa biosyntezy nowych typów surfaktantów z udziałem mikroorganizmów wiąże się m.in. z badaniem molekularnych mechanizmów ich tworzenia, poszukiwaniem nowych, bardziej wydajnych szczepów (np. wśród termofili, psychrofili, bądź halofili), opracowaniem tańszych metod wydzielania biosurfaktantów (precypitacja, frakcjonowanie, filtracja, krystalizacja), a także z przemysłowym zagospodarowaniem w hodowli surowców odpadowych.

Literatura

- [1] Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A.: Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 2008, **223**, 143-151.
- [2] Al-Araii L., Rahman R.N.Z.R.A., Basri M., Salleh A.B.: Microbial surfactants. *Asia Pac. J. Mol. Biol.*, 2007, **15** (3), 99-105.
- [3] Antczak T., Szczesna-Antczak M., Patura J.: Wykorzystanie lipaz do otrzymywania estrów sacharydów, ich charakterystyka i zastosowanie. W: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*. Red. E. Kołakowski, W. Bednarski, S. Bielecki. Wyd. AR w Szczecinie, 2005, ss. 295-312.
- [4] Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S.: Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **53**, 495-508.
- [5] Bednarski W., Adamczak M., Tomasik J., Płaszczyk M.: Application of oil refinery waste in biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technol.*, 2004, **95**, 15-18.
- [6] Cameotra S.S., Makkar R.S.: Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **50**, 520-529.
- [7] Cao L., Fischer A., Bornscheuer U.T., Schmid R.D.: Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester. *Biocatal. Biotransfor.*, 1997, **14**, 269-283.
- [8] Cao L., Fischer A., Bornscheuer U.T., Schmid R.D.: Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1999, **6**, 279-285.
- [9] Chrzanowski Ł., Dziadas M., Ławniczak Ł., Cyplik P., Białas W., Szulc A., Lisiecki P., Jeleń H.: Biodegradation of ramnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. *Bioresource Technol.*, 2012, **111**, 328-335.

- [10] Chrzanowski Ł., Ławniczak Ł., Czaczyk K.: Why do micro-organisms produce rhamnolipids? World J. Microbiol. Biotechnol., 2012, **28**, 401-419.
- [11] Chrzanowski Ł., Owsianiak M., Szulc A., Marecki R., Piotrowska-Cyplik A., Olejnik-Schmidt A.K., Staniewski J., Lisiecki P., Ciesielczyk F., Jesionowski T., Heipieper H.J.: Interaction between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of model hydrocarbon-rich effluent. Internat. Biodeterior. Biodegrad., 2011, **65**, 605-611.
- [12] Das P., Mukherjee S., Sen R.: Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2008, **25**, 165-186.
- [13] Deleu M., Paquot M.: From renewable vegetables resources to micro-organisms: new trends in surfactants. C.R. Chimie, 2004, **7**, 641-646.
- [14] Desai J., Banat I.: Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1997, **61** (1), 47-64.
- [15] Dubey K., Juwarkar A.: Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. World J. Microbiol. Biotechnol., 2001, **17**, 61-69.
- [16] Fiechter A.: Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends Food Sci. Technol., 1992, **3**, 286-293.
- [17] Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A.: Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factor. Applied Microbiol. Biotechnol., 1986, **24**, 443-448.
- [18] Gumienna M., Czarnecka M., Czarnecki Z.: Kondensat podezodoryzacyjny jako substrat tłuszczowy w biosyntezie związków powierzchniowo czynnych z wykorzystaniem drożdży *Candida bombicola*. Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria, 2002, **1** (2), 71-82.
- [19] Gumienna M., Czarnecki Z.: Rola mikroorganizmów w syntezie związków powierzchniowo czynnych. Nauka. Przyroda. Technologie, 2010, **4**, 1-14.
- [20] Haba E., Espuny M., Busquets M., Manresa A.: Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol., 2000, **88**, 379-387.
- [21] Holmberg K.: Natural surfactants. Curr. Op. In Colloid & Interface Science, 2001, **6**, 148-159.
- [22] Krasowska A.: Biomedyczna aktywność biosurfaktantów. Postępy Hig. Med. Dośw., [online], 2010, **64**, 310-313.
- [23] Ławniczak Ł., Czaczyk K., Owsianiak M., Chrzanowski Ł.: Rola rhamnolipidów w środowisku naturalnym. Post. Microbiol., 2011, **50**, 1, 17-30.
- [24] Makkar R.S., Cameotra S.S.: Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. J. Surfactants Deterg., 1999, **2** (2), 237-241.
- [25] Makkar R.S., Cameotra S.S.: Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 1997, **18**, 37-42.
- [26] Makkar R.S., Cameotra S.S.: An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **58**, 428-434.
- [27] Mazurkiewicz J.: Związki powierzchniowo czynne wytwarzane przez mikroorganizmy. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość., 1996, **3** (8), 60-70.
- [28] Mukherjee S., Das P., Sen R.: Towards commercial production of microbial surfactants. Trends Biotechnol., 2006, **24** (11), 509-515.
- [29] Mulligan C.N.: Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut., 2005, **133**, 183-198.
- [30] Mulligan C.N.: Recent advances in the environmental application of biosurfactants. Curr. Opin. Colloid & Int. Sci., 2009, **14**, 372-378.
- [31] Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Ravi T.K., Sivachidambaram P.: Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Curr. Sci., 2008, **94**, 736-747.

- [32] Nagao A., Kito M.: Synthesis of O-Acyl-L-Homoserine by lipase. J. Am. Oil Chemists' Society 1989, **66**, 710-713.
- [33] Nitschke M., Costa S.G.V.A.O.: Biosurfactants in food industry. Trends Food Sci Tech., 2007, **18**, 252-259.
- [34] Nitschke M., Pastore G.: Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Bioresource Technol., 2006, **97**, 336-341.
- [35] Ohno A., Ano T., Shoda M.: Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. J. Ferment. Bioeng., 1995, **80** (5), 517-519.
- [36] Owsianiak M., Chrzanowski Ł., Szulc A., Staniewski J., Olszanowski A., Olejnik-Schmidt A., Heipieper H.J.: Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. Bioresource Technol., 2009, **100**, 1497-1500.
- [37] Pacwa-Płociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S.: Environmental Application of Biosurfactants: Recent Advances. Int. J. Mol. Sci. 2011, **12**, 633-654.
- [38] Paraszkievicz K., Długoński J.: Wykorzystanie drobnoustrojowych surfaktantów do usuwania metali ciężkich z gleby. Biotechnologia, 2007, **2** (77), 81-94.
- [39] Patil D., Leonardis A., Nag A.: Synthesis of biosurfactants from natural resources. J. Food Biochem., 2011, **35**, 747-758.
- [40] Ron E.Z., Rosenberg E.: Natural roles of biosurfactants. Environ. Microbiol., 2001, **3**, 229-236.
- [41] Rosenberg E., Ron E.Z.: High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, **52**, 154-162.
- [42] Saharan B.S., Sahu R.K., Sharma D.: A review of biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. Genet. Eng. Biotechnol. J., 2011, **7**, 1-38.
- [43] Sarney D.B., Vulfson E.N.: Application of enzymes to the synthesis of surfactants. Focus, 1995, **13**, 164-172.
- [44] Singh P., Cameotra S.S.: Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends Biotechnol., 2004, **22** (3), 142-146.
- [45] Singh A., Hamme J.D., Ward O.P.: Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnol. Adv., 2007, **25**, 99-121.
- [46] Stuver O., Hommel R., Haferburg D., Kieber H.P.: Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. J. Biotechnol., 1987, **6**, 259-269.
- [47] Sullivan E.R.: Molecular genetics of biosurfactant production. Curr. Opin. Biotech., 1998, **9**, 263-269.
- [48] Sutthivanitchakul, B., Thaniyavorn J., Thaniyavarn S.: Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* F2.2. Thai J. Biotechnol., 1999, **1**, 46-53.
- [49] Šabeder S., Habulin M., Knez Z.: Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. J. Food Engin., 2006, **77**, 880-886.
- [50] Tarahomjoo S., Alemzadeh I.: Surfactant production by an enzymatic method. Enzyme Microb Tech., 2003, **33**, 33-37.
- [51] Van-Hamme J.D., Singh A., Ward O.P.: Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol. Adv., 2006, **24**: 604-620.
- [52] Ward O.P., Fang J., Li Z.: Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. Enzyme Microb. Tech., 1997, **20**, 52-56.
- [53] Wyrwas B., Chrzanowski Ł., Ławniczak Ł., Szulc A., Cyplik P., Białas W., Szymański A., Holderna-Odachowska A. Utilization of Tryton X-100 and polyethylene glycols during surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel. J. Hazard. Mater. 2011, **197**, 97-103.

- [54] Xu Q., Nakajima M., Liu Z., Shiina T.: Soybean-based surfactants and their applications. 2010, Chapter 20, 342-364 (online).
- [55] Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L.: Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermo-tolerant and halo-tolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Environ. Microbiol., 1995, **61**, 1706-1713.
- [56] Yan Y., Bornscheuer U.T., Cao L., Schmid R.D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters: Removal of byproducts by azeotropic distillation. Enzyme Microb Tech., 1999, **25**, 725-728.
- [57] Yoo I.S., Park S.J., Yoon H.H.: Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. J. Ind. Eng. Chem., 2007, **1 (13)**, 1-6.
- [58] Zhang I., Sun J., Hao Y., Zhu J., Chu J., Wei D., Shen Y.: Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. J. Ind. Microbial. Biotechnol., 2010, **37 (8)**, 857-862.

BIOTECHNOLOGICAL SYNTHESIS OF SURFACE ACTIVE COMPOUNDS AND EXAMPLES OF THEIR PRACTICAL APPLICATIONS

S u m m a r y

Surfactants, i.e. surface active agents, are an important group of chemical compounds that are studied and applied to industry and in chemical laboratories. Presently, a tendency is observed to produce surfactants from renewable and biodegradable sources. Bio-surfactants constitute such a group; they, compared to synthetic surfactants, show a lower toxicity and a higher environmental compatibility. Bio-surfactants can be produced either using a biotransformation method or a fermentation process with the use of bacteria, yeast, or fungi.

In this paper, the bio-surfactants are briefly described, the bio-technological methods of their synthesis are depicted, and, also, there are shown some selected trends in practical applications of surface active compounds.

Key words: bio-surfactants, surface active compounds, biosynthesis, micro-organisms, application of bio-surfactants ☒

ANDRZEJ CENDROWSKI, STANISŁAW KALISZ, MARTA MITEK

WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE OWOCÓW RÓŻY W PRZETWÓRSTWIE SPOŻYWCZYM

Streszczenie

Rodzina różowatych obejmuje liczne gatunki krzewów zarówno dziko rosnących, jak i uprawnych. Dzika róża (*Rosa canina*) jest surowcem stanowiącym źródło wielu cennych substancji. Występująca w jej owocach naturalna witamina C jest lepiej przyswajalna przez organizm ludzki i 3÷5-krotnie bardziej aktywna w porównaniu z syntetycznym związkiem. Jedną z najbardziej wartościowych odmian róży jest polska odmiana uprawna 'Konstancin', która charakteryzuje się dużą zawartością witaminy C i bardzo dobrą plennością.

Do przetwórstwa nadają się zarówno owoce, jak i płatki róż. Przetwory z róży wykazują dużą, potwierdzoną w badaniach wartość odżywczą i zdrowotną, która jest wynikiem obecności składników biologicznie aktywnych, działających synergistycznie w organizmie ludzkim.

Słowa kluczowe: dzika róża (*Rosa canina*), witamina C, aktywność przeciwutleniająca, galaktolipid

Wprowadzenie

Obserwuje się wzrost zainteresowania roślinami, takimi jak: rokitnik, dereń właściwy czy róża. Przed laty surowce te były wykorzystywane, jednak później zniknęły z powszechnego użycia. Okazuje się, że mogą one stanowić źródło wielu cennych substancji. Szczególnym surowcem jest róża.

Lekarze greccy, jak Dioskurides i Galen bardziej cenili róże dziko rosnące aniżeli uprawiane w ogrodach. Wykorzystywali oni przeważnie różę francuską (*Rosa gallica*) i różę stulistną (*Rosa centifolia*) oraz różę dziką (*Rosa canina*). W wiekach średnich róża była ważnym, podstawowym składnikiem tzw. rosee – ulubionej potrawy tamtej epoki uzyskiwanej z kapłona, migdałów, szafranu, cukru oraz płatków róży, które nadawały jej aromat [19].

Charakterystyka gatunkowa róż

Rodzina różowatych (*Rosaceae*) obejmuje bardzo liczne gatunki krzewów i drzew owocowych, ozdobnych, dziko rosnących i uprawianych do celów dekoracyjnych i leczniczych. Spośród ponad 25 gatunków róż występujących w Polsce w stanie dzikim do zakrzewiania wybrano róże: dziką, pomarszczoną, rdzawą i girlandową. Róża pomarszczona (*Rosa rugosa*) rozpowszechniona jest głównie w zachodniej i południowo-zachodniej Polsce. Róża rdzawa (*Rosa rubiginosa*) jest charakterystyczna zarówno dla terenów nizinnych, jak i górzystych. Róża girlandowa (*Rosa cinnamomea*) występuje w stanie dzikim na terenach nizinnych. Róża dzika (*Rosa canina*) jest najpopularniejszym i najbardziej znanym z gatunków róż występujących w Polsce. Spotykana jest w zaroślach, na obrzeżach lasów, zrębach leśnych, miedzach, przy drogach. Występuje w naturalnych siedliskach prawie całej Europy, Azji Mniejszej i Północnej Afryki [7].

To, co potocznie nazywa się owocem róży, w rzeczywistości jest jej owocem rzekomym (pozornym), zwanym też pseudoowocem. Dopiero pod barwną, mięsistą okrywą znajdują się twarde orzeszki stanowiące owoce właściwe. Do celów przetwórczych używa się okryw owoców szupinkowych, czyli pseudoowocni. Analizy składu chemicznego pseudoowoców potwierdzają ich wyjątkową wartość dietetyczną, chemoprewencyjną i leczniczą, co wzbudza duże zainteresowanie tym surowcem [19].

Surowcem do przetwarzania mogą być owoce rzekome różnych gatunków róży. Poza *Rosa canina* L. surowca mogą dostarczać także inne gatunki róż, np. *Rosa cinnamomea* L., *Rosa gallica* L., *Rosa centifolia* L. oraz ich mieszańce. Dojrzałe owoce zbierane są późną jesienią – od września do zimy – ze stanu naturalnego i suszone początkowo w temp. 50 - 60 °C, a następnie w 40 - 50 °C. Niekiedy owoce poddaje się tak zwanemu drażnieniu przepoławiając szupinki róży podłużnie i usuwając znajdujące się wewnątrz drobne owoce (orzeszki) i włoski, otrzymując owoc róży bez nasion (*Fructus Rosae sine semine*) [15].

Róża dzika (*Rosa canina*) jest krzewem ciernistym o wysokości do 3 m. Roślina ta kwitnie w czerwcu. Kwiaty dzikiej róży rosną pojedynczo lub zebrane są po kilka. Owoce mają kształt wrzecionowaty lub kulisto-jajowaty i osiągają około 3 cm długości i 1,5 cm średnicy. Są barwy pomarańczowej lub pomarańczowoczerwonej z resztkami kielicha na szczycie. Owocostany są twarde, błyszczące i przeważnie pomarszczone [7, 15].

Róża girlandowa (*Rosa cinnamomea*) jest gatunkiem polimorficznym, występującym głównie na Ukrainie, w Rosji, w Kazachstanie, na łąkach, w zaroślach, wąwozach, na porębach, na skrajach lasów i w zalewanych dolinach rzecznych. Jest to krzew o wysokości 1 - 2 m. Pędy dolne i pędy niekwitnące mają proste, cienkie, gęsto rozmieszczone kolce. Owoce rzekome, powstałe z silnie rozrośniętego dna kwiatowego i zalążni, są kuliste lub wydłużone, nieduże, pomarańczowe, pomarańczowoczerwone

lub czerwone, mięsiste, z dużą ilością nasion i bardzo ostrych, szczeciniastych włosków. Róża girlandowa kwitnie od maja do końca lipca, a owoce dojrzewają w sierpniu - wrześniu i pozostają na pędach do zimy. Roślina zaczyna owocować w 3. roku życia [7].

Zależnie od gatunku i odmiany róż proporcje zawartości poszczególnych składników, a tym samym skład chemiczny może być różny. Najwięcej cukrów i części nierozpuszczalnych zawiera róża rdzawa (*Rosa rubiginosa*). Bogactwem kwasów i składników polifenolowych charakteryzują się owoce róży dzikiej (*Rosa canina*), w białka bogate są owoce róży girlandowej (*Rosa cinnanomea*), zaś najwięcej tłuszczu zawierają owoce róży sinej (*Rosa dumalis*) [6, 21, 29].

Jedną z najbardziej wartościowych odmian jest dojrzewająca już od połowy lipca polska odmiana róży mieszańcowej 'Konstancin' [17, 19]. Odmiana 'Konstancin' uzyskana została w wyniku hybrydyzacji dwóch gatunków: wysokopiennej, wielkoowocowej, wywodzącej się z Dalekiego Wschodu róży pomarszczonej *Rosa rugosa* z wywodzącą się z Azji, mało plenną, o małych owocach, lecz 6-krotnie zasobniejszą w witaminę C, różą *Rosa beggeriana*, [11, 17, 29]. Jej wysoka wartość witaminowa, około 3000 - 3500 mg witaminy C w 100 g świeżej masy, przy zachowaniu dobrej plenności pożądana jest przez przemysł. Z jednego hektara uprawy róży odmiany 'Konstancin' można uzyskać od 43 do 78 kg witaminy C [29]. Ponadto, jak podaje Milewski [17], róża mieszańcowa 'Konstancin' charakteryzuje się wyrównanym składem chemicznym w odróżnieniu od róż występujących w stanie naturalnym, które cechuje w obrębie gatunku duża zmienność witaminy C. Owoce odmiany 'Konstancin' zawierają także ponad 53 % więcej karotenoidów w porównaniu z różą gęstokolczastą (*Rosa pimpinellifolia*) [1].

Skład chemiczny owoców róży

Pseudoowoce róży stanowią cenne źródło witaminy C i zależnie od gatunku, odmiany, terminu zbioru, postępowania pozbiorczego, sposobu suszenia i czasu przechowywania mogą znacznie różnić się w tym względzie. W przypadku surowca przejrzalego zawartość witaminy C w surowcu może być o 40 % mniejsza, w porównaniu z surowcem pozyskanym w fazie dojrzałości zbiorczej [11]. Zawartość witaminy C w pseudoowocach róży może kształtować się w szerokim zakresie od 300 do 4000 mg% [6], najczęściej podawana jest wartość od 840 do 3500 mg% [19, 29]. Zależnie od gatunku i odmiany zawartość witaminy C może dochodzić do 6800 mg%, a nawet 12000 mg% [3, 8, 13, 15, 19]. Oprócz kwasu L-askorbinowego (KA) w owocach znajduje się kwas dehydro-L-askorbinowy (DHA), który jest produktem utleniania kwasu L-askorbinowego. W miarę przechowywania owoców zawartość KA szybko się zmniejsza, a zawartość kwasu dehydroaskorbinowego ulega zwiększeniu [15]. Zawartość witaminy C w owocach róży jest 10 razy większa niż w owocach czarnej po-

rzeczki, a 100 razy większa niż w jabłkach. Trzy owoce dzikiej róży mogą pokryć dzienne zapotrzebowanie organizmu na witaminę C. Dziś praktycznie nie izoluje się witaminy C z roślin i powszechnie stosuje się jej syntetyczny odpowiednik, ale lepiej przyswajalna jest witamina C pozyskana z surowców naturalnych [19].

W owocach dzikiej róży można wyróżnić ponad 130 związków. Oprócz witaminy C obfitują one w karotenoidy (m.in. beta-karoten, likopen, ksantofile) i różne związki z grupy flawonoidów, w tym m.in. astragalinę, izokwercetynę i tylirozyd oraz proantocyjanidyny. W surowcu tym stwierdzono także zawartość witaminy E i K oraz B₁, B₂ i B₃ (PP), B₆ i olejków eterycznych (ok. 0,03 %) oraz pektyn (do 4 %). Owoce róży zawierają również kwasy organiczne (jabłkowy i cytrynowy do 2 %), cukry (do 4 %) [2, 4, 6, 7, 9, 10, 15, 19, 22]. Są także źródłem składników mineralnych, zarówno makroelementów (P, K, Ca, Mg), jak i mikroelementów, (Fe, Cu, Mn, Zn) [6]. Zawarte w owocach karotenoidy są bardzo cenione jako naturalne barwniki spożywcze [5].

Inne składniki owoców róży o właściwościach prozdrowotnych

Dzięki dużej zawartości substancji bioaktywnych przetwory z róży wykazują wysoką pojemność przeciwutleniającą, wynoszącą do 1025 µmoli troloxu/ml w przypadku soku z owoców róży mieszańcowej 'Konstancin' [11]. Przykładowo, pojemność przeciwutleniająca nektarów z czarnej porzeczki wynosi 6,8 - 12,0 µmoli troloxu/ml, soków jabłkowych naturalnie mętnych (z jabłek odmiany Brettacher) 2,1 - 8,4 µmoli troloxu/ml, zaś soków jabłkowych odtwarzanych z koncentratu tylko 1,4 - 2,5 µmoli troloxu/ml. Sok z malin wykazuje pojemność przeciwutleniającą wynoszącą 11,9 µmoli troloxu/ml [16].

W przypadku soków zagęszczonych z owoców róży, zależnie od metody ich otrzymywania, obserwuje się różnice w pojemności przeciwutleniającej. Koncentraty soku, otrzymane metodą zagęszczania próżniowego, wykazują 26 % właściwości przeciwutleniających soku użytego do ich otrzymania. Jednocześnie koncentraty otrzymywane metodą kriokoncentracji zachowują 30 % właściwości przeciwutleniających [14].

Istotnym odkryciem, związanym z wykorzystaniem owoców róży w farmacji, było wyizolowanie aktywnej substancji – galaktolipidu, GOPO ((2S)-1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z)-oktadeka-trienilo-3-O-β-D-galaktozyloglicerol]) odpowiedzialnego za działanie przeciwzapalne. Działanie to wynika z tego, że następuje hamowanie chemotaksji leukocytów, obniżenie stężenia białek ostrej fazy (CRP) oraz zmniejszenie stężenia kreatyniny w osoczu [21, 23, 30]. Przeprowadzone badania dowodzą, że u pacjentów cierpiących na przewlekłe stany zapalne kości i stawów, po przyjęciu sproszkowanych owoców róży nastąpiło polepszenie ruchomości stawów, a także złagodzenie bólu. Symptomy ostrego zwyrodnienia stawów ustąpiły u około 65 % badanej populacji [27]. Ponadto wykazano, że obecność witamin (w tym wit. C) oraz flawonoidów wspomaga działanie galaktolipidu [19].

Jak wykazały badania, występująca w pseudoowocach róży naturalna witamina C, w porównaniu z syntetyczną, jest lepiej przyswajalna przez organizm ludzki i 3 ÷ 5-krotnie bardziej aktywna od niej [19]. Syntetyczną witaminę C organizm wykorzystuje jedynie w 30 - 40 % [10]. Naturalna witamina C jest lepiej wchłaniana z przewodu pokarmowego i skuteczniejsza w działaniu, bo szybciej osiąga i dłużej utrzymuje niezbędne stężenie w organizmie. W środowisku naturalnym występuje wraz z flawonoidami, fenolokwasami i karotenoidami, co ją stabilizuje oraz wytwarza efekt synergistyczny [12, 19]. Ogromne znaczenie w tym zakresie ma obecność antocyjanów. Udowodniono, że ich niewielki dodatek rzędu 4 - 6 μmola do roztworu chroni kwas askorbinowy przed utlenieniem nawet podczas inkubacji w wysokiej temperaturze [25]. Witamina C obecna w dzikiej róży hamuje tworzenie się związków chemicznych odpowiedzialnych za procesy rakotwórcze, np. nitrozoamin.

Róża jako surowiec dla przemysłu spożywczego

Otrzymane z udziałem dzikiej róży produkty: soki, nektary, syropy, konfitury i dżemy polecane są zarówno ze względu na cechy sensoryczne, jak i właściwości prozdrowotne. Do celów spożywczych nadają się zarówno pseudoowoce, jak i płatki róż. Konfitury i nadzienia cukiernicze z płatków róż cenione są z uwagi na specyficzne cechy sensoryczne. Świadczy o tym między innymi fakt, że przy ograniczonej produkcji towarowej tego surowca w Polsce i wysokim zapotrzebowaniu przez konsumentów oraz ze względów ekonomicznych produkuje się marmolady i nadzienia aromatyzowane o zapachu róży, które jednak mają zdecydowanie uboższy skład chemiczny.

Owoce dzikiej róży to doskonały surowiec do witaminizowania produktów mniej zasobnych w witaminę C. Z uwagi na naturalne pochodzenie, taka forma witaminy, jako dodatek do żywności, znajduje wyższą akceptowalność konsumencką niż jej syntetyczny odpowiednik. Badania naukowe wykazały, że wprowadzanie produktów z dzikiej róży, jako komponentu innych produktów stanowi między innymi skuteczny sposób zwiększania zawartości biologicznie czynnych substancji w sokach odtwarzanych z koncentratów. Przykładowo, soki jabłkowe wzbogacane 25 % dodatkiem nektaru różanego po 4 miesiącach przechowywania odznaczały się 3-krotnie większą zawartością polifenoli i aktywnością przeciwutleniającą oraz 17-krotnie większą zawartością witaminy C niż soki kontrolne. Jest to tym istotniejsze, że soki jabłkowe odtwarzane z koncentratów pozbawione są w procesie technologicznym zarówno witaminy C, jak i ponad 90 % związków polifenolowych [12].

Herbatki z owoców dzikiej róży zawierają dużo związków polifenolowych, których ilość może dochodzić do ponad 51 mg/100 ml naparu. Jest ona ściśle skorelowana z ich wysoką aktywnością przeciwutleniającą [26].

Z pseudoowoców róży można też produkować wina, lecz podczas procesu fermentacji witamina C ulega częściowemu utlenieniu. Rozdrobnione i dosłodzone owoce

róży, z dodatkiem soku z cytryny, mogą służyć do produkcji sosów do mięs. Pachnące płatki róży dodaje się do sałatek, szarlotek i placków z wiśniami. Ponadto płatki stosowane są do aromatyzowania syropów, octu, napojów i słodczy. W formie kandyzowanej płatki róż używane są do dekoracji wyrobów cukierniczych. Różane pączki można także marynować. Wodą różaną aromatyzuje się cukierki i napoje, a w celu zwiększenia wartości prozdrowotnej niektórych potraw stosuje się posypkę witaminową z róży.

Działanie prozdrowotne produktów z róży

Przetwory z dzikiej róży wykazują działanie wzmacniające, wynikające z obecności składników biologicznie aktywnych, które działają synergistycznie w organizmie ludzkim. Przykładowo w obecności bioflawonoidów działanie fizjologiczne kwasu askorbinowego wzrasta od 50 do 400 % [12, 19]. Na bazie ekstraktów z tych owoców wytwarzane są między innymi preparaty wzmacniające i zalecane w stanach rekonwalescencji, stresu, zmęczenia, stanach ogólnego osłabienia, chorobach infekcyjnych oraz schorzeniach powiązanych z ograniczonym przyswajaniem witaminy C [10]. Zaleca się także spożywanie przetworów z dzikiej róży kobietom w ciąży i w okresie karmienia piersią [10, 28]. Owoce rzekome róży znajdują szerokie zastosowanie w pediatrii i geriatrii [19]. Wykazano, że wyciąg metanolowy z pseudoowoców *R. canina* działa hamująco na rozwój wirusów [18, 19]. Badając metanolowe ekstrakty z owoców właściwych *R. canina* wykazano, że hamują one wzrost szczepów bakterii *Escherichia coli*, a ekstrakty z pseudoowocni wykazują właściwości przeciwgrzybicze w stosunku do *Candida albicans*. W przypadku ekstraktów etanolowego i eterowego z owoców *R. canina* L. wykazano właściwości cytotoksyczne [19]. Wyciągi z owoców róży działają również nieznacznie żółciopędnie i moczopędnie, co związane jest prawdopodobnie z obecnością flawonoidów. Wyciągi z róży i wytwarzane z nich preparaty podawane są zapobiegawczo, jako główny lek w objawach gnilca (szkorbutu). Poza tym stosuje się je pomocniczo w biegunkach, zapaleniu żołądka i jelit, chorobie wrzodowej, niezycie błony śluzowej przewodu pokarmowego, niedokrwistości, chorobach zakaźnych, oparzeniach, reumatyzmie, zapaleniu wątroby [15]. Olejek różany stosuje się jako dodatek poprawiający smak i zapach leków oraz pobudzający łaknienie. Do ważniejszych właściwości olejku różanego należy zaliczyć działanie moczopędne, uspokajające, przeciwmigrenowe, antyseptyczne i przeciwbakteryjne [15, 20, 24].

Podsumowanie

Reasumując, można stwierdzić, że dzika róża stanowi cenny surowiec w przemyśle spożywczym. Uzyskiwane z niej produkty charakteryzują się wysoką, naukowo potwierdzoną wartością zdrowotną. Jednocześnie z uwagi na naturalne pochodzenie

zyskują dużą akceptację konsumencką i niejednokrotnie przewyższają syntetyczne odpowiedniki między innymi z uwagi na ich synergistyczne działanie.

Literatura

- [1] Babis A., Kucharska A.: Przydatność owoców *Rosa spinosissima* i *Rosa hybrida* do produkcji wysokowitaminowych soków mętnych. Biul. Wydz. Farm. AMW, 2004, **3**, 18-24.
- [2] Böhm V, Fröhlich K, Bitsch R.: Rosehip – a "new" source of lycopene? Moll. Asp. Med., 2003, **24**, 385-389.
- [3] Celik F., Kazankaya A., Ercisli S.: Fruit characteristics of some selected promising rose hip (*Rosa spp.*) genotypes from Van region of Turkey. Afr. J. Agric. Res., 2009, **4** (3), 236-240.
- [4] Cmar I, Colakoglu: Potential health benefits of rose hip products. Acta Hort., 2005, **690**, 253-7.
- [5] Demir F., Özcan M.: Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in turkey. J. Food Eng., 2001, **47**, 333-336.
- [6] Ercisli S.: Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa spp.*) species. Food Chem., 2007, **104**, 1379-1384.
- [7] Grochowski W.: Jadalne owoce leśne, PWRiL, Warszawa 1983, ss. 96-110.
- [8] Halasova J., Jicinska D., Hvozdkova E.: Content of ascorbic acid in some species of the genus *Rosa* L. Farm. Obzor., 1985, **54** (4), 169-175.
- [9] Hvattum E.: Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and diode – array detection. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2002, **16**, 655-62.
- [10] Jaroniewski W.: Owoce róży cennym surowcem witaminowym. Wiadomości Zielarskie, 1992, **8**, 1-2.
- [11] Kalisz S., Kalisz B., Dziubek P.: Właściwości przeciwutleniające soków i syropów z róży. Farm. Pol. 2003, **LIX. Supl.**, 30-34.
- [12] Kalisz S., Mitek M.: Wpływ dodatku nektaru z dzikiej róży na właściwości przeciwutleniające i zawartość składników bioaktywnych w mieszanych sokach różano-jabłkowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2007, **5** (54), 194-202.
- [13] Kazaz S., Baydar H., Erbas S.: Variations in chemical compositions of *Rosa damascena* Mill. And *Rosa canina* L. fruits. Czech J. Food Sci. 2009, **27** (3), 178-184.
- [14] Kobus M., Włodarczyk M., Pogorzelski E., Dziugan P., Laskowska J.: Koncentraty z dzikiej róży (*Rosa rugosa*) otrzymane różnymi metodami. Folia Univ. Agric. Stein. Scientia Alimentaria, 2005, **246** (4), 205-216.
- [15] Kohlmünzer S.: Farmakognozja. Wyd. Lek PZWL, Warszawa 2000, ss. 536-537.
- [16] Mitek M., Kalisz S.: Współczesne poglądy na właściwości przeciwutleniające soków owocowych i warzywnych. Przem. Spoż., 2003, **5** (57), 37-39.
- [17] Milewski J.: Hybrydyzacja róż owocodajnych w celu uzyskania wysokiej zawartości witaminy C w owocniach. Prace Inst. Bad. Leśnictwa, 1974, **474**, 128-172.
- [18] Mouhajir F., Hudson J.B., Rejdali M.: Towers G.H.N.: Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants by Berber peoples of Morocco. Pharm. Biol. 2001, **39** (5), 364-374.
- [19] Nowak R.: Badania fitochemiczne wybranych gatunków z rodzaju *Rosa* L. Analiza biologicznie aktywnych składników. Wyd. AM w Lublinie, Lublin 2006.
- [20] Nowak R.: Chemical composition of hips essential oil of some *Rosa* L. species. Z. Naturforsch., 2005, **60c**, 369-78.
- [21] Nowak R.: Fatty acid composition in fruits of wild rose species. Acta Soc. Bot. Pol. 2005, **74**, 229-35.

- [22] Özcan M.: Nutrient composition of Rose (*Rosa canina* L.) seed and oils. J. Med. Food, 2002, **5**, 137-40.
- [23] Rein E., Kharazmi A., Winther K.A.: Herbal remedy, Hyben Vital (stand. Powder of a subspecies of *Rosa canina* fruits), reduces pain and improves general wellbeing in patients with osteoarthritis – a double-blind, placebo controlled, randomized trial. Phytomedicine, 2004, **11**, 383-91.
- [24] Salch A.: Chemical composition of *Rosa hybrida* oil as a function of location and storage in Saudi Arabia. Am-Euras J. Sust. Agric., 2009, **3**, 24-8.
- [25] Sarma A.D., Sreelakshmi Y., Sharma R.: Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. Phytochem., 1997, **45** (4), 671-674.
- [26] Szlachta M., Małecka M.: Właściwości przeciwutleniające herbatek owocowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2008, **1** (56), 96-102.
- [27] Warholm O., Skaar S., Hedman E.: The effects of a standardized herbal remedy made from a subtype of *Rosa canina* in patients with osteoarthritis: a double-blind, randomized, placebo – controlled clinical trial. Curr. Ther. Res., 2003, **64**, 21-31.
- [28] Winter K., Rein E., Kharazmi A.: The anti-inflammatory properties of rose-hip. Inflammopharmacol., 1999, **7**, 63-8.
- [29] Wiśniewska-Grzeszkiewicz H.: Róże owocowe. Hasło Ogrodnicze, 1999, **10**, 26-27.
- [30] Xu H.X., Lee S.F.: Activity of plant flavonoids against antibiotic – resistant bacteria. Phytother. Res., 2001, **15**, 39-43.

PROPERTIES AND APPLICATION OF ROSE HIPS IN FOOD PROCESSING

S u m m a r y

Rosaceae, a rose family, includes numerous genera of shrubs both those wild-growing and those cultivated. The Wild Rose species (*Rosa canina*) is a raw material, which constitutes a source of many valuable substances. Compared to the synthetic vitamin C, the natural vitamin C contained in wild rose hips is better absorbed by human body and 3 to 5 times more active than the synthetic one. One of the most valuable rose varieties is the Polish 'Konstancin' agricultural rose variety that is characterized by a high content of vitamin C and very high fecundity.

Both the rose hips and the rose flower petals are valuable raw materials used in the food processing industry. Conserves made from rose show a high nutritional and pro-health value verified by many researches and attributed to the occurrence of biologically active components therein that act synergistically in human organisms.

Key words: wild rose (*Rosa canina*), vitamin C, antioxidant activity, galactolipid ☒

JAROSŁAWA RUTKOWSKA, AGATA ADAMSKA, MAGDALENA PIELAT,
MAŁGORZATA BIAŁEK

PORÓWNANIE SKŁADU I WŁAŚCIWOŚCI OWOCÓW DZIKIEJ RÓŻY (*ROSA RUGOSA*) UTRWALANYCH METODAMI LIOFILIZACJI I SUSZENIA KONWENCJONALNEGO

S t r e s z c z e n i e

W pracy analizowano wpływ procesu suszenia konwencjonalnego oraz liofilizacji na zawartość i właściwości przeciwutleniające wybranych składników bioaktywnych w owocach dzikiej róży (*Rosa rugosa*). Suszenie konwencjonalne (owiewowe) prowadzono w temp. 72 ± 1 °C w ciągu 37 h, liofilizację w temp. 33 °C w ciągu 22,5 h (z uprzednim mrożeniem w atmosferze azotu w temp. -20 °C). Suszone owoce charakteryzowały się małą zawartością frakcji lipidowej (0,67 i 0,88 %), w której oznaczono 19 kwasów tłuszczowych (KT). Ilościowo dominującymi KT były: C18:2n⁻⁷, C18:3n⁻⁷ oraz C16:0. Największe różnice stwierdzono pod względem zawartości PUFA: 56,55 g/100 g w liofilizacie i 48,35 g/100 g w suszu konwencjonalnym. Pod względem zawartości kwasu C18:3n⁻⁷ w suszu liofilizowanym było go aż o 16 % więcej niż w suszu konwencjonalnym. Zarówno liofilizat, jak i susz tradycyjny zawierały cenne karotenoidy (likopen, β -karoten, ζ karoten, luteina, zeaksantyna, rubiksantyna, β -kryptoksantyna). Mniejsza zawartość likopenu i rubiksantyny w suszu konwencjonalnym spowodowana była wrażliwością tych związków na podwyższoną temperaturę, którą warunkuje obecność wiązań nienasyconych. Niezależnie od zastosowanej metody suszenia w owocach *Rosa rugosa* oznaczono dużą zawartość związków polifenolowych: w liofilizacie 245,5 mg GAE/g s.m., w suszu konwencjonalnym 224,55 mg GAE/g s.m. Większą zdolność neutralizacji wolnego rodnika DPPH, wyrażoną jako procent inhibicji, stwierdzono w suszu otrzymanym poprzez liofilizację (średnio 72 %), natomiast w suszu konwencjonalnym wskaźnik inhibicji był niższy i wynosił średnio 49 %.

Słowa kluczowe: owoce róży *Rosa rugosa*, suszenie, karotenoidy, kwasy tłuszczowe, polifenole, DPPH

Wprowadzenie

Rosa rugosa, znana jako róża pomarszczona, należy do najbardziej wartościowych pod względem wartości odżywczej przedstawicieli rodziny różowatych (*Rosa-*

ceae), występujących w Polsce [17]. W stanie dzikim krzewy *Rosa rugosa* występują na różnych terenach, wykazując odporność na trudne warunki środowiska (słabe gleby, ograniczony dostęp wody) [4]. Jedynym wymaganiem tych roślin są nasłonecznione stanowiska. Uprawa dzikich róż nie jest możliwa jedynie na glebach kwaśnych i terenach podmokłych [23].

Owoce dzikiej róży z rodzaju *Rosa* L., do którego należą gatunki *Rosa canina* i *Rosa rugosa* charakteryzuje duża zawartość różnorodnych związków biologicznie aktywnych. Spośród wszystkich surowców roślinnych naszej strefy klimatycznej owoce dzikiej róży zawierają najwięcej witaminy C, związku znanego z właściwości przeciwutleniających [1, 5, 9]. Skład witaminowy dopełniają także tokoferole i karotenoidy. Owoce tych gatunków stanowią również znaczne źródło takich makroelementów, jak: P, K, Ca, Mg [1, 4, 9]. Owoce *Rosa canina* stanowią też cenne źródło cukrów prostych (fruktozy, glukozy, trehalozy) oraz wielocukrów – pektyn [1]. Inne związki polarne występujące w owocach gatunku *Rosa rugosa* to m.in. kwasy fenolowe (galusowy i genistynowy) wykazujące właściwości przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe [7, 15]. Ze względu na niezwykle bogaty skład, owoce dzikiej róży wykorzystywane są w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, w ziołolecznictwie oraz aromaterapii. W ziołolecznictwie stosowane są w schorzeniach wątroby i pęcherzyka żółciowego, chorobach nerek, przeziębieniach, nadkwasocie i chorobie wrzodowej [8]. Na polskim rynku farmaceutycznym są preparaty zalecane w leczeniu serca, nadciśnienia i niedokrwistości. Odkryciem ostatnich lat jest występujący w owocach dzikiej róży specyficzny galaktolipid (nazywany GOPO) wykazujący silne działanie przeciwzapalne i będący niezwykle skutecznym w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów [12]. Do celów spożywczych z owoców dzikiej róży produkuje się dżemy, soki, herbaty, wino, a nawet ocet. Stanowią także dodatek do deserów oraz żywności specjalnego przeznaczenia [6].

Wykorzystanie technologiczne owoców dzikiej róży jest ograniczone przez ich małą trwałość. Zebrane w odpowiednim stadium dojrzałości muszą być w niedługim czasie poddane zabiegom utrwalającym. Suszenie konwencjonalne jest powszechną metodą utrwalania owoców dzikiej róży rodzaju *Rosa* L. Mając na uwadze podatność związków bioaktywnych występujących w dzikiej róży na zmiany zachodzące podczas przetwarzania, celowe jest określenie wpływu procesu suszenia na jakość surowca.

Celem pracy było określenie wpływu procesu suszenia: konwencjonalnego i liofilizacji na zawartość wybranych składników bioaktywnych w owocach róży *Rosa rugosa* i ich właściwości przeciwutleniające.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły owoce róży gatunku *Rosa rugosa*, dziko rosnącej na wybrzeżu Morza Bałtyckiego. Owoce zbierano w pierwszej połowie września 2010 r.

w fazie dojrzałości zbiorczej. Z owoców rzekomych usuwano nasiona, następnie miąższ poddawano procesom utrwalania. Część surowca suszono metodą liofilizacji, stosując urządzenie: typ Ralpa 1-4 firmy Martin Christ (Niemcy), a drugą część poddano suszeniu konwencjonalnemu w laboratoryjnej suszarce owiewowej typu KC 100/200. Warunki suszenia owiewowego: temp. 72 ± 1 °C, czas 37 h. W przypadku liofilizacji owoce najpierw zamrażano w atmosferze azotu do temp. -20 °C, a następnie prowadzono proces suszenia z wykorzystaniem sublimacji w temp. 33 °C w ciągu 22,5 h. W obu procesach suszenia wykonano po 5 prób. Wysuszony materiał rozdrabniano, wykorzystując młynek laboratoryjny. W otrzymanym materiale badawczym oznaczano podstawowe wskaźniki jakościowe procesu suszenia (wydajność, zawartość: wody, tłuszczu i suchej masy), skład kwasów tłuszczowych (KT), skład karotenoidów, zawartość związków polifenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą.

Lipidy z suszów ekstrahowano metodą Folcha, stosując mieszaninę metanol : chloroform (1 : 2 v/v). Następnie lipidy poddawano reakcji transmetylacji w obecności stężonego H_2SO_4 . Otrzymane estry metylowe poddawano analizie GC [20] w celu zbadania składu KT, stosując aparat Agilent 6890N z wykorzystaniem detektora FID. Identyfikację jakościową i ilościową składu KT prowadzono z zastosowaniem wzorca FAME Supelco 37.

Ekstrakcję lipidów przeznaczonych do oznaczenia związków karotenoidowych w suszach prowadzono metodą Soxhleta. Następnie lipidy przeprowadzano w mydła, które rozpuszczano w 50 % roztworze alkoholu etylowego. Proces zmydlania trwał około 1 h. Trzykrotną ekstrakcję substancji niezmydlających przeprowadzono z zastosowaniem heksanu. Ekstrakty przesączano przez bezwodny siarczan sodu, w celu usunięcia pozostałości wody. Heksan odparowywano z użyciem ciekłego azotu, do uzyskania stałej masy kolby zawierającej substancję, które nie uległy zmydleniu (karotenoidy). Do oznaczenia składu karotenoidowego zastosowano technikę HPLC z detektorem UV-Vis, stosując kolumnę Hydro-RP, Phenomenex Inc. (l = 25 cm, ID 4,5 mm, dp 4 µm). Rejestrację widm karotenoidów prowadzono przy długości fali $\lambda = 460$ nm. Skład fazy ruchomej i gradient wg Rutkowskiej i Stołyhwo [21].

Związki polifenolowe oznaczano metodą kolorymetryczną, stosując spektrofotometr UV-Vis Milton Roy z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteau'a (FC) wg Ercisli [5]. Procedura była następująca: polifenole ekstrahowano z suszu wodą dejonizowaną, do oznaczenia pobierano 0,3 ml ekstraktu, do którego dodawano 8,1 ml wody dejonizowanej, 6 ml 2 % Na_2CO_3 oraz 0,3 ml 50 % odczynnika FC (Sigma – Aldrich), roztwór odstawiano w ciemne miejsce na 30 min celem przereagowania, następnie absorbancję roztworu mierzono względem wody dejonizowanej przy długości fali $\lambda = 750$ nm. Zawartość polifenoli w badanych próbach określano na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej z użyciem kwasu galusowego.

Określenie właściwości przeciwutleniających suszów polegało na pomiarze zdolności do wygaszania wolnych rodników z zastosowaniem wolnego rodnika DPPH: 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (Sigma - Aldrich). Związek ten charakteryzuje się maksimum absorpcji przy $\lambda = 515$ nm oraz purpurowym zabarwieniem roztworów. Oznaczenie wykonywano wg Wenzig i wsp. [24]. W probówce umieszczano 2,5 ml etanolowego ekstraktu analizowanej próbki oraz 7,5 ml roztworu DPPH, następnie po 30 min od zainicjowania reakcji mierzono absorbancję. Zmierzono również absorbancję roztworu rodnika DPPH w etanolu (o stężeniu 100 μ mol) oraz próbki kontrolnej, zawierającej tylko etanolowy ekstrakt badanej próby. Wartości absorbancji badanej próbki korygowano o absorbancję próbki kontrolnej. Pomiary absorbancji prowadzono w spektrofotometrze firmy Milton Roy. Zdolność antyoksydantów występujących w analizowanej próbce do inhibicji reakcji utleniania obliczano z równania zaproponowanego przez Molyneux [14]:

$$\% \text{inhibicji} = (A_0 - A_{\text{średnia}} / A_0) \times 100$$

gdzie: $A_{\text{średnia}}$ – średnia wartość absorbancji badanego roztworu (analizowanej próbki) skorygowana o absorbancję próbki kontrolnej, A_0 – absorbancja roztworu rodnika DPPH.

Wyniki i dyskusja

Wydajność procesu suszenia owoców dzikiej róży *Rosa rugosa* w przypadku zastosowania metod: liofilizacji i suszenia konwencjonalnego była porównywalna i wynosiła odpowiednio: 23,89 i 24,11 %. Nie stwierdzono również istotnych różnic w zakresie pozostałych wskaźników jakościowych (tab. 1).

Tabela 1

Podstawowe wskaźniki jakościowe suszonych owoców dzikiej róży.
Basic qualitative indicators of dried rosehip fruits.

Wskaźnik jakościowy Qualitative indicator	Owoce suszone konwencjonalnie Conventionally dried fruits $\bar{x} \pm s / SD$ (n = 5)	Owoce liofilizowane Freeze-dried fruits $\bar{x} \pm s / SD$ (n = 5)
Wydajność procesu suszenia Yield of drying process [%]	24,11 $\pm$ 0,45	23,89 $\pm$ 0,94
Zawartość wody Water content [%]	1,85 $\pm$ 0,04	1,68 $\pm$ 0,03
Zawartość suchej masy Content of dry matter [%]	98,15 $\pm$ 2,78	98,32 $\pm$ 2,52
Zawartość tłuszczu Fat content [%]	0,67 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01

Susze otrzymane w wyniku obu procesów utrwalania różniły się zarówno barwą, jak i zapachem. W przypadku zastosowania liofilizacji stwierdzono jasnopomarańczową barwę i zapach suszu charakterystyczne dla świeżych owoców dzikiej róży. Natomiast susz uzyskany metodą suszenia konwencjonalnego charakteryzowała ciemniejsza barwa i bardziej intensywny zapach. Wpływ sposobu suszenia na zmiany barwy owoców stwierdzili we wcześniejszych pracach Bober i Oszmiański [2], którzy stwierdzili 8-krotnie mniejszą zawartość barwników antocyjanowych w owocach aronii suszonych owiewowo w porównaniu z liofilizowanymi.

Tabela 2

Profil kwasów tłuszczowych lipidów w suszonych owocach *Rosa rugosa* [g/100 g tłuszczu].
Profile of fatty acids in lipids in dried fruits of *Rosa rugosa* [g/100g of fat].

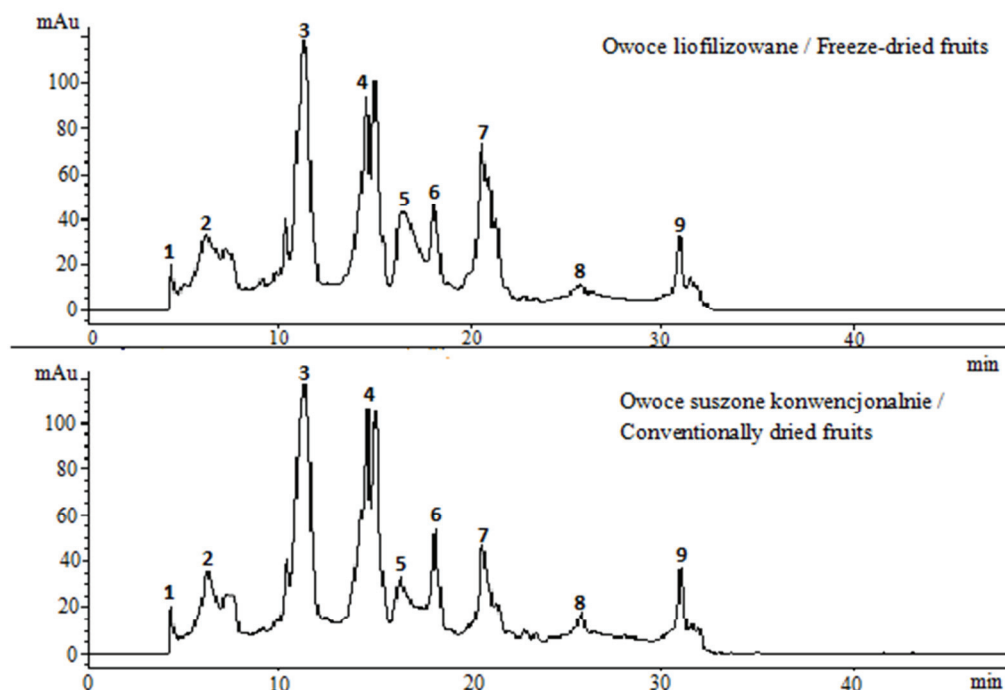
Kwas tłuszczowy (KT) Fatty acid (FA)	Zawartość KT w owocach / Content of FA in fruits $\bar{x} \pm s$ / SD (n = 5)	
	liofilizowanych freeze-dried	suszonych konwencjonalnie conventionally dried
C 4:0	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01
C 6:0	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,01
C 8:0	0,33 ± 0,02	0,40 ± 0,02
C 10:0	0,69 ± 0,02	0,75 ± 0,03
C 10:1	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00
C 12:0	6,48 ± 0,26	6,54 ± 0,22
C 14:0	3,40 ± 0,15	3,85 ± 0,17
C 15:0	0,26 ± 0,01	0,30 ± 0,01
C 16:0	20,83 ± 0,92	24,40 ± 1,18
C 16:1	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,01
C 17:0	0,83 ± 0,03	0,90 ± 0,03
C 17:1	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01
C 18:0	3,80 ± 0,15	3,85 ± 0,18
C 18:1 9cis	2,77 ± 0,11	2,70 ± 0,11
C 18:2 n-6	19,50 ± 0,81	17,35 ± 0,72
C 18:3 n-6	0,52 ± 0,02	0,48 ± 0,02
C 18:3 n-3	35,87 ± 1,54	29,90 ± 1,23
C 22:0	1,61 ± 0,06	1,65 ± 0,07
C 20:3 n-6	0,76 ± 0,03	0,62 ± 0,03
Σ SFA	38,51 ± 2,35	42,93 ± 2,58
Σ MUFA	3,26 ± 0,20	3,21 ± 0,19
Σ PUFA	56,65 ± 3,40	48,35 ± 2,95

Analiza składu KT metodą GC wyekstrahowanej frakcji lipidowej wykazała obecność 19 kwasów różniących się zarówno liczbą atomów węgla, jak i stopniem nienasycenia (tab. 2). Suszone owoce *Rosa rugosa* zawierały niewielką zawartość frakcji lipidowej (0,67 i 0,88 g/100 g), jednak charakteryzowała się ona bardzo cennym

składem KT, będąc źródłem głównie kwasu linolowego C18:2 α oraz α -linolenowego C18:3. Trzecim dominującym ilościowo był kwas palmitynowy C16:0. Podobnie znaczny udział tych trzech kwasów w owocach różnych gatunków dzikiej róży stwierdził Ercisli [5], analizując skład KT owoców dzikiej róży w 6 gatunkach popularnych w Turcji oraz Barros i wsp. [1] w *Rosa canina*, gatunku powszechnym również w Polsce. Odnosząc się do wyników badań składu KT gatunku *Rosa rugosa* prowadzonych w Polsce [16] należy zauważyć pewne różnice pod względem ilości oznaczanych KT. W porównaniu z wynikami własnymi Nowak [16] oznaczyła znacznie większą zawartość kwasu C18:2 (50,32 g/100 g), mniejszą C18:3 (27,90 g/100 g) oraz znacznie mniejszą C16:0 (2,77 g/100 g) w owocach gatunku *Rosa rugosa* [16]. Różnice te prawdopodobnie wynikały z tego, że Nowak [15] analizowała owoce dzikiej róży zawierające nasiona, na co wskazuje duża zawartość oznaczonego tłuszczu – około 7 g/100 g w gatunku *Rosa rugosa* oznaczona również przez Kazaz i wsp. [9] w gatunku *Rosa canina* (7,15 g/100 g). Natomiast w pracy własnej analizie poddano miąższ owoców, z których usunięto część nasienną.

Pod względem poznawczym interesująca jest obecność w składzie KT substancji lipidowej owoców *Rosa rugosa* krótko- i średniołańcuchowych nasyconych KT, które są typowe dla surowców zwierzęcych, np. w tłuszczu mlecznym stanowią 9,5 - 13,0 % KT [20]. Natomiast w surowcach roślinnych kwasy te nie są powszechne. W niniejszej pracy oznaczono łącznie KT od C4:0 do C12:0 na poziomie: 7,83 i 8,04 g/100 g, odpowiednio w owocach suszonych i liofilizowanych (tab. 2). Podobną sumaryczną zawartość tych kwasów (6,72 %) oznaczono w owocach gatunku *Rosa canina* [1].

Stwierdzono wpływ rodzaju procesu suszenia na skład KT we frakcji lipidowej owoców *Rosa rugosa*. Najbardziej zauważalny był on pod względem zawartości kwasów zawierających więcej niż jedno wiązanie podwójne, czyli PUFA: w owocach liofilizowanych oznaczono 56,55 g/100 g, a owocach suszonych konwencjonalnie 48,35 g/100 g PUFA (tab. 2). Największe różnice stwierdzono w przypadku kwasu α -linolenowego zawierającego trzy wiązania podwójne i z tego powodu najbardziej wrażliwego na procesy utleniania [10]. W porównaniu z surowcem liofilizowanym w owocach suszonych konwencjonalnie zmniejszenie zawartości kwasu C18:3 (27,90 g/100 g) wynosiło ponad 16 %.



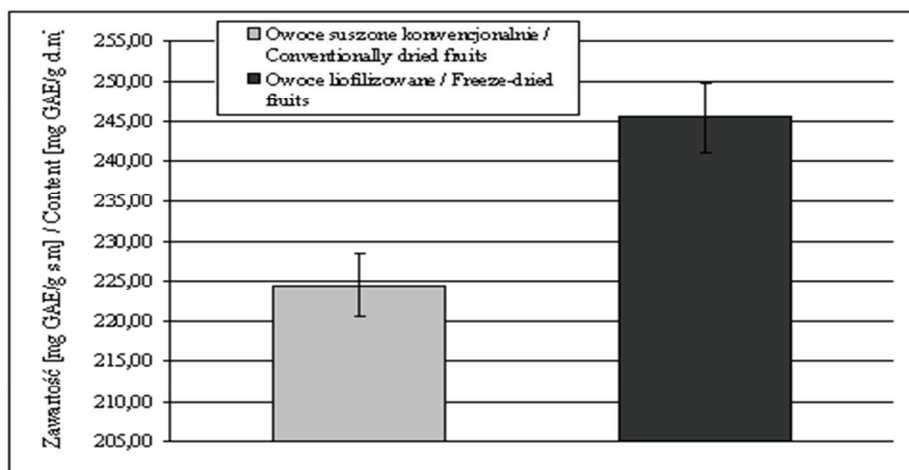
Rys. 1. Chromatogram HPLC związków karotenoidowych występujących w suszonych owocach dzikiej róży *Rosa rugosa*, Identyfikacja: 1-fitoen, 2-NI, 3-luteina, 4-zeaksantyna, 5-rubiksantyna, 6-β-kryptoksantyna, 7-likopen, 8-ζ-karoten, 9-β-karoten.

Fig. 1. HPLC chromatogram of carotenoids in dried fruits of *Rosa rugosa*; Identification: 1-phytoen, 2-lutein, 3-zeaxanthin, 5-rubixanthin, 6-β-cryptoxanthin, 7-lycopene, 8-ζ-carotene, and 9-β-carotene.

Zarówno liofilizat, jak i susz tradycyjny owoców *Rosa rugosa* charakteryzował się bogatym składem karotenoidów. Zidentyfikowano następujące karoteny: likopen, β-karoten, ζ-karoten i fitoen oraz ksantofile: luteinę, zeaksantynę, rubiksantynę, β-kryptoksantynę (rys. 1). Podobną identyfikację karotenoidów przeprowadzili Razungles, Oszmiański i Sapis [18], jednak nie zidentyfikowali oni rubiksantyny. Przedstawione wyniki potwierdzają również wcześniejsze prace, w których stwierdzono, że owoce dzikiej róży mogą być cennym naturalnym źródłem tych związków [18]. Z chromatogramów (rys. 1) wynika, że pod względem ilościowym najistotniejszymi karotenoidami w liofilizacie owoców *Rosa rugosa* były: luteina, zeaksantyna i likopen. Analizując wpływ metody suszenia na skład karotenoidów *Rosa rugosa* stwierdzono, że liofilizat wyróżniała przede wszystkim większa zawartość likopenu i rubiksantyny w porównaniu z suszem konwencjonalnym. Różnice w wysokościach pików i polach powierzchni widoczne są na chromatogramach przedstawionych na rys. 1 –

piki 5 i 7. Większa zawartość tych karotenoidów w suszu liofilizowanym świadczy o lepszym ich zachowaniu podczas tej metody utrwalania. Ich mniejsza zawartość w suszu konwencjonalnym potwierdziła wrażliwość karotenoidów na podwyższoną temperaturę, która jest uwarunkowana obecnością wiązań podwójnych sprzężonych w ich strukturze [19]. Wrażliwość likopenu na podwyższoną temperaturę podkreślali wcześniej Shi i wsp. [22].

Niezależnie od zastosowanej metody suszenia w owocach *Rosa rugosa* oznaczono dużą zawartość związków polifenolowych: w liofilizacie na poziomie 245,5 mg GAE/g s.m, w suszu konwencjonalnym: 224,55 mg GAE/g s.m (rys. 2). Podobną zawartość polifenoli w owocach *Rosa rugosa*, rosnących na terenie Lubelszczyzny, oznaczyła również Nowak [16]. Porównując inne gatunki owoców dzikiej róży należy stwierdzić, że badane susze zawierały znacznie większą zawartość polifenoli. Przykładowo zawartość polifenoli w gatunkach *Rosa canina*, *Rosa villosa* czy *Rosa dumalis* wynosiła 73 - 94 mg GAE/g s.m., czyli była około 3 razy mniejsza niż w owocach analizowanego gatunku *Rosa rugosa* [5].



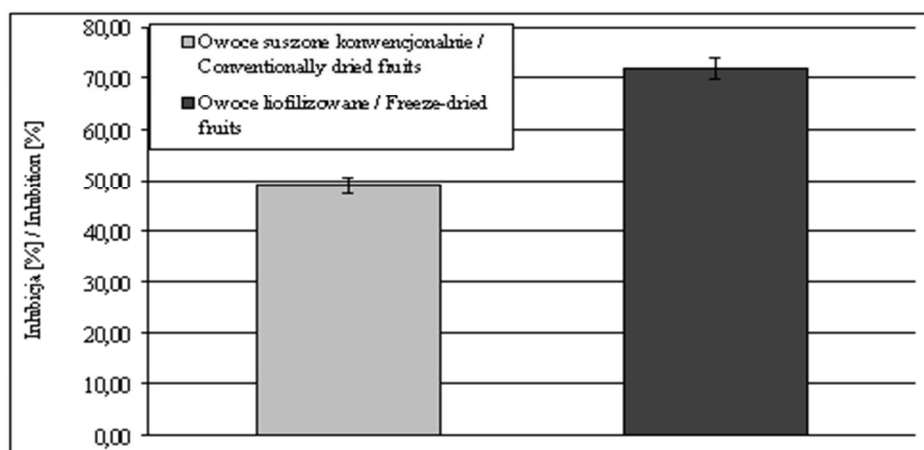
Rys. 2. Zawartość związków polifenolowych w przeliczeniu na kwas galusowy w suszach owoców dzikiej róży.

Fig. 2. Content of total phenolics, expressed per gallic acid, in dried fruits of *Rosa rugosa*.

Porównując z innymi owocami należy zauważyć, że niezależnie od zastosowanej metody suszenia owoce gatunku *Rosa rugosa* są znacznie lepszym źródłem polifenoli niż popularne w Polsce owoce leśne: borówki czernicy, borówki brusznicy czy żurawiny. W badaniach Witkowskiej i Zujko [25] oznaczona zawartość polifenoli w ww. owocach leśnych wynosiła od 2440 do 4900 mg GAE/100 g s.m, czyli była od 4 do 9

razy mniejsza niż w analizowanych suszach *Rosa rugosa*. W truskawkach również oznaczono mniejszą zawartość polifenoli: 4000 - 9500 mg GAE/100 g s.m. [3].

Pod względem właściwości przeciwutleniających stwierdzono wysoką zdolność neutralizacji wolnego rodnika DPPH przez składniki przeciwutleniające występujące w badanych suszach owoców *Rosa rugosa*, wyliczoną jako % inhibicji (rys. 3). Podobnie silne właściwości przeciwutleniające owoców gatunków roślin dziko rosnących wykazali Leja i wsp. [13]. Przykładowo aktywność antyrodnikowa świeżych owoców *Rosa canina* wynosiła: 95,05 %, bzu czarnego – 81,08 %, a derenia jadalnego – 94,54 % [13].



Rys. 3. Zdolności wygaszania rodników DPPH przez susze owoców dzikiej róży

Fig. 3. Ability of dried fruits of *Rosa rugosa* to absorb DPPH radicals.

Stwierdzono wpływ metody suszenia na właściwości przeciwutleniające badanych suszów. Susze liofilizowane charakteryzowała znacznie wyższa siła przeciwutleniająca – obliczony wskaźnik inhibicji wynosił średnio 72 %, natomiast w suszu konwencjonalnym był znacznie niższy i wynosił średnio 49 %. Na obniżenie siły przeciwutleniającej suszu konwencjonalnego miała wpływ podwyższona temperatura procesu w porównaniu z warunkami liofilizacji [11]. Jednakże porównując z siłą inhibicji różnych znanych przeciwutleniaczy (α -tokoferol – 42,27 % czy kwas askorbiny – 29,49 %) nawet w suszu konwencjonalnym obliczona siła inhibicji była zadowalająca [26]. Wyżej przedstawione wyniki świadczą o tym, że liofilizacja jest korzystniejszą metodą utrwalania owoców *Rosa rugosa*, biorąc pod uwagę zachowanie właściwości przeciwutleniających.

Wnioski

1. Stwierdzono większą zawartość związków bioaktywnych i silniejsze właściwości przeciwutleniające owoców róży *Rosa rugosa* utrwalanych metodą liofilizacji w porównaniu z suszami otrzymanymi konwencjonalną metodą suszenia.
2. Susz otrzymany metodą liofilizacji wyróżniała większa zawartość likopenu i rubik-santyny oraz nienasyconych KT, szczególnie C18:3 9c12c15c we frakcji lipidowej oraz wyższa zdolność neutralizacji wolnego rodnika DPPH, wyrażona jako wskaź-nik inhibicji.

Praca zgłoszona do konkursu Fundacji E. Michalskiego „Polska Róża” na naj-lepszą pracę naukową dotyczącą róż owocowych została wyróżniona II nagrodą w roku 2011.

Literatura

- [1] Barros L., Carvalho A.M., Ferreira I.C.F.R.: Exotic fruits as a source of important phytochemicals: Improving the traditional use of *Rosa canina* fruits in Portugal. *Food Res. Int.*, 2011, **44**, 2233-2236.
- [2] Bober I., Oszmiański J.: Zastosowanie wyłoków aronii do naparów herbat owocowych. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2004, **3** (1), 63-72.
- [3] Bojarska J.E., Czaplicki S., Zarecka K., Zadernowski R.: Związki fenolowe owoców wybranych odmian truskawki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2** (47) Supl., 20-27.
- [4] Demir F., Özcan M.: Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in Turkey. *J. Food Eng.*, 2001, **47**, 333-336.
- [5] Ercisli S.: Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chem.*, 2007, **104**, 1379-1384.
- [6] Gałązka-Czarnecka I., Krala L.: Właściwości przeciwutleniające mrożonych owoców dzikiej róży *Rosa canina* L. *Chłodnictwo*, 2007, **11** (42), 54-58.
- [7] Gawlik-Dziki U.: Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4** (41), 29-40.
- [8] Jaroniewski W.: Owoc róży cennym surowcem witaminowym. *Wiad. Ziel.*, 1992, **7-8**, 23-24.
- [9] Kazaz S., Baydar H., Urbas S.: Variations in chemical compositions of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa canina* L. fruits. *Czech J. Food Sci.* 2009, **3**, 178-184.
- [10] Kołakowska A.: Lipid oxidation in food systems. In: Chemical and functional properties of food lipids. Z.E. Sikorski, A. Kołakowska Eds. CRC Press, Boca Raton 2003, pp. 133-166.
- [11] Lapinskii A.G., Gorbachev V.V.: The antiradical activity of extracts from some wild-growing plants of the Okhotsk sea northern coastal region. *Pharm. Chem. J.*, 2006, **6** (40), 317-31.
- [12] Larsen E., Kharazmi A., Lars P.C., Brogger C.S.: An Anti-inflammatory galactolipid from rose hip (*Rosa canina*) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro. *J. Nat. Prod.*, 2003, **7**, 994-995.
- [13] Leja M., Mareczek A., Nanaszko B.: Antyoksydacyjne właściwości owoców wybranych gatunków dziko rosnących drzew i krzewów, *Rocz. AR Poznań*, 2007, **41**, 327-331.
- [14] Molyneux P.: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2004, **2** (26), 211-219.

- [15] Nowak R.: Fatty acid composition in fruits of wild rose species. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 2005, **3 (74)**, 229-235.
- [16] Nowak R.: Comparative study of phenolic acids in pseudofruits of some species of roses. *Acta Pol. Pharm – Drug Res.*, 2006, **4 (63)**, 281-288.
- [17] Ożarowski A., Jaroniewski W.: Róża dzika. W: *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*. Inst. Wyd. Związków Zawodowych Warszawa 1987, ss. 328-331.
- [18] Razungles A., Oszmianski J., Sapis J. C.: Determination of carotenoids In fruits of *Rosa* sp. (*Rosa canina* and *Rosa rugosa*) and of chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *J. Food Sci.*, 1989, **54 (3)**, 774-775.
- [19] Rodriguez-Amaya D.B.: A guide to carotenoids analysis. OMNI Research ILSI Human Nutrition Institute, USA. 2001, pp. 14-22.
- [20] Rutkowska J., Adamska A.: Fatty acid composition of butter originating from north-east region of Poland. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2011, **3 (61)**, 197-193.
- [21] Rutkowska J., Stołyhwo A.: Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO₂) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika. *Food Chem.*, 2009, **115**, 745-752.
- [22] Shi J., Qu Q., Kakuda Y., Yeung D., Jiang Y.: Stability and synergistic effect of antioxidative properties of lycopene and other active components. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, **44**, 559-573.
- [23] Tumidaj M.: Dzikie róże. *Poradnik Gospodarski*, 2001, **7/8**, 56.
- [24] Wenzig E.M., Widowitz U., Kunert O., Chrubasik S., Bucar F., Knauder E., Bauer R.: Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations. *Phytomedicine*, 2008, **15**, 826-835.
- [25] Witkowska A., Zujko M.E.: Aktywność antyoksydacyjna owoców leśnych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009, **3 (42)**, 900-903.
- [26] Zych A., Krzepiło A.: Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH. *Chemia. Dydaktyka. Ekologia. Metrologia*, 2010, **1 (15)**, 51-54.

COMPARISON OF COMPOSITION AND PROPERTIES OF *ROSA RUGOSA* FRUITS PRESERVED USING CONVENTIONAL AND FREEZE-DRYING METHODS

S u m m a r y

In the research study, the effect was analyzed of conventional and freeze-drying processes on the content and antioxidant properties of some selected bioactive components contained in *Rosa rugosa* rosehips. The conventional drying (air chilling) process was conducted at a temperature of 72±1°C during a 37 h period, and the freeze-drying process was carried out at a temperature of 33 °C for 22.5 h (including a pre-drying process in a nitrogen atmosphere at a temperature of -20 °C). The fruits dried were characterized by a low content of the lipid fraction (0.67 and 0.88 %), in which 19 fatty acids (FA) were determined. The following FA prevailed quantitatively: C18:2 9c12c; C18:3 9c12c15c; and C16:0. The biggest differences were found in the content of PUFA: 56.55g/100g contained in the lyophilisate and 48.35 g/100g contained in the conventionally dried fruits. As regards the content of C18:3 9c12c15c acid in the lyophilized dried fruits, the content thereof was as much as 16 % higher compared to the conventionally dried fruits. Both the lyophilized and the conventionally dried fruits contained beneficial carotenoids (lycopene, β-carotene, ζ-carotene, lutein, zeaxanthin, rubixanthin, and β-cryptoxanthin). A lower content of lycopene and rubixanthin in the rosehips dried using the conventional method was caused by the sensitivity of those compounds to a high temperature conditioned by the presence of unsaturated bindings. Regardless of the drying method applied to dry *Rosa rugosa* fruits, the levels of polyphenolic compounds determined in the

fruits were high: 245.5 GAE/1 g of dry matter in the lyophilisate and 224.55 mg GAE/1 g of dry matter in the conventionally dried fruits. A higher ability to neutralize the free DPPH radical, expressed as a percent rate of inhibition, was found in the freeze-dried fruits (averagely: 72 %), whereas in the conventionally dehydrated fruits, the inhibition rate was lower and amounted to 49 % on average.

Key words: *Rosa rugosa* rosehips, drying, carotenoids, fatty acids, polyphenols, DPPH ☒

BARBARA SOKOŁOWSKA, JOLANTA NIEZGODA, MARTA CHOTKIEWICZ

**WPLYW NIZYNY I LIZOZYMU NA WZROST SZCZEPÓW
ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS ORAZ MOŻLIWOŚĆ
ZASTOSOWANIA TYCH ZWIĄZKÓW JAKO BIOKONSERWANTÓW
W SOKU JABŁKOWYM**

Streszczenie

Acidotermofilne bakterie przetrwalnikujące *Alicyclobacillus acidoterrestris* są przyczyną psucia się pasteryzowanych soków owocowych i warzywnych.

Sprawdzono skuteczność działania nizyny oraz lizozymu jako naturalnych konserwantów zapobiegających zepsuciu soku jabłkowego przez te drobnoustroje. Dla każdego z ośmiu badanych szczepów wyznaczono minimalne stężenie hamujące MIC (Minimal Inhibitory Concentration) nizyny oraz lizozymu w pożywce hodowlanej. MIC nizyny w odniesieniu do przetrwalników wynosiło od 100 IU/cm³ do 1500 IU/cm³ pożywki, a w stosunku do form wegetatywnych od 50 IU/cm³ do 1250 IU/cm³ pożywki, w zależności od szczepu. Lizozym hamował kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestris* przy stężeniach od 0,005 mg/cm³ do 0,2 mg/cm³ pożywki, natomiast rozwój komórek wegetatywnych został zahamowany przy stężeniach od 0,05 mg/cm³ do 0,2 mg/cm³ pożywki.

Stwierdzono skuteczność nizyny, w stężeniach równych MIC, w próbach trwałościowych soku jabłkowego. Rozwój siedmiu badanych szczepów *A. acidoterrestris* został zahamowany w trakcie trwającej 28 dni inkubacji. Lizozym w stężeniach równych wartościom MIC zapewniał trwałość próbek soku jedynie w okresie 7 - 21 dni.

Słowa kluczowe: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, sok jabłkowy, nizyna, lizozym

Wprowadzenie

Poszukiwanie skutecznych metod ograniczenia wzrostu ciepłoopornych i kwasolubnych bakterii przetrwalnikujących z rodzaju *Alicyclobacillus*, odpowiedzialnych za psucie się soków owocowych i warzywnych, od wielu lat stanowi przedmiot zainteresowań naukowców i producentów. Zmiany cech smakowo-zapachowych w zepsutych sokach, powodowane przez *Alicyclobacillus acidoterrestris*, polegają na powstawaniu zapachu określanego jako medyczny, dezynfekcyjny, dymny. Zapach ten powodują

Dr inż. B. Sokołowska, mgr inż. J. Niezgoda, mgr inż. M. Chotkiewicz, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

2-metoksyfenol (gwajakol) oraz 2,6-dibromofenol i 2,6-dichlorofenol [5, 7, 9, 13, 19, 21].

Wykazana w wielu badaniach wysoka ciepłooporność przetrwalników *A. acidoterrestris* [3, 5, 14, 17, 22, 23, 26] oraz stwierdzone przypadki zepsucia soków pasteryzowanych wskazują na nieskuteczność przemysłowego procesu pasteryzacji i na konieczność poszukiwania innych niż cieplne metod ograniczenia wzrostu tych bakterii. Rozwijane są alternatywne technologie, takie jak zastosowanie wysokich ciśnień (HPP) [1, 15, 16]. Czynniki ograniczającymi wzrost *A. acidoterrestris* mogą być również kwasy organiczne i konserwanty [24, 25, 29].

Współczesny konsument coraz częściej poszukuje żywności „naturalnej”, niezawierającej żadnych syntetycznych dodatków. Naturalnymi substancjami konserwującymi, akceptowanymi przez konsumentów, mogą być substancje przeciwdrobnoustrojowe wytwarzane przez bakterie – bakteriocyny. Do najlepiej poznanych i najszerzej badanych bakteriocyn należą te, które syntetyzowane są przez bakterie fermentacji mlekowej, w tym nizyna wytwarzana przez niektóre szczepy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Amerykańska agencja FDA (Food and Drug Administration) w 1988 roku nadała nizynie status substancji GRAS (*generalny recognized as safe*), stąd duże zainteresowanie tym związkiem jako biokonserwantem. Nizyna wykazuje stabilność w wysokiej temperaturze (pasteryzacja i sterylizacja) przy niskim pH.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nizyny obejmuje szeroki zakres bakterii gram dodatnich, takich jak: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Brochotrix*, *Enterococcus*, *Listeria* i *Mycobacterium*, jak również przetrwalniki i komórki wegetatywne *Clostridium*, *Bacillus* i *Alicyclobacillus*. Wykazuje również aktywność przeciwko bakteriom gram ujemnym *E. coli* i *Salmonella* [10, 27, 28].

Nizyna jest dopuszczona do stosowania w wielu krajach świata. W niektórych krajach można ją dodawać do wszystkich produktów bez ograniczeń, w innych lista zastosowań i maksymalna dawka są ograniczone. Maksymalna dopuszczalna przez FDA dawka nizyny w produkcie końcowym wynosi 250 mg/kg [FDA 21 CFR § 184.1538]. Nizyna jest uznawana za substancję nietoksyczną – jej LD₅₀ wynosi 6,95 g/kg masy ciała [2]. Średnie dzienne pobranie (ADI) zalecane przez FAO/WHO nie powinno przekraczać 33 000 IU/kg masy ciała (co odpowiada 0,825 mg/kg masy ciała), natomiast zalecane przez FDA nie powinno przekraczać 2,9 mg/kg masy ciała [2].

Nizyna jest najczęściej stosowana jako biokonserwant w następujących produktach: mleko, sery, mrożone desery, masa jajowa, sosy, konserwy warzywne, mięso i produkty mięsne, ryby, pizza, zupy, wino, napoje alkoholowe [27].

Aktywność szczepów bakteriocynogennych i bakteriocyn w żywności często jest niższa niż w badaniach *in vitro*, gdyż ściśle zależy od różnych czynników fizycznych,

chemicznych i biologicznych, takich jak siła jonowa, pH, temperatura i typ atakowanego mikroorganizmu, dlatego ocena mikrobiologicznego działania bakteriocyn wymaga dokładnych testów [10].

Inną substancją naturalną o działaniu konserwującym jest lizozym (muramidaza, EC 3.2.1.17). Jest to enzym hydrolityczny, który rozkłada peptydoglikany ściany komórkowej bakterii. Hydrolizuje wiązania β -1,4-glikozydowe pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym i N-acetyloglukozaminą. Występuje w ziarnistościach granulocytów, monocytów oraz makrofagów, jest obecny w większości płynów tkankowych, stanowiąc jeden z mechanizmów odporności. Naturalnie występuje także w białku jaja kurzego, z którego pozyskuje się go na skalę przemysłową. Lizozym wykazuje działanie przeciwbakteryjne w stosunku do bakterii gram dodatnich [8]. Bakterie gram ujemne są bardziej odporne na jego działanie. Lizozym jest białkiem termostabilnym, szczególnie w środowisku kwaśnym i może być ogrzewany nawet do 100 °C bez utraty aktywności. FDA w 1998 roku nadała lizozymowi status substancji GRAS. Najczęściej jest on stosowany jako dodatek do serów, zapobiegający późnym wzdęciom wywoływanym przez *Clostridium tyrobutyricum*. Ponadto jest stosowany jako biokonserwant w następujących produktach: mięso i produkty mięsne, ryby i ich przetwory, mleko i produkty mleczarskie, świeże warzywa i owoce, wino. Produkty zawierające lizozym powinny być odpowiednio oznakowane z uwagi na możliwość występowania alergii na białko kurze.

Celem pracy było określenie skuteczności działania nizyny oraz lizozymu jako naturalnych konserwantów zapobiegających zepsuciu soku jabłkowego przez bakterie *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Materiał i metody badań

Badania przeprowadzono z zastosowaniem przetrwalników ośmiu szczepów *A. acidoterrestris* wyizolowanych w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego:

- 1) szczep TO-29/4/02 wyizolowany w 2002 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 2) szczep TO-117/02 wyizolowany w 2002 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 3) szczep TO-57/01/04 szczep wyizolowany w 2004 r. z emulsji do produkcji napojów,
- 4) szczep TO-224/1/05 wyizolowany w 2005 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 5) szczep U-44/25/06 wyizolowany w 2006 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 6) szczep TO-41/06 wyizolowany w 2006 r. z napoju pomarańczowego,
- 7) szczep TO-169/06 wyizolowany w 2006 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 8) szczep TO-27/2/07 wyizolowany w 2007 r. z zagęszczonego soku pomarańczowego.

Do izolacji szczepów zastosowano metodę International Federation of Fruit Juice Producers [12]. Szczepy zidentyfikowano i zaliczono do gatunku *Alicyclobacillus acidoterrestris* na podstawie ich zdolności do wytwarzania kwasu z erytrolu [4] oraz do wytwarzania gwajakolu w pożywce YSG z dodatkiem kwasu wanilinowego [18].

W celu uzyskania przetrwalników szczepu inkubowano w temp. 45 °C przez 10 dni na podłożu PDA (Oxoid) o pH 4,0. Biomase bakterii zebraną z powierzchni podłoża agarowego zawieszano w sterylnej wodzie redestylowanej, a następnie wirowano przez 10 min przy 14 000 obr./min w temp. 4 °C. Osad przemywano trzykrotnie: sterylną wodą redestylowaną, 50 % alkoholem etylowym i ponownie jałową wodą redestylowaną. Przygotowaną zawiesinę przechowywano w temp. 5 °C. Obecność przetrwalników w zawieszynie potwierdzano w preparatach mikroskopowych barwionych metodą Schaeffera-Fultona w modyfikacji Wirtza. Liczbę przetrwalników oznaczano metodą płytkową na BAT-agar (Merck, pH 4,0) po 5 dniach inkubacji w temp. 45 °C.

Do przygotowania inokulum komórek wegetatywnych stosowano pożywkę BAT-bulion, do której dodawano zawiesinę przetrwalników *A. acidoterrestris* i inkubowano w temp. 45 °C przez 17 - 20 h. Czas hodowli regulowano tak, aby przetrwalniki nie zdążyły się uformować (kontrola stanu hodowli w preparatach mikroskopowych). W celu przygotowania inokulum o odpowiedniej liczebności wykonywano dziesięciokrotne rozcieńczenia w fizjologicznym roztworze peptonu (Merck). Końcową liczbę komórek wegetatywnych oznaczano metodą płytkową na BAT-agar (Merck, pH 4,0) po 5 dniach inkubacji w temp. 45 °C.

Do badań zastosowano nizinę z *Lactococcus lactis* – producent: SIGMA-ALDRICH; o aktywności: $1,0 \times 10^6$ IU/g. Roztwór podstawowy o aktywności $5,0 \cdot 10^4$ IU/cm³ przygotowano w 0,02 M HCl. Następnie roztwór ten wirowano przez 15 min z prędkością 3000 obr./min; supernatant wyjaławiano metodą filtracji membranowej (Millipore 0,2 µm) [14, 30] i przechowywano w temp. 2 - 8 °C.

W badaniach zastosowano lizozym krystaliczny (z białka jaja) EC 3.2.1.17, producent: Merck (nr kat. 1.05281), o aktywności: 50 000 U/mg. Roztwór podstawowy o stężeniu 50 mg/cm³ sporządzono w jałowej wodzie destylowanej.

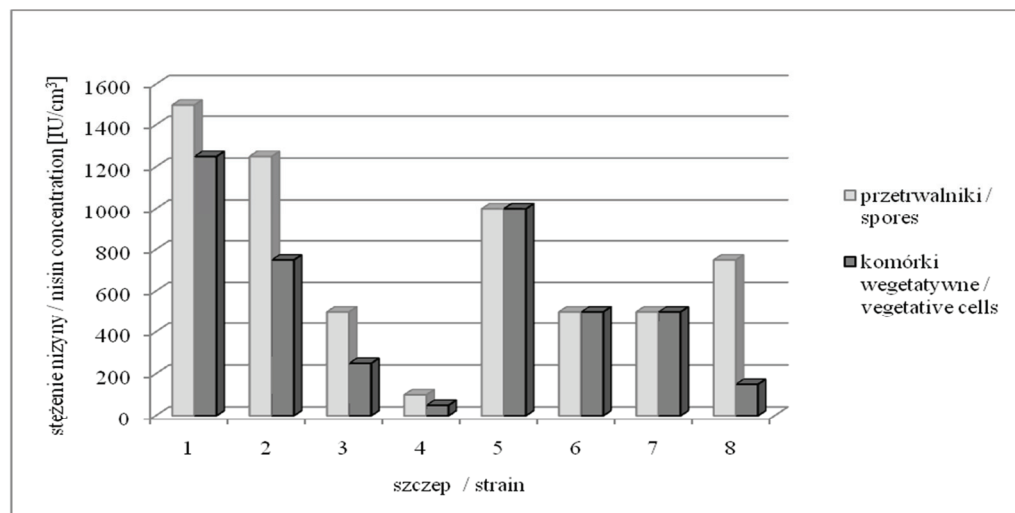
Wartość MIC (Minimal Inhibitory Concentration) nizyny i lizozymu wyznaczano w zautomatyzowanym analizatorze BacT/ALERT[®], stosując pożywkę węglowodanową LYM (bioMerieux nr kat. 259788) o pH 3,7. Zasada oznaczenia w analizatorze polegała na kolorymetrycznym pomiarze poziomu metabolitów wytwarzanych przez rosnące drobnoustroje. Zastosowano inokulum zawierające ok. 10^5 przetrwalników w 1 cm³ pożywki i inokulum komórek wegetatywnych o liczbie 10^3 do 10^4 jtk/cm³ pożywki. Do pożywki hodowlanej LYM dodawano roztwór podstawowy nizyny do uzyskania końcowego stężenia [IU]: 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 1250 i 1500 w 1 cm³ pożywki. Natomiast roztwór podstawowy lizozymu dodawano do uzyskania końcowego stężenia [mg]: 0,0025, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, i 0,5 w 1 cm³ pożywki.

Inkubację prowadzono maksymalnie przez 34 dni, w optymalnej dla bakterii *Alicyclobacillus* temp. 45 °C. Badania wykonano w 2 - 4 powtórzeniach. Za wartość MIC uznawano stężenie nizyny lub lizozymu, które całkowicie hamowało kiełkowanie przetrwalników i wzrost szczepów *A. acidoterrestris*.

Próby trwałościowe soku jabłkowego z dodatkiem nizyny lub lizozymu prowadzono w temp. 45 i 25 °C przez 28 dni. Do próbek soku jabłkowego o objętości 20 cm³ dodawano nizynę lub lizozym w stężeniach odpowiadających wyznaczonym wartościom MIC. Inokulum stanowiła zawiesina przetrwalników *A. acidoterrestris* dodawana do uzyskania końcowej liczby 10³ jtk/cm³ i 10⁵ jtk/cm³ soku. Przed inkubacją próbki soku poddawano szokowi termicznemu (80 °C /10 min) w celu aktywacji przetrwalników. Badania wykonano w trzech powtórzeniach. W trakcie inkubacji obserwowano zmętnienie soku i pojawianie się obcego zapachu.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie minimalnych stężeń nizyny hamujących kiełkowanie przetrwalników oraz rozwój komórek wegetatywnych ośmiu badanych szczepów *A. acidoterrestris*. Zaobserwowano duże różnice we wrażliwości poszczególnych szczepów na ten biokonserwant. Kiełkowanie przetrwalników zostało zahamowane przy zastosowanych stężeniach nizyny od 100 IU/cm³ (szczep nr 4) do 1500 IU/cm³ pożywki (szczep nr 1) (rys. 1). Rozwój komórek wegetatywnych *A. acidoterrestris* został zahamowany przy stężeniach nizyny wynoszących od 50 IU/cm³ (szczep nr 4) do 1250 IU/cm³ pożywki (szczep nr 1).

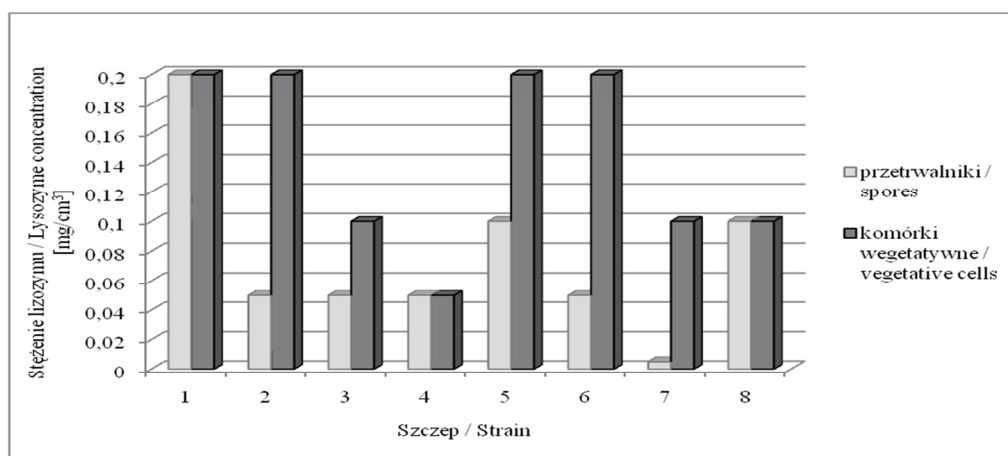


Rys. 1. MIC nizyny w pożywce hodowlanej.

Fig. 1. MIC of nisin in the culture medium.

Przedstawione powyżej wartości MIC były zdecydowanie wyższe od uzyskanych w badaniach Yamazaki i wsp. [30], w których określono minimalne stężenie hamujące MIC nizyny w stosunku do przetrwalników siedmiu badanych szczepów na poziomie od 0,78 do 12,5 IU/cm³ pożywki mYPGA (modified Yeast-Peptide-Glucose Agar) przy pH 3,4 i od 25 do 100 IU/cm³ przy pH 4,2. Komórki wegetatywne były bardziej odporne na działanie nizyny i wyznaczone wartości MIC wynosiły od 1,56 do 50 IU/cm³ pożywki mYPGA przy pH 3,4 i 25 - 100 IU/cm³ przy pH 4,2. Stwierdzone różnice w oporności na działanie nizyny polskich i japońskich szczepów *A. acidoterrestris* mogą wynikać zarówno z bioróżnorodności szczepów, jak i z różnic w składzie pożywki i jej pH oraz z rzeczywistej aktywności nizyny (przyjęto aktywność deklarowaną przez producenta).

Lizozym, w zależności od szczepu, hamował kiełkowanie przetrwalników przy stężeniach od 0,005 mg/cm³ (szczep nr 7) do 0,2 mg/cm³ pożywki (szczep nr 1) (rys. 2). Rozwój komórek wegetatywnych *A. acidoterrestris* został zahamowany przy zastosowaniu lizozymu w stężeniach od 0,05 mg/cm³ (szczep nr 4) do 0,2 mg/cm³ pożywki (szczepy nr 1, 2, 5, 6). Przetrwalniki okazały się bardziej wrażliwe na działanie lizozymu niż komórki wegetatywne. Badania Bevilacqua i wsp. [6] doprowadziły do takiego samego wniosku. Ponadto autorzy ci stwierdzili znaczący wpływ medium, w którym prowadzono doświadczenia: roztwór lizozymu w soli fizjologicznej o stężeniu 1 mg/cm³ skutecznie hamował wzrost komórek wegetatywnych *A. acidoterrestris* (redukcja liczby wyniosła ponad 5 log jtk/cm³ już po 4 h działania), podczas gdy w pożywce z wyciągiem słodowym obserwowano efekt ochronny – w tych samych warunkach liczba komórek zmniejszyła się tylko o 3 log jtk/cm³.



Rys. 2. MIC lizozymu w pożywce hodowlanej.

Fig. 2. MIC value of lysozyme in the culture medium.

W przeprowadzonych próbach trwałościowych soku jabłkowego nizyna okazała się skutecznym konserwantem (tab. 1). Uzyskano 28-dniową trwałość soków inkubowanych zarówno w temp. 45, jak i 25 °C, przy zanieczyszczeniu przetrwalnikami *A. acidoterrestris* na poziomie 10^3 i 10^5 jtk/cm³ soku. Jedynie szczep nr 7 rozwijał się w soku jabłkowym po 21 dniach inkubacji w temp. 45 °C, przy wysokim poziomie zanieczyszczenia przetrwalnikami *A. acidoterrestris* (10^5 jtk/cm³ soku).

Tabela 1

Wzrost szczepów *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym z dodatkiem nizyny i lizozymu w stężeniach równych MIC, wyznaczonym w pożywce hodowlanej.

Growth of *A. acidoterrestris* strains in apple juice with lysozyme and nisin added at concentration levels equal to MIC value as determined in the culture medium.

Szczep Strain	Inokulum Inoculum [jtk/cm ³] [cfu/cm ³]	Nizyna / Nisin		Lizozym / Lysozyme	
		Temperatura inkubacji / Incubation temperature [°C]			
		45	25	45	25
		Czas inkubacji (dni) / Incubation time (days)			
1	10 ³	- (28)	- (28)	+ (28)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	- (28)	- (28)
2	10 ³	- (28)	- (28)	+ (14)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (14)	+ (28)
3	10 ³	- (28)	- (28)	+ (21)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (14)	- (28)
4	10 ³	- (28)	- (28)	+ (14)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (14)	+ (28)
5	10 ³	- (28)	- (28)	+ (28)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (28)	+ (28)
6	10 ³	- (28)	- (28)	+ (14)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (14)	+ (28)
7	10 ³	- (28)	- (28)	+ (7)	- (28)
	10 ⁵	+ (21)	- (28)	+ (7)	+ (28)
8	10 ³	- (28)	- (28)	- (28)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	- (28)	- (28)

Objaśnienia: / Explanatory notes:

– brak zepsucia / no spoilage; + zepsucie / spoilage.

Do zahamowania wzrostu *A. acidoterrestris* stosowano nizynę w bardzo szerokim zakresie stężeń, w zależności od rodzaju soku i szczepu. Komitopoulou i wsp. [14] wykazali hamujące działanie nizyny w stężeniu 100 IU/cm³ soku w stosunku do mieszaniny przetrwalników i komórek wegetatywnych *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym, pomarańczowym i grejpfrutowym. Yamazki i wsp. [30], badając siedem szcze-

pów *A. acidoterrestris*, stwierdzili hamowanie wzrostu tych bakterii przez 7 dni w soku pomarańczowym i w soku mieszanym z różnych owoców z dodatkiem nizyny w stężeniu 25 IU/cm³ soku. Hamowanie wzrostu przez 12 dni obserwowano przy wyższych dawkach, wynoszących odpowiednio 50 IU nizyny/cm³ i 100 IU nizyny/cm³ wyżej wymienionych soków. Natomiast w soku jabłkowym działanie nizyny, nawet w dawce 600 IU/cm³, okazało się nieskuteczne.

Z kolei dodatek nizyny w ilości 5 IU/cm³ do soku jabłkowego i pomidorowego powodował redukcję przetrwalników *A. acidoterrestris* o 5 log jtk/cm³ i zapewniał 30-dniową trwałość soków przechowywanych w temp. 43 °C. Dodatek 3 IU/cm³ powodował redukcję przetrwalników *A. acidoterrestris* o 5 log jtk/cm³ w soku pomidorowym i o 4,2 log jtk/cm³ w soku jabłkowym, co zapewniało 30-dniową trwałość soków przechowywanych w temp. 43 °C [11].

Nizyna w stężeniu 70 IU/cm³ hamowała wzrost *A. acidoterrestris* w sokach jabłkowych o zawartości ekstraktu od 11 do 19 °Brix, pH w zakresie od 3,5 do 5,5 i w temp. inkubacji od 25 do 50 °C [20].

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na to, że polskie szczepy *A. acidoterrestris* należą do grupy mniej wrażliwych na działanie nizyny w soku jabłkowym i do zahamowania ich rozwoju potrzebne są wysokie jej dawki, tak jak to stwierdzono w badaniach Yamazaki i wsp. [30].

Zastosowane w badaniach trwałościowych dawki lizozymu okazały się, w zdecydowanej większości, mniej skuteczne w sokach jabłkowych niż w pożywce hodowlanej. Zepsucie soków inkubowanych w temp. 45 °C obserwowano po 7 – 21 dniach w zależności od szczepu (tab. 1). Jedynie wzrost szczepu nr 8 został zahamowany w tych warunkach przez 28 dni. W temp. 25 °C wzrost trzech szczepów *A. acidoterrestris* (nr 1, nr 3 i nr 8) został zahamowany przez 28 dni, przy dawkach lizozymu odpowiadających wartościom MIC tych szczepów. Wzrost pozostałych pięciu szczepów został zahamowany, przy zastosowaniu dawki lizozymu odpowiadającej MIC, tylko przy niższym inokulum rzędu 10³ jtk/cm³. Przy wyższym inokulum rzędu 10⁵ jtk/cm³ okres trwałości wynosił 21 dni (tab. 1).

W literaturze światowej dostępne są nieliczne publikacje dotyczące zastosowania lizozymu do ograniczenia wzrostu *A. acidoterrestris* w sokach owocowych. Dodatek lizozymu w ilości 0,125 i 0,075 mg/cm³ powodował redukcję liczby przetrwalników *A. acidoterrestris* o 5,1 log jtk/cm³ w soku jabłkowym i o 4,4 log jtk/cm³ w soku pomidorowym, co zapewniało 30-dniową trwałość soków przechowywanych w temp. 43 °C. Lizozym w ilości 0,025 mg/dm³ powodował redukcję bakterii o 5,1 log jtk/cm³ w soku jabłkowym i o 3,8 log jtk/cm³ w soku pomidorowym. Soki z dodatkiem 0,025 mg/dm³ lizozymu wykazywały trwałość w okresie 30-dniowego przechowywania w temp. 43°C [11].

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na to, że polskie szczepy *A. acidoterrestris* są bardziej odporne na działanie lizozymu niż szczepy amerykańskie badane przez Hartman [11].

Z uwagi na stwierdzoną dużą bioróżnorodność szczepów *A. acidoterrestris*, w praktyce produkcyjnej należałoby stosować dawki biokonserwantów hamujące rozwój najbardziej opornych szczepów: 0,2 mg lizozymu/cm³ soku lub 1500 IU nizyny/cm³ soku, co przekracza dawkę dopuszczoną przez FDA. Dodatkowym problemem może być wyczuwalny w soku jabłkowym, przy tak wysokiej zawartości nizyny, lekko słony posmak wynikający z obecności chlorku sodu jako składnika preparatów nizyny.

Wnioski

1. Nizyna wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do przetrwalników i komórek wegetatywnych bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris*.
2. Nizyna skutecznie ogranicza wzrost przetrwalników *A. acidoterrestris* w pasteryzowanych sokach jabłkowych w trakcie ich przechowywania, nawet w podwyższonej temperaturze.
3. Lizozym wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do przetrwalników i komórek wegetatywnych bakterii *A. acidoterrestris*, przy czym komórki wegetatywne są bardziej odporne na jego działanie.
4. Skuteczność lizozymu w soku jabłkowym jest mniejsza niż w pożywce hodowlanej, dlatego dla zapewnienia trwałości soków jabłkowych potrzebne są wyższe dawki lizozymu niż wyznaczone eksperymentalnie w pożywce wartości MIC.

Literatura

- [1] Alpas H., Alma L., Bozoglu F.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juice by high hydrostatic pressure. World J. Microbiol. Biotechnol., 2003, **19**, 619-623.
- [2] Ash M., Ash I.: Handbook of Food Additives. An international guide to more than 7,000 products by trade name, chemical, function, and manufacturer. Published by: Gower Publishing Limited. Cornwall, England, 1995.
- [3] Bahçeci K.S., Acar J.: Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Int. J. Food Microbiol., 2007, **120** (3), 266-273.
- [4] Baumgart J.: Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. In: Handbook of culture media for food microbiology. Progress in industrial microbiology vol. 37. Ed. by J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird. Amsterdam: Elsevier, 2003, pp. 161-166.
- [5] Baumgart J., Husemann M., Schmidt C.: *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Vorkommen, Bedeutung und Nachweis in Getränken und Getränkegrundstoffen. Fluss. Obst, 1997, **64** (4), 178-180.
- [6] Bevilacqua A., Corbo M.R., Buonocore G.G., Del Nobile M.A., Sinigaglia M.: Antimicrobial effectiveness of lysozyme against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Adv. Food Sci., 2007, **29**, 47-52.

- [7] Borlinghaus A., Engel R.: Alicyclobacillus incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies and validation. *Fruit Process.*, 1997, **7** (7), 262-266.
- [8] Gao Y.C., Zhang G., Krentz S., Darius S., Power J., Lagarde G.: Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. *Australian J. Grape and Wine Res.*, **8** (1), 76-83.
- [9] Gocmen D., Elston A., Williams T., Parish M. and Housett R.L.: Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Lett. in Appl. Microbiol.*, 2005, **40**, 172-177.
- [10] Gwiazdowska D., Trojanowska K.: Bakteriocynty – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, 2005, **1** (68), 114-130.
- [11] Hartman A.D.: The efficacy of antimicrobials for the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit and vegetable juice. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science and Technology. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blackburg, Virginia, 2003. Dost. on-line: <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-06252003-133915/unrestricted/hartmanthesis.pdf>
- [12] IFU Method No 12, September 2004/revised March 2007. Method on the Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices.
- [13] Jensen N., Whitfield F.B.: Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, **36**, 9-14.
- [14] Komitopoulou E., Boziaris I.S., Davies E.A. Delves-Broughton J., Adams M.R.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1999, **34**, 81-85.
- [15] Lee S.Y., Chung H.J., Kang D.H.: Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. *J. Food Protect.*, 2006, **69** (5), 1056-1060.
- [16] Lee S.Y., Dougherty R.H., Kang D.H.: Inhibitory effect of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 4158-4161.
- [17] Maldonado M.C., Belifiore C., Navarro A.R.: Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. *J. Ind Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **35**, 141-144.
- [18] Niwa M., Kawamoto A.: Development of a rapid detection method of *A. acidoterrestris*, hazardous bacteria to acidic beverage. *Fruit Process.*, 2003, **13** (2), 102-107.
- [19] Orr R.V., Shewfelt R.L., Huang C.J., Tefera S., Beuchat L.R.: Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses, and comparison with spore and vegetative cell populations. *J. Food Prot.*, 2000, **11**, 1517-1522.
- [20] Peña W.E.L., de Messaguer P.R.: Use of artificial neural networks for modeling survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 in apple juice. 20th Intern. ICFMH Symposium Food Micro, Bologna, Italy, 2006, august 29 – september 2, p. 527.
- [21] Pettipher G.L., Osmundson M.E., Murphy J.M.: Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestis* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Lett Appl. Microbiol.*, 1997, **24**, 185-189.
- [22] Silva F.V.M., Gibbs P., Vieira M. C., Silva C.L.M.: Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **51** (2/3), 95-103.
- [23] Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M.: Ciepłoporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2008, **12**, 22-27.
- [24] Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M.: Wpływ kwasów organicznych na kiełkowanie i wzrost populacji szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 2009, t. **64**, 66-76.

- [25] Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M.: Wpływ konserwantów na rozwój *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 2010, **4**, 18-20.
- [26] Splittstoesser D.F., Churey J.J., Lee C.Y.: Growth characteristic of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. J. Food Protect., 1994, **57** (12), 1080-1083.
- [27] Thomas L.V., Delves-Broughton J.: Nisin. In: Antimicrobials in food. Ed. by Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L., 3-rd ed. Taylor & Francis Group. Boca Raton, USA, 2005, pp. 237-274..
- [28] Walczak P.: Podstawy genetyczne produkcji bakteriocyn przez bakterie fermentacji mlekowej. W: Bakterie fermentacji mlekowej. Klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie. Red. Z. Libudzisz, P. Walczak, J. Bardowski. Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź 1998.
- [29] Walker M., Phillips C.A.: The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. Food Control, 2008, **19** (10), 974-981.
- [30] Yamazaki K., Murakami M., Kawai Y., Inoue N., Matsuda T.: Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. Food Microbiol., 2000, **17**, 315-320.

EFFECT OF NISIN AND LYSOZYME ON GROWTH OF *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* STRAINS AND POTENTIAL TO USE THOSE COMPOUNDS AS BIO-PRESERVATIVES IN APPLE JUICE

S u m m a r y

Acidothermophilic and spore-forming bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris* can cause pasteurized fruit and vegetable juices to spoil.

The effectiveness was examined of nisin and lysozyme used as natural preservatives to prevent apple juice from being spoiled by those bacteria.

For each of the eight strains studied, a Minimal Inhibitory Concentration (MIC) level of nisin and lysozyme contained in the culture medium was determined. Depending on the strain, the MIC value of nisin was from 100 IU/cm³ to 1500 IU/cm³ of medium with regard to spores, and, with regard to vegetative forms, the MIC value ranged from 50 IU/cm³ to 1250 IU/cm³ of medium. The lysozyme prevented *A. acidoterrestris* spores from growing at a concentration level from 0.005 mg/cm³ to 0.2 mg/cm³ of medium, and the growth of vegetative cells was inhibited by the lysozyme at a concentration level ranging from 0.05 mg/cm³ to 0.2 mg/cm³ of medium.

The results of the apple juice shelf life tests performed showed that the nisin was effective at the concentration levels equal to MIC. The growth of seven *A. acidoterrestris* strains was inhibited during their 28 day incubation period. The lysozyme at the concentration levels equal to MIC values guaranteed the durability of juice samples only during a period between 7 and 21 days.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, apple juice, nisin, lysozyme ☒

TOMASZ TARKO, ALEKSANDRA DUDA-CHODAK, ANNA BEBAK

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA WYBRANYCH WYTŁOKÓW OWOCOWYCH ORAZ WARZYWNYCH

Streszczenie

Celem pracy była ocena zawartości wybranych składników o potencjale biologicznym w wyciekach z: jabłek, winogron, buraków ćwikłowych oraz marchwi. W próbach oznaczono zawartość związków polifenolowych i ich aktywność przeciwutleniającą oraz zawartość cukrów, błonnika i pektyn. Wykazano, że ekstrakty uzyskane z wycieków winogronowych charakteryzują się najwyższym wśród badanych wycieków potencjałem przeciwutleniającym. Względnie wysoki potencjał przeciwutleniający stwierdzono również w wyciekach z jabłek. Zawartość polifenoli w odpadach owocowych była około 5-krotnie większa niż w wyciekach buraczanych i marchwiowych. Mimo małej zawartości suchej masy, wycieki marchwiowe stanowią dobre źródło β -karotenu. Uzyskane wyniki wskazują także, że wycieki buraczane, winogronowe i jabłkowe stanowią bogate źródło błonnika. Zawartość pektyn w analizowanych wyciekach kształtowała się na zbliżonym poziomie. Jedynie odpady jabłek zawierały prawie 2-krotnie więcej pektyn niż pozostałe wycieki.

Słowa kluczowe: wycieki owocowo-warzywne, aktywność przeciwutleniająca, polifenole, β -karoten, błonnik, pektyny

Wprowadzenie

Podczas przetwarzania surowców w przemyśle owocowo-warzywnym powstają odpady poprodukcyjne oraz ścieki. Ilość odpadów wytwarzanych z przerobu owoców i warzyw mieści się w granicach 10 - 35 % masy przetworzonego surowca [17]. Największy udział w powstających odpadach mają wycieki. Są materiałem nietrwałym, niestabilnym, a duża zawartość wody (nawet do 73 % w wyciekach jabłkowych) może prowadzić do szybkiego wzrostu zanieczyszczeń mikrobiologicznych [17]. Powstająca duża masa wycieków w krótkim okresie stanowi ważny problem dla przedsiębiorstw przetwórczych. Natychmiastowa obróbka wytworzonych wycieków w miejscu ich powstawania mogłaby być rozwiązaniem tego problemu. Utrwalone (poprzez suszenie

Dr inż. T. Tarko, dr A. Duda-Chodak, mgr inż. A. Bebak, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

lub kiszenie) czy też wstępnie przetworzone odpady nadawałyby się do dalszego ich wykorzystania [5, 31].

Mimo problemów niestabilności mikrobiologicznej wyczołki są bogatym źródłem wielu wartościowych składników, m.in.: sacharydów, białek, związków mineralnych, pektyn, błonnika, lipidów, kwasów organicznych, witamin, aldehydów, alkoholi oraz substancji barwnych i aromatycznych. Dlatego powinno się je traktować jako półprodukt do dalszego przerobu [9]. Wykorzystanie odpadów na świecie zmierza w kierunku przekształcania jak największych ich ilości do użytecznych produktów, poprzez procesy z udziałem mikroorganizmów. Główne badania są jednak prowadzone nad sposobami zminimalizowania narażenia środowiska naturalnego nie tylko poprzez pozycie się odpadów, ale właśnie przez ich konwersję do przydatnych składników [22].

Wyczołki są tanim oraz łatwo dostępnym materiałem do przetwarzania, a dodatkowo mogą zostać wykorzystane do różnych celów. Najpowszechniejszą metodą wykorzystania wyczołków jest ich użycie jako paszy, ze względu na wysoką zawartość takich składników, jak: kwasy organiczne, związki bezazotowe, cukry, substancje tłuszczowe oraz witaminy. Efektem ich zastosowania jest zmniejszenie kosztów żywienia zwierząt [29]. Pożądanym sposobem konwersji wyczołczyn jest proces beztlenowego ich przetwarzania z wytworzeniem energii w postaci biogazu. Ze względu na dużą zawartość związków węgla i azotu, a także śladową ilość składników, takich jak metale ciężkie, doskonale nadają się na jego źródło. Nawet 80 % materii organicznej wyczołków może przekształcić się w substytut naturalnego gazu o wartości energii 10 - 30 W/m³ [13]. Wyczołki, poprzez wykorzystanie ich do produkcji etanolu, mogą stać się ważnym źródłem do otrzymywania biopaliwa. Fermentacja cukrów do alkoholu jest postrzegana jako jedna z najlepszych metod służących do wydobycia z biomasy skumulowanej energii [6]. Odpadki owocowe i warzywne są również bogatym źródłem błonnika. Jest on bardzo ważnym elementem diety człowieka. Odgrywa znaczącą rolę w zapobieganiu nie tylko cukrzycy, ale także otyłości, miażdżycy, chorób serca i niektórych rodzajów raka [20]. Wyczołki z niektórych owoców i warzyw są istotnym źródłem pozyskiwania pektyn. Pektyny znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym jako hydrokoloidalne dodatki z właściwościami żelującymi, zagęszczającymi oraz stabilizującymi [12]. Innym sposobem wykorzystania wyczołków owocowo-warzywnych jest wydobycie z nich i produkcja barwników. Antocyjany nadają większości owoców oraz warzyw barwę od żółtej do niebieskiej [32]. Związki barwiące występują głównie w skórce, która należy do odpadów pozostających po tłoczeniu. Najlepszym źródłem barwników są owoce jagodowe, m.in. borówka czernica, aronia, czarna porzeczka, żurawina oraz warzywa – czerwona kapusta i bakłażan [14]. W odpadach pochodzących z przetwórstwa owocowo-warzywnego znajduje się dużo związków o silnej aktywności przeciwutleniającej – głównie polifenoli. Odgrywają one istotną rolę w ży-

wieniowych i sensorycznych właściwościach artykułów spożywczych [1]. Zainteresowanie związkami przeciwutleniającymi wynika przede wszystkim z aspektów zdrowotnych. Naturalne przeciwutleniacze, do których należą związki fenolowe oraz tokoferole stanowią efektywną ochronę komórek przed atakiem wolnych rodników, co wspomaga zapobieganie chorobom serca, nowotworom, zaćmie i powstrzymywanie procesów starzenia [4, 33]. Ważnymi składnikami, pozostającymi w masie odpadowej po tłoczeniu owoców i warzyw, są witaminy oraz prowitaminy. Podczas produkcji soków od 60 do 80 % występujących w marchwi karotenoidów, jest zatrzymywana w wytlókach i nie przechodzi do soku. Całkowita ich zawartość w wytlókach może dochodzić nawet do 2 g/kg suchej masy. Wartość ta zależy jednak od warunków procesu tłoczenia [26]. Pestki pochodzące z niektórych owoców oraz warzyw mogą zostać potraktowane jako źródło oleju o znacznym potencjale biologicznym. Oleje uzyskiwane z pestek należących do odpadów warzywnych są wysoko nienasycone. Zawierają dodatkowo odpowiednio dużo witaminy E, aby utrzymywać stabilność oksydacyjną występujących w oleju nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) [3]. Alternatywą utylizacji wytlóków jabłkowych może być wykorzystanie ich jako pożywki dla bakterii produkujących kwas mlekowy. Jest to związane z dużą zawartością w wytlókach związków łatwo metabolizowanych przez bakterie kwasu mlekowego, takich jak sacharydy (monosacharydy, disacharydy) oraz kwasy organiczne (cytrynowy, jabłkowy) [11].

Dokładne zbadanie zawartości cukrów, pektyn, błonnika, związków polifenolowych oraz określenie aktywności przeciwutleniającej wytlóków przyczyni się do lepszego poznania możliwości i sposobów pełniejszego ich wykorzystania. Celem pracy było określenie zawartości wybranych składników o potencjale biologicznym w wytlókach z: jabłek, winogron, buraków ćwikłowych i marchwi.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły wytloki winogron (laboratoryjna prasa tłokowa), jabłek (zakład Tymbark), marchwi (zakład w Olsztynku) i buraków ćwikłowych (zakład Hortex).

Analizy obejmowały oznaczenie zawartości: suchej masy metodą wagową, cukrów ogółem metodą Luffa-Schoorla, pektyn metodą karbazolową oraz błonnika metodą enzymatyczną wg AOAC [2]. Oznaczano również: aktywność przeciwutleniającą i zawartość związków fenolowych ogółem, a w wytlókach marchwiowych dodatkowo zawartości β -karotenu.

Do oznaczenia pektyn odważano 2 g wytlóków, dodawano 40 ml etanolu (80 %), ogrzewano pod chłodnicą zwrotną (30 min) i sączono. Sączek wraz z osadem przenoszono do kolby, dodawano 50 ml wody destylowanej, doprowadzano do wrzenia, są-

czono na gorąco i dopełniano przesącz do 100 ml. Uzyskany ekstrakt zawierał pektyny. Zawartość pektyn ogółem oznaczano metodą kolorymetryczną z karbazolem [10].

Aktywność przeciwutleniającą oznaczano metodą spektrofotometryczną [30]. Rodnik ABTS wytwarzano w wyniku reakcji pomiędzy 7 mM solą amonową kwasu 2,2'azynobis(3-etylenobenzotiazolinowego) i 2,45 mM pirosiarczynem potasu. W celu stabilizacji rodnika ABTS roztwór przetrzymywano w ciemności (temp. 22 - 25 °C) przez 18 h. Roztwór rozcieńczano z wykorzystaniem buforu fosforanowego (PBS) tak, aby jego absorbancja oznaczana przy długości fali 734 nm wynosiła $A = 0,70 \pm 0,02$ (ABTS_{0,7}). Wytloki liofilizowano (liofilizator Christ Ralpha 1-4) i poddawano ekstrakcji z użyciem 80 % metanolu (0,5 g w 25 ml). Ekstrakty (100 µl) i roztwór Trolox (stężenie 1 - 10 mg/100 ml) wprowadzano do 1 ml ABTS_{0,7} i mierzono absorbancję w 6. minucie. Aktywność przeciwutleniającą wyznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej wykreślonej z użyciem syntetycznej witaminy E (Trolox).

W celu oznaczenia zawartości związków fenolowych ogółem do 45 ml wody redestylowanej dodawano 0,25 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a (rozpuszczonego w wodzie w stosunku 1 : 1) i 0,5 ml 7 % Na₂CO₃, a następnie 5 ml ekstraktu z wytlóków (0,5 g w 25 ml 80 % metanolu). Absorbancję roztworów mierzono po 30 min w spektrofotometrze (Beckman DU 650, $\lambda = 760$ nm). Zawartość związków fenolowych ogółem wyznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej wykreślonej z użyciem katechiny [30].

Oznaczenie zawartości β -karotenu poprzedzano ekstrakcją wytlóków marchwiowych (2,5 g i 25 ml 80 % heksanolu, mieszadło magnetyczne, 3 h). Pomiaru dokonywano w spektrofotometrze (Beckman DU 650, $\lambda = 470$ nm), a zawartość β -karotenu wyznaczano na podstawie krzywej kalibracyjnej wykreślonej z użyciem β -karotenu.

Do określenia różnic między wartościami średnimi zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukey'a. Rozkład normalności określono za pomocą testu Kołgomorowa-Smirnova, wykorzystując program InStat3.

Wyniki i dyskusja

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono w tab. 1. oraz na rys. 1.

Zawartość suchej masy w wytlókach buraczanych, jabłkowych oraz winogronowych kształtowała się na podobnym poziomie od 30,7 do 33,7 %. Wytloki marchwiowe charakteryzowały się istotnie mniejszą zawartością analizowanego czynnika (4,9 %). Zawartość cukrów w wytlókach z marchwi, winogron oraz jabłek była mała (0,7 - 1,2 g/100 g ś.m.). Odpady powstałe z przerobu buraków ćwikłowych nie zawierały takiej ilości cukrów, która mogła być oznaczona przy użyciu metody Luffa-Schoorla.

Tabela 1

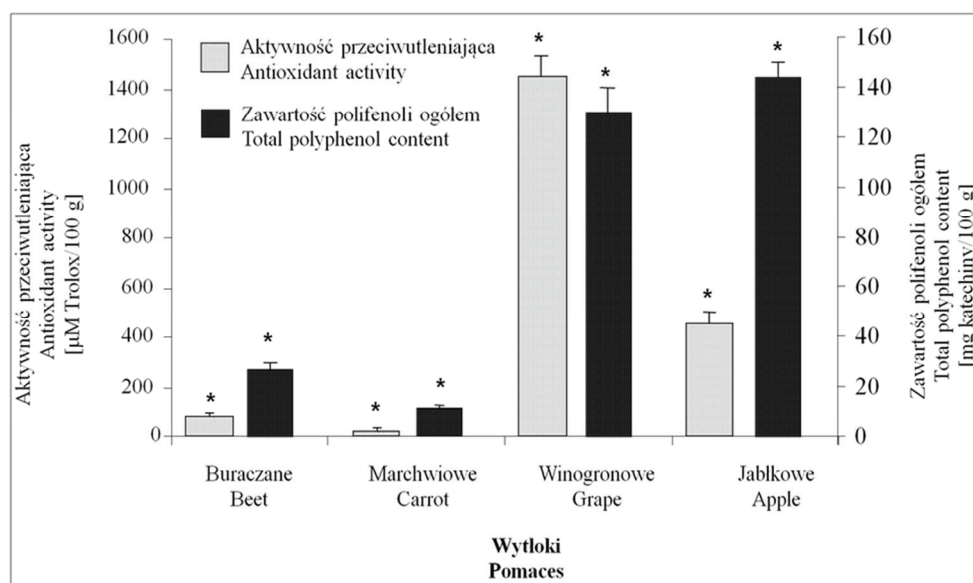
Zawartość suchej masy, cukrów ogółem, błonnika i pektyn w analizowanych wytłokach.
Contents of dry matter, total sugars, dietary fibre, and pectines in pomaces analyzed.

Wyróżnik Factor	Wytłoki Pomaces			
	buraczane beet pomace	marchwiowe carrot pomace	winogronowe grape pomace	jabłkowe apple pomace
Sucha masa [%] Dry matter [%]	33,5 ± 0,07 ^a	4,9 ± 0,06 ^a	32,6 ± 1,32 ^b	30,7 ± 1,94 ^c
Cukry ogółem [g/100 g ś.m.] Total sugars [g/100 g f.w.]	0 ^a	0,68 ± 0,079 ^b	0,93 ± 0,168 ^c	1,20 ± 0,052 ^d
Zawartość błonnika [g/100 g ś.m.] Dietary fibre [g/100 g f.w.]	12,8 ± 0,23 ^a	0,4 ± 0,57 ^b	8,9 ± 2,66 ^c	6,7 ± 0,61 ^d
Zawartość pektyn [g/100 g ś.m.] Content of pectines [g/100 g f.w.]	0,37 ± 0,046 ^a	0,27 ± 0,010 ^b	0,36 ± 0,007 ^a	0,66 ± 0,047 ^c

Objaśnienia: / Explanatory notes:

- wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; n = 3;

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



* – oznacza różnice statystycznie istotne w obrębie analizowanego parametru, $p < 0,05$ / means statistically significant differences at $p < 0.05$ within one analyzed parameter.

Rys. 1. Aktywność przeciwutleniająca i zawartość związków fenolowych ogółem w wytłokach.

Fig. 1. Antioxidant activity and total phenolic content in pomaces.

Potencjał przeciwutleniający ocenianych wytlóków był znacznie zróżnicowany (rys. 1). Największą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się wytloki z winogron (1452 mg Trolox/100 g ś.m.). Analizowane odpady warzyw (buraki, marchew) odznaczały się bardzo niską wartością ocenianego parametru (od 22 do 79 mg Trolox/100 g ś.m.). Przeprowadzono także doświadczenia mające na celu określenie zawartości polifenoli w wytlókach. Wykazano, że zawartość polifenoli w odpadach owocowych była około 5-krotnie większa niż w przypadku wytlóków buraczanych i z marchwi. Na uwagę zasługuje fakt, że wytloki jabłkowe, mimo że charakteryzowały się największą wśród analizowanych wytlóków zawartością polifenoli ogółem (143,7 mg/100 g ś.m.), miały względnie niską aktywność przeciwutleniającą. Dodatkowo w wytlókach z marchwi oznaczono zawartość β -karotenu i wykazano, że w 100 g świeżej masy znajduje się 1,8 mg β -karotenu.

Przeprowadzono również analizę zawartości błonnika oraz pektyn. Najwięcej błonnika zawierały wytloki buraczane (12,8 g/100 g ś.m.). Istotnie mniejszą jego zawartością charakteryzowały się wytloki winogronowe (8,9 g/100 g ś.m.). Wytloki marchwiowe zawierały nieznaczną ilość błonnika (0,4 g/100 g ś.m.) w porównaniu z pozostałymi rodzajami wytlóków. Zawartość pektyn w ocenianych wytlókach była względnie wyrównana (0,27 - 0,37 g/100 g ś.m.). Jedynie odpady po tłoczeniu jabłek charakteryzowały się wyższym stężeniem pektyn – 0,66 g/100 g.

Produkty z jabłek oraz winogron są ważnymi składnikami diety człowieka, spożywani w dużej ilości. Owoce te są doskonałym źródłem flawonoidów oraz innych wtórnych roślinnych metabolitów [24]. Tylko niewielka część związków fenolowych jest przekazywana do moszczu w procesie produkcji wina, reszta natomiast nadal pozostaje w wytlókach. Całkowitą zawartość możliwych do wyekstrahowania związków fenolowych szacuje się na poziomie 10 % w miążdze owocowej, 60 - 70 % w pestkach oraz 28 - 35 % w skórce [8]. Można zatem stwierdzić, że skórka oraz pestki winogron, stanowiące znaczną część wytlóków, są istotnym źródłem korzystnych dla zdrowia polifenoli. W niniejszej pracy wykazano, że wytloki powstające w trakcie procesu przetworu winogron są surowcem o największym potencjale przeciwutleniającym (1452 mg Trolox/100 g ś.m.), w porównaniu z pozostałymi badanymi wytlókami. W winogronach występują głównie kwasy cyanomonowe (kumarynowy, kawowy, chlorogenowy, ferulowy i neochlorogenowy) oraz kwasy benzoesowe (p-hydroksybenzoesowy, waniliowy, gallusowy). Do flawonoidów winogronowych zalicza się bezbarwne flawon-3-ole, takie jak katechina, epikatechina oraz ich barwne polimery i estry – flawanony, z których najbardziej znana jest kwercetyna, a także czerwone i niebieskie antocyjany [25]. Zawartość polifenoli w wytlókach winogronowych ocenianych w niniejszej pracy wyniosła 130 mg katechiny/100 g ś.m. (rys. 1). Materiał badawczy nie został rozdrobiony przed przeprowadzeniem ekstrakcji. Rzeczywista ilość polifenoli w analizowanych wytlókach była prawdopodobnie większa, ponieważ ich stężenie w pestkach jest

znacznie większe niż w skórce. Można się zatem spodziewać, że homogenizacja analizowanych wytlóków winogronowych dodatkowo wpłynęłaby na podwyższenie już i tak wysokiego ich potencjału przeciwutleniającego. Innym ważnym składnikiem winogron jest resweratrol, mający niezwykle wysoki potencjał przeciwutleniający [18]. Resweratrol występuje nie tylko w miększu i pestkach winogron, ale także w skórce [18]. Można przypuszczać, że jego obecność w skórkach analizowanych wytlóków miała duży udział w zwiększeniu aktywności przeciwutleniającej badanych w niniejszej pracy ekstraktów, mimo braku homogenizacji próbek. Resweratrol, należący do grupy stilbenów, występuje w dwóch formach *cis* oraz *trans*, z których to *trans* jest formą szerzej rozpowszechnioną o wyższej aktywności biologicznej i dominującej w winogronach [15]. Znaczne rozbieżności w wynikach pomiędzy potencjałem przeciwutleniającym wytlóków z winogron w porównaniu z zawartością polifenoli ogółem ($r = 0,64$) wskazują, że zawierają składniki, które nie należą do grupy związków fenolowych, a charakteryzują się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi. Smak oraz zapach większości owoców – w tym winogron – wynika z obecności różnorodnych estrów należących do klasy związków chemicznych tworzących olejki eteryczne [27]. Można przypuszczać, że właśnie olejki eteryczne oraz witaminy (B i C), oprócz polifenoli, miały pewien wpływ na aktywność przeciwutleniającą badanych wytlóków winogronowych.

Dużym potencjałem przeciwutleniającym (415 mg Trolox/100 ś.m.), wykazany w niniejszej pracy, charakteryzowały się również wytloki z jabłek. Ich aktywność była silnie skorelowana z ilością występujących związków fenolowych (142 mg katechiny/100 g ś.m., $r = 1$). Polifenole występujące w jabłkach składają się w ponad 50 % z procyanidyn należących do flawon-3-oli. Resztę stanowią natomiast glikozydy kwercetyny, kwasy fenolowe oraz chalkony, takie jak florydżyna i floretyna. Skład wytlóków zależy jednak od odmiany jabłek oraz stopnia ich dojrzałości. W jabłkach procyanidyny występują głównie jako 3 dimery: procyanidyna B1, B2 i B5, a także jako trimer C1. Zawartość tych związków zależy od odmiany jabłoni i warunków uprawy owoców oraz części jabłka. W skórce występuje więcej procyanidyn czy glikozydów kwercetyny niż w miększu [16]. W przeprowadzonych przez Kosmałą i Kołodziejczyka [16] badaniach ogólna zawartość procyanidyn w miększu wyniosła od 258 do 631 mg/kg, natomiast w skórce między 701 a 1445 mg/kg.

Wtórne metabolity roślinne buraków ćwikłowych znacznie różnią się od występujących w większości owoców oraz warzyw. Zawierają one betalainy, które mogą wykazywać aktywność przeciwutleniającą [24] i stanowią 75 - 95 % barwników czerwonych buraka. Zdolność betaniny do wychwytywania wolnych rodników przewyższa zdolności antocyjanów, a dodatkowo są one łatwo wchłaniane w przewodzie pokarmowym [21]. Potencjał przeciwutleniający wytlóków buraczanych wykazany w niniejszych badaniach (79 mg Trolox/100 g ś.m) wynikał prawdopodobnie z występowania

barwników betalainowych, a także od zawartości polifenoli (27 mg katechiny/100 g ś.m.).

Aktywność przeciwutleniająca marchwi związana jest z występującymi w niej witaminami, karotenoidami oraz polifenolami z grupy fenylopropanoidów. Najcenniejszym składnikiem marchwi jest α - i β -karoten, będący źródłem witaminy A w organizmie [26]. Ponieważ nie wszystkie składniki przechodzą do soku, w wyłokach pozostaje nadal pewna ilość β -karotenu. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki (ok. 2 mg/100 g ś.m.), pozwalają sądzić, że β -karoten ma duży wpływ na właściwości przeciwutleniające tych wyłoków. Związki fenolowe występujące w marchwi są reprezentowane przede wszystkim przez kwas chlorogenowy, p-hydroksybenzoesowy, kawowy oraz pochodne kwasu cynamonowego. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki aktywności przeciwutleniającej (22 mg Trolox/100 g ś.m.) oraz zawartość polifenoli ogółem (12 mg katechiny/100 g ś.m.) w wyłokach marchwiowych są małe. Prawdopodobnie przyczyną jest ogólna mała zawartość nie tylko polifenoli, ale i innych składników w wyłokach. Jest to związane z ich dużą wilgotnością i najmniejszą w porównaniu z analizowanymi wyłokami zawartością suchej masy. Polifenole gromadzone są głównie w skórce, a ich ilość zmienia się podczas przechowywania i dojrzewania. Ponadto wyłoki z marchwi mogą zawierać pewne ilości kwasów oligogalakturnowych, uznawanych za związki funkcjonalne żywności [28].

Większość komponentów błonnika, takich jak: pektyny, hemicelulozy i celuloza są składnikami ścian komórkowych roślin oraz ich skórek i pozostają w wyłokach podczas procesu produkcji soków [24]. Składniki rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej frakcji błonnika nie należą do substancji biologicznie czynnych, takich jak witaminy czy związki mineralne, mimo to wywierają znaczący wpływ na metaboliczne oraz fizjologiczne procesy w organizmie człowieka [19]. Stwierdzono, że największą zawartością błonnika odznaczały się wyłoki z buraków (12,8 g/100 g ś.m). Charakteryzowały się też największą zawartością suchej masy (33,7 %). Również znaczne ilości błonnika oznaczono w wyłokach winogronowych oraz jabłkowych. Uzyskane wyniki wskazują wyłoki buraczane, winogronowe oraz jabłkowe jako dobre źródło do odzysku błonnika. Wśród badanych wyłoków największą zawartość pektyn – stanowiących jeden ze składników rozpuszczalnej frakcji błonnika – oznaczono w wyłokach jabłkowych (0,66 g/100 g ś.m). Ich obecność w pozostałych wyłokach (buraczanych, marchwiowych, winogronowych) była 2 razy mniejsza. Świadczy to o niewielkim udziale tej frakcji w błonniku. Równocześnie potwierdza przekonanie, że zarówno jabłka, jak i wyłoki z nich są cennym źródłem tego składnika. Pektyna, aktualnie produkowana właśnie z wyłoków jabłkowych, ma silniejsze właściwości żelujące od np. pektyny owoców cytrusowych, jednak występowanie brązowienia enzymatycznego ogranicza jej dodatek do żywności o jasnym zabarwieniu [23]. Cohn i Cohn [7] podają, że średnia zawartość pektyn w wyłokach jabłkowych wynosi 1,5 - 2,5 % w suchej

masie wytlóków wynoszącej około 20 - 30 %. Na uwagę zasługuje fakt, że zawartość pektyn w badanych wytlókach, po przeliczeniu wyników ze świeżej na suchą masę, wynosiła 2,5 %. A zatem przeprowadzone badania wskazują, że zawartość pektyn w analizowanych wytlókach jest duża.

Wnioski

1. Spośród analizowanych surowców, wytloki z winogron i jabłek charakteryzowały się względnie wysoką aktywnością przeciwutleniającą (odpowiednio 1452 i 415 mg Trolox/100 g ś.m.) i zawartością związków polifenolowych (130 i 142 mg katechiny/100 g ś.m.).
2. Wytłoki jabłkowe charakteryzowały się dużą zawartością pektyn (0,66 g/100 g ś.m.), około dwukrotnie większą niż pozostałe analizowane surowce.
3. Oceniane wytloki stanowią dobre źródło błonnika pokarmowego. Najwięcej błonnika zawierały odpady z buraków ćwikłowych (12,8 g/100 g ś.m.).
4. Wytłoki marchwiowe, mimo małej zawartości suchej masy, stanowiły dobre źródło β -karotenu.

Literatura

- [1] Alonso-Salces R.M., Korta E., Barranco A., Burrueta L.A., Gallo B., Vicente F.: Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenol in apple. *J. Chromagr. A*, 2001, **933**, 37-43.
- [2] AOAC 985.29: Total Dietary Fiber in Foods Enzymatic-Gravimetric Method, 1985.
- [3] Ball G.F.M.: Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability. CRC Press Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2006.
- [4] Baydar N.G., Ozkan G., Cetin E.S.: Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas Y Aceites*, 2007, **58** (1), 29-33.
- [5] Borycka B.: Utylizacja wybranych produktów odpadowych przemysłu owocowo-warzywnego. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1999, **11**, 38-40.
- [6] Chatanta D.K., Attri C., Gopal K., Devi M. Bhalla T.C.: Bioethanol production from apple pomace left after juice extraction. *Int. J. Microbiol.*, 2008, **5** (2).
- [7] Cohn R., Cohn A.: The by-product of food processing. In: *Fruit processing*. D. Arthey, P. Ashurst Eds. Blackie Academic & Professional London 1998, pp. 210-218.
- [8] Dumitrina P., Leopold L., Ranga F., Fetea F., Pop N., Socaciu C.: Evaluation of residue composition of catechin compounds from wine industry through spectrometric and chromatographic methods. *Buletin USAMV-CN*, 2006, **62**, 338-342.
- [9] Fronc A., Nawirska A.: Możliwości wykorzystania odpadów z przetwórstwa owoców. *Ochr. Środ.*, 1994, **2** (53), 31-32.
- [10] Gołubowska G., Lisińska G.: Zmiany tekstury i zawartości związków pektynowych w ziemniakach podczas produkcji frytek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **1** (42), 63-70.
- [11] Gullon B., Falque E., Alonso J.L., Parajo J.C.: Evaluation of apple pomace as a raw material for alternative applications in food industries. *Food Technol. Biotechnol.*, 2007, **45** (4), 426-433.

- [12] Hromadkova Z., Malovikova A., Mozes S., Srodkova I., Ebringerova A.: Hydrophobically modified pectates as novel functional polymers in food and non – food applications. *BioResources*, 2008, **3** (1), 71-78.
- [13] Jewell W.J., Cummings R.J.: Apple pomace energy and solids recovery. *J. Food Sci.*, 1984, **49**, 407-410.
- [14] Kahkonen M., Heinamaki J., Ollilainen V., Heinonen M.: Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agric.*, 2003, **83**, 1403-1411.
- [15] King R., Bomser J., Min B.: Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive rev. Food Sci. Food Safety*, 2006, **5**, 65-70.
- [16] Kosmala M., Kołodziejczyk K.: Procyjanidyny najpopularniejszych w Polsce deserowych odmian jabłek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2** (47), 124-134.
- [17] Kumider J.: Utylizacja odpadów przemysłu rolno-spożywczego. Wyd. AE, Poznań 1996, ss. 66-70.
- [18] Lachman J., Sulc M., Faitova K., Pivec V.: Major factors influencing antioxidant contents and antioxidant activity in grapes and wines. *Int. J. Wine Res.*, 2009, **1**, 101-121.
- [19] Nawirska A., Kwaśniewska M.: Frakcje błonnika w wyłokach z owoców. *Acta Sci. Polon., Technolog. Aliment.*, 2004, **3** (1), 13-20.
- [20] Nawirska A., Uklańska C.: Waste products from fruit and vegetable processing as potential sources for food enrichment in dietary fibre. *Acta Sci. Polon., Technolog. Aliment.*, 2008, **7** (2), 35-42.
- [21] Nowak D., Kidoń M., Syta M.: Ocena zmian właściwości przeciwutleniających suszy buraka ćwikłowego i selera w zależności od zastosowanych operacji jednostkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **4** (59), 227-235.
- [22] Okonko I.O., Adeola O.T., Aloysius F.E., Damilola A.O., Adewale O.A.: Utilization of food wastes for sustainable development. *Electr. J. Environ., Agric. Food Chem.*, 2008, **8** (4), 263-286.
- [23] Oreopoulou V., Tzia C.: Utilization of plant by-product for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants and colorants. In: *Utilization of by-product and treatment of waste in the food industry*. V. Oreopoulou, W. Russ Eds. ISEKI-Food series 2007, pp. 209-232.
- [24] Sembries S., Dongowski G., Mehrlander F., Dietrich H.: Physiological effects of extraction juices from apple, grape and red beet pomace in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 10269-10280.
- [25] Shi J., Yu J., Pohorly J., Kakuda J.: Polyphenolics in grape seeds – Biochemistry and functionality. *J. Med. Food*, 2003, **6** (4), 291-299.
- [26] Singh B., Panesar P.S., Nanda V.: Utilization of carrot pomace for the preparation of a value added product. *World J. Dairy Food Sci.*, 2006, **1** (1), 22-27.
- [27] Stewart D.: The chemistry of essential oils. CARE Publications, Marble Hill, MO. 2005, pp.145.
- [28] Stoll T., Schweiggert U., Schieber A., Carle R.: Application of hydrolyzed carrot pomace as a functional food ingredient to beverages. *Food, Agric. Environ.*, 2003, **1** (2), 88-92.
- [29] Świątkiewicz S., Koreleski J.: Próba zastosowania suszonych wyłoków jabłecznych jako dodatku dietetycznego w żywieniu kur nieśnych. *Polskie Drobiarstwo*, 2003, **4**, 11-13.
- [30] Tarko T., Duda-Chodak A., Sroka P., Satora P., Michalik J.: Transformations of phenolic compounds in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract. *Food Technol. Biotechnol.*, 2009, **47** (4), 456-463.
- [31] Tarko T., Sobusiak J., Duda-Chodak A.: Sposoby wykorzystania odpadów przemysłu owocowo-warzywnego. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2009, **3**, 21-31.
- [32] Vatai T., Skerget M., Knez Z., Kareth S., Wehowski M., Weidner E.: Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *J. Supercritic. Fluids*, 2008, **45**, 32-36.
- [33] Waladkhani A.R., Clemens M.: Effect of dietary phytochemicals on cancer development. In: *Vegetables, fruits and herbs in health promotion*. R.R. Watson Eds. CRC Press LLC, Boca Raton 2001, pp. 2-11.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SELECTED FRUIT AND VEGETABLE POMACES**S u m m a r y**

The objective of the study was to determine the content of selected components with biological potential in apple, grape, red beet, and carrot pomaces. In the samples investigated determined were: content of polyphenolic compounds and their antioxidant activity, content of sugars, and contents of dietary fibre and pectines. It was shown that the extracts obtained from the grape pomace were characterized by the highest antioxidant potential among all the samples analyzed. A relatively high antioxidant potential was also found in the apple pomace. The content of polyphenols in fruit waste was approximately 5 time higher than in the beet and carrot pomaces. Although the carrot pomace contains a low content of dry matter, it is still is a good source of β -carotene. The results obtained also prove that the beet, grape, and apple pomaces constitute a rich source of fibre. The content levels of pectines in the pomaces analyzed were similar. Only the waste of apples contained almost twice as much pectines as other pomaces.

Key words: fruit and vegetable pomaces, antioxidant activity, polyphenols, β -carotene, dietary fibre, pectines 

MAGDALENA MICHALCZYK, DANIEL KUCZEWSKI

ZMIANY ZAWARTOŚCI SKŁADNIKÓW O CHARAKTERZE PROZDROWOTNYM W PRZECHOWYWANYCH SORBETACH Z OWOCÓW JAGODOWYCH

Streszczenie

Owoce borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*), maliny (*Rubus ideaus* L.) i truskawki (*Fragaria ananassa* Duch) przetworzono na sorbety, które przechowywano w temperaturze -22 °C przez 10 miesięcy. Produkcja sorbetów obejmowała pozyskanie soku, jego ogrzanie wraz z dodatkiem cukru oraz stabilizatora, a następnie zamrożenie we frezerze cukierniczym. Po przetworzeniu oraz w trakcie przechowywania analizowano zawartość związków fenolowych, antocyjanów, witaminy C oraz wskaźnika właściwości antyoksydacyjnych – siły redukującej. Największe straty analizowanych substancji po przetworzeniu owoców na sorbety odnotowano w przypadku borówki. Stwierdzono znaczący ubytek witaminy C we wszystkich przechowywanych produktach. Jej zawartość po 10 miesiącach wynosiła 43 % (sorbet malinowy) i 67 % (sorbet truskawkowy) ilości oznaczonej w świeżym produkcie. Natomiast zawartość antocyjanów i związków fenolowych w trakcie przechowywania sorbetów nie ulegała większym zmianom. We wszystkich przypadkach zaobserwowano zmniejszenie siły redukującej o co najmniej 50 % w porównaniu z wartością początkową. Pomimo tych strat, sorbety z owoców jagodowych mogą być atrakcyjnym nośnikiem związków fenolowych o walorach prozdrowotnych w diecie w okresach, kiedy świeży surowiec jest trudno dostępny.

Słowa kluczowe: owoce jagodowe, sorbet, przechowywanie, witamina C, polifenole, antocyjany

Wprowadzenie

Sorbety, podobnie jak lody, szербety czy mrożony jogurt należą do deserów mrożonych. Składnikami do ich produkcji są: woda, soki i zagęszczone soki owocowe, puree z owoców, cukier, syrop glukozowy, inne cukry i substancje słodzące, kwas cytrynowy, aromaty, substancje barwiące oraz emulgatory i stabilizatory [3, 10]. Sorbety są produkowane w bardzo szerokim asortymencie smaków, również w wersjach bez dodatku cukru [4]. Także tekstura tego produktu może być bardzo różna: od du-

żych kryształów lodu wpływających na odczuwanie świeżości w trakcie konsumpcji po drobne kryształki w wyrobach tworzące wrażenie kremistości [3].

Zaletą sorbetów dla konsumenta jest to, że w przeciwieństwie do lodów klasycznych nie zawierają tłuszczu [3]. Istotną cechą tych deserów jest również to, że w swej podstawowej postaci nie zawierają składników mleka, co ma znaczenie dla osób z alergią bądź stosujących dietę bez produktów mlecznych. Do bardziej popularnych należą sorbety o smaku: malinowym, cytrynowym, truskawkowym i czekoladowym [10]. Większość produkowanych sorbetów zawiera od 10 do 40 % owoców [10]. W niektórych krajach nie ma regulacji dotyczących minimalnej dopuszczalnej zawartości owoców lub soków w sorbetach, w innych wartości te wynoszą od 15 do 30 %, zależnie od gatunku owoców [3]. Ze względu na skład sorbety mogą być nie tylko atrakcyjnym sensorycznie deserem, ale również składać się na wartościową prozdrowotną dietę. Wiele owoców jagodowych o prozdrowotnych właściwościach to surowce dostępne w stanie świeżym sezonowo, przez krótki czas. Mrożonki z nich nie dla wszystkich konsumentów mogą być atrakcyjne. Stąd też sorbety z owoców jagodowych mogą być cennym i atrakcyjnym składnikiem całorocznej diety. Halvorsen i wsp. [8] szacują, że owoce jagodowe dostarczają około 27,1 % ogólnej ilości roślinnych antyoksydantów w diecie Norwegów. Do najpopularniejszych owoców jagodowych należą maliny, truskawki i borówki. Te ostatnie są szczególnie bogate w antocyjany, których zawartość może wynosić nawet ponad 300 mg/100 g owoców [19]. Antocyjanom zawartym w borówkach przypisuje się właściwości poprawiania mikrocyrkulacji krwi oraz redukcję niektórych zaburzeń wzroku [12, 13]. W tradycyjnej medycynie ludowej stosuje się je do regulowania pracy układu pokarmowego. Truskawki oprócz antocyjanów, katechin, kwercetyny, kemferolu i kwasu askorbinowego są bogate w kwas elagowy [7]. Duże ilości tej substancji zawierają również maliny, które są ponadto bogatsze w antocyjany. Stwierdzono m.in., że wodne ekstrakty z malin mają zdolność przeciwdziałania namnażaniu się niektórych komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* [9]. Wykazano również aktywność antybakteryjną soku z tych owoców [20].

Celem pracy było określenie zmian zawartości istotnych, prozdrowotnych składników owoców jagodowych (związków fenolowych, antocyjanów i witaminy C) po przetworzeniu ich na sorbety. Badano również wpływ długookresowego zamrażalniczego przechowywania otrzymanych produktów na zawartość wymienionych związków.

Material i metody badań

Surowcem do badań była malina (*Rubus ideaus* L.), truskawka (*Fragaria ananassa* Duch) oraz borówka czernica (*Vaccinium myrtillus*). Owoce pochodzące ze zbiorów w roku 2006 zakupiono na lokalnym rynku. Z owoców po umyciu, osuszeniu i usunięciu sztuk uszkodzonych uzyskano sok w sokowirówce (Zelmer, typ 177). Do soku

dodawano 20 % cukru i 0,2 % stabilizatora (SWISSGUM F-6068). Całość poddawano pasteryzacji w temp. 82 °C przez 5 min. Po ostudzeniu półprodukt przelewano do zbiornika frezera cukierniczego MHFU/5a (Mirkoz, Węgry). Uzyskane zamrożone sorbety dzielono na porcje i umieszczano w polipropylenowych opakowaniach jednostkowych (przygotowano 40 prób każdego rodzaju sorbetu). Produkt domrażano, a następnie przechowywano w temp. -22 ± 1 °C przez 10 miesięcy. Analizom poddawano świeże owoce, sorbety 24 h po wytworzeniu oraz produkty przechowywane, w odstępach jednego miesiąca. W próbach analizowano ogólną zawartość polifenoli, zawartość antocyjanów, witaminy C oraz siłę redukującą jako wskaźnik właściwości antyoksydacyjnych.

Ogólną zawartość polifenoli oznaczano zgodnie z metodyką opisaną przez Singletona i Rossiego [21] z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteau'a. Absorbancję, przy długości fali $\lambda = 750$ nm, mierzono w spektrofotometrze Cecil UV/VIS CE 9500 (Cecil Instruments, Cambridge England). Wyniki odczytywano na podstawie wykreślonej uprzednio krzywej kalibracyjnej i wyrażano jako równoważniki kwasu galusowego (GAE) w mg/100 g produktu.

Antocyjany ogółem oznaczano zgodnie z metodyką opisaną przez Giusti i Wrolstada [6]. Wyniki wyrażano jako mg cyjanidyno-3-glukozydu w 100 g próbki. Indeks degradacji (ID) tych związków oznaczano metodą różnicowego pH zgodnie z opisem podanym przez Fuleki i Francisa [5]. ID definiowany jest jako stosunek ogólnej zawartości antocyjanów (zdegradowanych i niezdegradowanych) do zawartości antocyjanów niezdegradowanych.

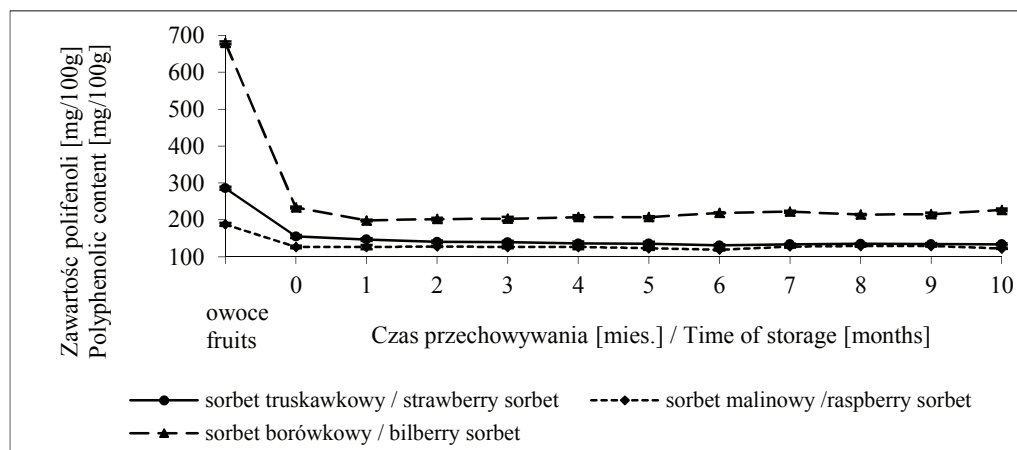
Zawartość witaminy C oznaczano z wykorzystaniem chromatografu HPLC typu Merck-Hitachi LaChrome (Darmstadt, Niemcy), zgodnie z normą [18].

Siłę redukującą (określającą właściwości przeciwutleniające surowca poprzez zdolność jego ekstraktu do redukcji jonów Fe^{+3} do Fe^{+2}) analizowano zgodnie z metodyką podaną przez Yena i Chena [27]. Siłę redukującą wyrażano jako absorbancję przy długości fali $\lambda = 700$ nm mierzoną 7 min od rozpoczęcia reakcji.

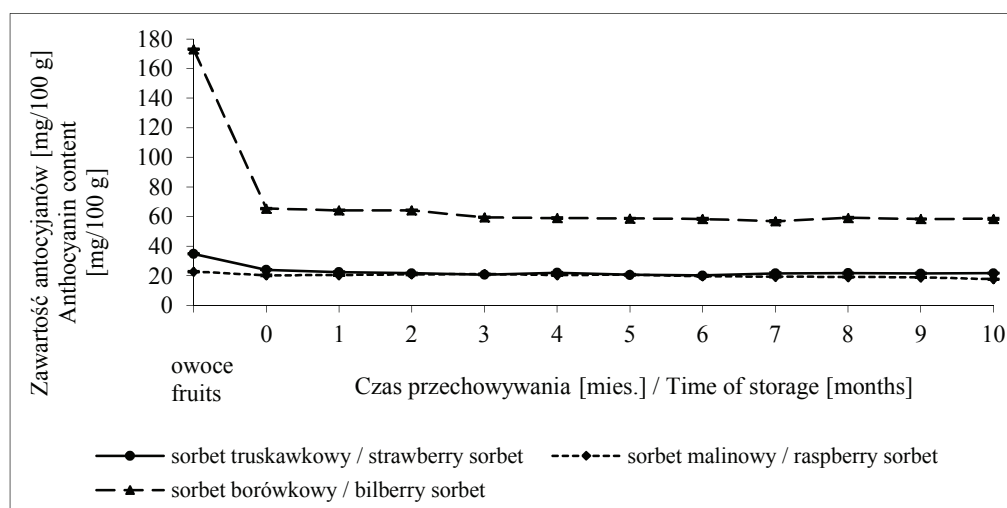
Oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach. Obliczenia statystyczne, w tym oznaczenie wartości odchyłeń standardowych i współczynników korelacji, przeprowadzono przy użyciu pakietu CSS Statistica. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test Schaff. Analizowano istotność różnic przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Zawartość polifenoli w sorbetach: truskawkowym, malinowym i borówkowym w odniesieniu do samych owoców, bez uwzględnienia dodatku cukru, wynosiła odpowiednio: 65 %, 81 % oraz 41 % tej stwierdzonej w świeżych owocach. Zmiany zawartości polifenoli w owocach oraz w przechowywanych sorbetach przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Zmiany zawartości polifenoli w owocach oraz w przechowywanych sorbetach [mg GAE/100 g].
Fig. 1. Changes in polyphenol content [mg GAE/100 g] in fruits and stored sorbets.

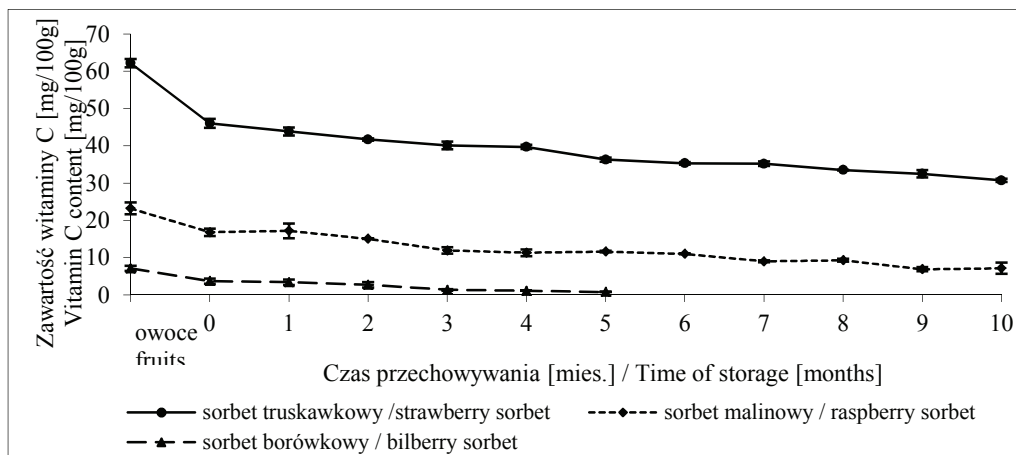


Rys. 2. Zmiany zawartości antocyjanów w owocach oraz w przechowywanych sorbetach [mg cyjanidyno-3-glukozydu/100 g].
Fig. 2. Changes in anthocyanins content [mg of cyanidin-3-glucoside/100 g] in fruits and stored sorbets.

Statystycznie istotne ($p \leq 0,05$), choć mniejsze straty zaobserwowano również pod względem zawartości antocyjanów. Zmiany zawartości tych składników przedstawiono na rys. 2. Duże straty związków fenolowych w produkcie wytworzonym z owoców borówki wynikają niewątpliwie z obecności relatywnie grubej i mocnej skórki, w której skoncentrowane są te związki. Skrede i wsp. [22], badając sok z owoców bo-

rówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.), również stwierdzili, że pomimo uzyskania 83-procentowej wydajności, w soku tym znalazło się jedynie 32 % antocyjanów obecnych w owocach. Przypisali to zarówno dużej ilości antocyjanów, które pozostały w wytlókach, jak i również degradacji tych związków w trakcie procesu otrzymywania soku przez enzymy endogenne. Najważniejszymi endogennymi enzymami odpowiedzialnymi za straty związków fenolowych są oksydaza polifenolowa oraz peroksydaza [26].

Duża zawartość antocyjanów w pozostałych sorbetach, a zwłaszcza malinowym, jest zapewne m.in. wynikiem tego, że znaczącą część odpadu po wytworzeniu soku z tych owoców stanowiły pestki. Ponadto antocyjany zawarte w malinach występują w postaci pochodnych di- i trisacharydów, które są bardziej stabilne niż monosacharydy antocyjanów zawarte w truskawkach [15]. Owoce borówki ze względu na prozdrowotne właściwości zawartych w nich związków fenolowych stanowią składnik czynny wielu parafarmaceutyków. Stosunkowo mała zawartość tych związków w gotowym sorbecie, w porównaniu z surowcem, mogłaby być zwiększona poprzez zmianę receptury uwzględniającą np. zastosowanie homogenatu z tych owoców lub też modyfikacje metod uzyskiwania soku. Na wydajność ekstrakcji antocyjanów w trakcie otrzymywania soku wpływ mają m.in. temperatura tłoczenia i zastosowanie preparatów enzymatycznych do maceracji miazgi [14, 15]. Po procesie przetwarzania stwierdzono również statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) straty witaminy C, na które wpływ miał proces pozyskiwania soku, ogrzewania mieszanki sorbetowej i zamrażania produktu. Największe straty tej witaminy wystąpiły w borówkach (rys. 3).



Rys. 3. Zmiany zawartości witaminy C w owocach oraz w przechowywanych sorbetach [mg/100 g].

Fig. 3. Changes in vitamin C content [mg/100 g] in fruits and stored sorbets.

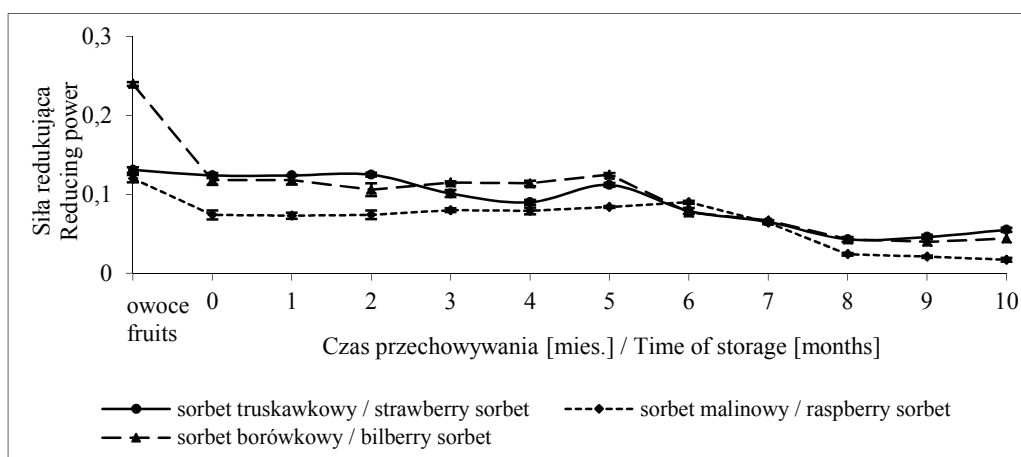
W trakcie przechowywania gotowych sorbetów substancje polifenolowe oraz antocyjany cechowały się bardzo dobrą stabilnością (rys. 1 i 2). Również indeks degradacji antocyjanów w trakcie przechowywania sorbetów nie ulegał statystycznie istotnym zmianom i utrzymywał się na poziomie 1,2; 1,3; 1,1 odpowiednio w przypadku sorbetu truskawkowego, malinowego i borówkowego.

Dane literaturowe wskazują zarówno na zmniejszenie zawartości ekstrahowanych związków polifenolowych i antocyjanów w przechowywanych zamrażalniczo owocach [1, 2, 11, 16], jak i stabilność, a nawet zwiększenie ich zawartości [1, 2, 23, 25]. De Ancos i wsp. [1, 2] podają, że większa lub mniejsza stabilność ekstrahowanych związków fenolowych w trakcie zamrażalniczego przechowywania uzależniona jest od odmiany owoców m.in. ze względu na różne proporcje zawartości poszczególnych antocyjanów w różnych odmianach i różną aktywność w nich oksydazy polifenolowej. Wskazuje się też na ochronną rolę względem omawianych substancji dodatku do mrożonych owoców substancji, takich jak: cukier, pektyna czy kwas askorbinowy [11, 16]. Jak podają Ścibisz i wsp. [24], połowiczny czas rozpadu antocyjanów w dżemach z borówki wysokiej przechowywanych w temp. 22 °C wynosił 73,4 dnia, co wskazuje na to, że przetworzenie owoców na sorbety umożliwia skuteczniejsze zachowanie w nich tych składników.

Znacznie mniejszą stabilnością w trakcie przechowywania sorbetów cechowała się witamina C. Po 10 miesiącach składowania jej zawartość zmniejszyła się do 66,7 i 42,6 % zawartości w świeżych sorbetach truskawkowym i malinowym. Zawartość witaminy C w sorbecie borówkowym zmniejszyła się tak znacząco, że już po 5 miesiącach była na poziomie poniżej 1 mg/100 g produktu. Do strat witaminy C przyczyniają się: utlenianie tlenem oraz działanie enzymów. W truskawkach przechowywanych przez 5 miesięcy w temp. -18 °C Palich i Puksza [17] stwierdzili 24-procentowe straty witaminy C, natomiast w -8 °C straty wynosiły 34 %. Produkty mrożone sprzedawane w handlu podlegają fluktuacjom temperatury przechowywania, co może powodować znacznie większe ubytki witaminy C w sorbetach niż stwierdzone w tej pracy. Przechowując groszek zielony i truskawki w temp. -18 °C i -8 °C z 48-godzinnym cyklem zmiany Palich i Puksza [17] wykazali, że straty kwasu L-askorbinowego po 5 miesiącach przechowywania były większe niż w tych samych surowcach składowanych w stałej temp. -8 °C i w mrożonych truskawkach wynosiły 44 %. Autorzy ci stwierdzili również, że przechowywanie w temperaturach zmiennych znacznie wzmaga ususzkę, co zwiększa dostęp tlenu i ułatwia utlenianie witaminy C. Straty witaminy C dochodzące do 72 % w przechowywanych przez rok w -25 °C owocach borówki wysokiej stwierdziła Skupień [23], natomiast de Ancos i wsp. [1] ubytek tej witaminy po rocznym składowaniu w -20 °C różnych odmian malin określili na poziomie do 55 %. Porównanie tych danych z wynikami uzyskanymi w sorbetach sugeruje, że ani zastoso-

wana łagodna obróbka cieplna, ani dodatek cukru nie wpłynęły w wyrażnie spowalniający sposób na rozkład witaminy C w przechowywanym zamrażalniczo produkcie.

Właściwości antyoksydacyjne świeżych sorbetów, mierzone wielkością siły redukującej, wyraźnie zmniejszyły się w porównaniu z nieprzetworzonymi owocami maliny i borówki (rys. 4). W przypadku owoców truskawki zmniejszenie oznaczonej wartości było statystycznie nieistotne ($p > 0,05$).



Rys. 4. Zmiany wartości siły redukującej (A_{700}) w owocach oraz w przechowywanych sorbetach.

Fig. 4. Changes in value of reducing power (A_{700}) in fruits and stored sorbets.

Przechowywaniu gotowych wyrobów towarzyszyło dalsze zmniejszenie właściwości przeciwutleniających, jednak wyraźnie zauważalne było ono dopiero od piątego miesiąca składowania. Współczynnik korelacji pomiędzy siłą redukującą a zawartością witaminy C był stosunkowo wysoki i w przypadku sorbetów truskawkowego, malinowego i borówkowego wynosił odpowiednio: $r = 0,77$; $0,71$; $0,83$. Natomiast współczynniki korelacji pomiędzy wartościami siły redukującej a zawartością antocyjanów i polifenoli były niższe i wynosiły odpowiednio: $r = 0,44$; $0,86$; $0,83$ (antocyjany) oraz $r = 0,48$; $0,49$; $0,78$ (polifenole). De Ancos i wsp. [1] bezpośrednio po zamrożeniu malin stwierdzili zmniejszenie aktywności wygaszania wolnego rodnika DPPH, którego wielkość zależała od odmiany owocu, natomiast w trakcie rocznego zamrażalniczego przechowywania większych zmian właściwości antyoksydacyjnych malin już nie stwierdzili. Autorzy ci stwierdzili również niski współczynnik korelacji pomiędzy ogólną zawartością składników fenolowych a aktywnością przeciwrodnikową w czasie zamrażalniczego przechowywania badanych przez nich malin.

Wnioski

1. Sorbety z owoców jagodowych mogą być atrakcyjnym nośnikiem polifenoli zawartych w tych cennych żywieniowo owocach. W produktach tych stabilność związków fenolowych, a zwłaszcza antocyjanów w trakcie dziesięciomiesięcznego przechowywania w temp. -22 °C była bardzo wysoka.
2. Ze względu na stosunkowo niski wskaźnik związków fenolowych przechodzących do soku w trakcie jego pozyskiwania z borówek korzystne wydaje się wzbogacenie sorbetu o dodatek homogenatu z tych owoców lub zmodyfikowanie metody pozyskiwania soku.
3. Składnikiem, którego zawartość zmniejszała się znacząco w trakcie okresu zamrażalniczego składowania produktów, była witamina C.

Literatura

- [1] De Ancos B., González E.M., Cano M.P.: Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48** (10), 4565-4570.
- [2] De Ancos B., Ibañez E., Reglero G., Cano M.P.: Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48** (3), 873-879.
- [3] Christensen E. S.: Summer sorbets: the texture factor. *Dairy Industr. Int.*, 1997, **62** (6), 39, 41.
- [4] Cvetan D.: Sorbet sales soaring. *Dairy Field*, 1997, **180** (2), 20.
- [5] Fuleki T., Francis F.J.: Quantitative methods for anthocyanins. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci.*, 1968, **33**, 78-83.
- [6] Giusti M.M., Wrolstad R.G.: Characterisation and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. Eds J. Wiley and Sons, New York 2001, pp. F1.2.1 – F1.2.13.
- [7] Hannum S.M.: Potential impact of strawberries on human health: A review of the science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, **44**, 1-17.
- [8] Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C.W., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S.F., Wold A.B., Haffner K., Baugerød H., Andersen L.F., Moskaug J.O., Jacobs D.R., Biomhoff R.: Systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.*, 2002, **132**, 461-472.
- [9] Juranic Z., Zizak Z., Tasic S., Petrovic S., Nidzovic S., Leposavic A., Stanojkovic T.: Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars. *Food Chem.*, 2005, **93** (1), 39-45.
- [10] Klahorst S.: The “skinny” on frozen dessert specialties. *Food Product Design*, 1997, **7**(7), 93-94, 96, 98, 103-104, 107-108, 110, 112.
- [11] Kmiecik W., Jaworska G., Lisiewska Z.: Effect of sucrose, L-ascorbic acid and pectin on the quality of frozen strawberries. *EJPAU.*, 2000, **3** (2), 1-15.
- [12] Morazzoni P., Bombardelli E.: *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia*, 1996, LXVII, 3-29.
- [13] Murray M.T.: Bilberry (*Vaccinium myrtillus*). *Am. J. Nat. Med.*, 1997, **4** (1), 18-22.
- [14] Narwojsz A., Borowska E.J.: Zmiany składników strukturotwórczych owoców porzeczki czarnej podczas maceracji miazgi a uwalnianie polifenoli do soku. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **1** (74), 87-98.

- [15] Oszmiański J.: Zachowanie przeciwutleniaczy w czasie produkcji soków i przecierów z jabłek i owoców jagodowych. W: *Przeciwutleniacze w żywności, aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*. Red.. W. Grajek. WNT, Warszawa 2007.
- [16] Oszmiański J., Wojdyło A., Kolniak J.: Effect of L-ascorbic acid, sugar, pectin and freeze-thaw treatment on polyphenol content of frozen strawberries. *LWT-Food Sci.Technol.*, 2009, **42**, 581-586.
- [17] Palich P., Pukszta T.: Zmiany zawartości witaminy C mrożonych warzyw i owoców w czasie przechowywania. *Chłodnictwo*, 2001, **36** (7), 43-45.
- [18] PN-EN 14130:2003. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie witaminy C za pomocą HPLC.
- [19] Prior R.L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwan J., O'Brien Ch., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G., Mainland C.M.: Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 2686-2693.
- [20] Ryan T., Wilkinson J.M., Cavanagh H.M.: Antibacterial activity of raspberry cordial *in vitro*. *Res. Vet. Sci.*, 2001, **71**, 155-159.
- [21] Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, **16**, 144-158.
- [22] Skrede G., Wrolstad R.E., Durst R.W.: Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Food Sci.*, 2000, **65** (2), 357-364.
- [23] Skupień K.: Evaluation of chemical composition of fresh and frozen berry fruits (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus.*, 2006, **5** (1), 19-25.
- [24] Ścibisz I., Gasik A., Mitek M., Cendrowski A.: Wpływ warunków przechowywania na barwę dżemów z owoców kolorowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **1** (74), 99-111.
- [25] Ścibisz I., Mitek M.: Wpływ procesu mrożenia i zamrażalniczego przechowywania owoców borówki wysokiej na zawartość antocyjanów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **5** (54), 231-238.
- [26] Tomás-Barberán F.A., Espín J.C.: Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 2001, **81** (9), 853-876.
- [27] 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.

QUANTITATIVE CHANGES IN HEALTH-PROMOTING COMPONENTS IN STORED SORBETS OBTAINED FROM BERRY FRUITS

S u m m a r y

Sorbets made from bilberries (*Vaccinium myrtillus*), raspberries (*Rubus ideaus* L.), and strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) have been stored for 10 months, at -22 °C. The sorbet-making process involved obtaining the juice, heating the juice with added sugar and stabiliser, and, finally, freezing in an ice cream machine. After processing and during storage, the content levels of phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C were analyzed as was the antioxidant capacity index: a reducing power. After processing the fruits into sorbets, the highest losses of the substances analyzed were found in the case of bilberry. In all the products stored, a significant decrease was found in the content of vitamin C. Its content, after a 10 month storage period, was 43 % (raspberry sorbet) and 67 % (strawberry sorbet) of that in the freshly made product. However, the content of anthocyanin and phenolic compounds did not change much during storage. In all the cases analyzed, the reducing power was found to decrease by at least 50% compared to its initial value. Despite those losses, sorbets obtained from berry fruits may be considered an attractive source of health-promoting phenolic compounds in the diet during the seasons of the year, when fresh raw material is hardly available.

Key words: berry fruits, sorbet, storage, vitamin C, polyphenols, anthocyanins ☒

URSZULA ZŁOTEK, WIESŁAW WÓJCIK

**WPŁYW POWLEKANIA CHITOZANEM KORZENI PIETRUSZKI
(*PETROSELINUM HORTENSE*) NA WYBRANE ICH CECHY
PODCZAS PRZECHOWYWANIA**

Streszczenie

W czasie produkcji, a następnie przechowywania, w warzywach o małym stopniu przetworzenia zachodzą procesy chemiczne i biochemiczne obniżające ich jakość. Starzenie się warzyw podczas długotrwałego przechowywania polega na obniżeniu aktywności fizjologicznej i zdolności przystosowania do niesprzyjających warunków otoczenia. Jednym ze sposobów powodujących ograniczenie tych procesów, bez utraty właściwości użytkowych, jest pokrywanie warzyw powłokami jadalnymi. W pracy podjęto próbę określenia wpływu powlekania świeżo krojonych korzeni pietruszki warstwą chitozanu na zmiany właściwości antyoksydacyjnych wynikających m.in. ze zmian zawartości związków fenolowych, w tym flawonoidów i kwasów fenolowych. Badano też dynamikę procesów starzenia związanych z degradacją polisacharydów i dalszymi przemianami cukrów prostych, co skutkuje ubytkiem masy i zmianami zawartości suchej masy badanego warzywa. Stwierdzono wzrost aktywności antyoksydacyjnej w pietruszce pokrywanej chitozanem, wynikający ze stymulacji biosyntezy związków fenolowych, w tym kwasów fenolowych i flawonoidów. Wykazano, że pokrywanie plasterków pietruszki warstwą powłok chitozanych wpływa na zahamowanie rozkładu polisacharydów, jak również dalszych przemian cukrów w badanych próbach, począwszy od 3. tygodnia przechowywania.

Słowa kluczowe: pietruszka, powłoki chitozanowe, polifenole, aktywność antyoksydacyjna

Wprowadzenie

W czasie produkcji, a następnie przechowywania warzyw o małym stopniu przetworzenia zachodzi szereg procesów chemicznych i biochemicznych obniżających ich jakość. Starzenie się warzyw podczas długotrwałego przechowywania wynika z obniżenia aktywności fizjologicznej i zdolności przystosowania do niesprzyjających warunków otoczenia. Następuje też utrata ich wartości użytkowej spowodowana zmianą barwy, związaną z metabolizmem związków fenolowych na skutek aktywności enzymów uczestniczących w tych przemianach, takich jak: peroksydaza (POD), amoniaka-

liaza polifenyloalaninowa (PAL) i oksydaza polifenolowa (PPO) [13, 17, 18]. Wydłużenie trwałości świeżych owoców i warzyw osiągnąć można poprzez zahamowanie utraty wilgotności i ograniczenie procesów oddychania [29]. Pokrywanie warzyw powłokami jadalnymi przyczynia się m.in. do zahamowania procesów transpiracji, co znacznie ogranicza niekorzystne zmiany wartości użytkowej tych warzyw [23]. Głównymi składnikami powłok jadalnych są związki pochodzenia naturalnego, tj. woski, polisacharydy, proteiny [20]. Konsumenci oczekują dobrej jakości owoców i warzyw, dlatego przy wyborze składnika używanego do powlekania należy brać pod uwagę jego wpływ na zdrowie oraz inne pożądane cechy (np. właściwości przeciwbakteryjne) [5]. Chitozan charakteryzuje się wieloma udowodnionymi właściwościami prozdrowotnymi np. aktywnością przeciwutleniającą czy dodatnim wpływem na zatrzymywanie witaminy C w owocach, jak też oddziaływaniem grzybobójczym i grzybobostatycznym, dlatego jest pożądanym składnikiem do tworzenia powłok jadalnych [2, 5, 10, 11, 21, 27, 32].

Celem pracy było określenie wpływu powłok chitozanowych na zmiany właściwości antyoksydacyjnych plasterów pietruszki wynikające m.in. ze zmian zawartości związków fenolowych. Badano też wpływ powłok chitozanowych na zmiany zawartości cukrów redukujących oraz ubytki masy podczas przechowywania korzenia pietruszki w warunkach chłodniczych.

Materiał i metody badań

Materiałem do badań były korzenie pietruszki zwyczajnej (*Petroselinum hortense* var. *microcarpum*) zakupione w lokalnym supermarkecie. Badane warzywa umyto, odfekowano 2 % podchlorynem sodu, następnie przepłukano kilkakrotnie wodą destylowaną. Tak przygotowany materiał pokrojono w plastry o grubości 0,5 cm i pokryto roztworem 0,1 % chitozanu w 1 % kwasie cytrynowym. Równolegle wykonano próby kontrolne, w których zamiast chitozanu użyto wody destylowanej i 1 % kwasu cytrynowego. Pokryte powłokami plastry badanych warzyw przechowywano przez 4 tygodnie w temp. 4 °C. W próbie przed powlekaniami, a także po: 1, 2, 3 i 4 tygodniach przechowywania oznaczano: suchą masę, zawartość cukrów redukujących, całkowitą zawartość polifenoli, a także zawartość flawonoidów i kwasów fenolowych oraz aktywność przeciwrodnikową. Oznaczono również ubytki masy korzenia pietruszki.

Do oznaczania związków fenolowych: 10 g korzenia pietruszki rozdrabniano robotem kuchennym, następnie przeprowadzano 3-krotną ekstrakcję 50 % metanolem (30 ml) na wytrząsarce przez 20 min. Uzyskany ekstrakt wirowano przez 20 min przy 4000×g i przesączano; supernatanty łączono. W przygotowanych ekstraktach oznaczano całkowitą zawartość polifenoli, a także zawartość flawonoidów i kwasów fenolowych oraz aktywność przeciwrodnikową.

Całkowitą zawartości polifenoli oznaczano wg Singletona i Rossiego [25]. Do 0,5 ml ekstraktu dodano 0,5 ml wody, 2 ml odczynnika Folina (1 : 5 z wodą), po 3 min dodawano 10 ml 10 % Na_2CO_3 i mieszano. Próbę odniesienia wykonywano używając 50 % metanolu zamiast ekstraktu. Po upływie 30 min mierzono absorbancję (wobec próby odniesienia) przy długości fali 725 nm. Stężenie związków fenolowych w przeliczeniu na kwas galusowy odczytywano z krzywej wzorcowej.

Oznaczanie zawartości kwasów fenolowych wykonywano metodą Arnova [9]. Do 2,5 ml wody destylowanej dodawano 0,5 ml badanego ekstraktu, 0,5 ml 0,5 N HCl, 0,5 ml odczynnika Arnova, 0,5 ml 1 N NaOH. Próbę odniesienia wykonywano używając 50 % metanolu zamiast ekstraktu. Absorbancję mierzono wobec próby odniesienia przy długości fali 490 nm. Zawartość kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy odczytywano z krzywej wzorcowej.

Zawartości flawonoidów oznaczano wg Lamaison [1]. Do 1 ml ekstraktu dodawano 1 ml 2 % $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Po 10 min mierzono absorbancję wobec próby zerowej przy długości fali 430 nm. Próbę odniesienia wykonywano używając 50 % metanolu zamiast ekstraktu. Stężenie flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę odczytywano z krzywej wzorcowej.

Aktywność przeciwrodnikową oznaczano wobec DPPH• [4]. Do 0,04 ml ekstraktu zawierającego związki fenolowe dodawano 1,96 ml metanolowego roztworu DPPH• o stężeniu 6×10^{-5} mol/l. Równolegle wykonywano próbę odniesienia, w której zamiast ekstraktu używano 50 % metanolu. Absorbancję mierzono przy długości fali 515 nm w ciągu 0 i po 60 min.

Aktywność przeciwrodnikową, wyrażano jako % inhibicji, obliczano z równania podanego przez Yena i Duha [30]:

$$\% \text{ inhibicji} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

gdzie:

$A_{C(0)}$ – absorbancja próby odniesienia w czasie 0 min.

$A_{A(t)}$ – absorbancja próby badanej mierzona po 60 min.

Zawartość suchej masy oznaczano zgodnie z normą PN-90/A-75101/03 [22].

Oznaczano także ubytki masy korzenia pietruszki. Plastry pietruszki ważono bezpośrednio po powlekaniu oraz po 1, 2, 3 i 4 tygodniach przechowywania. Wielkość ubytku masy pietruszki wyrażano procentowo w stosunku do pierwotnej masy plastrów warzywa.

Do oznaczania cukrów redukujących przygotowywano wodne ekstrakty: 1 g startego korzenia pietruszki zalewano 50 ml wody destylowanej i gotowano pod przykryciem 5 min – po wystudzeniu przesączano i dopełniano wodą do 50 ml, tak przygotowany ekstrakt używano do oznaczania zawartości cukrów redukujących metodą Millera [19]. Do 1 ml ekstraktu dodawano 0,5 ml H_2O i 3 ml DNS (kwasu

3,5-dwunityrosalicylowego). Całość utrzymywano w stanie wrzenia 5 min, po czym rozcieńczano wodą destylowaną. Próbę odniesienia wykonywano używając wody destylowanej zamiast ekstraktu. Absorbancję mierzono wobec próby odniesienia przy długości fali 540 nm. Stężenie cukrów redukujących odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej z użyciem glukozy.

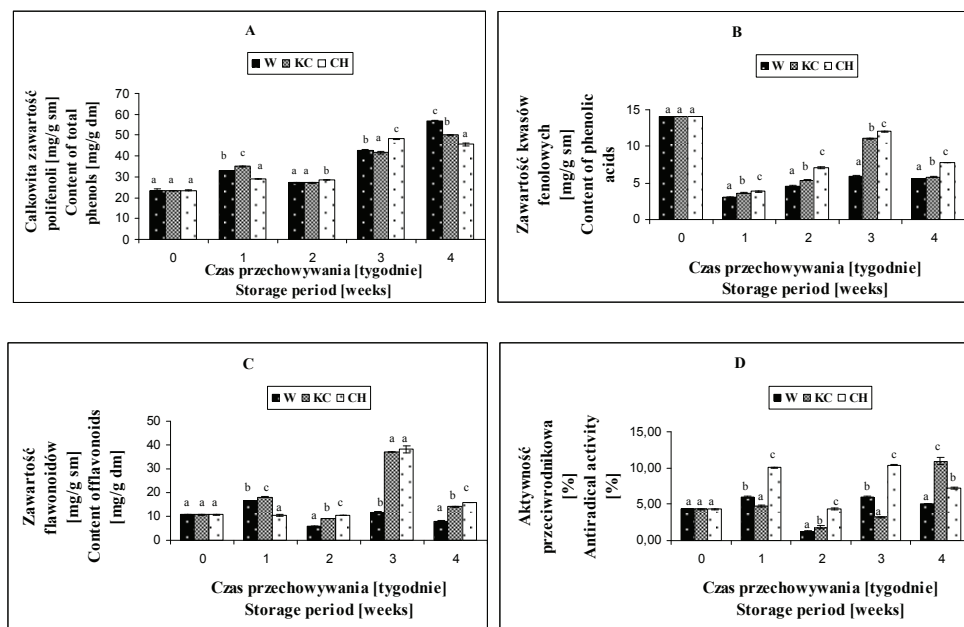
Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem analizy wariancji. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano za pomocą testu Tukey'a przy poziomie istotności $p = 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 7.0.

Wyniki i dyskusja

Stwierdzono, że całkowita zawartość polifenoli w plastrach korzenia pietruszki po 1 tygodniu przechowywania w temp. 4 °C zwiększyła się (z 23,4 mg/g s.m. do 32,8 mg/g s.m. w próbie kontrolnej; 35,1 mg/g s.m. w próbie kontrolnej z kwasem cytrynowym i 28,9 mg/g s.m. w pietruszce pokrytej chitozanem), po 2 tygodniach przechowywania nieznacznie zmniejszyła się (odpowiednio do: 27,2 mg/g s.m.; 27,2 mg/g s.m. i 28,7 mg/g s.m.), aby po 3 i 4 tygodniach znacząco zwiększyć się (rys. 1A). Zawartość kwasów fenolowych zmniejszyła się dość znacznie po 1 tygodniu przechowywania o 78,19 % w próbie kontrolnej, 74,28 % w próbie kontrolnej z kwasem cytrynowym i 72,72 % w plastrach pietruszki pokrywanych chitozanem; po czym sukcesywnie zwiększała się aż do 4. tygodnia przechowywania, po którym zaobserwowano ponowne zmniejszenie zawartości tej frakcji fenoli (rys. 1B). Analizując zawartość flawonoidów w badanych plastrach pietruszki należy zauważyć jej zmniejszenie się po około 2 tygodniach przechowywania i zwiększenie w dalszych tygodniach (rys. 1C). Pen i Jiang [21], badając zawartość polifenoli w owocu kasztanowca przechowywanego w temp. 4 °C zauważyli jej zwiększenie po 7. dniach, a następnie zmniejszenie. Zaznaczyć należy, że cytowani autorzy badali te zmiany tylko przez około 2 tygodnie przechowywania, a otrzymane w tej pracy wyniki dotyczące zawartości polifenoli w pierwszych 2 tygodniach przechowywania w plastrach pietruszki były zbieżne z wynikami cytowanymi powyżej. Pen i Jiang [21] stwierdzili także, że pokrywanie powłokami chitozanowymi opóźniało zwiększanie się zawartości polifenoli w owocach kasztanowca (po 1 tygodniu przechowywania w owocach pokrytych chitozanem było mniej polifenoli w stosunku do próby kontrolnej, natomiast około 12. dnia przechowywania zawartość polifenoli w kasztanach pokrywanych chitozanem była większa niż w próbie kontrolnej). Opóźnienie zwiększenia zawartości polifenoli wymienieni autorzy tłumaczyli inhibicją enzymu regulującego szlak biosyntezy związków fenolowych – amoniakaliazy polifenyloalaninowej. W badaniach własnych nie zaobserwowano wyraźnego wpływu powlekania chitozanem na całkowitą zawartość fenoli w trakcie przechowywania (rys. 1A), natomiast analizując poszczególne frakcje fenoli

tn. zawartość flawonoidów i kwasów fenolowych zauważyć należy, że plastry pietruszki pokrywane powłokami chitozanowymi odznaczały się w stosunku do próby kontrolnej większą zawartością kwasów fenolowych (o około 25 % po 1 tygodniu przechowywania i nawet o 100 % po 3 tygodniach w stosunku do próby kontrolnej), a począwszy od 2. tygodnia przechowywania także większą zawartością flawonoidów (największą różnicę w stosunku do próby kontrolnej zaobserwowano również po 3 tygodniach przechowywania) (rys. 1 B i C). Jiang i wsp. [14], badając zawartość wybranej frakcji flawonoidów – antocyjanin w owocach liczi pokrywanych chitozanem i przechowywanych w temp. 2 °C wykazali zwiększenie zawartości tej frakcji w owocach pokrywanych chitozanem już po 6 h przechowywania, tłumacząc to inhibicją oksydazy polifenolowej – enzymu zaangażowanego w system degradacji antocyjanin. Inhibujący wpływ chitozanu na aktywność oksydazy polifenolowej potwierdzili m.in. Jiang i Li [15] w badaniach owoców longan pokrytych chitozanem i przechowywanych w temp. 2 °C. Dong i wsp. [8], badając wpływ powłok z chitozanu o stężeniu 1, 2 i 3 % na aktywność oksydazy polifenolowej po 3 i 6 dniach przechowywania śliwek liczi, zauważyli po 3 dniach ok. 34 % inhibicję tego enzymu w przypadku zastosowania 1 % chitozanu i 40 % po zastosowaniu 3 % chitozanu oraz po 6 dniach odpowiednio 23 i 28 %. Podobnie Jiang i wsp. [14], badając wpływ 2 % powłok chitozanowych na aktywność oksydazy polifenolowej w śliwkach liczi przechowywanych w temp. 25 °C potwierdzili inhibujący wpływ chitozanu. Wyniki cytowanych badaczy mają szczególne znaczenie dla utrzymania wartości użytkowej owoców i warzyw, ponieważ oksydaza polifenolowa jest enzymem odpowiedzialnym m.in. za efekt brązowienia. Pen i Jiang [21] zauważyli ponadto, iż efekt hamujący aktywność oksydazy polifenolowej wzrasta wraz ze zwiększeniem stężenia roztworu chitozanu użytego do powlekania.

Związki fenolowe wykazują szeroko udokumentowane właściwości antyoksydacyjne. Ze względu na różnice w strukturze poszczególnych frakcji polifenoli prowadzonych było wiele prac wyjaśniających korelacje pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną a strukturą tych związków [7, 12, 24]. W badaniach własnych zaobserwowano wyższą aktywność przeciwrodnikową w plastrach pietruszki pokrywanych chitozanem i przechowywanych w temp. 4 °C (rys. 1D) (z wyjątkiem 4. tygodnia przechowywania, po którym ekstrakt z pietruszki pokrytej jedynie kwasem cytrynowym silniej stabilizował wolne rodniki DPPH[•]), co może być związane z dużą, w stosunku do próby kontrolnej, zawartością flawonoidów i kwasów fenolowych w pietruszce pokrywanej chitozanem (rys. 1 B i C). Innym powodem większej aktywności przeciwrodnikowej plastrów pietruszki w powłokach chitozanowych mogą być udokumentowane przez innych badaczy właściwości przeciwutleniające roztworów chitozanu [10, 11, 27].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

W – woda / water; KC – kwas cytrynowy / citric acid; CH – chitozan / chitosan;

a - c – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie tego samego czasu przechowywania nie różnią się statystycznie istotnie przy $p = 0,05$ / values within the same storage period and denoted by the same letters do not differ statistically significantly at $p = 0.05$.

Rys. 1. Wpływ powlekania chitozanem na całkowitą zawartość polifenoli (A), kwasów fenolowych (B), flawonoidów (C) i aktywność antyrodnikową (D) plasterków pietruszki podczas przechowywania w temp. 4 °C.

Fig. 1. Effect of chitosan-film coating on content of total phenols (A), phenolic acids (B), flavonoids (C) and antiradical activity (D) of parsley slices during storage at a temperature of 4 °C.

Utrata wartości użytkowej owoców i warzyw w trakcie przechowywania jest w dużej mierze związana z ich wędnięciem, spowodowanym utratą wody. Powłoki jadalne powinny opóźniać te procesy, stanowiąc czynnik barierowy chroniący owoc/warzywo przed nadmierną transpiracją. Chien i wsp. [6], badając ubytek masy w owocach mango pokrytych chitozanem i przechowywanych w temp. 6 °C, stwierdzili, że w tak chronionych owocach ubytek ten jest znacznie wolniejszy. W badaniach Chien i wsp. [5], dotyczących wpływu powłok chitozanowych na zmiany cech użytkowych owoców czerwonej pitai, również wykazano mniejszy ubytek wody w owocach pokrytych chitozanem. Rezultaty przedstawione przez Dong i wsp. [8], jak też w pracy Jang i Li [15], również potwierdzają hamujący wpływ powłok chitozanowych na ubytek wody w owocach liczi i owocach longan. Zhang i wsp. [31], używając chito-

zanu jako jednego ze składników powłok zabezpieczających plastry ogórka, dowiedli, że zabieg ten wpłynął istotnie na zmniejszenie strat masy badanego warzywa. Efekt zabezpieczający przed utratą masy wykazano też po zastosowaniu powłok malto-dekstrynowych do ochrony owoców truskawki [3]. Wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy potwierdzają diskutowane powyżej tendencje. Ubytek masy po 4 tygodniach przechowywania próby kontrolnej i plastrów pietruszki pokrytej 0,1 % chitozanem wynosił odpowiednio 1,85 i 1,03 % (tab. 1). Ochronny efekt powłok chitozanowych w przechowywanej pietruszce zauważyć można już po 2 tygodniach przechowywania (ubytok masy wynosił 0,49 % w próbie kontrolnej i 0,40 % w pietruszce powlekanej chitozanem) (tab. 1).

Tabela 1

Ubytek masy pietruszki pokrytej chitozanem podczas przechowywania w temp. 4 °C.

Weight loss of parsley coated using chitosan film during storage at a temperature of 4 °C.

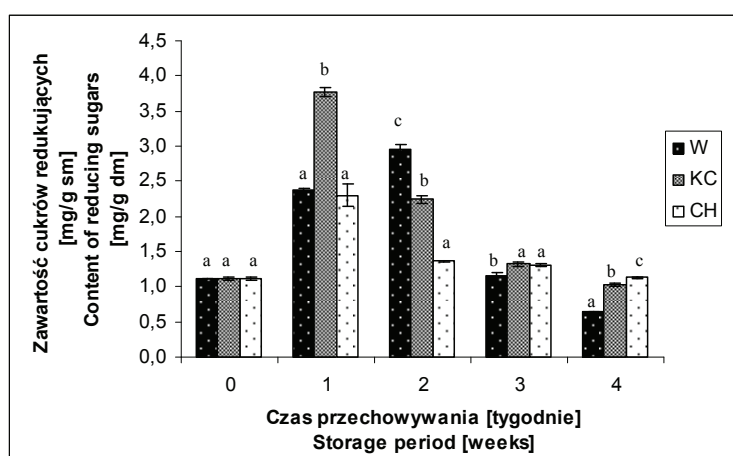
Czas przechowywania Storage period	Ubytek masy w próbkach z: [%] / Weight loss in samples with: [%] $\bar{x} \pm s / SD; n = 9$		
	wodą Water	kwasem cytrynowym Citric acid	chitozanem Chitosan
1 tydzień 1 week	0,13 $\pm$ 0,012 b	0,27 $\pm$ 0,012 a	0,30 $\pm$ 0,004 a
2 tygodnie 2 weeks	0,49 $\pm$ 0,029 b	0,63 $\pm$ 0,012 c	0,40 $\pm$ 0,008 a
3 tygodnie 3 weeks	0,92 $\pm$ 0,024 b	0,99 $\pm$ 0,012 c	0,65 $\pm$ 0,021 a
4 tygodnie 4 weeks	1,85 $\pm$ 0,037 c	1,21 $\pm$ 0,012 b	1,03 $\pm$ 0,052 a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a - c – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie wierszy nie różnią się statystycznie istotnie ($p = 0,05$) / values in lines and denoted by the same letters do not differ statistically significantly ($p = 0.05$).

Procesy fizjologiczne związane z dojrzewaniem i przejrzeniem owoców i warzyw nie kończą się z chwilą zbioru. Dojrzewanie warzyw w czasie przechowywania uważane jest za przewlekłą formę starzenia się rośliny. W wyniku tych procesów, oprócz utraty wody przez roślinę, następuje też często gwałtowny rozkład skrobi związany z aktywnością enzymów tj.: amylazy, fosforylasy skrobi, α -1,6-glukozydazy czy syntazy sacharozy, co skutkuje wzrostem poziomu cukrów redukujących. Kittur i wsp. [16], badając zawartość cukrów redukujących w owocach banana i mango pokrywanych powłokami polisacharydowymi (w tym też chitozanowymi) i przechowywanych w temp. 27 °C, oznaczyli mniej cukrów redukujących w owocach pokrywanych powłokami w stosunku do próby kontrolnej w 15. dniu przechowywania. Powyższe wy-

niki cytowani autorzy tłumaczyli hamowaniem aktywności enzymów przyczyniających się do rozkładu skrobi i przejrzenia owoców, co skutkuje obniżeniem jakości owoców czy warzyw. Podobnie Srinivasa i wsp. [26], badając wpływ powłok chitozanych na zmiany zachodzące podczas przechowywania owoców mango, potwierdzili, że powlekanie chitozanem opóźnia zwiększanie się zawartości cukrów redukujących. Również w badaniach Zhang i wsp. [31] zwiększanie się zawartości cukrów redukujących podczas przechowywania plasterów ogórka pokrywanych powłokami z dodatkiem chitozanu było częściowo zahamowane. Tanada-Palmu i Grosso [28], analizując zmiany biochemiczne zachodzące podczas przechowywania owoców truskawki pokrywanych powłokami glutenowymi, również stwierdzili, że powlekanie owoców zwalnia procesy przejrzenia, skutkujące zwiększaniem poziomu cukrów redukujących. W badanych plasterach korzenia pietruszki w pierwszych 2 tygodniach przechowywania również zauważono zwiększenie poziomu cukrów redukujących, jednak, podobnie jak w badaniach cytowanych wyżej, w próbach pokrywanych chitozanem proces ten był wolniejszy (z 1,1 mg/g s.m. w czasie „0” do 2,3 mg/g s.m. w próbie kontrolnej, 3,7 mg/g s.m. w próbie kontrolnej z kwasem cytrynowym i 2,3 mg/g s.m. w próbach pokrywanych chitozanem po 1 tygodniu przechowywania oraz odpowiednio: 2,9 mg/g s.m., 2,2 mg/g s.m. i 1,3 mg/g s.m. po 2 tygodniach przechowywania) (rys. 2). Po 3 i 4



Objaśnienia: / Explanatory notes:

W – woda / water; KC – kwas cytrynowy / citric acid; CH – chitozan / chitosan;

a - c – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie tego samego czasu przechowywania nie różnią się statystycznie istotnie przy $p = 0,05$ / values within the same storage period and denoted by the same letters do not differ statistically significantly at $p = 0.05$.

Rys. 2. Wpływ powlekania chitozanem na zawartość cukrów redukujących w pietruszce podczas przechowywania w 4 °C.

Fig. 2. Effect of chitosan coating on content of reducing sugars in parsley during storage at 4 °C.

tygodniach przechowywania zawartość cukrów redukujących zmniejszyła się we wszystkich próbach, co może świadczyć o rozkładzie powstałych cukrów redukujących w wyniku np. reakcji z innymi produktami katabolizmu lub procesów fermentacji. Ubytek cukrów redukujących w korzeniach pietruszki pokrytych chitozanem był znacznie wolniejszy w porównaniu z próbą kontrolną. Wyniki te nie mają potwierdzenia w cytowanych pracach innych badaczy, ale zaznaczyć należy, że badali oni poziom cukrów redukujących tylko do 15. [16], 16. [28] lub 18. [26] dnia przechowywania badanych owoców.

Wnioski

1. Plastry pietruszki pokryte chitozanem odznaczały się (w stosunku do próby kontrolnej) większą aktywnością przeciwutleniającą wynikającą między innymi ze zwiększenia się zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów.
2. Zastosowanie powłok chitozanowych w przechowywanej pietruszce spowodowało zmniejszenie transpiracji, co skutkowało spowolnieniem utraty masy.
3. Powlekanie chitozanem powodowało spowolnienie procesów przejrzenia podczas przechowywania plasterów pietruszki co skutkowało wolniejszym zwiększaniem się poziomu cukrów redukujących.

Literatura

- [1] Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vaseur J., Cazin M., Cazin J.-C., Pinkas M.: Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch./Drug Res.*, 1996, **46 (II)**, 1086-1089.
- [2] Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A.N., Velázquez-del Valle M.G., Hernández-Lopez M., Ait Barka E., Bosquez-Molina E., Wilson C.L.: Chitosan as potential natural compounds to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.*, 2006, **25**, 108-118.
- [3] Białas W., Modzelewska A., Grajek W., Jankowski.: Wpływ powłoki maltodekstrynowej na ubytki masy i jędrność rozmrożonych truskawek (*Fragaria ananasa*). *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4 (41)S**, 41-51.
- [4] Brand-Williams W, Cuvelier E, Berset C.M., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss U – Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [5] Chien P.-J., Sheu F., Lin H.-R.: Quality assessment of low molecular weight chitosan coating on slices red pitayas. *J. Food Engin.*, 2007, **19**, 736-740.
- [6] Chien P.-J., Sheu F., Yang F.-H.: Effect of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *J. Food Engin.*, 2007, **78**, 225-229.
- [7] Cuvelier M.E., Rihard H., Berset C.: Comparison of the antioxidative activity of some-acid-phenols-structure activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, **56**, 324-325.
- [8] Dong H., Cheng L., Tan J., Zheng K., Jiang Y.: Effect of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *J. Food Engin.*, 2004, **64**, 355-358.
- [9] Farmakopea Polska, T.V. Pol. Tow. Farm., Warszawa 1999.

- [10] Guo Z. Xing R., Liu S., Yu H., Wang P., Li C., Li P.: The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 4600-4603.
- [11] Guo Z., Liu H., Chen X., Ji X., Li P.: Hydroxyl radicals scavenging activity of N-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 6348-6350.
- [12] Hinneburg I., Dorman H.J.D., Hiltunen R.: Antioxidant activities of extract from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.*, 2006, **97**, 122-129.
- [13] Jiang Y.M.: Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chem.*, 1999, **66**, 75-79.
- [14] Jiang Y., Li J., Jiang W.: Effect of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. *LWT*, 2005, **38**, 757-761.
- [15] Jiang Y., Li Y.: Effect of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chem.*, 2001, **73**, 139-143.
- [16] Kittur F.S., Saroja N., Habibunnisa, R.N. Tharanathan.: Polysaccharide-based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and mango. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, **213**, 306-311.
- [17] Loaiza-Velarde J.G., Saltveit M.E.: Heat shock applied either before or after wounding reduce browning of lettuce leaf tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2001, **126**, 227-234.
- [18] Lopez-Serrano M., Barcelo R.: A H₂O₂-mediated pigment decay in strawberry as a model system for color alterations in processed plant foods. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 824-827.
- [19] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1956, **1**, 426-428.
- [20] Moldão-Martins M., Beirão-da-Costa S.M., Beirão-da-Costa M.L.: The effect of edible coatings on postharvest quality of the "Bravo de Esmolfe" apple. *Eur. Food Res. Technol.*, 2003, **217**, 325-328.
- [21] Pen L.T., Jiang Y.M.: Effect of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 2003, **36**, 359-364.
- [22] PN-90/A-75101/03. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości suchej masy metodą wagową.
- [23] Shahidi F., Arachchi J.K.V., You-Jin J.: Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10**, 37-51.
- [24] Singh G., Marimuthu P., de Heluani C.S., Catolan C.: Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 2005, **85**, 2297-2306.
- [25] Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Etnol. Vitic.*, 1965, **16**, 144-158.
- [26] Srinivasa P.C., Revathy Baskaran M.N., Ramesh, K.V., Harish Prashanth R.N. Tharanathan.: Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **215**, 504-508.
- [27] Sun T., Xie W., Xu P.: Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. *Carbohydr. Polym.*, 2004, **58**, 379-382.
- [28] Tanada-Palmu P.S., Grosso C.R.F.: Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Postharvest Biol. Technol.*, 2005, **36**, 199-208.
- [29] Tendaj B., Tendaj M.: Woski jako składniki warstw chroniących świeże owoce i warzywa. *Post. Nauk Roln.*, 1998, **1**, 79-90.
- [30] Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F.: Comparison of the antioxidant activity of Aspalathin with that of the other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherols, BHT and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45** (3), 632-638.

- [31] Zhang M., Xiao G., Luo G., Peng J., Salokhe V.M.: Effect of coating treatments on the extension of the shelf-life of minimally processed cucumber. *Int. Agrophysics*, 2004, **18**, 97-102.
- [32] Zhang H., Li R. Liu W. : Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, **12**, 917-934.

EFFECT OF COATING PARSLEY ROOTS (*PETROSELINUM HORTENSE*) WITH CHITOSAN FILM ON SELECTED CHARACTERISTICS THEREOF DURING STORAGE

S u m m a r y

During the production and storage of roughly-processed vegetables, chemical and biochemical processes occur that cause their quality to decrease. The process of vegetable ageing during long-term storage consists in that their physiological activity and ability to adapt to unfavourable environmental conditions decrease. One of the methods to limit those processes without losing their functional properties is to coat vegetables with edible films. This research study was an attempt to determine the effect of coating the freshly-chopped parsley roots with the use of a chitosan film on changes in the antioxidant properties thereof that result from, among other things, the changes in the content of phenolic compounds including flavonoids and phenolic acids. Also, the dynamics was studied of the aging processes linked with the degradation of polysaccharides and with further transformations of mono-carbohydrates, which resulted in the loss of weight and changes in the content of dry matter in the vegetable analyzed. It was found that the antioxidant activity of chitosan-coated parsley increased owing to the biosynthesis stimulation of phenolic compounds including the phenolic acids and flavonoids. It was evidenced that the coating of parsley slices using a chitosan film caused, from the third storage week on, the polysaccharide decomposition process and further carbohydrate transformation processes in the samples analyzed to inhibit.

Key words: parsley, chitosan coatings, polyphenols, antioxidant activity ☒

DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA,
ANASTASIA V. SIDARENKA, GALINA I. NOVIK

WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM* W NAPOJU SOJOWYM

Streszczenie

Celem badań była ocena możliwości zastosowania napoju sojowego jako medium do wzrostu i przeżycia bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a także określenie wpływu dodatku cukrów na ich przeżywalność. Badanie podzielono na dwa etapy: w pierwszym zbadano wzrost i przeżywalność szczepów *Bifidobacterium* w napoju sojowym, który poddano fermentacji oraz w napoju niefermentowanym. W drugim etapie badano wpływ dodatku cukrów (glukozy i oligofruktozy) na wzrost i przeżywalność wybranego szczepu *Bifidobacterium* w napoju sojowym.

Napój sojowy szczepiono 5 % (v/v) inoculum 24-godzinnej hodowli *Bifidobacterium* o liczbie komórek od 8,7 - 9,2 log jtk/ml w zależności od zastosowanego szczepu. W próbach niepoddanych fermentacji liczba komórek istotnie zmniejszyła się po 7 dniach chłodniczego przechowywania do wartości 5,8 - 4,1 jtk/ml. Natomiast po procesie fermentacji (37 °C/24 h) liczba komórek badanych szczepów *Bifidobacterium* zwiększyła się o około 2 rzędy logarytmiczne, z wyjątkiem próby z dodatkiem szczepu A6. Wybrany szczep *B. longum* BIM B-647 charakteryzował się dużą produkcją biomasy (już po 15 h fermentacji) >8,7 log jtk/ml. Dodatek oligofruktozy istotnie wpłynął na zwiększenie liczby komórek *B. longum* BIM B-647 w napoju sojowym podczas fermentacji, a także spowodował wydłużenie fazy stacjonarnej w czasie chłodniczego przechowywania prób. Napój sojowy jest dobrym nośnikiem bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i może być wykorzystywany do wytwarzania nowych produktów probiotycznych.

Słowa kluczowe: *Bifidobacterium*, napój sojowy, oligofruktoza, przeżywalność

Wprowadzenie

Bifidobakterie były po raz pierwszy wyizolowane oraz opisane przez Tissiera w latach 1899-1900. Przedstawił on je jako beztlenowe, pałeczkowate, nieprodukujące gazu mikroorganizmy. Ich obecność stwierdzono w jelitach niemowląt karmionych piersią matki i nazwano *Bacillus bifidus*. Ogólnie można je scharakteryzować jako

Dr inż. D. Zielińska, prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C 02-776 Warszawa, mgr A.V. Sidarenka, dr G.I. Nowik, Białoruska Kolekcja Mikroorganizmów, Instytut Mikrobiologii, Białoruska Akademia Nauk.

katalazo-ujemne beztlenowce, gram dodatnie, nieprzetrwalnikujące. Mają różne kształty od krótkich zakrzywionych po rozwidlone pałeczki, np. w kształcie litery Y lub V. Taksonomia bifidobakterii była wielokrotnie zmieniana, obecnie zalicza się je do typu *Actinobacteria*. Rodzaj *Bifidobacterium* liczy ponad 30 gatunków [7, 10].

Bifidobacterium hydrolizują cukier w jelicie grubym i stanowią 25 % bakterii w jelicie dorosłego człowieka oraz 95 % u noworodków. Wytwarzają silne kwasy, takie jak kwas octowy i mlekowy, które są końcowymi produktami metabolizmu. Dzięki niskiemu pH mogą wywierać efekt antybakteryjny w organizmie. Dodatkowym atutem produkcji kwasu przez te bakterie jest dodanie protonu do toksycznego amoniaku, tak aby powstał NH_4^+ . Powoduje to obniżenie poziomu amoniaku we krwi. Bifidobakterie wytwarzają witaminy, głównie, z grupy B, ale także enzymy pokarmowe, fosfatazę kazeinową i lizozym. Ponadto niektóre składniki komórkowe tych mikroorganizmów wykazują działanie immunologiczne i powstrzymują działanie chorobotwórcze [6].

Bifidobakterie są szeroko stosowane w żywności, medycynie i w paszach dla zwierząt. Produkty zawierające te bakterie wzbogacają mikroflorę jelitową, co przyczynia się do poprawy środowiska jelit oraz zdrowia. Udowodniono, że zmniejszenie liczby komórek lub brak *Bifidobacterium* w środowisku jelita może wpłynąć negatywnie na stan zdrowia człowieka. Wiele szczepów *Bifidobacterium* wykazuje właściwości probiotyczne [8, 11].

W wielu pracach wykazano, że napój sojowy (tzw. „mleko sojowe”) jest odpowiednim medium do wzrostu bifidobakterii, niektórzy badacze twierdzą nawet, że lepszym od mleka krowiego [14, 15, 17, 18].

Soja i produkty sojowe są rozpowszechnione w krajach azjatyckich ze względu na dużą zawartość białka i niski koszt produkcji, a mniej doceniane w Europie. Soi przypisuje się wiele właściwości prozdrowotnych, m.in.: wpływ na obniżanie całkowitego poziomu cholesterolu we krwi, zmniejszanie ryzyka wystąpienia chorób sercowo – naczyniowych, nowotworów sutka i prostaty ze względu na obecność naturalnych fitoestrogenów, a także wpływ na zwiększenie gęstości mineralnej kości u kobiet, a w konsekwencji ochronę przed osteoporozą [4, 9]. Napój sojowy z dodatkiem *Bifidobacterium* mógłby być prozdrowotnym produktem probiotycznym.

Celem badań była ocena możliwości zastosowania napoju sojowego jako medium do wzrostu i przeżycia bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a także określenie wpływu dodatku cukrów (glukozy i oligofruktozy) na ich przeżywalność.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* pochodzące z Białoruskiej Kolekcji Mikroorganizmów, Instytutu Mikrobiologii, Białoruskiej Akademii Nauk: *B. adolescentis* BIM B-642 (H1), *B. animalis* ssp. *lactis* BIM B-643 (H2),

B. animalis ssp. *lactis* BIM B-644 (A6), *B. longum* BIM B-646 (H3), *B. longum* BIM B-647 (A4), *B. longum* BIM B-648 (B3).

Badane szczepki *Bifidobacterium* zostały wyizolowane od zdrowych, dorosłych ochotników. Charakteryzują się opornością na środowisko o pH = 2,0 i 4,5 % dodatek soli żółciowych, przeżywają szok termiczny (15 min/65 °C) Ponadto wykazują silne właściwości antagonistyczne w stosunku do wybranych patogenów. Są zdolne do produkcji egzopolisacharydów, nie mają plazmidów.

Nośnikiem bakterii był napój sojowy firmy Frias, wyprodukowany z nasion soi (13 %) i wody. Wartość odżywczą napoju sojowego według deklaracji producenta przedstawiono w tab. 1.

T a b e l a 1

Składniki odżywcze [w 100 g] i wartość energetyczna [kcal] napoju sojowego wg deklaracji producenta.
Nutrients [in 100 g] and food energy [kcal] of soy beverage according to the manufacturer's declaration.

Wartość energetyczna / Calories	32,00 kcal
Białko / Protein	3,10 g
Węglowodany / Sugars	1,00 g
Tłuszcz / Fat	1,70 g
Błonnik / Cellulose	0,3 g

Napój sojowy szczepiono 5 % (v/v) inoculum 24-godzinnej hodowli *Bifidobacterium* o liczbie komórek od 8,7 - 9,2 log jtk/ml w zależności od zastosowanego szczepu.

Badanie podzielono na dwa etapy. W pierwszej części określano wpływ procesu fermentacji na wzrost i przeżywalność bifidobakterii w napoju sojowym. W tym celu próby napoju sojowego z dodatkiem 6 badanych szczepów podzielono na dwie partie. Pierwszą z nich poddano fermentacji (37 °C/24 h), a następnie przechowywaniu w temp. 4 °C przez 14 dni, natomiast drugą partię prób nie fermentowano – po inokulacji i dokładnym wymieszaniu bezzwłocznie poddano chłodniczemu przechowywaniu (4 °C). Próby kontrolne przygotowano bez dodatku *Bifidobacterium*. W czasie 14 dni monitorowano wzrost i przeżywalność bakterii w próbach napoju sojowego.

W ramach pierwszego etapu badań określono także dynamikę wzrostu wybranego szczepu w czasie fermentacji w temp. 37 °C przez 27 h.

Druga część badań obejmowała ocenę wpływu dodatku glukozy (Glu) i oligofruktozy (OF) (Hortimex), na wzrost wybranego w pierwszym etapie szczepu bifidobakterii w napoju sojowym w czasie fermentacji (37 °C/48 h) i podczas chłodniczego przechowywania przez 14 dni. Do wszystkich prób napoju dodawano 5 % (v/v) inoculum *Bifidobacterium*. Próby różniły się dodatkiem cukrów. Układ doświadczenia przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Układ prób doświadczenia dotyczącego zbadania wpływu dodatku cukrów na wzrost i przeżywalność *Bifidobacterium* w napoju sojowym.

System of samples under experiment performed to study effect of added sugars on growth and survival of *Bifidobacterium* in soy beverage.

Próba / Sample	Objaśnienia / Explanation
K	NS bez dodatku cukrów (próba kontrolna) / SB without sugars added
1%Glu	NS z dodatkiem 1 % glukozy / SB with 1 % of glucose added
1%OF	NS z dodatkiem 1 % oligofruktozy / SB with 1 % of oligofructose added
1%Glu+1%OF	NS z dodatkiem 1 % glukozy i 1 % oligofruktozy / SB with 1 % of glucose and 1 % of oligofructose added
1%Glu+3%OF	NS z dodatkiem 1 % glukozy i 3 % oligofruktozy / SB with 1 % of glucose and 3 % of oligofructose added
1%Glu+5%OF	NS z dodatkiem 1 % glukozy i 5 % oligofruktozy / SB with 1 % of glucose and 5 % of oligofructose added

NS – napój sojowy/ SB – soy beverage

Badania mikrobiologiczne wykonywano zgodnie z normą PN-ISO:15214:2002 [12]. Liczbę komórek *Bifidobacterium* oznaczano metodą płytkową, przez posiew wgłębny na podłożu BSM (Sigma Aldrich). Posiewy inkubowano w temp. 30 °C przez 72 h.

Pomiar pH wykonywano za pomocą aparatu ELMETRON CP551. Wynik odczytywano z dokładnością 0,05.

Badanie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną wyników (analizę wariancji, test T-Studenta, współczynnik korelacji prostej) wykonano przy użyciu programu statystycznego Statistica 10.0. Przyjęto poziom istotności $p = 0,05$.

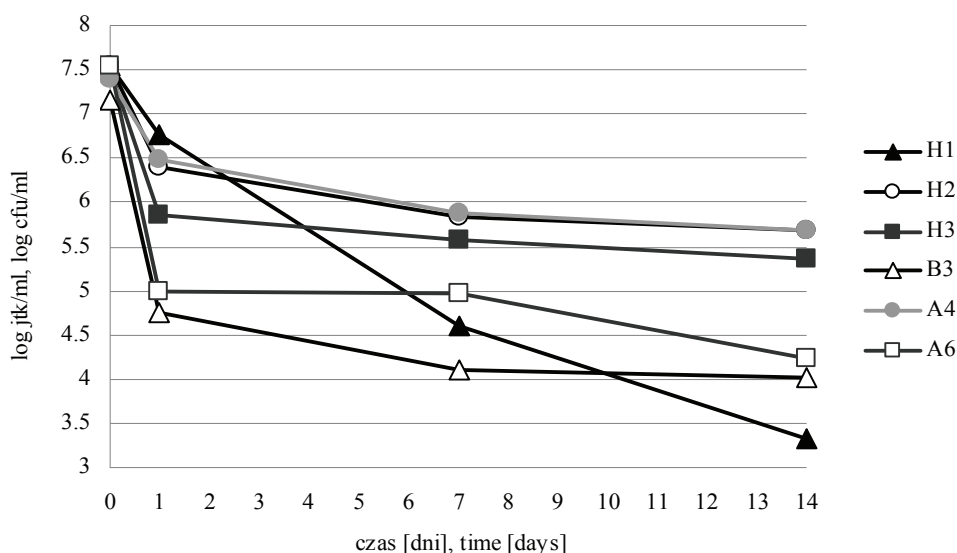
Wyniki i dyskusja

Monitorowanie zmian liczby komórek Bifidobacterium w napoju sojowym w czasie chłodniczego przechowywania

W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono, że proces fermentacji istotnie wpłynął na zmianę liczby komórek *Bifidobacterium* w napoju sojowym podczas chłodniczego przechowywania. W próbach niepoddanych fermentacji (rys. 1) liczba komórek zmniejszyła się po 1 dniu chłodniczego przechowywania z wartości 7,5 log jtk/ml do wartości 5,0 log jtk/ml w przypadku próby z dodatkiem szczepu A6 oraz do wartości 6,4 log jtk/ml w przypadku próby z dodatkiem szczepu H2. W pozostałych próbach (tj. z dodatkiem szczepów H1, H3, B3 i A4) liczba komórek bakterii znacząco

zmniejszała się dopiero po 7 dniach chłodniczego przechowywania. W kolejnych dniach proces zamierania komórek bifidobakterii postępował we wszystkich próbach, jednak najbardziej intensywnie w próbach z dodatkiem szczepów H1 i A6. W próbach z dodatkiem szczepów H2, H3, B3 i A4 liczba komórek bakterii pomiędzy 7. a 14. dniem chłodniczego przechowywania nie zmieniła się istotnie ($p > 0,05$).

Po 24-godzinnej fermentacji w temp. 37 °C (rys. 2) liczba komórek bifidobakterii zwiększyła się istotnie (o około 2 rzędy logarytmiczne) w próbach z dodatkiem szczepów H1, H2, H3, B3 i A4 ($p < 0,05$). Tylko w próbie z dodatkiem szczepu A6 nie zaobserwowano istotnych zmian pod względem liczby komórek bakterii ($p > 0,05$). W kolejnych dniach chłodniczego przechowywania zafermentowanych prób napoju stwierdzono stabilizację do 7. dnia, a następnie zamieranie komórek bifidobakterii.

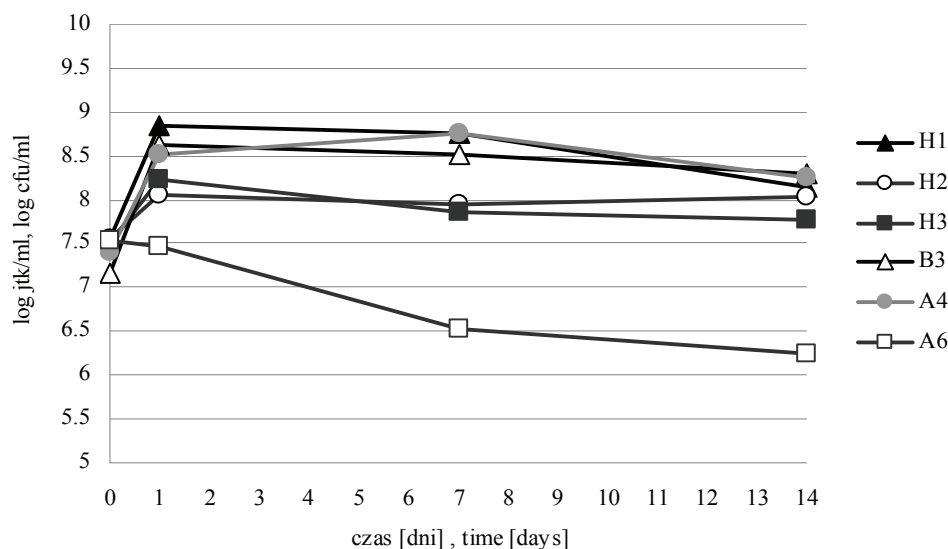


*Próba kontrolna (bez dodatku *Bifidobacterium*) < 1 log jtk/gml / Control sample (no *Bifidobacterium*) < 1 log cfu/ml added)

Rys. 1. Zmiany liczby komórek *Bifidobacterium* w napoju sojowym podczas przechowywania w temp. 4 °C.

Fig. 1. Changes in *Bifidobacterium* cells count in soy beverage during storage at temp. of 4 °C.

Warto zauważyć, że liczba komórek bifidobakterii w napojach poddanych fermentacji (z wyjątkiem próby A6) utrzymywała się na wysokim poziomie 7,7 - 8,8 log jtk/ml podczas 14 dni przechowywania w warunkach chłodniczych. Natomiast w próbach niepoddanych fermentacji liczba komórek bifidobakterii zmniejszała się istotnie i po 14 dniach chłodniczego przechowywania w każdej z prób wynosiła < 6 log jtk/ml.



*Próba kontrolna (bez dodatku *Bifidobacterium*) < 1 log jtk/gml / Control sample (no *Bifidobacterium*) < 1 log cfu/ml added)

Rys. 2. Zmiany liczby komórek *Bifidobacterium* w napoju sojowym podczas 24-godzinnej fermentacji w temp. 37 °C, a następnie w czasie przechowywania w temp. 4 °C.

Fig. 2. Changes in *Bifidobacterium* cells count in soy beverage during 24 h fermentation at temp. 37 °C, and, next during storage at temp. of 4 °C.

Liczne badania dowodzą, że proces fermentacji wpływa na poprawę przeżywalności bifidobakterii w napoju sojowym. Chou i Hou [3] podczas przechowywania prób fermentowanego napoju sojowego przez 10 dni w temp. 5 °C nie wykazali statystycznie istotnych różnic pod względem liczby żywych komórek bakterii *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 [3]. Wang i wsp. [18] również nie stwierdzili zmniejszenia liczby żywych komórek bakterii *Bifidobacterium infantis* CCRC14633 i *Bifidobacterium longum* B6 w fermentowanym napoju sojowym podczas 10 dni chłodniczego przechowywania. Natomiast Canganella i wsp. [2] po fermentacji napoju sojowego stwierdzili zwiększenie liczby komórek *Bifidobacterium infantis*, następnie stabilizację, a w końcowych dniach chłodniczego przechowywania ich zamieranie. Doświadczenie opisane przez autorów trwało 45 dni.

Zmiany kwasowości, wyrażone wartościami pH, w próbach napojów sojowych z dodatkiem bifidobakterii zamieszczono w tab. 3. W próbach niefermentowanych kwasowość napojów nie zmieniała się istotnie podczas 14 dni przechowywania, natomiast po 24 h fermentacji wykonano istotne obniżenie wartości pH we wszystkich próbach. Zjawisko to było silnie, ujemnie skorelowane ze zwiększeniem się liczby

komórek bakterii w próbach po fermentacji ($r = -0,9$), z wyjątkiem próby z dodatkiem szczepu A6 ($r = 0,6$).

Tsangelis i Shah [16], fermentując napój sojowy różnymi kulturami bifidobakterii, stwierdzili, że wartość pH po 24 h fermentacji obniżyła się o około 1 (do wartości 5,5), w zależności od zastosowanego szczepu. Wydłużanie czasu fermentacji do 48 h nie wpłynęło istotnie na zmianę pH. Podobne rezultaty uzyskano w badaniu własnym.

Tabela 3

Wartości pH prób napoju sojowego z dodatkiem *Bifidobacterium* podczas przechowywania w temp. 4 °C.
Changes in pH value of soy beverage samples with *Bifidobacterium* added during storage at temp. of 4 °C.

Szczep Strain	Kwasowość (pH) / Acidity (pH)							
	Próby niefermentowane Unfermented samples				Próby poddane fermentacji Fermented samples			
	0 h	24 h	7 d	14 d	0 h	24 h	7 d	14 d
H1	7,22±0,04	7,28±0,12	7,27±0,06	7,33±0,11	7,21±0,02	4,88±0,05	4,88±0,11	4,82±0,12
H2	7,22±0,04	7,31±0,09	7,23±0,1	7,32±0,05	7,21±0,02	5,67±0,12	5,7±0,03	5,68±0,09
H3	7,22±0,04	7,24±0,14	7,12±0,08	6,63±0,16	7,21±0,02	5,63±0,14	5,7±0,05	5,69±0,14
B3	7,22±0,04	7,29±0,11	7,24±0,02	7,32±0,12	7,21±0,02	5,04±0,09	5,05±0,07	4,98±0,04
A4	7,22±0,04	7,28±0,05	7,18±0,09	7,35±0,18	7,21±0,02	4,92±0,07	4,95±0,12	4,92±0,05
A6	7,22±0,04	7,29±0,02	7,31±0,12	7,36±0,16	7,21±0,02	4,22±0,11	4,3±0,09	4,28±0,05
K	7,22±0,04	7,3±0,10	7,26±0,04	7,24±0,04	7,21±0,02	7,2±0,03	7,18±0,05	7,18±0,02

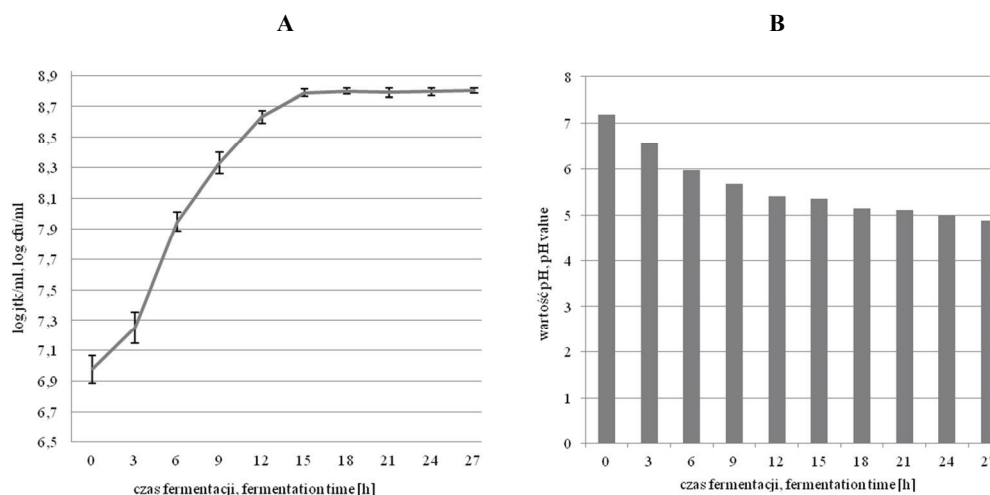
Objaśnienia / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s$ / SD; K – próba kontrolna / control sample; d – dni / days.

Biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonych doświadczeń, a przede wszystkim dobrą przeżywalność podczas chłodniczego przechowywania, do dalszych badań wytypowano szczep *B. longum* BIM B-647 (A4) i na przykładzie tego szczepu zbadano zmiany liczby komórek bakterii i zmiany kwasowości w czasie 27-godzinnej fermentacji w temp. 37 °C (rys. 3 A i B).

Stwierdzono intensywne zwiększanie liczby komórek bifidobakterii do 15. godziny fermentacji, a następnie stabilizację. Kształt krzywej wzrostu nie jest typowy dla wzrostu większości drobnoustrojów, o czym świadczy brak lag-fazy. Liczba komórek *B. longum* BIM B-647 (A4) w czasie fermentacji była skorelowana z kwasowością. Współczynnik korelacji Pearsona równy $r = -0,98$ świadczy o silnej zależności obniżania wartości pH wraz ze wzrostem liczby komórek *Bifidobacterium* w czasie fermentacji. Ponieważ po 15 h fermentacji nastąpiła stabilizacja liczby komórek bakterii (8,8 log jtk/ml), wydaje się, że ten czas jest odpowiedni i wystarczający, aby zakończyć proces fermentacji w przypadku *B. longum* BIM B-647. Po 15 h fermentacji pH próby obniżyło się do wartości 5,4, natomiast po 27 h do 4,9. *Bifidobacterium* nie mają

silnych właściwości zakwaszania środowiska. W wyniku metabolizmu glukozy produkują kwas octowy i mlekowy, najczęściej w proporcji 3 : 2 [10]. Stwierdzono, że dalsze przetrzymywanie prób w temp. 37 °C nie jest korzystne ze względów technologicznych.



Rys. 3. Zmiany liczby komórek bakterii szczepu *Bifidobacterium longum* BIM B-647 (A4) (A) oraz kwasowości (B) w napoju sojowym w czasie fermentacji w temp. 37 °C.

Fig. 3. Changes in cells count of *Bifidobacterium longum* BIM B-647 (A4) (A) strain and in acidity (B) in soy beverage during 24 h fermentation at temp. of 37 °C.

Wpływ dodatku glukozy i oligofruktozy na wzrost *Bifidobacterium* w napoju sojowym w czasie fermentacji i chłodniczego przechowywania

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono wpływ dodatku glukozy i oligofruktozy na wzrost *Bifidobacterium longum* BIM B-647 w napoju sojowym w czasie fermentacji w temp. 37 °C w porównaniu z próbą kontrolną (tab. 4). Istotne zwiększenie liczby komórek bakterii po 24 h wykazano w przypadku prób z dodatkiem 1 % glukozy i 1 % oligofruktozy oraz 1 % glukozy i 3 % oligofruktozy ($p < 0,05$), natomiast po 48 h fermentacji liczba komórek bakterii istotnie zwiększyła się we wszystkich próbach z dodatkiem oligofruktozy ($p < 0,05$). Stwierdzono, że w próbach z dodatkiem oligofruktozy nastąpiło większe zakwaszenie, po 48 h fermentacji pH zmniejszyło się do wartości $< 4,6$. Natomiast w próbie z dodatkiem 1 % glukozy i w próbie kontrolnej wartości pH były $> 4,6$ nawet po 48 h fermentacji.

T a b e l a 4

Wzrost i przeżywalność *B. longum* BIM B-647 (A4) w napoju sojowym podczas fermentacji w temp. 37 °C, w zależności od dodatku glukozy i oligofruktozy.

Growth and survival of *B. longum* BIM B-647 (A4) in the soy beverage during fermentation at 37 °C depending on the addition of glucose and oligofructose.

Próba Sample	Liczba bakterii [jtk/ml] Count of bacteria [cfu/ml]			Kwasowość (pH) Acidity (pH)		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
K	7,02 ± 0,06	8,79 ± 0,06	8,72 ± 0,06	7,2 ± 0,06	4,99 ± 0,08	4,7 ± 0,07
1%Glu	7,14 ± 0,08	8,9 ± 0,13	8,88 ± 0,13	7,2 ± 0,04	4,92 ± 0,06	4,64 ± 0,13
1%OF	7,11 ± 0,04	9,05 ± 0,08	9,02 ± 0,09	7,2 ± 0,09	4,77 ± 0,11	4,37 ± 0,07
1%Glu+1%OF	6,92 ± 0,09	9,26 ± 0,13	9,36 ± 0,12	7,2 ± 0,12	4,83 ± 0,15	4,26 ± 0,08
1%Glu+3%OF	7,05 ± 0,02	9,53 ± 0,1	9,73 ± 0,06	7,2 ± 0,03	4,74 ± 0,03	4,28 ± 0,15
1%Glu+5%OF	7,03 ± 0,05	9,39 ± 0,19	9,82 ± 0,04	7,2 ± 0,11	4,73 ± 0,06	4,27 ± 0,04

Objasnienie: / Explanatory note:

$\bar{x} \pm s$ / SD.

Na działalność mikroorganizmów wpływ ma rodzaj i ilość pożywienia w środowisku. Cukry obecne w podłożu, zarówno glukoza, jak i wielocukry (np. prebiotyki) mogą stanowić źródło węgla, które bakterie są w stanie metabolizować. Zależność pomiędzy zawartością cukrów w podłożu a czasem generacji komórek nie zawsze jest zależnością prostą [19].

W tab. 5. przedstawiono wyniki dotyczące przeżywalności *Bifidobacterium longum* BIM B-647 (A4) w fermentowanym napoju sojowym podczas 14 dni chłodniczego przechowywania prób z dodatkiem glukozy i oligofruktozy. We wszystkich próbach stwierdzono zamieranie komórek bakterii. Podobne badania wykonali Bożanić i wsp. [1], którzy stwierdzili, że 5 % dodatek glukozy spowodował stabilizację oraz wydłużenie fazy stacjonarnej żywotności komórek *Bifidobacterium* spp. w napoju sojowym, w porównaniu z próbą bez dodatku glukozy. Bakterie utrzymywały się na poziomie ok. 7,5 log jtk/ml przez 28 dni. Jednakże w przypadku niniejszych doświadczeń stężenie glukozy było mniejsze, czym można tłumaczyć efekt, który zauważono, po zastosowaniu dodatku tego cukru.

Liczne badania wykazują, że dodatek prebiotyków stymuluje wzrost, a także wydłuża fazę stacjonarną *Bifidobacterium*, podczas przechowywania żywności [5, 13, 15, 17, 19].

Tabela 5

Przeżywalność *B. longum* BIM B-647 (A4) w napoju sojowym po fermentacji, podczas 14 dni chłodniczego przechowywania, w zależności od dodatku glukozy i oligofruktozy.

Growth and survival of *B. longum* BIM B-647 (A4) in soy beverage after fermentation, during 14 days of cold storage depending on the addition of glucose and oligofructose.

Próba Sample	Liczba bakterii [jtk/ml] Count of bacteria [cfu/ml]			Kwasowość (pH) Acidity (pH)		
	0 d	7 d	14 d	0 d	7 d	14 d
K	8,72 ± 0,06	8,2 ± 0,13	7,8 ± 0,07	4,7 ± 0,07	4,71 ± 0,06	4,74 ± 0,12
1 % Glu	8,88 ± 0,13	8,54 ± 0,07	8,03 ± 0,1	4,64 ± 0,13	4,6 ± 0,04	4,57 ± 0,07
1 % OF	9,02 ± 0,09	8,92 ± 0,04	8,87 ± 0,09	4,37 ± 0,07	4,35 ± 0,09	4,32 ± 0,02
1 % Glu+1 % OF	9,36 ± 0,12	9,07 ± 0,16	8,5 ± 0,18	4,26 ± 0,08	4,29 ± 0,03	4,27 ± 0,08
1 % Glu+3 % OF	9,73 ± 0,06	9,57 ± 0,16	8,7 ± 0,12	4,28 ± 0,15	4,28 ± 0,11	4,24 ± 0,04
1 % Glu+5 % OF	9,82 ± 0,04	9,05 ± 0,25	8,8 ± 0,14	4,27 ± 0,04	4,26 ± 0,06	4,24 ± 0,07

Objaśnienia / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s$ / SD; K – próba kontrolna / control sample; d – dni / days.

Stwierdzenia i wnioski

1. Proces fermentacji (37 °C/24 h) spowodował wzrost liczby komórek *Bifidobacterium* spp. w napoju sojowym i wpłynął na ich większą przeżywalność podczas przechowywania w temperaturze 4 °C.
2. Wybrany szczep *B. longum* BIM B-647 charakteryzował się znacznym wzrostem komórek bakterii (powyżej 8,7 log jtk/ml) w ciągu 15 h fermentacji.
3. Dodatek oligofruktozy wpłynął istotnie na zwiększenie liczby komórek *B. longum* BIM B-647 (A4) po fermentacji, a także na przeżywalność komórek podczas chłodniczego przechowywania napoju sojowego.
4. Napój sojowy jest dobrym nośnikiem bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i może być stosowany do otrzymywania nowych produktów probiotycznych.

Badania zrealizowano w ramach Programu Wykonawczego z Republiką Białorusi na lata 2011-2013 „Próba izolacji i charakterystyka bakterii probiotycznych oraz zastosowanie w wybranych produktach żywnościowych”

Literatura

- [1] Bożanić R., Pletikapić G., Lovković S.: Influence of temperature and glucose addition on growth and survival of bacteria from BCT culture in soymilk. *Mljekarstvo*, 2008, **58** (2), 171-179.
- [2] Canganella F., Giontella D., Nespica M.L., Massa S., Trovatielli L.D.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* in yogurts manufactured from cow's milk and soymilk during storage at two temperatures. *Annals of Microbiology*, 2000, **50** (1), 43-53.

- [3] Chuo CC., Huo JW.: Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **56** (2-3), 113-121.
- [4] Cichocka A.: Korzyści zdrowotne ze spożywania produktów sojowych. *Przem. Spoż.*, 2005, **9** (59), 41-43.
- [5] Donkor O., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P.: Rheological Properties and Sensory Characteristics of Set-Type Soy Yogurt. 2007.
- [6] Gibson G.R., Roberfroid, M.B.: Dietary modulation of the human colonie microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 1995, **125** (6), 1401-1412.
- [7] Gomes A.M.P, Malcata F.X.: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, **10** (4-5), 139-157.
- [8] Inhibashi N., Yaeshima T., Hayasawa H.: Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malaysian J. Nutr.*, 1997, **3** (2), 149-159.
- [9] Kanadys W., Oleszczuk J.: Izoflawony a utrata masy kostnej u kobiet w okresie pomenopauzalnym. I. Wpływ produktów i preparatów z soi na metabolizm kostny. *Postępy Fitoterapii*, 2007, **3**, 136-144.
- [10] Libudzisz Z.: Bakterie fermentacji mlekowej W: *Mikrobiologia techniczna*. Red. Z. Libudzisz., K. Kowal, Z. Żakowska: t. 2. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2008, ss. 25-58.
- [11] Mitsuoka T.: Bifidobacteria and their role in human health. *J. Indus. Microbiol.*, 1990, **6**, 263-268.
- [12] PN-ISO: 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [13] Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zaroni S., Matteuzzi D.: Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Envir. Microbiol.*, 2005, **71** (10), 6150-6158.
- [14] Shimakawa Y., Matsubara S., Yuki N., Ishikawa F.: Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **81**, 131-136.
- [15] Swidan N.: Factors affecting the growth and survival of probiotic in milk. Cardiff School of Health Sciences University of Wales Institute, Cardiff, United Kingdom, 2009.
- [16] Tsangalis D., Shah N.P.: Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2004, **39**, 541-554.
- [17] Varga L., Süle J., Szigeti J.: Stimulation of probiotics lactobacilli and bifidobacteria in cultured dairy foods. International Scientific Conference on Sustainable Development & Ecological Footprint, Sopron, Hungary, March 26-27, 2012.
- [18] Wang Y-C., Yu R-C., Chou C-C.: Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiology*, 2002, **19** (5), 501-508.
- [19] Yeo S-K i Liong M-T: Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics soymilk. *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 267-275.

GROWTH AND SURVIVAL OF *BIFIDOBACTERIUM* IN SOY BEVERAGE

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the potential use of soy beverage as a medium for the growth and survival of *Bifidobacterium* and, also, to determine the effect of added sugars on the survival thereof. The study was divided into two stages: at the first stage, the growth and survival of *Bifidobacterium* strains were studied in fermented and unfermented soy beverage. At the second stage, the effect of added sugars (glucose and oligofructose) was investigated on the growth and survival of a selected *Bifidobacterium* strain in the soy beverage.

The soy beverage was inoculated with a 5 % (v/v) inoculum of the 24-hour culture of the *Bifidobacterium* population, its count being between 8.7 and 9.2 log cfu/ml depending on the strain applied. In the unfermented samples, after 7 days of refrigerated storage thereof, the number of cells significantly decreased to a value of 5.8 - 4.1 cfu/ml. However, after fermentation (37 °C/24 h), the number of *Bifidobacterium* cells increased by approximately 2 logarithmic orders, except for the sample with the A6 strain added. The selected strain of *B. longum* BIM B-647 was characterized by a high biomass production (already after 15 h fermentation) > 8.7 log cfu/ml. The addition of oligofructose significantly impacted the increase in the number of *B. longum* BIM B-647 cells in the soy beverage during fermentation and it also caused the stationary phase during cold storage of the samples to extend. The soy drink is a good carrier for the *Bifidobacterium* and it can be used to produce new probiotic foods.

Key words: *Bifidobacterium*, soy beverage, oligofructose, survival ☒

HANNA BORUCZKOWSKA, TOMASZ BORUCZKOWSKI,
WACŁAW LESZCZYŃSKI, EWA TOMASZEWSKA-CIOSK,
JOANNA MIEDZIANKA, WIOLETTA DROŹDŹ, PIOTR REGIEC

THE OBTAINING OF STARCH – AND OLEIC ACID – BASED ESTER AND ITS PROPERTIES

S u m m a r y

Nowadays, esters of saccharides and fatty acids are obtained mainly using chemical methods. An alternative method of saccharide esterification with fatty acids is a process using a lipase biocatalyst. The objective of the study was to develop a method to enzymatically esterify starch with a lipase preparation isolated from the *Candida antarctica* yeast. The esterification reaction of starch was performed at a low temperature (60 °C) using non-toxic reagents. The reaction medium was also non-toxic. The obtained product of this reaction was a starch oleate that could be a thickening agents' constituent owing to its hydrophilic and hydrophobic properties.

The starch ester obtained through the enzymatic esterification reaction was analysed using a HNMR (Nuclear Magnetic Resonance) technique. The degree of substituting starch with oleic acid was $DS = 0.13$. The DSC (Differential Scanning Calorimeter) analysis proved that the enzymatic modification of starch caused the thermal characteristics of the product obtained to change. The heat appearing specific for the starch oleate phase transition was three times lower than that of the native starch. The correlation was also determined between rheological properties of water suspensions of starch and starch oleate and temperature. The starch oleate was characterized by a rapid increase in its viscosity during the initial phase of heating and, as the temperature rose, by a slow decrease in its viscosity.

Key words: starch, esterification, lipase, oleic acid

Introduction

Owing to their properties, saccharide and fatty acid-based esters are produced on an industrial scale. Saccharose is used to esterify fatty acids including long-chain fatty acids. Saccharose esters are the food ingredients referred to as E 473 [11]. At present,

Dr inż. H. Boruckowska, dr inż. T. Boruckowski, prof. dr hab. W. Leszczyński, dr inż. E. Tomaszewska-Ciosk, dr inż. J. Miedzianka, dr inż. W. Drożdż, dr inż. P. Regiec, Katedra Technologii Rolnej i Przechowywania, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 53-630 Wrocław

research studies are carried out on the synthesis of such esters as: maltose [7], fructose [12], and glucose [4], as well as on the starch-based esters [2, 3, 8].

Saccharide-based esters have many free hydroxide groups; therefore, they exhibit high affinity to water molecules. A fatty acid esterified in sugar plays a role of the alkyl (hydrophobic) chain. Owing to this structure, the saccharide- and fatty acid-based esters are able to form thermostable emulsions. The esters of the compounds as mentioned above, which are the ideal non-ionic surfactants, exhibit emulsifying and stabilizing properties along with other physical and chemical properties, which make them suitable for industrial applications.

Today, the saccharide- and fatty acid-based esters are mainly produced with the use of chemical methods. The chemical synthesis of esters must be performed in the media that contain polar organic solvents, such as: pyridine, dimethylsulfoxide (DMSO), and NN-dimethylformamide (DMF). Those solvents are very toxic to humans, thus, it is impossible to apply them in the food industry. The esterification can also be successfully performed without a solvent, at a melting temperature of the saccharide (169 - 170 °C). However, at these temperatures, discoloration (darkening) of the product occurs. When chemical methods are used, the blends of mono- and polyesters are produced instead of one ester only.

The lipase-catalyzed esterification is a good alternative to the chemical methods. With the use of this enzyme, the esterification reaction is performed either in the medium containing apolar solvents or in a two-phase (water-solvent) system. The reaction temperatures are much lower (30 - 50 °C), when the esterification is performed using chemical methods. Specific actions of the enzymes affect the resulting structure of the products that are free of any discolorations [5, 6, 15, 17]. However, the enzyme substitution is expensive and therefore not used on a large scale.

The sources of lipases are bacteria, yeast, fungi, and, also, some plant and animal species [13]. The lipases are glycoproteins (containing 2 - 15 % of carbohydrates, mainly mannose) active within a wide range of pH and temperatures [14].

Up to date, the starch has been esterified with long-chain fatty acids, using, mainly, chemical methods. Thus, the esters obtained exhibit thermoplastic properties similar to those found in the low-substituted starch. Consequently, the starch esters are suitable to produce biodegradable plastic products [2].

The objective of the present study was to esterify starch with the use of a long-chain fatty acid and with yeast enzymes.

Material and methods

The study material comprised: *Candida antarctica* yeast obtained from the company 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH'; potato starch called "Superior" and manufactured in a potato plant 'Przedsiębiorstwo Prze-

mysłu Ziemiaczanego S.A. in Niechlów; oleic acid (Fluka Chemika Co.); lauric acid (Przedsiębiorstwo Odczynników Chemicznych S.A., Gliwice); tert – butanol (Fluka Chemika Co.); a Sigma - Aldrich molecular sieve (4 Å, 8 - 12 mesh); analytically pure acetone (Przedsiębiorstwo Odczynników Chemicznych S.A., Gliwice); olive oil (Aceites Ybarra S.A., Seville, Spain), arabic gum, (Fluka Chemika); and yeast culture of *Candida antarctica*.

The yeast culture of *Candida antarctica* was developed on an YM medium, at 30 °C, during a 5 day period.

Isolating the extracellular lipase from a culture medium of the yeast of Candida antarctica sp.

The culture medium, containing the *Candida antarctica* yeast and all the enzymes present in the yeast, was centrifuged in a K80 centrifuge (MLW Co.) and, next, the supernatant obtained was separated from the yeast sediment. Afterwards, the supernatant containing lipase (separated from the yeast) was densified, using a laboratory vacuum evaporator, and lyophilized for further densification and reduction of the moisture content. The resultant lipase called lyophylisate was refrigerated and stored in an airtight container. This procedure ensured the biological value and the structure of the enzyme.

Determining the lipolytic activity of the enzyme obtained during the research [1]

A mixture necessary to determine the lipase activity was prepared in 150 ml conical flasks. It contained 50 ml of olive oil, 10 ml of 5 % solution of arabic gum, and 40 ml of distilled water. A 20 ml portion of the mixture and 0.25 g of the enzyme preparation were placed in conical flasks. A control sample was one with no enzyme preparation added. The reaction was carried out in a shaker at 50 °C for 3 h. Afterwards, to each flask, 5 ml of 96 % ethanol and 75 ml of distilled water were added. The quantity of the released fatty acids was determined while titrating the samples in 0.05 M NaOH in the presence of phenolphthalein. The lipolytic activity was expressed in U (μM fatty acid produced in 1 hour by 1 g of enzyme).

Esterifying the starch enzyme with oleic acid [18]

The starch was dried in a vacuum drier until a stable dry matter was obtained [15]. Next, a blend containing 20.0 g of starch and 31.4 g of oleic acid (1 mol equivalent of glucose corresponds to 1 mol of fatty acid) was prepared and supplemented with 2.5 g of the isolated enzyme. The medium contained 102.8 g of tert-butanol (a double weight equivalent of saccharide and fatty acid). The resultant water (a by-product of

the esterification) was removed using a 10.3 g molecular sieve (4 Å, 8 - 12 mesh; 0.2 – fold weight equivalent of saccharide and fatty acid). The reaction was performed with constant shaking (300 rev/min) at 60 °C for 28 days. Afterwards, the mixture was washed with acetone and, next, filtered. The sediment from the filter was dried at a room temperature and placed in an air-tight container. The resultant starch oleinate was the subject of subsequent research. Simultaneously, an identical reaction of starch esterification with fatty acid without using lipase was performed as a test reaction to demonstrate the effect of enzyme on the process of starch esterification.

Determining the esterification level with the use of a ^1H NMR method (Nuclear Magnetic Resonance)

The starch oleinate was subject to analysis of ^1H NMR spectrum using an Avance AMX 300 spectrometer (Bruker Co.). Prior to analysis, the samples were dissolved in a blend of DMSO and water (ratio of 9:1). The analysis was carried out at 70 °C. The degree of substitution was determined as a 1/3 ratio of the signal surface of the final CH_3 group of oleic acid, at 0.85 ppm to 1/7 of the surface of proton signals of the glucose ring in the starch chain, ranging from 3.1 to 3.9 ppm, and at 5.1 ppm.

Analysing the functional groups present in the tested specimens by means of an FTIR absorption spectroscopy

In order to confirm the existence of an ester bond, the pills of the tested material compressed with KBr were analysed using an FTIR absorption spectroscopy with a Mattson FTIR-300 spectrometer.

Determining the thermal characteristics of the substance using an 822e DSC (Mettler – Toledo)

The starch oleinate portions of 5 mg (in conversion to dry matter) were placed in 100 μl aluminum containers, to which distilled water was added, and its quantity was three times higher than that of the ester. The samples underwent a conditioning process in closed containers at a room temperature for 30 minutes. Afterwards, they were placed in a DSC furnace and kept at 30 °C for 5 minutes. The measurements were made while heating them to 100 °C at a rate of 4 °C/min.

The measurements comprised the initial and final temperatures of changes observed at different phases, the temperatures of an extrapolated peak centre, and the heat appearing specific for phase changes.

Determining the viscosity of solutions with a Haake RS 50 Rheostress rheometer

50 cm³ portions of 2 % suspensions of starch and starch oleate were prepared. They were analysed in a rotational mode using a measuring unit type DG 41. The 6.3 cm³ of the above-mentioned suspensions were put into a cylinder.

The viscosity of the solutions was measured under the following conditions: shear force 200 s⁻¹; range of temperature between 30 °C and 85 °C, at a heat rate of 1.4 °C/min.

Results and discussion

The activity of the lipase, obtained from the *Candida Antarctica* yeast according to the procedure as described above, was 0.1 U/mg and it was sufficient to efficiently perform the starch esterification using this enzyme. The product obtained during the starch esterification with the use of lipase was a white powder containing two fractions of varying solubility values. One of them was soluble in a blend of DMSO (dimethyl sulfoxide) and water. The highest solubility was found at a DMSO-to-water ratio of 9:1, at 70 °C. The second fraction was neither soluble in the DMSO-water blends prepared from different quantities of water nor in the chloroform at a temperatures in various temperature ranges. The above two solvents were used pursuant to the ¹HNMR analysis requirements.

The product obtained was then analysed using MNR (Fig. 1).

The analysis of the ¹HNMR spectrum showed that the product obtained was an ester (of potato starch and oleic acid). Moreover, the FTIR analysis confirmed the existence of an ester bond (signal at 1715 cm⁻¹) in the product tested, which was an explicit proof of the occurrence of enzymatic reaction.

The degrees of starch substitution were calculated with regard to the spectra obtained [3]. The degree of substitution shows the number of hydroxyl groups in a glucose molecule, which have been substituted for fatty acid. Theoretically, its maximum value is around 3 [9, 10]. The degree of starch substitution with oleic acid determined with regard to ¹HNMR spectrum was 0.13. This means that each eighth glucose molecule in a starch chain possesses one hydroxyl group substituted with fatty acid. No data are available in the reference literature, which would make it possible to compare them with the results obtained under the present study. So far, no data have been reported on potato starch esterification with a long-chain fatty acid using an enzymatic method.

It is likely that the substitution degree of a fraction insoluble in a solvent is much higher than that of the soluble fraction. Similarly, the acetylated starch (DS 2.97) and its products, obtained through chemical esterification [3], were hardly soluble (the degree of substituting the acetyl-caprylic starch with caprylic acid was DS = 0.51 and with acetic acid DS = 2.51).

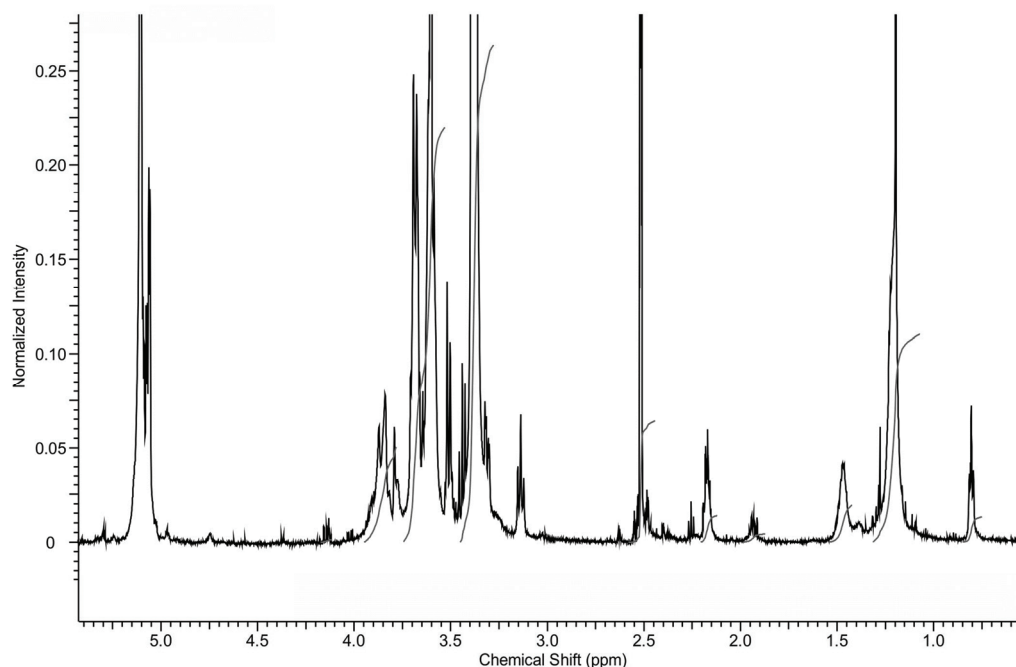


Fig. 1. ^1H NMR spectrum of starch oleinate.

Rys. 1. Widmo ^1H NMR oleinianu skrobi.

The ^1H NMR and FTIR analyses of the reaction product without using enzyme did not show any chemical changes in the starch chain. It means that the starch esterification reaction with fatty acid takes place only in the presence of the lipase enzyme obtained from the *Candida antarctica*.

Starch modification causes changes in the thermal characteristics of the subsequent product determined with the use of a differential scanning calorimeter (DSC). The analysis included a starch oleinate obtained by the enzymatic method and a natural starch (for comparison) used as a substrate during the ester production. The measurements comprised the initial and final temperatures of changes observed at different phases, the temperatures of the extrapolated peak centre, and the heat appearing specific for phase changes (Fig. 2).

The phase changes in the natural starch occurred at the temperatures similar to those occurring when the starch was modified to ester. A pasting process of the starch ester, soluble in water containing DMSO (presumably with a low DS), began at 60.23 °C and was accomplished at 71.16 °C. The similar temperatures were observed when pasting the natural starch granules, which were not substituted with fatty acid. However, the heat appearing specific for the phase changes in the starch oleinate was about three times lower (4.31 J·g⁻¹) compared to the native starch (12.07 J·g⁻¹). This

finding confirms that the starch was substituted with oleic acid; the same was also proved by HNMR.

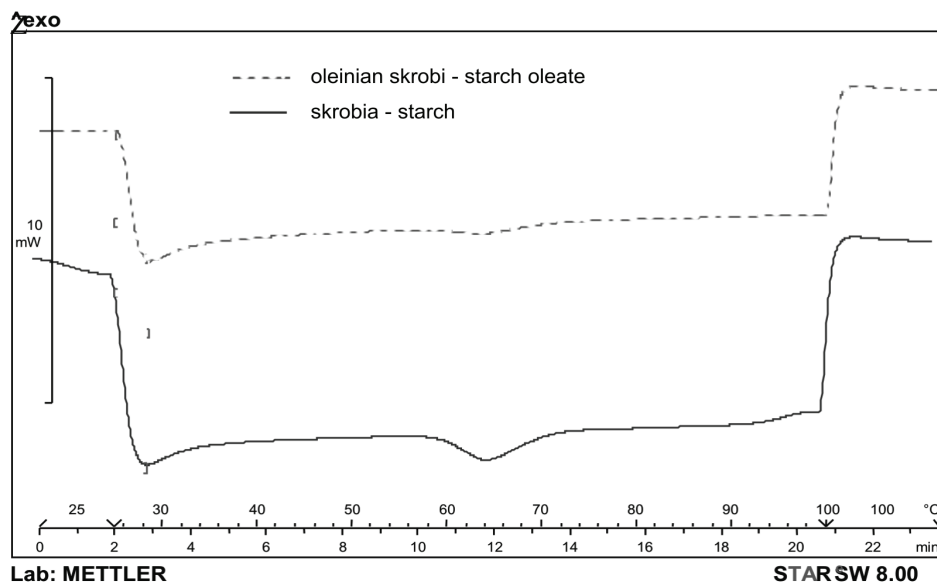


Fig. 2. Thermal characteristics of aqueous solutions of modified starch and its ester as measured by DSC.

Rys. 2 Charakterystyka termiczna DSC wodnych roztworów skrobi modyfikowanej oraz oleinianu skrobi.

Fig. 3 and 4 show changes in the viscosity of starch pastes and starch oleinate suspensions in water, depending on temperatures.

The heating of 2 % starch pastes slightly reduced their viscosity, when the temperature was increased to 70 °C whereas their viscosity increased at temperatures >70 °C. A contrary dependence was found as for the starch oleinate that exhibited an increasing viscosity at the beginning of the heating treatment, but, after some time, its viscosity began to decrease. The maximum viscosity of starch oleinate was $7.09 \cdot 10^{-3}$ Pas at 47 °C. The viscosity of the starch at the same temperature was twice as low ($3.44 \cdot 10^{-3}$ Pas). This characteristic of esters could be utilized to produce densifiers, used, for example, in a variety of „convenience food” (desserts, instant soups, etc.). The reagents and solvents used in the enzymatic starch esterification with fatty acids are totally removed after the process is accomplished, i.e. during the extraction and steaming.

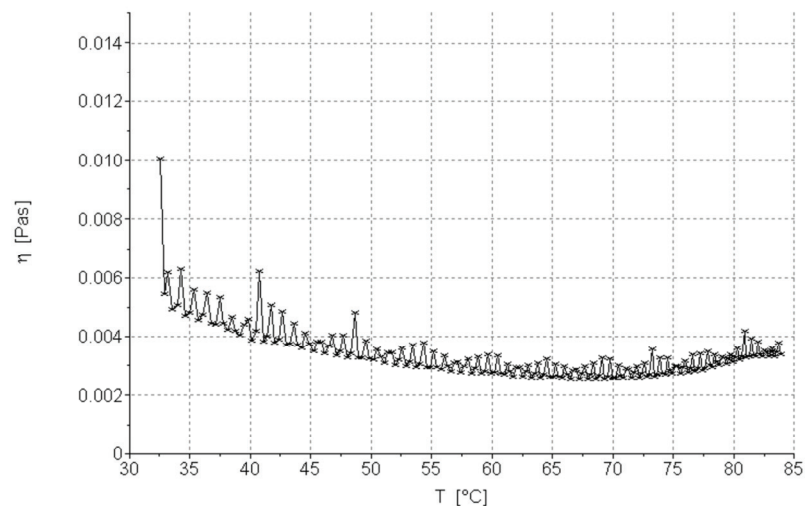


Fig. 3. Dependences between viscosity of 2 % starch paste and temperatures.

Rys. 3 Zależność lepkości od temperatury 2 % kleiku skrobiowego.

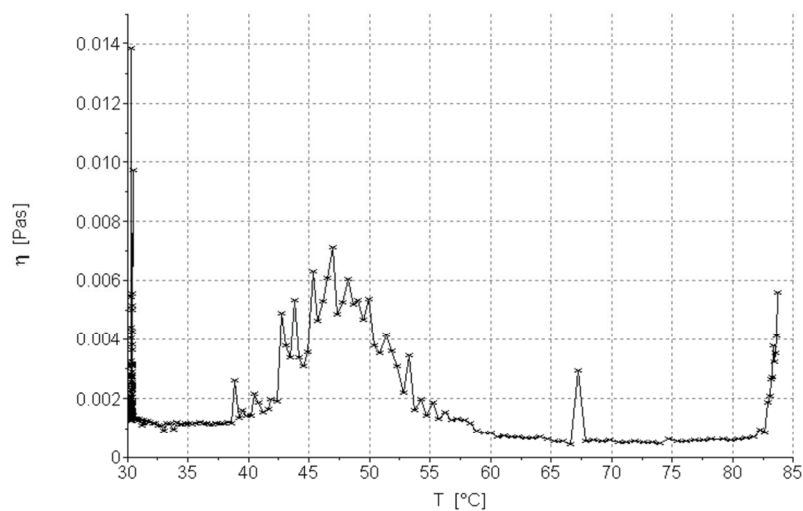


Fig. 4. Dependences between viscosity of 2% water suspension of starch oleinate and temperatures.

Rys. 4. Zależność lepkości wodnej zawiesiny oleinianu skrobi od temperatury 2 %.

An ester of the potato starch and oleic acid was the final product obtained when applying the method as developed and described above of the enzymatic esterification of the starch with the use of preparation of lipase from the *Candida antarctica* yeast. The degree of starch substitution (DS) with oleic acid in the ester fraction solvable in

the 9:1 mixture of DMSO and water, was 0.13 as determined based on the ^1H NMR spectrum. The reaction proceeded at a low temperature (60 °C) with non-toxic reagents and a non-toxic reaction medium. The product of this reaction, starch oleate, could be a constituent of thickening agents owing to its hydrophilic and hydrophobic properties.

Conclusions

1. The ester of potato starch and oleic acid was obtained with the use of a lipase isolated from the *Candida antarctica* yeast.
2. The degree of substituting the starch with oleic acid in the fraction of ester soluble in a 9:1 blend of DMSO and water was DS = 0.13.
3. The starch was esterified at a low temperature (60 °C) with the use of non-toxic reagents and a non-toxic medium.

References

- [1] Adamczak M., Bednarski W.: Enhanced activity of intracellular lipase from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Process Biochemistry*, 2004, **39**, 1347-1361.
- [2] Bikiaris D., Aburto J., Alric I., Borredon E., Botev M., Betchev C., Panayiotou C.: Mechanical Properties and Biodegradability of LDPE Blends with Fatty-Acid Esters of Amylose and Starch., *J. Appl. Polymer Sci.*, 1999, **71**, 1089-1100.
- [3] Boruckowska H., Leszczyński W., Panek J., Boruckowski T., Zdybel E.: Niektóre właściwości produktu otrzymanego w wyniku działania chlorku kwasu kaprylowego na acetylowaną skrobię ziemniaczaną. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 2006, **511**, 653-664.
- [4] Boruckowska H., Boruckowski T., Leszczyński W., Tomaszewska-Ciosk E., Ślusarczyk M.: Selected physicochemical properties of fatty acid esters with mono- and disaccharides. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2007, **57 (4A)**, 59-63.
- [5] Cao L., Bornscheuer U.T., Schmid R.D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J. Molec. Catalysis B: Enzymatic*, 1999, **6**, 279-285.
- [6] Coulon D., Ismail, A., Girardin M., Ghoul M.: Enzymatic synthesis of alkylglycoside fatty acid esters catalyzed by an immobilized lipase. *J. Molec. Catalysis B: Enzymatic*, 1998, **5**, 45-48.
- [7] Ferrer M., Soliveri J., Plou F., López-Cortés N., Reyes-Duarte D., Christensen M., Copa-Patiño J.L., Ballesteros A.: Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, **36**, 391-398.
- [8] Miladinov V.D., Hanna M.A.: Starch esterification by reactive extrusion. *Industrial Crops and Products*, 2000, **11**, 55-57.
- [9] Rajan A., Sudha J.D., Abraham T.E.: Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase". *Industrial Crops and Products*, 2008, **27**, 50-59.
- [10] Rajan A., Abraham T.E.: Enzymatic modification of cassava starch by bacterial lipase. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 2006, **29**, 65-71.
- [11] Rutkowski A.: Dodatki funkcjonalne do żywności, *Agro&Food Technology*. Katowice, 1993, s. 145.

- [12] Sabeder S., Habulin M., Knez Z.: Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. J. Food Engin., 2006, 77, 880-886.
- [13] Saxena R.K., Sheoran A., Giri B., Davidson W.S.: Purification strategies for microbial lipases. J. Microbiol. Methods, 2003, 52, 1-18.
- [14] Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C.: Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances, 2001, 19, 627-662.
- [15] PN-EN ISO 1666:2000. Starch. Determination of moisture content. Oven-drying method.
- [16] Soultani S., Ognier S., Engasser J.M., Ghoul M.: Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003, 227, 35-44.
- [17] Yan Y., Bornscheuer U.T., Cao L., Schmid R.D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters. Removal of byproducts by azeotropic distillation. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25, 725-728.
- [18] Zgłoszenie patentowe: „Sposób modyfikacji skrobi”, nr zgłoszenia P 382698

OTRZYMYWANIE ESTRU SKROBI I KWASU OLEINOWEGO ORAZ JEGO WŁAŚCIWOŚCI

Streszczenie

Estry sacharydów i kwasów tłuszczowych otrzymuje się głównie metodami chemicznymi. Alternatywną metodą estryfikacji sacharydów kwasami tłuszczowymi jest sposób z użyciem biokatalizatora – lipazy.

Celem pracy było opracowanie metody enzymatycznej estryfikacji skrobi przy użyciu preparatu lipazy z drożdży *Candida antarctica*. Reakcja estryfikacji skrobi przebiegała w niskiej temperaturze (60 °C), z zastosowaniem nietoksycznych reagentów oraz nietoksycznego środowiska reakcji. Otrzymany produkt – oleinian skrobi – dzięki właściwościom hydrofilowym oraz hydrofobowym może być składnikiem substancji zagęszczających.

Ester skrobi uzyskany za pomocą reakcji enzymatycznej estryfikacji poddano analizie HNMR. Stopień podstawienia skrobi kwasem oleinowym wynosił $DS = 0,13$. Analiza DSC wykazała, że modyfikacja enzymatyczna skrobi spowodowała zmiany właściwości termicznych uzyskanego produktu. Ciepło właściwe przemiany fazowej oleinianu skrobi było 3 razy mniejsze niż ciepło właściwe przemiany fazowej skrobi naturalnej. Określono również właściwości reologiczne zawiesin wodnych skrobi oraz oleinianu skrobi w zależności od temperatury. Oleinian skrobi charakteryzował się szybkim wzrostem lepkości w początkowej fazie ogrzewania i jej powolnym zmniejszaniem wraz z dalszym wzrostem temperatury.

Słowa kluczowe: skrobia, estryfikacja, lipaza, kwas oleinowy 

ZOFIA KAROLINI-SKARADZIŃSKA, ANNA CZUBASZEK, MAŁGORZATA
STANISŁAWSKA, PAWEŁ SZEWCÓW

ZMIANY WŁAŚCIWOŚCI WYPIEKOWYCH MĄKI PSZENNEJ POD WPLYWEM DODATKU MALTODEKSTRYN

Streszczenie

Celem badań było określenie zmian zachodzących we właściwościach kleiku mącznego, ciasta i pieczywa pszenne pod wpływem dodatku maltodekstryn.

Materiał badawczy stanowiły handlowe mąki pszenne (typu 550 i 750) oraz maltodekstry ny niskoskucrzzone (DE = 9,4) i średnioskucrzzone (DE= 16,8). Maltodekstry ny dodawano w ilości: 1, 2, 3 i 4 % w stosunku do naważki mąki. Jakość mąki pszennej oceniono na podstawie zawartości białka ogółem, wydajności glutenu i jego rozplywalności oraz wskaźnika sedymentacyjnego. W mące pszennej bez i z dodatkiem maltodekstryn wykonano oznaczenie liczby opadania. Próbk i poddano również ocenie amylograficznej, farinograficznej i ekstensograficznej oraz wykonano laboratoryjny wypiek chleba metodą jednofazową. Użyte mąki pszenne cechowały się dobrą wartością wypiekową. Pod wpływem dodatku maltodekstryn obserwowano tendencję zmniejszenia maksymalnej lepkości kleików mącznych. Przyczyniały się one do zmniejszenia wodorocłonności mąki oraz wydłużenia czasu rozwoju i stałości ciasta, co świadczyło o wzmocnieniu jego wytrzymałości na obróbkę mechaniczną. Dodatek maltodekstryn powodował także uplastycznienie ciasta wyrażające się zwiększeniem rozciągliwości oraz zmniejszeniem maksymalnego oporu na rozciąganie. Zastosowanie 1 - 4 % dodatku maltodekstryn do mąki pszennej, zwłaszcza maltodekstryn średnioskucrzonych do mąki typu 550 o niskiej aktywności amylolitycznej, spowodowało zwiększenie objętości pieczywa. Pod wpływem stosowanych dodatków maltodekstryn nie ulegała zmianom wydajność chleba. Obserwowano natomiast tendencję zmniejszania porowatości miękiszu.

Słowa kluczowe: maltodekstry ny, mąka pszenna, kleiki mączne, ciasto, chleb

Wprowadzenie

Maltodekstry ny to produkty otrzymane podczas enzymatycznej, niepełnej hydrolyzy skrobi. Zawierają one cukry o dużej masie cząsteczkowej, których właściwości zależą od równoważnika glukozyowego DE. Równoważnik ten jest definiowany jako stosunek zawartości cukrów redukujących do całkowitej zawartości cukrów. Rozróżnia

*Dr inż. Z. Karolini-Skaradzińska, dr hab. A. Czubaszek, mgr inż. M. Stanisławska, mgr inż. P. Szewców,
Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we
Wrocławiu, ul. J. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław*

się maltodekstryny niskoscukrzone (DE = 7 - 10), średnioskukrzone (DE = 14 - 22) i wysokoscukrzone (DE = 23 - 35) [28]. Maltodekstryny mogą być produkowane z różnych skrobi przy użyciu enzymów różnego typu [8, 25]. W zależności od botanicznego pochodzenia skrobi, sposobu jej przygotowania, rodzaju zastosowanych enzymów oraz czasu ich działania otrzymane maltodekstryny, nawet te o takim samym równoważniku glukozowym, mogą różnić się składem cząsteczkowym i właściwościami reologicznymi. Substancje te mają działanie żelotwórcze, emulgujące, stabilizujące, spulchniające i wypełniające. Zwiększają one lepkość cieczy, korzystnie wpływają na zachowanie barwy mrożonych owoców i hamują tworzenie się kryształków lodu, wiążą zapachy oraz intensyfikują właściwości smakowe. Są łatwo przyswajalne przez organizm człowieka i wykazują właściwości prebiotyczne [3, 7, 26]. Z tych względów maltodekstryny znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym. Używane są do produkcji przetworów mięsnych i mleczarskich, mrożonych deserów, budyniu, napojów, likierów, chrupiek ziemniaczanych oraz żywności dla dzieci, a także jako zamienniki tłuszczu. W ciastkarstwie, do produkcji biszkoptów czy herbatników, wykorzystywane są jako składnik recepturowy, który reguluje lepkość ciasta, wpływa na porowatość i kruchość końcowego wyrobu, zapobiega nadmiernemu wysychaniu oraz wydłuża okres przydatności do spożycia [2, 4, 9, 12, 24].

W literaturze fachowej niewiele jest informacji dotyczących stosowania maltodekstryn w produkcji pieczywa, a także ich oddziaływania na właściwości wypiekowe mąki. W związku z tym podjęto badania, których celem było określenie wpływu dodatku maltodekstryn na właściwości kleiku mącznego, cechy reologiczne ciasta oraz jakość chleba pszennego.

Material i metody badań

Materiał badawczy stanowiły: handlowa mąka pszenna typu 550 i 750 oraz 2 rodzaje maltodekstryn. Używano maltodekstryny niskoscukrzone (DE = 9,4) i średnioskukrzone (DE = 16,8), wyprodukowane ze skrobi ziemniaczanej przez Przedsiębiorstwo Przemysłu Spożywczego PEPEES S.A. w Łomży. Maltodekstryny dodawano w ilości: 1, 2, 3 i 4 % w stosunku do naważki mąki pszennej. Próbkę kontrolną stanowiła mąka pszenna (0 % dodatku). Układ doświadczenia powtórzono dwukrotnie.

W mące pszennej typu 550 i 750 określano zawartość białka ogółem metodą Kjeldahla ($N \times 5,7$) [18], wydajność glutenu i jego rozpływalność [13] oraz wskaźnik sedimentacyjny wg Zeleny'ego [20]. W mąkach pszennych bez i z dodatkiem maltodekstryn wykonywano oznaczenia: liczby opadania wg Hagberga-Pertena [19], cech amylograficznych [14], farinograficznych [15] oraz ekstensograficznych [16]. Laboratoryjny wypiek chleba z ciasta prowadzonego metodą jednofazową wykonywano w sposób opisany przez Karolini-Skaradzińską i wsp. [6]. Współczynnik porowatości miękiszu określano na podstawie skali Dallmanna [5].

Uzyskane wyniki cech amylograficznych, farinograficznych i wypieku laboratoryjnego opracowano statystycznie wykonując trójczynnиковą analizę wariancji, gdzie źródłem zmienności były: rodzaj maltodekstryn, ich dodatek ilościowy, typ mąki pszennej oraz interakcje pomiędzy tymi czynnikami. Wartości cech ekstensograficznych poddano natomiast czteroczynnikowej analizie wariancji, w której oceniono wpływ następujących zmiennych: rodzaj maltodekstryn, ich dodatek ilościowy, typ mąki pszennej i czas fermentacji. Istotność różnic wartości średnich wyceniano testem Duncana na poziomie istotności $p = 0,05$. Do obliczeń wykorzystano program Statgraphics v 6,0 plus.

Wyniki i dyskusja

Chlebowa mąka pszenna o dobrej wartości wypiekowej powinna cechować się zawartością białka na poziomie 11 - 14 %, wydajnością glutenu mokrego powyżej 25 %, wodochłonnością w granicach 51 - 59 %, czasem stałości ciasta w zakresie od 1 do 4 min i rozmiękczeniem ciasta po 12 min mieszenia wynoszącym 40 - 150 j.B. [17, 22, 23]. Ważny dla wartości wypiekowej mąki jest również poziom aktywności enzymów amylolitycznych, który określa się na podstawie oznaczenia liczby opadania. Aktywność amylaz mąki pszennej jest za wysoka, gdy liczba opadania przyjmuje wartości poniżej 200 s, a za niska przy wartościach powyżej 300 s [22]. Oznaczona amylograficznie lepkość kleiku wskazuje na optymalne właściwości układu amylazowo-skrobiowego mąki pszennej przeznaczonej do wypieku pieczywa, gdy kształtuje się na poziomie około 500 j.B. [5].

Użyta w badaniach mąka pszenna typu 550 zawierała 11,1 % białka ogółem, a mąka typu 750 – 11,9 % (tab. 1). Obie mąki cechowały się odpowiednią wydajnością glutenu (27 % – typ 550 i 30,5 % – typ 750). Gluten mąki typu 550 miał nieznacznie mniejszą rozplywalność (4 mm) niż gluten wymyty z mąki typu 750 (5,5 mm). Mąka typu 550, w porównaniu z mąką typu 750, charakteryzowała się mniejszą zdolnością pęcznienia cząstek mąki w środowisku kwaśnym określoną na podstawie wskaźnika sedymentacyjnego i wodochłonnością oraz krótszym czasem rozwoju ciasta. Biorąc pod uwagę te cechy jakościowe obu mąk pszennych można uznać, że odznaczały się one dobrą wartością wypiekową. Mąka typu 550 odznaczała się jednak gorszymi właściwościami układu skrobiowo-amylazowego niż mąka typu 750, na co wskazuje wysoka liczba opadania i lepkość kleiku mącznego.

T a b e l a 1

Cechy jakościowe mąki pszennej.
Quality parameters of wheat flour.

Cechy / Parameters	Typ mąki / Type of flour	
	550	750
Zawartość białka ogółem [%] Total protein content	11,1	11,9
Wydajność glutenu mokrego [%] Wet gluten yield	27,0	30,5
Rozpływalność glutenu [mm] Deliquescence of gluten	4,0	5,5
Wskaźnik sedymentacyjny [cm ³] Sedimentation index	29,0	33,5
Wodochłonność mąki [%] Water absorption of flour	55,5	59,2
Czas rozwoju ciasta [min] Dough development time	1,8	3,3
Liczba opadania [s] Falling number	402	304
Maksymalna lepkość [AU] Maximum viscosity	1250	390

T a b e l a 2

Średnie wartości liczby opadania i cech amylograficznych mąki pszennej z dodatkiem maltodekstryn.
Mean values of falling number and amylographic properties of wheat flour with maltodextrins added.

Czynniki Factors	Liczba opadania Falling number [s]	Temperatura początkowa kleikowania Initial temperature of gelation [°C]	Temperatura końcowa kleikowania Final temperature of gelation [°C]	Maksymalna lepkość Maximum viscosity [AU]
Dodatek maltodekstryn / Maltodextrins added [%]				
0	362a	57,4 a	82,0 a	818a
1	364 a	57,7 a	83,5 a	807 ab
2	355 a	58,2 a	83,3 a	795 abc
3	346 a	58,6 a	84,1 a	779 bc
4	353 a	59,1 a	83,3 a	768 c
Rodzaj maltodekstryn / Type of maltodextrins				
niskoscukrzone low-saccharified	354 a	57,8 a	83,1 a	790 a
średnioscukrzone mean-saccharified	350 a	58,6 a	83,3 a	796 a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – grupy jednorodne według testu Duncana przy $p = 0,05$ / homogenous groups according to Duncan's test ($p = 0.05$).

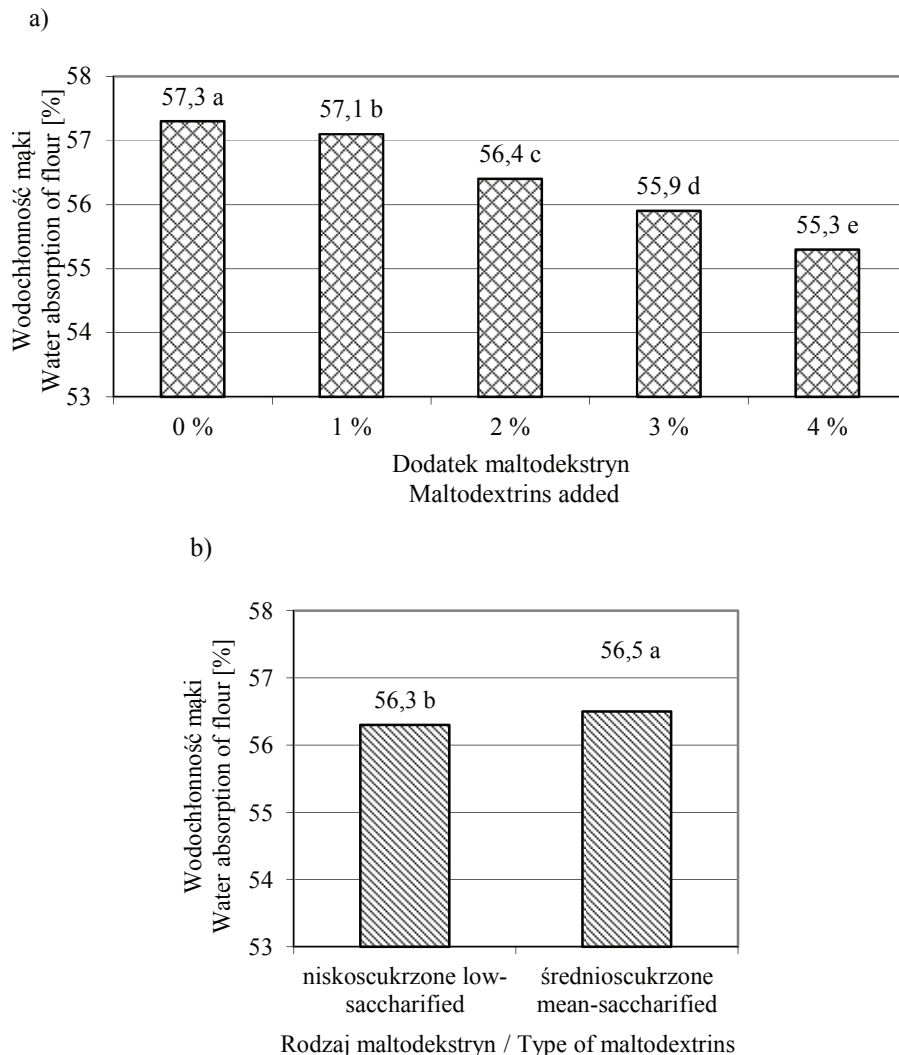
Przeprowadzone badania wykazały, że rodzaj i ilość dodanych maltodekstryn nie wpłynęły na liczbę opadania oraz początkową i końcową temperaturę kleikowania (tab. 2). Średnie wartości liczby opadania próbek zawierających maltodekstryny wahały się w zakresie 350 - 364 s. Początek procesu kleikowania następował w temp. 57,4 - 59,1 °C, a kończył przy 82,0 - 84,1 °C. Zaobserwowano natomiast statystycznie istotne, lecz niemające znaczenia technologicznego, zmniejszenie maksymalnej lepkości kleików pod wpływem 3 i 4 % dodatku maltodekstryn. Średnia wartość tej cechy w mące pszennej wynosiła 818 AU i obniżała się do 779 i 768 AU odpowiednio w próbkach z 3 i 4 % dodatkiem maltodekstryn. Według Dokic i wsp. [1] lepkość roztworów maltodekstryn zmniejsza się wraz z rosnącą wartością DE, a Witczak i wsp. [27] wykazali, że lepkość kleików z mieszanek chleba bezglutenowego w skład, których wchodzi maltodekstryny zmniejsza się pod wpływem wzrostu ich udziału w mieszance (5 - 15 %) i zwiększeniem DE (3,6 - 21,8). W badaniach własnych nie stwierdzono istotności zróżnicowania wartości średnich maksymalnej lepkości kleików mącznych otrzymanych z próbek zawierających maltodekstryny nisko- i średnioscukrzane. Przypuszczalnie stosowany dodatek maltodekstryn był zbyt mały by znacząco zmienić właściwości układu skrobiowo-amylazowego badanych próbek.

Dodatki technologiczne stosowane w piekarstwie mogą wzmacniać lub osłabiać strukturę glutenową występującą w cieście pszennym. W badaniach własnych do oceny zmian zachodzących pod wpływem dodatku maltodekstryn posłużono się farinografem i ekstensografem Brabendera.

Wyniki zamieszczone na rys. 1. dowodzą, że w miarę zwiększania dodatku maltodekstryn sukcesywnemu zmniejszeniu ulegała wodorochłonność mąki. Przy 2 % dodatku maltodekstryn odnotowano zmniejszenie chłonięcia wody o 0,9 %, a przy 4 % ilość pochłoniętej wody była mniejsza o 2 % w porównaniu z próbką kontrolną.

Pod wpływem zwiększającego się dodatku maltodekstryn wydłużał się czas rozwoju ciasta. W próbkach zawierających 4 % maltodekstryn nisko- i średnioscukrzonych był o 1,8 min dłuższy w stosunku do ciasta kontrolnego (2,5 min) (tab. 3). Próbki zawierające 1 i 2 % niskoscukrzonych maltodekstryn (odpowiednio 3,5 i 4,2 min) odznaczały się dłuższym czasem rozwoju w porównaniu z próbkami, do których dodano maltodekstryny średnioscukrzane (odpowiednio 2,9 i 3,1 min). Przy większych ilościach tych substancji (3 i 4 %) wartości omawianej cechy były podobne.

Stałość ciasta pszennego średnio wynosiła 4,4 min, a po dodaniu maltodekstryn ulegała sukcesywnemu zwiększeniu (tab. 4). Istotną różnicę stwierdzono po zastosowaniu 3 i 4 % maltodekstryn (średnie odpowiednio 6,4 i 7,0 min). Rozmiękczenie ciasta i liczba jakości nie zmieniały się istotnie pod wpływem stosowanych dodatków maltodekstryn. Niemniej jednak zaobserwowano tendencję zmniejszania rozmiękczenia ciasta i zwiększania liczby jakości. Zmiany te należy uznać za korzystne, ponieważ ciasto o rozmiękczeniu mniejszym niż 75 FU jest uważane za odpowiednie do



Rys. 1. Średnie wartości wodochłonności mąki pszennej: a) z różnym dodatkiem maltodekstryn, b) z różnym rodzajem maltodekstryn. Małe litery przy wartościach oznaczają grupy jednorodne wyznaczone testem Duncana ($p = 0,05$).

Fig. 1. Mean values of water absorption of wheat flour: a) with different addition of maltodextrins, b) with different types of maltodextrins. Lowercase letters at values represent homogeneous groups determined using Duncan's test ($p = 0.05$).

wypieku chleba [10]. Porównując oddziaływanie maltodekstryn nisko- i średnioscukrzonych nie stwierdzono różnic pomiędzy wartościami stałości, rozmiękczenia i liczby jakości w ciastach zawierających dwa rodzaje maltodekstryn (tab. 4). Uzyskane

wyniki oceny farinograficznej są potwierdzeniem wcześniejszych badań przeprowadzonych przez Miyazaki i wsp. [11]. Wymienieni autorzy stwierdzili wzrost wodochłonności mąki i wydłużenie czasu stałości ciasta pod wpływem 2,5 oraz 7,5 % dodatku maltodekstryn otrzymanych ze skrobi kukurydzianej i tapiokowej, a także zwiększenie chłonięcia wody i wydłużenie czasu rozwoju ciast przy zastosowaniu maltodekstryn o DE zwiększającym się od 3 do 40.

Tabela 3

Średnie wartości rozwoju ciasta pszennego z dodatkiem maltodekstryn [min].
Mean values of wheat dough development with maltodextrins added [min].

Dodatek maltodekstryn Maltodextrins added [%]	Rodzaj maltodekstryn / Type of maltodextrins	
	Niskoscukrzzone Low-saccharified	Średnioskukrzzone Mean-saccharified
0%	2,5 c ^A	2,5 c ^A
1%	3,5 b ^A	2,9 bc ^B
2%	4,2 a ^A	3,1 b ^B
3%	3,9 ab ^A	3,9 a ^A
4%	4,3 a ^A	4,3 a ^A

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – grupy jednorodne według testu Duncana przy $p = 0,05$ w kolumnach / homogenous groups according to Duncan's test ($p = 0.05$) in columns; A, B – grupy jednorodne według testu Duncana przy $p = 0,05$ w wierszach / homogenous groups according to Duncan's test ($p = 0.05$) in rows.

Tabela 4

Średnie wartości cech farinograficznych mąki pszennej z dodatkiem maltodekstryn.
Mean values of farinographic properties of wheat flour with maltodextrins added.

Czynniki Factors	Staość ciasta Dough stability [min]	Rozmiękczenie Dough softening [FU]	Liczba jakości Quality number [mm]
Dodatek maltodekstryn / Maltodextrins added [%]			
0	4,4 c	90 a	60 a
1	5,2 bc	78 a	70 a
2	5,4 bc	83 a	74 a
3	6,4 ab	79 a	81 a
4	7,0 a	73 a	89 a
Rodzaj maltodekstryn / Type of maltodextrins			
niskoscukrzzone low-saccharified	5,7 a	80 a	75 a
średnioskukrzzone mean-saccharified	5,7 a	81 a	75 a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – grupy jednorodne według testu Duncana ($p = 0,05$) / homogenous groups according to Duncan's test ($p = 0.05$).

Tabela 5

Średnie wartości cech ekstensograficznych ciasta pszennego z dodatkiem maltodekstryn.
Mean values of extensigraphic properties of wheat dough with maltodextrins added.

Czynniki Factors	Maksymalny opór ciasta Maximum resistance of dough [EU]	Rozciągliwość ciasta Extensibility of dough [mm]	Energia ciasta Dough energy [cm ²]	Współczynnik ekstensograficzny Extensigraphic index [EU/mm]
Dodatek maltodekstryn / Maltodextrins added [%]				
0	656 a	153 c	124,6 a	4,4 a
1	504 c	176 ab	117,2 b	2,7 b
2	508 c	174 ab	116,9 b	2,8 b
3	534 b	173 b	120,4 b	2,9 b
4	494 c	180 a	119,9 b	2,7 b
Rodzaj maltodekstryn / Type of maltodextrins				
niskoscukrzone low-saccharified	523 a	174 a	118,5 a	2,9 b
średnioscukrzone mean-saccharified	555 a	168 b	121,1 a	3,3 a
Czas fermentacji / Fermentation time [min]				
45	453 b	188 a	117,2 a	2,3 b
90	563 a	165 b	119,4 a	3,3 a
135	602 a	160 b	122,9 a	3,7 a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – grupy jednorodnie według testu Duncana przy $p = 0,05$ w kolumnach / homogenous groups according to Duncan's test ($p = 0.05$) in columns.

Mailhot i Patron [10] uważają, że z mąki odpowiedniej do wypieku chleba powstaje ciasto, które w ocenie ekstensograficznej charakteryzuje się oporem podczas rozciągania wynoszącym powyżej 500 EU. W badaniach własnych, z mąk pszennych uzyskiwano ciasta o średnim maksymalnym oporze wynoszącym 656 EU (tab. 5), co świadczy o ich dobrej wartości wypiekowej. Pod wpływem maltodekstryn następowało zmniejszenie wartości tej cechy, oscylowała ona w granicach 500 EU. Nie stwierdzono istotnych różnic w oddziaływaniu stosowanych rodzajów maltodekstryn na wartości maksymalnego oporu.

Dodatek maltodekstryn do ciasta pszennego zwiększał jego zdolność do rozciągania. Ciasta pszenne cechowały się rozciągliwością na poziomie 153 mm, a ciasta zawierające 1 - 4 % maltodekstryn uzyskiwały wartości tej cechy w zakresie od 173 do 180 mm (tab. 5). Wykazano również, że bardziej rozciągliwe były ciasta z maltodekstrynami niskoscukrzonymi (174 mm) niż te z maltodekstrynami średnioscukrzonymi (168 mm). Według Mailhota i Pattona [10] rozciągliwość ciasta powinna wyno-

się co najmniej 120 mm, a zadowalająca jest wtedy, gdy mieści się w zakresie 140 - 220 mm. Na tej podstawie można sądzić, że dodatek maltodekstryn wpływał na podwyższenie jakości ciasta.

Energia ciasta była największa w próbce kontrolnej ($124,6 \text{ cm}^2$) (tab. 5). Stosowane dodatki maltodekstryn przyczyniały się do obniżenia wartości tej cechy. W ciastach z różną zawartością maltodekstryn energia wahała się w przedziale od $116,9$ do $120,4 \text{ cm}^2$. Zgodnie z klasyfikacją Prestona i Hoseneya [21] ciasto o energii powyżej 120 cm^2 uzyskuje się z mąki mocnej. Wobec tego użytą w badaniach mąkę pszenną można uznać za mąkę mocną, a wprowadzenie maltodekstryn osłabiało jej właściwości. Uważa się, że ciasta z mąki o optymalnych właściwościach wypiekowych osiągają wartości współczynnika ekstensograficznego w zakresie od 3,5 - 5,0 [5]. Tylko ciasta pszenne bez maltodekstryn uzyskiwały wartości z tego zakresu (średnio 4,4), a stosowane dodatki maltodekstryn obniżały wartości średnie tej cechy do 2,7 - 2,9 (tab. 5). Stwierdzono, że mniej szkodliwie działały maltodekstryny średnioscukrzane niż niskoscukrzane (średnie współczynniki ekstensograficzne wynosiły odpowiednio 3,3 i 2,9).

Ocena właściwości ekstensograficznych ciast z dodatkiem maltodekstryn niski- i średnioscukrzonych w ilości 0 - 4 % po różnych okresach fermentacji wykazała, że lepsze właściwości miały ciasta fermentujące 90 i 135 min, niż te które fermentowały 45 min. Zauważono, że wartości wszystkich cech ekstensograficznych po 90 i 135 min. fermentacji były podobne. W związku z tym można sądzić, że dodatek maltodekstryn do ciasta pszennego może pozwolić na skrócenie czasu cyklu produkcji pieczywa.

Z badań przeprowadzonych przez Lewandowicz i wsp. [8] wynika, że właściwości funkcjonalne majonezów niskotłuszczowych z udziałem różnych maltodekstryn zależą również od zastosowanego w nich białka (żółtko jaja kurzego lub gluten). Można zatem przypuszczać, że maltodekstryny wchodzi w interakcje z białkami. W związku z tym ich oddziaływanie na właściwości ciasta i pieczywa ze zróżnicowanych jakościowo mąk może być niejednakowe. W badaniach własnych stwierdzono zróżnicowanie objętości pieczywa pod wpływem zmienności interakcji pomiędzy typem mąki pszennej a ilością oraz rodzajem zastosowanych maltodekstryn (tab. 6). Okazało się, że pieczywo kontrolne otrzymane z mąki typu 550 miało wyraźnie mniejszą objętość (456 cm^3) niż pieczywo z mąki typu 750 (532 cm^3), a po wprowadzeniu takich samych ilości maltodekstryn do obu mąk stwierdzono, że różnice objętości chleba z nich otrzymanego były nieistotne. Powodem tego był fakt, że dodatek maltodekstryn (1 - 4 %) do receptury chleba z mąki typu 550 przyczyniał się do wzrostu objętości bochenków o 73 - 99 cm^3 , natomiast wprowadzenie maltodekstryn do mąki typu 750 tylko nieznacznie zwiększało objętość (maksymalnie o 29 cm^3 przy 4 % dodatku). Objętość chlebów z maltodekstrynami niski- i średnioscukrzonymi była podobna w przypadku stosowania ich do obydwu typów mąk pszennych. Ponadto chleby z mal-

todekstrynami niskoscukrzonymi wypieczone z mąki typu 750 miały większą objętość (średnio 555 cm³) w porównaniu z tymi z mąki typu 550 (521 cm³), natomiast pieczywo zawierające maltodekstryny średnioscukrzzone z obu typów mąk miało podobną objętość (535 i 542 cm³). Można przypuszczać, że dodatek maltodekstryn średnioscukrzonych do mąki o niskiej aktywności amylolitycznej i małej podatności skrobi na działanie tych enzymów (mąka typu 550) stwarza korzystniejsze warunki do fermentacji ciasta i w rezultacie uzyskania pieczywa o większej objętości. Pozostaje to w zgodzie z wynikami badań przeprowadzonych przez Miyazaki wsp. [11]. Wymienieni autorzy wykazali, że objętość właściwa pieczywa z dodatkiem maltodekstryn (w ilości 2,5 oraz 7,5 %) zwiększa się przy wzroście ich DE.

Tabela 6

Średnie wartości objętości pieczywa pszenne z różnym dodatkiem maltodekstryn [cm³].
Mean values of loaf volume of wheat bread with different addition of maltodextrins [cm³].

Dodatek maltodekstryn Maltodextrins added [%]	Typ mąki Type of flour	
	550	750
0	456 b ^B	532 a ^A
1	529 a ^A	542 a ^A
2	546 a ^A	549 a ^A
3	555 a ^A	559 a ^A
4	553 a ^A	561 a ^A
Rodzaj maltodekstryn Type of maltodextrins		
niskoscukrzzone low-saccharified	521 a ^B	555 a ^A
średnioscukrzzone mean-saccharified	535 a ^A	542 a ^A

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – grupy jednorodne według testu Duncana przy p = 0,05 w kolumnach / homogenous groups according to Duncan's test (p = 0.05) in columns; A, B – grupy jednorodne według testu Duncana przy p = 0,05 w wierszach / homogenous groups according to Duncan's test (p = 0.05) in rows.

Oceniając wydajność pieczywa nie wykazano istotnych zmian tej cechy pod wpływem zróżnicowanego dodatku oraz rodzaju maltodekstryn (tab. 7). Przeciętna wydajność pieczywa pszenne zawierającego 0 - 4 % maltodekstryn mieściła się w zakresie od 42,0 do 43,5 %. Średnie wartości tej cechy chleba z maltodekstrynami nisko- i średnioscukrzonymi były również podobne (43,0 i 42,6 %).

Tabela 7

Średnie wartości cech wypieku laboratoryjnego pieczywa pszennego z dodatkiem maltodekstryn.
Mean values of baking properties of wheat bread with maltodextrins added.

Czynniki Factors	Wydajność pieczywa Yield of bread [%]	Współczynnik porowatości Porosity index
Dodatek maltodekstryn / Maltodextrins added [%]		
0	142,6 a	77 a
1	142,0 a	71 a
2	143,5 a	66 a
3	143,1 a	63 a
4	142,8 a	65 a
Rodzaj maltodekstryn / Type of maltodextrins		
niskoscukrzone low-saccharified	143,0 a	70 a
średnioskukrzone mean-saccharified	142,6 a	67 a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – grupy jednorodne według testu Duncana przy $p = 0,05$ / homogenous groups according to Duncan's test ($p = 0.05$).

Sudha i wsp. [24] stwierdzili, że częściowa zamiana tłuszczu maltodekstryną wpływa na poprawę tekstury herbatników. Gambuś i wsp. [4] wykazali natomiast, że wprowadzenie niskoscukrzonej maltodekstryny owsianej (o DE = 5) w ilości 5 % do receptury herbatników, jako zamiennika margaryny, powoduje zwiększenie twardości herbatników. Miyazaki i wsp. [11], oceniając zmiany jakości pieczywa podczas substytucji mąki pszennej różnymi maltodekstrynami, zauważyli, że twardość miększu chleba pszennego wzrasta wraz ze zwiększeniem ilości maltodekstryn w recepturze, a wartości tej cechy chlebów z dekstrynami o DE = 3 są większe niż po użyciu dekstryn o DE = 40. W badaniach własnych miększ pieczywa zawierającego maltodekstryny w ocenie sensorycznej określano jako bardziej miękki w porównaniu z miększem chleba kontrolnego. Porowatość miększu chleba pszennego była równomierna, a średni współczynnik porowatości wynosił 77 % (tab. 7). Dodatek maltodekstryn tylko w niewielkim stopniu obniżał wartości tej cechy. Wahały się one w zakresie od 63 do 71 %. Różnice te były statystycznie nieistotne. Nie stwierdzono istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi współczynników porowatości miększu chlebów zawierających maltodekstryny nisko- i średnioskukrzone (średnie odpowiednio 70 i 67 %). Wszystkie wypieczone chleby cechowały się typowym dla pieczywa pszennego smakiem i zapachem.

Wnioski

1. Maltodekstryny oddziaływały na właściwości układu skrobiowo-amylazowego powodując niewielkie zmniejszenie maksymalnej lepkości kleików mącznych.
2. Stwierdzono, że dodatek maltodekstryn zmniejszał wodochłonność mąki oraz wydłużał czas rozwoju i stałości ciasta, co świadczyło o wzmocnieniu jego wytrzymałości na obróbkę mechaniczną.
3. W ocenie ekstensograficznej stwierdzono, że maltodekstryny uplastyczniały ciasto. Było ono bardziej podatne na rozciąganie i miało mniejszą energię niż ciasto kontrolne.
4. Właściwości ciasta w niewielkim stopniu zależały od rodzaju użytych maltodekstryn. Mąka z maltodekstrynami średniosukrzonymi charakteryzowała się większą wodochłonnością, a ciasta z niej otrzymane miały mniejszą rozciągliwość i większy współczynnik ekstensograficzny w porównaniu z próbkami zawierającymi maltodekstryny niskosukrzone.
5. Maltodekstryny, a szczególnie średniosukrzone, korzystnie oddziaływały na objętość chleba uzyskanego z mąki typu 550 cechującej się małą aktywnością amylolityczną.

Badania i publikacja finansowana ze środków przyznanych na działalność statutową Katedry Owoców, Warzyw i Zbóż, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Literatura

- [1] Dokic L., Jakovljevic J., Dokic P.: Relation between viscous characteristics and equivalent of maltodextrins. *Starch/Stärke*, 2004, **56**, 520-525.
- [2] Dokic-Baucal L., Dokic P., Jakovljevic J.: Influence of different maltodextrins on properties of O/W emulsions. *Food Hydroc.*, 2004, **18**, 233-239.
- [3] Fortuna T., Sobolewska-Zielińska J., Juszcak L.: Wybrane właściwości reologiczne roztworów maltodekstryn ziemniaczanych. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.*, 2002, **489**, 413-422.
- [4] Gambuś H., Gibiński M., Gambuś F.: Możliwość zastąpienia tłuszczu w herbatnikach maltodekstryną owsianą. *Biul. IHAR*, 2006, **239**, 319-328.
- [5] Jakubczyk T., Haber T. (Red.): *Analiza zbóż i przetworów zbożowych*. Wyd. SGGW-AR, Warszawa 1983.
- [6] Karolini-Skaradzińska Z., Czubaszek A., Łuczak D., Frączak A.: Jakość ciasta i pieczywa pszennego z dodatkiem serwatki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **6 (73)**, 46-57.
- [7] Krzyżaniak W., Olesienkiewicz A., Białas W., Słonimska L., Jankowski T., Grajek W.: Charakterystyka chemiczna maltodekstryn o małym równoważniku glukozowym otrzymanym przez hydrolizę skrobi ziemniaczanej za pomocą alfa-amylaz. *Technologia Alimentaria*. 2003, **2 (2)**, 5-15.
- [8] Lewandowicz G., Prochaska K., Grajek W., Krzyżaniak W., Majchrzak A., Ciapa T.: Właściwości użytkowe maltodekstryn w układach emulsyjnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **1 (42)**, 35- 47.

- [9] Liong M.T., Shah N.P.: Effects of a *Lactobacillus casei* symbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**, 1390-1399.
- [10] Mailhot W.C., Patton J.C.: Criteria of flour quality. In Y. Pomeranz (Ed.). *Wheat: Chemistry and technology* (vol. II). Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN 1988, 69-90.
- [11] Miyazaki M., Maeda T., Morita N.: Effect of various dextrin substitutions for wheat flour on dough properties and bread qualities. *Food Res. Int.*, 2004, **37**, 59-65.
- [12] Obuchowski W., Chalcarz A.: Wpływ surowca na zawartość substancji rozpuszczalnych oraz kierunek i wielkość przemian sacharydów w procesie ekstruzji. *Przegl. Zboż. Młyn.*, 2006, **4**, 16-19.
- [13] PN-77/A-74041. Oznaczenie ilości i jakości glutenu.
- [14] PN-ISO 7973: 2001. Ziarno zbóż i przetwory zbożowe. Oznaczanie lepkości mąki. Metoda z zastosowaniem amylografu.
- [15] PN-ISO 5530-1: 1999. Fizyczne właściwości ciasta. Oznaczanie wodochłonności i właściwości reologicznych za pomocą farinografu.
- [16] PN-ISO 5530-2:2004. Mąka pszenna. Fizyczne właściwości ciasta. Część 2.: Oznaczanie właściwości reologicznych za pomocą ekstensografu.
- [17] PN-A-74022:2003. Przetwory zbożowe. Mąka pszenna.
- [18] PN-EN ISO 20483:2007. Ziarno zbóż i nasiona roślin strączkowych. Oznaczanie zawartości azotu i przeliczanie na zawartość białka. Metoda Kjeldahla.
- [19] PN-EN ISO 3093:2010. Pszenica, żyto i mąki z nich uzyskane, pszenica durum i semolina. Oznaczanie liczby opadania metodą Hagberga-Pertena.
- [20] PN-EN ISO 5529:2010. Pszenica. Oznaczanie wskaźnika sedymentacyjnego. Test Zeleny'ego.
- [21] Preston K.R., Hosney R.C.: Applications of the extensigraph. In: *Extensigraph Handbook* (eds. V.F. Rasper, K.R. Preston). Am. Assoc. Cereal Chem. St Paul, MN 1991, 13.
- [22] Słowik E.: Ocena jakości mąki – przegląd najczęściej stosowanych metod badania mąki (część 1). *Przegl. Piek. Cuk.*, 2006, **11**, 14-18.
- [23] Słowik E.: Ocena jakości mąki – przegląd najczęściej stosowanych metod badania mąki (część 2). *Przegl. Piek. Cuk.*, 2007, **1**, 8-9.
- [24] Sudha M. L., Srivastava A.K., Vetrmani R., Leelavathi K.: Fat replacement in soft dough biscuits: Its implications on dough rheology and biscuit quality. *J. Food Eng.*, 2007, **80** (3), 922-930.
- [25] Tur W., Szczepanik E., Krzyżaniak W., Białas W., Grajek W.: Charakterystyka maltodekstryn otrzymanych ze skrobi ziemniaczanej przy użyciu preparatów enzymatycznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4** (41), 79-94.
- [26] Wang Y-J., Wang L.: Structure and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. *Stärke/Starch*, 2000, **52**, 296-304.
- [27] Witczak M., Korus J., Ziobro R., Juszczak L.: The effects of maltodextrins on gluten-free dough and quality of bread. *J. Food Eng.*, 2010, **96**, 258-265.
- [28] Zięba T.: Resistant starch in food products. *Food*, 2009, **3** (Special Issue 1), 67-71.

CHANGES IN BAKING PROPERTIES OF WHEAT FLOUR IMPACTED BY MALTODEXTRINS ADDED

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the changes occurring in the properties of flour paste, dough, and wheat bread owing to the impact of maltodextrins added.

The research material comprised commercial wheat flours (type 550 and 750), low-saccharified (DE = 9.4) and mean-saccharified (DE = 16.8) maltodextrins. The quantity of maltodextrins added was 1, 2, 3

and 4 % of the weighed portion of flour. The quality of the wheat flour was assessed on the basis of total protein content, wet gluten yield and its deliquescence, and sedimentation index. It was also determined the falling number of wheat flour with and without maltodextrins added. Furthermore, the samples were assessed using a farinographic, amylographic, and extensigraphic analysis; a one-phase bread-making laboratory process was performed.

The wheat flour types used represented a high baking quality. It was found that owing to the maltodextrins added, the maximum viscosity level of flour pastes tended to decrease. Moreover, they caused the water absorption level of flour to decrease, the time of dough development to extend, and the dough stability to improve; this was a proof that the resistance of dough to mechanical processing increased. The addition of maltodextrins also caused the dough to become more flexible since its extensibility increased and its maximum resistance to stretching decreased. The addition of 1-4 % of maltodextrins to wheat flour, especially of mean-saccharified maltodextrins to wheat flour, its type 550 and its amylolytic activity low, caused the bread volume to increase. The maltodextrins added did not change the yield of bread. However, it was reported that the crumb porosity tended to decrease.

Key words: maltodextrins, wheat flour, flour pastes, dough, bread 

JOANNA BARŁOWSKA, WITOLD CHABUZ, JOLANTA KRÓL,
MAGDALENA SZWAJKOWSKA, ZYGMUNT LITWIŃCZUK

WARTOŚĆ ODŻYWCZA I PRZYDATNOŚĆ TECHNOLOGICZNA MLEKA PRODUKOWANEGO W SYSTEMIE INTENSYWNYM I TRADYCYJNYM W TRZECZ REJONACH WSCHODNIEJ POLSKI

Streszczenie

Badaniami objęto 68 gospodarstw zlokalizowanych w 3 rejonach wschodniej Polski, tzn. na nizinach (tereny nadbużańskie i biebrzańsko-narwiańskie), w Beskidzie Niskim i Bieszczadach, wyróżniając gospodarstwa produkujące mleko w systemie intensywnym i tradycyjnym. W 1589 próbach mleka oznaczono: zawartość tłuszczu, białka, kazeiny, laktozy i suchej masy, kwasowość (pH), stabilność cieplną, czas krzepnięcia mleka pod wpływem podpuszczki, zawartość α -laktoalbuminy, β -laktoglobuliny, albuminy serum, laktoferyny i lizozymu. W wybranych 298 próbkach oznaczono także profil kwasów tłuszczowych. Wykazano istotny ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) wpływ systemu produkcji mleka (intensywny vs tradycyjny) na podstawowy skład chemiczny, zawartość białek serwatkowych, profil kwasów tłuszczowych, kwasowość, czas krzepnięcia i stabilność cieplną. Mniej wyraźny, chociaż w wielu przypadkach także statystycznie istotny był wpływ rejonu produkcji mleka. Najwięcej składników podstawowych i niektórych frakcji białek serwatkowych zawierało mleko pozyskiwane w rejonie Beskidu Niskiego. Może to wynikać z dominującej w tym rejonie rasą krów (polska czerwona) i większą różnorodnością składu botanicznego zielonki łąkowej i pastwiskowej. Stwierdzono istotne ($p \leq 0,001$) interakcje tych dwóch analizowanych czynników, tzn. systemu i rejonu produkcji prawie w przypadku wszystkich ocenianych podstawowych składników mleka i frakcji białek serwatkowych.

Słowa kluczowe: mleko, wartość odżywcza, przydatność technologiczna, lokalne rasy bydła, system produkcji

Wprowadzenie

Zróżnicowane warunki przyrodnicze w Polsce mają decydujący wpływ na stopień intensyfikacji produkcji rolniczej. Tereny Polski południowej i wschodniej zaliczane są do uboższych regionów, gdzie jest małe uprzemysłowienie, a gospodarstwa rolne cha-

Dr hab. inż. J. Barłowska, prof. nadzw. dr hab. inż. J. Król, mgr inż. M. Sz wajkowska, Katedra Towaroznawstwa i Przetwórstwa Surowców Zwierzęcych, dr inż. W. Chabuz, prof. dr hab. inż. Z. Litwińczuk, Katedra Hodowli i Ochrony Zasobów Genetycznych Bydła, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

rakteryzują się dużym rozdrobnieniem i dużym udziałem użytków zielonych (TUZ). Ukształtowanie tamtejszych rejonów (tereny górzyste na południu Polski i podmokłe obszary wzdłuż rzek Bugu i Narwi) nie sprzyja intensyfikacji produkcji rolniczej. Dlatego też w takich rejonach dominują lokalne rasy bydła (polska czerwona, białogrzbieta) i simentaliska, które przez dziesiątki lat użytkowania dostosowały się do istniejących warunków środowiskowych, przez co są bardziej odporne na choroby i lepiej wykorzystują dostępne pasze [18].

Trwałe użytki zielone są źródłem tanich, naturalnych i wartościowych pasz, tzn. zielonka latem, a siano i sianokiszonka zimą, a ich udział w dawce pokarmowej stanowi czasem nawet 100 %. Pasze te są bogate w karoten, witaminy, mikroelementy i inne substancje katalizujące przetworzenie pasz objętościowych na mleko. Są one niezastąpione, zwłaszcza w nisko nakładowych systemach produkcji (np. ekologicznym lub ekstensywnym chowie zwierząt), w których mogą być jedynym i wystarczającym źródłem tanich pasz dla bydła. Województwa wschodniej i południowej Polski, a szczególnie podlaskie, lubelskie, małopolskie i podkarpackie należą do najbardziej zasobnych rejonów w TUZ, których udział wynosi ok. 30 % w użytkach rolnych [13].

Wyniki badań [2, 5, 11, 16, 21] wskazują, że mleko pozyskiwane od krów korzystających z pastwiska charakteryzuje się lepszymi parametrami do produkcji serów oraz jest bogatsze w składniki korzystnie oddziałujące na zdrowie człowieka (białka serwatkowe, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, w tym CLA i witaminy rozpuszczalne w tłuszczach).

Celem pracy było określenie wpływu rejonu i systemu produkcji na wartość odżywczą i przydatność technologiczną mleka produkowanego w gospodarstwach wschodniej Polski.

Materiał i metody badań

Badaniami objęto 68 gospodarstw zlokalizowanych w 3 rejonach wschodniej Polski, tzn. na nizinach (tereny nadbużańskie i biebrzańsko-narwiańskie), w Beskidzie Niskim i w Bieszczadach. W każdym rejonie badaniami objęto po 6 gospodarstw produkujących mleko w systemie intensywnym. Utrzymywano tam krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej (niziny) oraz czarno- i czerwono-białej (Beskid Niski) lub simentaliskiej (Bieszczady) w oborach wolno stanowiskowych i żywiono w systemie TMR (*Total Mixed Ration*) – kiszonka z kukurydzy, sianokiszonka oraz przemysłowe pasze treściwe. W pozostałych gospodarstwach, tzn. w: 24 w rejonie nizinnym, w 14 w Beskidzie Niskim i 12 w Bieszczadach utrzymywano lokalne rasy bydła (białogrzbieta, polska czerwona, simentaliska) i stosowano tradycyjny system żywienia. W okresie letnim krowy korzystały głównie z pastwiska, a zimą żywiono je sianem lub sianokiszonką, ewentualnie burakami pastewnymi lub ziemniakami i paszami treściwymi z własnego gospodarstwa. We wszystkich gospodarstwach

stosujących wypas pastwiskowy wykonano ocenę składu runi pastwiskowej metodą botaniczno-wagową. Wszystkie gospodarstwa były objęte oceną wartości użytkowej krów mlecznych.

Próby mleka pobierano indywidualnie od każdej krowy 2 razy w roku, tzn. w sezonie letnim i zimowym. Przebadano łącznie 1589 próbek.

Oznaczano:

- podstawowy skład chemiczny, tj. zawartość tłuszczu, białka, laktozy i suchej masy – Infrared Milk Analyzer (Bentley Instruments);
- zawartość kazeiny – metodą Walkera, wg PN 68/A-86122 [20];
- kwasowość czynną (pH) – pehametrem Pioneer 65 firmy Radiometer Analytical;
- stabilność cieplną w temp. 140 °C w łaźni olejowej firmy TEWES-BIS metodą White'a i Daviesa [19];
- czas krzepnięcia mleka pod wpływem podpuszczki metodą Scherna (moment powstawania pierwszych płatków kazeiny) [19];
- zawartość wybranych białek serwatkowych, tj. α -laktoalbuminy (α -LA) i β -laktoglobuliny (β -LG), albuminy serum (BSA), laktoferyny i lizozymu na podstawie metody opracowanej przez Romero i wsp. [23] z pewnymi modyfikacjami. Rozdzielenia białek dokonywano za pomocą chromatografu cieczowego ProStar 210 i detektora UV-VIS ProStar 325 (Varian). We wszystkich przypadkach pomiary odbywały się z wykorzystaniem fazy ruchomej woda-acetonitryl w gradiencie przepływowym i kolumny NUCLEOSIL 300-5 C18 (Varian) o długości 250 mm i średnicy 4,6 mm. Czas analizy pojedynczej próbki wynosił 35 min przy długości fali 205 nm, zaś temp. kolumny 37 °C. W identycznych warunkach przeprowadzano analizy substancji wzorcowych. Na podstawie uzyskanych chromatogramów, przy zastosowaniu programu Star 6.2 Chromatography Workstation (Varian), dokonywano identyfikacji jakościowej poszczególnych substancji, a następnie określano ich stężenie.

Dodatkowo w 298 próbkach mleka oznaczano profil kwasów tłuszczowych aparatem Varian CG 3900 z dekodern promieniowo-jonizującym (FID) i kolumną kapilarną CP Sil 88, wykorzystując program Star GS Workstation ver. 5.5. W badaniach tych uwzględniono następujące kwasy tłuszczowe:

- nasycone (SFA) w tym krótko- i średniołańcuchowe (SFAsmc), do których zaliczono kwasy od C4:0 do C14:0 oraz długołańcuchowe (SFAlc), w skład których wchodziły kwasy od C15:0 do C18:0;
- nienasycone UFA w tym jednonienasycone (MUFA – C10:1, C14:1, C15:1, C16:1, C17:1 i C18:1) oraz wielonienasycone (PUFA – C18:2, C18:3 i CLA).

Ponadto wyliczano proporcje pomiędzy tymi kwasami, tzn. SFA/UFA, MUFA/SFA, PUFA/SFA oraz CLA/PUFA.

Wszystkie analizy wykonywano tylko w próbach mleka, w których liczba komórek somatycznych nie przekraczała 400 tys./ml – Somacount 150 (Bentley Instruments).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując program StatSoft Inc. STATISTICA ver. 6. Zastosowano jedno- i dwuczynnikową analizę wariancji z interakcją, podając średnie wartości poszczególnych cech oraz odchylenie standardowe. Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami ocenianych grup wyznaczono testem HSD Tukey'a.

Wyniki i dyskusja

Od krów utrzymywanych w gospodarstwach stosujących intensywny system produkcji pozyskano istotnie ($p \leq 0,01$) więcej mleka (o 9,45 kg/dobę) w porównaniu z zwierzętami z gospodarstw z tradycyjnym systemem żywienia (tab. 1). Mleko krów żywionych w systemie intensywnym miało istotnie ($p \leq 0,01$) korzystniejszy skład podstawowy. Zawierało bowiem więcej tłuszczu (o 0,34 %), białka (o 0,35 %), w tym kazeiny (o 0,19 %) i suchej masy (o 0,54 %). Wyższą wydajność i korzystniejszy skład mleka krów żywionych w systemie TMR potwierdzają inni autorzy [1, 2, 26]. White i wsp. [26] stwierdzili podwyższenie dziennej produkcji mleka o 9,2 kg oraz wzrost zawartości tłuszczu o 0,10 % i laktozy o 0,20 % w mleku krów rasy holsztyńskiej żywionych paszą TMR, w porównaniu z mlekiem krów korzystających z pastwiska. W przypadku krów rasy jersey różnice zawartości tłuszczu w mleku wynosiły 0,42 %, białka – 0,19 %, a laktozy – 0,07 %. Barłowska [2] wykazała, że krowy rasy simentalskiej żywione w systemie TMR produkowały więcej mleka o 7,0 kg/dobę, o większej zawartości suchej masy (o 0,09 %), białka (o 0,15 %) i laktozy (o 0,08 %).

Mleko pozyskiwane od krów żywionych systemem tradycyjnym charakteryzowało się istotnie ($p \leq 0,01$) krótszym czasem krzepnięcia pod wpływem podpuszczki (o 0,53 s), co jest pożądane przy produkcji serów podpuszczkowych (tab. 1). Również Barłowska [2] oraz Tyriesevä i wsp. [25] potwierdzają, że żywienie krów zielonką pastwiskową skraca czas koagulacji enzymatycznej mleka. Devold i wsp. [8] twierdzą, że sposób żywienia ma wpływ na zawartość frakcji białkowych (kazeiny, białek serwatkowych) i składników mineralnych (wapnia, magnezu i cytrynianów), których ilość i proporcje mają istotny wpływ na proces krzepnięcia mleka. Uzyskany w badaniach własnych krótszy czas krzepnięcia mleka może być również związany z faktem, że w gospodarstwach stosujących tradycyjny system żywienia utrzymywano krowy ras lokalnych, a liczne badania [2, 5, 7, 12] potwierdzają, że mleko od takich zwierząt charakteryzuje się korzystniejszymi parametrami do przetwórstwa, szczególnie do produkcji serów. Chiofalo i wsp. [5], porównując parametry określające przydatność mleka dwóch ras krów do produkcji serów, tzn. modicana (lokalna) i holsztyńskiej (wysoko produkcyjna), wykazali, że mleko tej pierwszej charakteryzuje

się korzystniejszymi wynikami, tzn. ma krótszy o 5 min czas koagulacji (r) i o 4,2 min czas formowania się skrzepu (K_{10}) oraz o 17,8 mm wyższą jędrność skrzepu (A_{30}). De Marchi i wsp. [7], prowadząc podobne badania mleka 5 ras krów utrzymywanych we Włoszech tzn. holsztyńsko-fryzyjskiej, brown swiss, simentaliskiej, rendena i alpine gray, wykazali, że najlepsze parametry w tym zakresie osiągało mleko lokalnej rasy rendena ($r = 13,5$ min, $k_{10} = 5,9$ min i $a_{30} = 27$ mm), a najmniej korzystne mleko krów holsztyńsko-fryzyjskich ($r = 18,0$ min, $k_{10} = 8,2$ min i $a_{30} = 17,5$ mm). W przypadku pozostałych 3 ras wyniki te były na poziomie pośrednim. Również Barłowska [2], oceniając mleko 7 ras krów użytkowanych w Polsce, stwierdziła, że mleko ras lokalnych (polskiej czerwonej, białogrzbieter i simentaliskiej) jest bardziej predysponowane do produkcji serów.

Znajdujące się w mleku białka serwatkowe i powstające z nich peptydy charakteryzują się wieloma niespecyficznymi właściwościami, m.in. przeciwzapalnymi, bakteriostatycznymi, antyoksydacyjnymi, opioidowymi, przeciwnadciśnieniowymi i antynowotworowymi [14]. Wykazano, że mleko pozyskiwane od krów żywionych systemem tradycyjnym zawierało istotnie ($p \leq 0,01$) więcej funkcjonalnych białek serwatkowych, tzn. α -laktoalbuminy (1,03 vs 1,01 g/l), β -laktoglobuliny (3,30 vs 2,99 g/l), laktoferyny (139,15 vs 104,72 mg/l) i lizozymu (10,11 vs 8,01 μ g/l) w porównaniu z mlekiem z gospodarstw z systemem intensywnym (tab. 2).

Zależności te korespondują z wynikami uzyskanymi przez Król i wsp. [16], którzy stwierdzili, że mleko krów rasy simentaliskiej korzystających z pastwiska wyróżniało się większą zawartością białek serwatkowych, szczególnie β -laktoglobuliny (o 0,34 g/l), α -laktoalbuminy (o 0,14 g/l) i laktoferyny (o 27,9 mg/l). W innych badaniach Król i wsp. [15], w których oceniano mleko pozyskiwane od krów 5 ras wykazano, że w przypadku ras lokalnych (białogrzbieter, polskiej czerwonej, polskiej czarno-białej i polskiej czerwono-białej) była istotnie ($p \leq 0,01$) większa zawartość biologicznie czynnych białek serwatkowych w porównaniu z mlekiem krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Wykazali również, że w mleku krów ras lokalnych żywionych tradycyjnie poziom tych białek był wyższy w sezonie letnim, kiedy zwierzęta korzystały z pastwiska. Również Reklewska i wsp. [22] potwierdzają większą zawartość białek serwatkowych w mleku krów rasy czarno-białej korzystających z pastwiska w porównaniu z mlekiem zwierząt żywionych przez cały rok zbilansowaną dietą pełnoporcjową.

T a b e l a 1

Wydajność i parametry fizykochemiczne mleka krów w zależności od systemu żywienia i regionu produkcji.
Milk yield and physicochemical parameters of cows' milk depending on feeding system and production region.

Wyszczególnienie Specification	n	System intensywny / Intensive System					System tradycyjny / Traditional System					Interakcja system × region Interaction between system and production region
		Niziny Lowland	Beskid Niski M.	Bieszczady M.	Przeciętnie Averagely		Niziny Lowland	Beskid Niski M.	Bieszczady M.	Przeciętnie Averagely		
Wydajność dobową [kg] Daily yield	291	28,63 ^C	26,84 ^B	23,01 ^A	26,43 ^{**}		329	206	386	921		xx
	SD	7,60	6,78	7,06	7,61		6,73	5,15	7,02	6,89		
Tłuszcz / Fat [%]	291	4,36 ^A	4,62 ^B	4,27 ^A	4,40 ^{**}		4,02 ^X	4,36 ^Y	3,93 ^X	4,06 ^{**}		xx
	SD	0,57	0,52	0,42	0,53		0,58	0,70	0,46	0,59		
Białko / Protein [%]	291	3,43 ^A	3,73 ^B	3,76 ^B	3,61 ^{**}		3,38 ^X	3,56 ^Y	3,37 ^X	3,41 ^{**}		xx
	SD	0,41	0,40	0,40	0,43		0,38	0,49	0,33	0,40		
Kazeina / Casein [%]	291	2,63 ^A	2,71 ^A	2,83 ^B	2,71 ^{**}		2,46 ^X	2,66 ^Y	2,49 ^X	2,52 ^{**}		xx
	SD	0,40	0,33	0,40	0,39		0,40	0,40	0,32	0,38		
Proporcja białko/tłuszcz Protein to fat ratio	291	0,79 ^A	0,81 ^A	0,88 ^B	0,83 ^{**}		0,85	0,83 ^X	0,86 ^Y	0,85 ^{**}		xx
	SD	0,09	0,09	0,09	0,10		0,11	0,16	0,09	0,11		
Laktoza / Lactose [%]	291	4,81 ^B	4,64 ^A	4,69 ^A	4,73		4,70	4,68 ^X	4,76 ^Y	4,72		x
	SD	0,23	0,32	0,26	0,28		0,28	0,34	0,38	0,34		
Sucha masa / Dry matter [%]	291	13,26 ^A	13,67 ^B	13,39 ^A	13,40 ^{**}		12,77 ^Y	13,28 ^X	12,72 ^Y	12,86 ^{**}		xx
	SD	0,89	0,90	0,78	0,87		0,85	0,99	0,72	0,86		
Mocznik / Urea [mg/l]	291	179,53	191,43	212,69	186,66 [*]		173,39	180,29	189,20	181,56 [*]		xx
	SD	59,28	81,58	244,52	74,82		80,95	73,83	94,73	85,76		

c.d. Tab. 1

Kwasowość / Acidity (pH)	$\bar{x}$	6,74 ^C	6,67 ^A	6,70 ^B	6,71 ^{**}	6,73 ^Y	6,70 ^X	6,74 ^Y	6,73 ^{**}	xx
	SD	0,07	0,10	0,08	0,08	0,10	0,12	0,06	0,09	
Czas krzepnięcia [min] Coagulation time	$\bar{x}$	5:39 ^B	4:23 ^A	4:49	5:03 ^{**}	3:56 ^Y	3:09 ^X	3:34	3:35 ^{**}	ns
	SD	2:10	2:19	2:25	2:18	1:57	1:22	1:33	1:40	
Stabilność cieplna [min] Heat Stability	$\bar{x}$	3:48 ^B	2:01 ^A	2:11 ^A	2:53	3:03 ^X	2:33 ^Y	2:59 ^X	2:55	xx
	SD	1:51	0:40	0:44	1:35	1:18	0:47	1:08	1:09	

Objaśnienia: / Explanatory notes:

A, B, C - różnice pomiędzy rejonami w obrębie systemu intensywnego istotne przy $p \leq 0,01$; X, Y, Z - różnice pomiędzy rejonami w obrębie systemu tradycyjnego istotne przy $p \leq 0,01$; ** - różnice pomiędzy systemami produkcji istotne przy $p \leq 0,01$; * - istotne przy $p \leq 0,05$; xx - interakcja istotna przy $p \leq 0,001$,

^x - istotny przy $p \leq 0,01$; ns - nieistotna statystycznie.

A, B, C - differences between regions within the intensive production system significant at $p \leq 0,01$; X, Y, Z - differences between regions within the traditional production system significant at $p \leq 0,01$; ** - differences between production systems significant at $p \leq 0,01$; * - significant at $p \leq 0,05$; xx - interaction significant at $p \leq 0,001$, ^x - significant at $p \leq 0,01$; ns - statistically insignificant.

T a b e l a 2

Zawartość wybranych białek serwatkowych w mleku krów w zależności od systemu i regionu produkcji.
Content of selected whey proteins in cows' milk depending on system and production region.

Wyszczególnienie Specification	n	System intensywny / Intensive System				System tradycyjny / Traditional System				Interakcja system × region Interaction between system x production region
		Niziny Lowland	Beskid Niski M.	Bieszczady M.	Przeciętnie Averagely	Niziny Lowland	Beskid Niski M.	Bieszczady M.	Przeciętnie Averagely	
α-LA [g/l]	̄	0,95 ^A	1,01 ^B	1,10 ^C	1,01 ^{**}	1,00 ^X	1,11 ^Y	1,01 ^X	1,03 ^{**}	xx
	SD	0,12	0,11	0,17	0,15	0,12	0,17	0,17	0,16	
β-LG [g/l]	̄	2,90 ^A	2,95 ^A	3,14 ^B	2,99 ^{**}	3,18 ^X	3,48 ^Y	3,20 ^X	3,30 ^{**}	xx
	SD	0,29	0,33	0,30	0,32	0,54	0,36	0,45	0,49	
BSA [g/l]	̄	0,42 ^A	0,46 ^B	0,44	0,44 [*]	0,41 ^X	0,48 ^Y	0,41 ^X	0,43 [*]	ns
	SD	0,14	0,14	0,16	0,15	0,16	0,13	0,14	0,15	
Laktoferyna [mg/l] Lactoferrin	̄	91,85 ^A	91,74 ^A	133,26 ^B	104,72 ^{**}	153,35 ^Z	114,34 ^X	140,39 ^Y	139,15 ^{**}	xx
	SD	17,38	21,33	64,27	43,55	54,42	31,08	54,81	52,32	
Lizozym [μg/l] Lysozyme	̄	6,91 ^A	7,50 ^A	9,97 ^B	8,01 [*]	9,33 ^X	10,98 ^Y	10,08	10,01 [*]	xx
	SD	3,64	3,11	3,98	3,86	5,02	4,62	6,41	5,29	

Objaśnienia: / Explanatory notes:

A, B, C - różnice pomiędzy regionami w obrębie systemu intensywnego istotne przy $p \leq 0,01$; X, Y, Z - różnice pomiędzy regionami w obrębie systemu tradycyjnego istotne przy $p \leq 0,01$; ** - różnice pomiędzy systemami produkcji istotne przy $p \leq 0,01$; * - istotne przy $p \leq 0,05$; xx - interakcja istotna przy $p \leq 0,001$; ns - nieistotna statystycznie.

A, B, C - differences between regions within the intensive production system significant at $p \leq 0,01$; X, Y, Z - differences between regions within the traditional production system significant at $p \leq 0,01$; ** - differences between production systems significant at $p \leq 0,01$; * - significant at $p \leq 0,05$; xx - interaction significant at $p \leq 0,001$; ns - statistically insignificant.

T a b e l a 3

Profil kwasów tłuszczowych w mleku krów w zależności od systemu i regionu produkcji [%].
Fatty acid profile in cows' milk depending on system and production region [%].

Wyszczególnienie Specification	n	System intensywny / Intensive System				System tradycyjny				Interakcja system × region Interaction between system and production region
		Niziny Lowland	Beskid Niski M.	Bieszczady M.	Przeciętnie Averagely	Niziny Lowland	Beskid Niski M.	Bieszczady M.	Przeciętnie Averagely	
		57	19	27	103	101	41	53	195	
CLA	$\bar{x}$	0,32 ^A	0,46	0,64 ^B	0,43 ^{**}	0,96	1,22	1,15	1,15 ^{**}	ns
	SD	0,42	0,45	0,49	0,46	1,35	1,57	1,53	1,51	
SFA	$\bar{x}$	66,11	67,93	66,68	66,59 [*]	65,72	62,58	62,87	63,32 [*]	ns
	SD	6,55	4,55	6,41	6,17	8,98	8,38	6,70	8,15	
SFAsmc	$\bar{x}$	16,40	14,59	15,24	15,76	13,86	15,37	15,52	15,09	ns
	SD	4,88	3,39	2,91	4,22	3,18	4,61	5,04	4,50	
SFAlc	$\bar{x}$	49,71	53,34	51,44	50,83 [*]	51,86 ^y	47,21 ^x	47,35 ^x	48,23 [*]	ns
	SD	5,43	3,35	6,68	5,61	6,92	7,60	8,34	7,86	
UFA	$\bar{x}$	33,89	31,98	33,38	33,40 ^{**}	34,94	37,57	36,74	36,79 ^{**}	ns
	SD	6,73	4,63	6,35	6,28	8,46	8,33	6,12	7,85	
MUFA	$\bar{x}$	30,86	29,04	29,49	30,17 [*]	31,01	32,73	31,70	32,09 [*]	ns
	SD	5,92	4,29	5,18	5,47	6,35	6,73	5,18	6,27	
PUFA	$\bar{x}$	3,02	2,94 ^A	3,89 ^B	3,23 ^{**}	3,93	4,84	5,04	4,71 ^{**}	ns
	SD	1,29	1,09	1,66	1,41	3,14	3,21	4,05	3,45	

c.d. Tab. 3

SFA/UFA	$\bar{x}$	2,06	2,19	2,11	2,10*	2,04	1,81	1,79	1,85*	ns
	SD	0,59	0,48	0,63	0,58	0,71	0,71	0,50	0,66	
MUFA/SFA	$\bar{x}$	0,48	0,43	0,45	0,47*	0,49	0,55	0,52	0,53*	ns
	SD	0,15	0,09	0,13	0,13	0,18	0,18	0,13	0,17	
PUFA/SFA	$\bar{x}$	0,05	0,04	0,06	0,05**	0,07	0,08	0,09	0,08**	ns
	SD	0,03	0,02	0,03	0,03	0,07	0,07	0,08	0,07	
CLA/PUFA	$\bar{x}$	0,10	0,14	0,16	0,12**	0,21	0,23	0,21	0,22**	ns
	SD	0,08	0,13	0,09	0,10	0,15	0,19	0,15	0,17	

Objaśnienia: / Explanatory notes:

A, B, C – różnice pomiędzy rejonami w obrębie systemu intensywnego istotne przy $p \leq 0,01$; X, Y, Z – różnice pomiędzy rejonami w obrębie systemu tradycyjnego istotne przy $p \leq 0,01$; ** – różnice pomiędzy systemami produkcji istotne przy $p \leq 0,01$; * – istotne przy $p \leq 0,05$; ns – interakcja nieistotna statystycznie.

A, B, C – differences between regions within the intensive production system significant at $p \leq 0.01$; X, Y, Z – differences between regions within the traditional production system significant at $p \leq 0.01$; ** – differences between production systems significant at $p \leq 0.01$; * – significant at $p \leq 0.05$; ns – interaction statistically insignificant.

System produkcji mleka wpływał istotnie także na profil kwasów tłuszczowych (tab. 3). Wykazano, że krowy żywione tradycyjnie produkowały mleko o istotnie ($p \leq 0,01$) wyższym udziale kwasów nienasyconych (UFA), w tym jedno- (MUFA) i wielonienasyconych (PUFA), a w tym CLA. Mleko pozyskiwane od zwierząt utrzymywanych w systemie intensywnym charakteryzowało się natomiast istotnie ($p \leq 0,01$) wyższym udziałem kwasów nasyconych (SFA), w tym długłańcuchowych (SFSlc). Tendencje te potwierdza wielu autorów [9, 10, 21, 24, 26]. Ellis i wsp. [10] twierdzą, że żywienie pastwiskowe powoduje zmniejszenie w mleku udziału nasyconych kwasów tłuszczowych, a zwiększenie udziału PUFA, w tym CLA i kwasów n-3 w porównaniu z żywieniem w systemie TMR. Dhiman i wsp. [9] stwierdzili nawet 5-krotny wzrost zawartości CLA w mleku krów wypasanych na pastwisku.

Stwierdzono, że niezależnie od systemu żywienia skład mleka różnił się także pomiędzy analizowanymi rejonami produkcji. Wynikało to prawdopodobnie z różnic międzyrasowych i składu botanicznego skarmianych pasz z użytków zielonych. Stwierdzono najkorzystniejszy skład mleka od krów utrzymywanych w Beskidzie Niskim (tab. 1). Mleko pozyskiwane w tym rejonie charakteryzowało się również najkrótszym czasem krzepnięcia. Związane to było prawdopodobnie z rasą krów, dominującą w tym rejonie, tzn. polską czerwoną.

W przypadku białek serwatkowych stwierdzono, że generalnie istotnie ($p \leq 0,01$) większa ich zawartość była w mleku pozyskiwanym w rejonie Bieszczad i Beskidu Niskiego. Wynikało to prawdopodobnie również z różnic międzyrasowych, ale także być może w pewnym zakresie ze składu botanicznego podstawowej paszy jaką była zielonka z trwałych użytków zielonych. Wykonane analizy botaniczno-wagowe pobranych próbek roślinności pastwiskowej wykazały, że w rejonie Bieszczad i Beskidu Niskiego był wyraźnie wyższy udział ziół i chwastów, odpowiednio: 15,6 i 12,2% w porównaniu z rejonem nizinny (9,8%) [17].

W mleku krów utrzymywanych na terenach górzystych (Beskid Niski i Bieszczady) była większa zawartość kwasów nienasyconych, w tym CLA (tab. 3). Może być to podyktowane wykazaniem powyżej odmiennym składem botanicznym runi łąkowej i pastwiskowej. Podstawową paszą objętościową w tych rejonach w intensywnym systemie produkcji mleka jest sianokiszonka, a w systemie tradycyjnym pastwisko, siano i sianokiszonka. Collomb i wsp. [6] podają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) korelacje między składem botanicznym pastwiska a udziałem poszczególnych grup kwasów tłuszczowych. Na szczególną uwagę zasługują ujemne korelacje między trawami (*Poaceae*) a udziałem PUFA ($r = -0,77$) i CLA ($r = -0,73$) oraz dodatnie między astrowatymi (*Asteraceae*), odpowiednio: $r = 0,74$ i $r = 0,75$ i baldaszkowatymi (*Apiaceae*), odpowiednio: $r = 0,63$ i $r = 0,58$. Bugaud i wsp. [3] stwierdzili większą zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych w mleku krów wypasanych na pastwiskach górskich. Tłumaczą ten fakt specyficznymi,

trudniejszymi warunkami środowiskowymi dla zwierząt (niższa temperatura, większy ruch po górzystym terenie), co może wpływać na mobilizację lipidów i zwiększenie udziału kwasu C18:1.

Podane w tab. 1., 2. i 3. wyniki wskazują na istotne ($p \leq 0,001$) interakcje tych dwóch analizowanych czynników, tj. systemu i rejonu produkcji na wydajność dobową, zawartość tłuszczu, białka, w tym kazeiny, suchej masy, mocznika, proporcję białka do tłuszczu, kwasowość, termostabilność mleka oraz zawartość α -laktoalbuminy, β -laktoglobuliny, laktoferyny i lizozymu.

Wnioski

1. Wykazano istotny ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) wpływ systemu produkcji mleka (intensywny vs tradycyjny) na większość analizowanych wskaźników charakteryzujących wartość odżywczą i jego przydatność technologiczną, tzn. podstawowy skład chemiczny, zawartość białek serwatkowych, profil kwasów tłuszczowych, kwasowość, czas krzepnięcia i stabilność cieplną.
2. Mniej znaczący, chociaż w wielu przypadkach także statystycznie istotny był wpływ rejonu produkcji mleka. Najwięcej składników podstawowych i niektórych frakcji białek serwatkowych zawierało mleko pozyskiwane w rejonie Beskidu Niskiego. Można to wiązać z dominującą w tym rejonie rasą krów (polska czerwona) i większą różnorodnością składu botanicznego zielonki łąkowej i pastwiskowej.
3. Stwierdzono istotne ($p \leq 0,001$) interakcje tych dwóch analizowanych czynników, tzn. systemu i rejonu produkcji prawie na wszystkie oceniane podstawowe składniki mleka i frakcje białek serwatkowych.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr NN 311 02 83 34 finansowanego przez MNiSW.

Literatura

- [1] Bargo F., Muller L.D., Delahoy J.E., Cassidy T.W.: Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and Total Mixed Rations. *J. Dairy Sci.*, 2002, **85** (11) 2948-2963.
- [2] Barłowska J.: Wartość odżywcza i przydatność technologiczna mleka krów 7 ras utrzymywanych w Polsce. Wyd. AR w Lublinie, Lublin 2007.
- [3] Bugaud C., Buchin S., Coulon J., Hauwuy A., Dupont D.: Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. *Lait*, 2001, **81**, 401-414.
- [4] Butler G., Nielsen J.H., Tina S., Chris S., Mick D.E., Roy S., Leifert C.: Fatty acid and fat – soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low- input conventional and organic systems: seasonal variation. *J. Sci. Food Agric.*, 2008, **88** (8), 1431-1441.

- [5] Chiofalo V., Maldonato R., Martin B., Dupont D., Coulon J.B.: Chemical composition and coagulation properties of Modicana and Holstein cows' milk. *Ann. Zootech.* 2000, **49**, 497-503.
- [6] Collomb M., Butikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J.O.: Correlation between fatty acids in cows' milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder. *Int. Dairy J.*, 2002, **12**, 661-666.
- [7] De Marchi M., Dal Zotto R., Cassandro M., Bittante G.: Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**, **8**, 3986-3992.
- [8] Devold T.G., Brovold M.J., Langsrud T., Vegarud G.E.: Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red Cattle – effect of milk protein polymorphism and different feeding regimes. *Int. Dairy J.*, 2000, **10**, 313-323.
- [9] Dhiman T. R., Anand G. R., Satter L. D., Pariza M. W.: Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.*, 1999, **82** (**10**), 2146-2156
- [10] Ellis K.A., Innocent G., Grove-White D., Cripps P., McLean W.G., Howard C.V., Mihm M.: Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *J. Dairy Sci.*, 2004, **89**, 1938-1950.
- [11] Frelich J., Ślachta M. Szarek J., Węglarz A., Zapletal P.: Seasonality in milk performance and reproduction of dairy cows in low-input farms depending on feeding system. *J. Anim. Feed Sci.*, 2008, **18**, 197-208.
- [12] Gandini G., Maltecca C., Pizzi F., Bagnato A., Rizzi R.: Comparing local and commercial breeds on functional traits and profitability: The case of Reggiana dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**, 2004-2011.
- [13] Jankowska-Huflejt H., Domański P. J.: Aktualne i możliwe kierunki wykorzystania trwałych użytków zielonych w Polsce. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, 2008, **8**, **2** (**24**), 31-49.
- [14] Król J., Brodziak A., Litwińczuk Z., Sz wajkowska M.: Wykorzystanie białek serwatkowych w promocji zdrowia *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, 2011, **XXXVIII** (**1**), 36-45.
- [15] Król J., Litwińczuk Z., Brodziak A., Sawicka-Zugaj W.: Bioactive protein content in milk from local breeds of cows included in the genetic resources conservation programme. *Ann. Anim. Sci.*, 2010, **10** (**3**), 213-221.
- [16] Król J., Litwińczuk Z., Litwińczuk A., Brodziak A.: Content of protein and its fractions in milk of Simmental cows with regard to rearing technology. *Ann. Anim. Sci.*, 2008, **8** (**1**), 57-61.
- [17] Litwińczuk Z. (Red.): Sprawozdanie merytoryczne z realizacji projektu badawczego Nr NN 311 02 83 34 pt. „Przydatność rodzimych ras bydła (polskiej czerwonej i białogrzbiętów) oraz simentalerów do produkcji mleka i mięsa o wysokiej wartości odżywczej oraz zachowania walorów przyrodniczych regionu”, Lublin 2011.
- [18] Litwińczuk Z. (Red.): Ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich i dziko żyjących. PWRiL, Warszawa 2011.
- [19] Litwińczuk Z. (Red.): Metody oceny towaroznawczej surowców i produktów zwierzęcych. Wyd. UP Lublin, 2011, s. 7-44.
- [20] PN-68/A-86122 Mleko. Metody badań.
- [21] Rego O.A., Portugal P.V., Sousa M.B., Rosa H.J.D., Vouzela C.M., Borba A.E. S., Bessa R.J. : Effect of diet on the fatty acid pattern of milk from dairy cows. *Anim. Res.*, 2004, **53**, 213-222.
- [22] Reklewska B., Bernatowicz E., Reklewski Z., Nałęcz-Tarwacka T., Kuczyńska B., Zdziarski K., Oprządek A.: Zawartość biologicznie aktywnych składników w mleku krów zależnie od systemu żywienia i sezonu. *Zesz. Nauk. Przegl. Hod.*, 2003, **68**, 85-98.
- [23] Romero C., Perez-Andujar O., Jimenes S.: Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia*, 1996, **42**, 181-184.
- [24] Staszak E.: Conjugated Linoleic Acid (CLA) content of milk from cows fed different diets. *Folia Biologica*, 2005, **53**, 103-106.

- [25] Tyrisevä A.-M., Ikonen T., Ojala M.: Repeatability estimates for milk coagulation traits and non-coagulation of milk in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Res.*, 2003, **70**, 91-98.
- [26] White S. L., Bertrand J.A., Wade M.R., Washburn S.P., Greek J.T., Jenkins T.C.: Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a Total Mixed Ration. *J. Dairy Sci.*, 2001, **84**, 2295-2301.

NUTRITIONAL VALUE AND TECHNOLOGICAL SUITABILITY OF MILK PRODUCED IN INTENSIVE AND TRADITIONAL SYSTEMS IN 3 REGIONS OF EASTERN POLAND

S u m m a r y

The study involved 68 farms located in 3 regions of Eastern Poland, i.e. in the lowland (terrains near the Bug, Biebrza, and Narew rivers), in the Beskid Niski Mountains, and in the Bieszczady Mountains. The farms studied were arranged in 2 groups: 1 group were those producing milk in an intensive system, and the second group: those using a traditional system. In 1589 milk samples, the following was determined: contents of fat, protein, casein, lactose, and dry matter; acidity (pH), heat stability; rennet coagulation time; contents of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, serum albumin, lactoferrin, and lysozyme. In the selected 298 samples, a fatty acid profile was also determined. It was found that the milk production system (intensive vs. traditional) had a significant ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$) impact on the basic chemical composition, concentration level of whey proteins, fatty acid profile, acidity, rennet coagulation time, and heat stability. The effect of region where milk was produced was less marked; however, in many cases, it was statistically significant. The milk manufactured in the Beskid Niski M. region had the highest contents of basic components as well as of some fractions of whey proteins. This could be attributed to the dominant cow breed (Polish Red) in this region and to a higher diversity of botanical composition of meadow and pasture forages. Significant ($p \leq 0.001$) interactions between the two analyzed factors (i.e. production system and production region) were found in nearly all evaluated basic milk components and whey proteins fractions.

Key words: milk, nutritional value, technological suitability, local cattle breeds, production system 

JAN MICIŃSKI, JANINA POGORZELSKA, ANNA KALICKA,
IRENEUSZ M. KOWALSKI, JÓZEF SZAREK

ZAWARTOŚĆ KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MLEKU KRÓW RASY POLSKIEJ HOLSZTYŃSKO-FRYZYJSKIEJ Z UWZGLĘDNIENIEM ICH WIEKU I FAZY LAKTACJI

Streszczenie

Celem pracy było określenie udziału kwasów tłuszczowych w mleku krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, uwzględniając wpływ kolejności laktacji i fazy laktacji.

Do badań wybrano 48 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, będących w różnym wieku: I, II, III i IV laktacja (po 12 szt. w każdej z nich). Od każdej krowy pobierano próby mleka z uwzględnieniem fazy laktacji, tj. w następujących dniach doju: 6., 30., 90., 300., 350. i 400. (łącznie 288 prób). Spośród oznaczonych kwasów tłuszczowych mleka najwyższy udział stanowiły: C16:0, C18:1 cis 9, C18:0 oraz C14:0, w tym kwasy oleinowy (C18:1 cis 9) i stearynowy (C18:0), którym przypisuje się właściwości obniżające poziom cholesterolu we krwi, stanowiły aż 37,35 g/100 g tłuszczu. Największą zawartością nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) charakteryzowało się mleko krów z IV laktacji ($p \leq 0,05$) oraz w okresie okołoporodowym, tj. w 6. dniu laktacji. Zawartość korzystnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) malała w tłuszczu mleka w kolejnych czterech laktacjach ($p \leq 0,05$), także w miarę upływu laktacji, osiągając najwyższą wartość w 6. dniu, a najniższą w 400. dniu ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$). Mleko pochodzące od pierwiastek charakteryzowało się najwyższą koncentracją kwasów tłuszczowych wielonienasyconych (PUFA) i jednonienasyconych (MUFA), a jednocześnie najmniejszą zawartością kwasów mniej korzystnie wpływających na zdrowie człowieka, tj. C12:0, C14:0, C16:0. W miarę trwania laktacji zawartość MUFA w tłuszczu mleka malała, a PUFA wzrastała, co potwierdzają różnice statystyczne przy $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$. W okresie od 6. do 90. dnia laktacji najkorzystniejszy był stosunek kwasów n-6/n-3 oraz największa zawartość funkcjonalnych kwasów tłuszczowych, tj.: masłowego (BA), cis 9 oleinowego (OA), linolowego (LA) oraz krótkołańcuchowych (SCFA) i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCFA). Zawartość kwasów: cis 9 trans 11 sprzężonego linolowego (CLA) i trans 10+11 wakcenowego (TVA) była najmniejsza w tzw. szczycie wydajności laktacyjnej i wzrastała w miarę trwania laktacji, osiągając najwyższe wartości w 300. dniu laktacji.

Słowa kluczowe: krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, mleko, wiek krów, faza laktacji, kwasy tłuszczowe

Dr hab. inż. J. Miciński, prof. nadzw., prof. dr hab. J. Pogorzelska, mgr inż. A. Kalicka, Katedra Hodowli Bydła i Oceny Mleka, Wydz. Bioinżynierii Zwierząt, dr hab. n. med. Ireneusz M. Kowalski, prof. nadzw., Katedra i Klinika Rehabilitacji, Wydz. Nauk Medycznych, prof. dr hab. J. Szarek, Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn

Wprowadzenie

W wielu pracach naukowych podkreśla się, że do żywności funkcjonalnej należy zaliczyć także mleko [32]. Sucha masa mleka zawiera bowiem podstawowe składniki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, spośród których najistotniejszymi są: laktoza, białko, tłuszcz, składniki mineralne oraz witaminy. Skład mleka nie jest stały i zależy głównie od rasy, a także od żywienia, kolejnej laktacji, fazy laktacji, sezonu, żywienia czy też sposobu zarządzania stadem [16, 18, 30, 31].

Istotnym składnikiem energetycznym mleka jest tłuszcz, który nadaje mu przyjemny smak. Jego znaczna wartość odżywcza i wysoka strawność (dochodząca nawet do 99 %) sprawiły, że odgrywa on dużą rolę w diecie człowieka [4]. Tłuszcz nie jest substancją jednorodną. Ma on postać rozproszonych w wodnej fazie mleka zdyspergowanych kuleczek tłuszczowych, tworzących emulsję. Ich wnętrze wypełniają triacyloglicerole, stanowiące 98 % całego tłuszczu mleka. Otoczka kuleczki tłuszczowej oprócz glikoprotein zawiera około 1,1 % fosfolipidów, mono- i diacyloglicerole (odpowiednio 0,16 - 0,38 % oraz 0,28 - 0,59 %), wolne kwasy tłuszczowe (0,1 - 0,4 %), sterole (0,42 %) oraz karotenoidy i witaminy rozpuszczalne w tłuszczach [11, 15, 25, 20].

Decydujący wpływ na jakość tłuszczu mają kwasy tłuszczowe, których właściwości zależą od długości łańcucha węglowodanowego i liczby wiązań nienasyconych. Syntetyzowane są one w żwaczu przy udziale mikroflory z octanu, β -hydroksymaślanu, triacylogliceroli, lipoprotein oraz w mniejszych ilościach ze steroli, fosfolipidów oraz wolnych kwasów tłuszczowych [5, 6, 24, 21, 25].

W składzie tłuszczu stwierdzono obecność około 400 różnych kwasów tłuszczowych, przy czym 14 występuje w ilości około 1 %, natomiast pozostałe w ilościach śladowych. Kwasy tłuszczowe o długości łańcucha od 4 do 16 atomów węgla syntetyzowane są przez tkankę gruczołową wymienia, natomiast te o łańcuchach dłuższych pochodzą z osocza krwi. Stwarza to możliwość wpływania na skład tłuszczu mlekowego poprzez umiejętne kierowanie dietą krów mlecznych [2, 4, 21, 22, 25].

Mleko zawiera około 70 % kwasów tłuszczowych nasyconych i 30 % kwasów nienasyconych. Wśród tych ostatnich wyróżnia się kwasy jednonienasycone (MUFA), które stanowią około 83 % kwasów nienasyconych oraz kwasy wielonienasycone (PUFA), które stanowią około 17 % [7, 19].

Tłuszcz mleka krowiego jest jednym z najbardziej złożonych pod względem składu. Występuje w nim od 400 do 500 różnych kwasów tłuszczowych [4, 5, 14, 19]. Kwasy te można podzielić na różne grupy, w zależności od przyjętego kryterium, np. stopień nasycenia czy długość łańcucha węglowego [5, 13].

Do najważniejszych kwasów tłuszczowych o pożądanym działaniu prozdrowotnym zalicza się m.in. kwas oleinowy (z rodziny n-9), który blokuje wchłanianie cholesterolu pokarmowego, obniża zawartość LDL cholesterolu oraz zmniejsza lepkość krwi

i wpływa na obniżenie ciśnienia krwi [23]. Kolejnymi są: kwas linolowy (z rodziny n-6) i powstający z niego kwas arachidonowy (prekursor prostaglandyn i leukotrienów) oraz kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 (np. kwas eikozapentaenowy i dokozaheksaenowy). Kwasy te są niezbędne do normalnego wzrostu i rozwoju organizmu, zapobiegają niewydolności wieńcowej serca, zwiększają odporność organizmu, uczestniczą w transporcie lipidów, w tym cholesterolu, a także obniżają poziom cholesterolu we krwi obwodowej. Zachwianie równowagi proporcji kwasów n-6/n-3 jest uznawane za czynnik ryzyka dla zdrowia człowieka [9, 10, 17, 23, 33].

Celem pracy było określenie zawartości kwasów tłuszczowych w mleku krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej z uwzględnieniem ich wieku i fazy laktacji.

Material i metody badań

Do badań wybrano 48 krów rasy polskiej olsztyńsko-fryzyjskiej, zróżnicowanych wiekiem, będących w I, II, III i IV laktacji (po 12 w każdej z nich). Od każdej krowy pobierano próby mleka z uwzględnieniem fazy laktacji, tj. w następujących dniach doju: 6., 30., 90., 300., 350. i 400. Pobrano 288 prób mleka.

Krowy utrzymywane były alkierzowo w oborze wolno stanowiskowej na głębokiej ściółce. W żywieniu stosowano tzw. monodietę, której podstawą były pasze objętościowe soczyste: kiszonka z kukurydzy, sianokiszonka, kiszzone ziarno kukurydzy a także śruta sojowa, rzepakowa, żytnia oraz mieszanka treściwa granulowana „Focus” z firmy „Cargill”, koncentrat witaminowy „Super Premium”. Do paszy dodawane były także metabolity drożdży „diamond”, kreda, sól pastewna, kwaśny węglan sodu. Pasze przygotowywano i zadawano w systemie TMR (*total mixed ration*). Skład dawki był taki sam przez cały okres badań. Udój wykonywano dwukrotnie w ciągu doby w 2 halach udojowych typu „rybia ość” (2×7), firmy Fullwood Limited Ellesmere Shropshire, England. Mleko przechowywano w zbiorniku o poj. 13 000 litrów. Ze względu na codzienny odbiór, wystarczające było schładzanie mleka do temp. 6 °C.

Próby mleka pobierano pipetą do pojemników „eppendorf”. Następnie mrożono je w celu wykonania analizy frakcji tłuszczowej. Ekstrakcję tłuszczu prowadzono metodą Röse-Gottlieba (AOAC 1990). Analizę składu profilu 43 kwasów tłuszczowych wykonywano metodą chromatografii gazowej, stosując chromatograf gazowy firmy Varian CP 3800. Aparat wyposażony był w kolumnę CP7420 o długości 100 m, dozownik typu split/splitless oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny FID. Do sterowania i akwizycji danych z chromatografu gazowego służyła Chromatograficzna Stacja Robocza GALAXIE.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, wykorzystując program Statistica ver. 9.0. W analizie wariancji obliczono średnie arytmetyczne ($\bar{x}$), odchylenie standardowe (s) oraz określono istotność różnic testem Duncana.

Wyniki i dyskusja

W wyekstrahowanym tłuszczu mleka wyodrębniono 43 kwasy tłuszczowe (te o najmniejszym udziale połączono w jedną grupę) – tab. 1. Najwyższy udział miały kwasy: palmitynowy (C16:0) oraz oleinowy (C18:1 *cis* 9), których średnia zawartość

Tabela 1

Zawartość wybranych kwasów tłuszczowych w tłuszczu badanego mleka [g/100 g tłuszczu].

Content of selected fatty acids in fat of milk studied [g/100 g fat].

Nazwa kwasu Fatty acid	Zawartość Content
	$\bar{x}$ (n = 228)
C4:0 masłowy (BA) / butyric acid	2,43
C6:0 kapronowy / caproic acid	1,59
C8:0 kaprylowy / caprylic acid	0,99
C10:0 kaprynowy / capric acid	2,20
C10:1 kapronelowy / capronelic acid	0,24
C12:0 laurynowy / lauric acid	2,65
C12:1 laurolenowy / laurolenic acid	0,07
C13:0 tridekanowy / tridecanoic acid	0,11
C14:0 mirystynowy / myristic acid	9,43
C14:1 mirystooleinowy / miristioleic acid	1,19
C15:0 pentadekanowy / pentadecanoic acid	1,15
C16:0 palmitynowy / palmitic acid	27,76
C16:1 palmitooleinowy / palmitoleic	1,74
C17:0 margarynowy / margaric acid	0,66
C17:1 margarynooleinowy / margaric-oleic acid	0,35
C18:0 stearynowy / stearic acid	11,16
C18:1 <i>trans</i> 8+9 oleinowy / <i>trans</i> 8 + 9 oleinic	0,66
C18:1 <i>trans</i> 10+11 wakcenowy (TVA) <i>trans</i> 10+11 vaccenic	2,15
C18:1 <i>cis</i> 9 oleinowy (OA) / <i>cis</i> 9 oleinic	26,19
C18:2 linolowy (LA) / linoleic acid	1,80
C18:3 linolenowy (LNA) / linolenic acid	0,42
C20:0 arachidowy / arachidic acid	0,18
C18:2 <i>cis</i> 9 <i>trans</i> 11 sprzężony kwas linolowy (CLA) <i>cis</i> 9 <i>trans</i> 11 conjugated linoleic acid	0,80
C20:1 godoleinowy / godoleic acid	0,08
C20:2 eikozadienowy / eicosadienoic acid	0,03
C20:4 arachidonowy (AA) / arachidonic acid	0,16
C22:0 behenowy / behenic acid	0,06
C20:5 eikozapentaenowy (EPA) / eicosapentaenoic acid	0,05
C22:5 dokozapentaenowy (DPA) / docosapentaenoic acid	0,09
C22:6 dokozaheksaenowy (DHA) / docosahexaenoic acid	0,01
Pozostałe kwasy (łącznie) / Remaining acids (altogether)	4,48
Suma / Total	100

w 100 g badanego tłuszczu wyniosła odpowiednio: 27,76 g oraz 26,19 g. Stwierdzono, że średnia zawartość kwasu stearynowego (C18:0) kształtowała się na poziomie 11,16 g, a kwasu mirystynowego (C14:0) na poziomie 9,43 g/100 g. Udział pozostałych kwasów w składzie tłuszczu mleka był znacznie mniejszy i nie przekroczył 2,65 g.

Jakkolwiek największą frakcję spośród wszystkich kwasów tłuszczowych stanowił kwas palmitynowy (C16:0), to jednak udział tego kwasu był niższy aniżeli w badaniach innych autorów, którzy podają, że jego średnia zawartość kształtowała się na poziomie od 30,06 do 32,61 g/100 g [4, 19, 28]. Oddziaływanie kwasu palmitynowego na zdrowie człowieka może być albo neutralne, albo wręcz niekorzystne, ze względu na możliwość podwyższania poziomu cholesterolu ogólnego we krwi [23]. Jego stosunkowo wysoki poziom wynika z tego, że połowa tego kwasu jest syntetyzowana *de novo* z kwasów: octowego i β -hydroksymaślanu lub też może on przenikać do gruczołu wymienia bezpośrednio z krwi. Zawartość kwasu mirystynowego (C14:0) kształtowała się na poziomie 9,43 g/100 g tłuszczu. Kwas ten uznawany jest za zwiększający ryzyko chorób układu krążenia. Z tego względu wskazany jest jak najniższy jego udział w tłuszczu mleka.

W badaniach własnych stwierdzono 11,16 g/100 g tłuszczu kwasu stearynowego (C18:0). Mniejszą zawartość tego kwasu stwierdzono zarówno w badaniach Stoop i wsp. [28], jak i Lindmark-Månsson [19]. Mogło to być wynikiem zróżnicowanego żywienia. Zdaniem Barłowskiej i Litwińczuka [4], jako główne źródło przyjmuje się produkty powstające podczas procesów fermentacyjnych w żywcu oraz lipidy zawarte w dawce pokarmowej i lipidy zapasowe organizmu zwierząt. Należy podkreślić stosunkowo dużą zawartość (26,19 g/100 g) pochodnej kwasu oleinowego (C18:1 *cis* 9), która przewyższa wyniki uzyskane przez wymienionych autorów [4, 28].

Zawartość sumy nasyconych kwasów tłuszczowych (Saturated Fatty Acid - SFA) oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych (Unsaturated Fatty Acid - UFA) przedstawiono w tab. 2. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że największą zawartością kwasów SFA charakteryzował się tłuszcz mleka krów będących w IV laktacji (62,36 g), natomiast najmniejsza zawartość wystąpiła w tłuszczu mleka krów w laktacji I (60,49 g). Statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) odnotowano, poddając analizie zawartość kwasów tłuszczowych w zależności od okresu laktacji. Najmniejszą zawartość kwasów SFA stwierdzono w początkowej fazie laktacji: w 6., a następnie w 30. dniu. Wartości te wynosiły odpowiednio: 56,17 g i 60,08 g. Największa zawartość tych kwasów wystąpiła w szczycie laktacji, tj. w 90. dniu i wynosiła 64,71 g, po czym zmniejszała się wraz ze zmniejszaniem się wydajności krów, osiągając w 400. dniu laktacji wartość 62,95 g. W badaniach własnych stwierdzono, że większą zawartością SFA cechowało się mleko krów wieloródek niż pierwiastek. Uzyskane wyniki są zgodne z tendencjami podawanymi przez Thomsona i van der Poela [29] oraz Nałęcz-

Tarwacką [23]. Ponadto, wykazano istotny wpływ fazy laktacji na zawartość tej grupy kwasów tłuszczowych w mleku krów. Zawartość SFA była najmniejsza po ocieleniu i zmieniała się w kolejnych okresach, największą wartość osiągając w 90. dniu laktacji. W przypadku kwasów UFA, największa zawartość wystąpiła w mleku krów z laktacji I (39,51 g), a najmniejsza z laktacji IV (37,64 g). W obu przypadkach analiza statystyczna wykazała istotne różnice na poziomie $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$. W przypadku kwasów UFA ich największa zawartość wystąpiła na początku laktacji, tj. w 6. dniu (43,83 g) i w miarę upływu laktacji malała, przyjmując wartość 37,05 g w 400. dniu jej trwania. Podobną tendencję zaobserwowały Barłowska [5] i Nałęcz-Tarwacka [23].

Tabela 2

Zawartość sum nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) i nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) w tłuszczu badanego mleka [g/100 g tłuszczu mleka].

Content of totals of saturated fatty acids (SFA) and unsaturated fatty acids (UFA) in fat of milk studied [g/100 g milk fat].

Czynnik Factor	n	SFA		UFA	
		$\bar{x}$	s / SD	$\bar{x}$	s / SD
Laktacja / Lactation					
I	72	60,49 ^{Aa}	0,557	39,51 ^{Aa}	0,557
II	72	60,99 ^a	0,628	39,01 ^a	0,628
III	72	61,85 ^b	0,579	38,15 ^b	0,579
IV	72	62,36 ^{Bb}	0,677	37,64 ^{Bb}	0,676
Dzień laktacji / Day of lactation					
6	48	56,17 ^A	0,797	43,83 ^A	0,797
30	48	60,08 ^B	0,763	39,92 ^B	0,763
90	48	64,71 ^C	0,532	35,29 ^{Ca}	0,533
300	48	62,04 ^{Da}	0,485	37,96 ^{Cb}	0,479
350	48	62,57 ^D	0,589	37,43 ^{Cc}	0,589
400	48	62,95 ^{Db}	0,662	37,05 ^{DH}	0,663
Ogółem / Total	288	61,42	0,307	38,58	0,307

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie: duże litery – $p \leq 0,01$, małe litery – $p \leq 0,05$ / Values designated by different letters differ statistically significantly: capital letters – $p \leq 0,01$, small letters – $p \leq 0,05$.

W tab. 3. przedstawiono wyniki zawartości sum jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w tłuszczu mleka. Największą zawartością MUFA charakteryzowało się mleko krów pierwiastek (35,34 g), najmniejszą zaś mleko krów najstarszych (33,65 g). Podobna sytuacja dotyczyła koncentracji kwasów PUFA. Potwierdzają to statystycznie istotne różnice na poziomie $p \leq 0,05$.

Istotne różnice ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) zawartości kwasów MUFA i PUFA w tłuszczu mleka wykazano w poszczególnych fazach laktacji. Najwyższy udział kwasów MUFA stwierdzono w 6. dniu laktacji (39,89 g), najwyższy zaś w 90. dniu laktacji (31,18 g). W przypadku kwasów wielonienasyconych (PUFA) najmniej było ich na początku laktacji (3,94 g), a najwięcej na jej końcu (4,25 g). Wyniki te są zgodne z badaniami Thomsona i van der Poela [29].

Tabela 3

Zawartość sum jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w tłuszczu badanego mleka [g/100 g tłuszczu mleka].

Content of totals of monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in fat of milk studied [g/100 g milk fat].

Czynnik Factor	n	MUFA		PUFA	
		$\bar{x}$	s / SD	$\bar{x}$	s / SD
Laktacja / Lactation					
I	72	35,34 ^a	0,528	4,23 ^a	0,054
II	72	34,78 ^a	0,626	4,05	0,056
III	72	34,10 ^a	0,583	4,17	0,066
IV	72	33,65 ^b	0,660	4,01 ^b	0,064
Dzień laktacji / Day of lactation					
6	48	39,89 ^A	0,815	3,94 ^a	0,071
30	48	36,00 ^B	0,734	3,91 ^a	0,073
90	48	31,18 ^{Ca}	0,489	4,11 ^a	0,075
300	48	33,75 ^D	0,438	4,23 ^b	0,069
350	48	33,17 ^D	0,547	4,26 ^b	0,069
400	48	32,81 ^{Cb}	0,621	4,25 ^b	0,076
Ogółem / Total	288	34,47	0,302	4,11	0,030

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

Największą zawartością MUFA charakteryzowało się mleko krów z I laktacji. Uzyskane wyniki potwierdzają doniesienia Nałęcz-Tarwackiej [23] i Thomsona i van der Poela [29], którzy podają, że największą zawartością tej frakcji kwasów tłuszczowych charakteryzuje się mleko pierwiastek. W badaniach własnych stwierdzono mniejszą zawartość MUFA w 90. dniu laktacji, w porównaniu z innymi autorami, którzy wskazują, że między 90. a 120. dniem występuje największa zawartość MUFA [23] lub 121. a 200. dniem [1, 2]. Trudno jest wytłumaczyć tę mniejszą zawartość – można przypuszczać, że mogło to mieć związek z dłuższą utrzymującym się niedoborem energetycznym tych krów, bowiem w dalszych fazach laktacji odnotowano większe zawartości tego kwasu.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają wnioski Gregi i wsp. [12], którzy podają, że zawartość PUFA wzrasta wraz z czasem trwania laktacji. Odwrotną tendencję wykazała Nałęcz-Tarwacka [23], która oznaczyła największą zawartość tej frakcji kwasów tłuszczowych w początkowej (do 30. dnia) fazie laktacji. Natomiast Barłowska i wsp. [2] największą zawartość PUFA stwierdzili między 121. a 200. dniem laktacji.

Tabela 4

Zawartość sum kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 i n-6 w tłuszczu badanego mleka [g/100 g tłuszczu mleka].

Content of totals of fatty acids from n-3 and n-6 group in fat of milk studied [g/100 g milk fat].

Czynnik Factor	n	n-3		n-6		n-6 / n-3	
		$\bar{x}$	s / SD	$\bar{x}$	s / SD	$\bar{x}$	s / SD
Laktacja / Lactation							
I	72	0,50	0,013	2,15	0,051	4,52	0,149
II	72	0,46	0,014	2,06	0,053	4,74	0,182
III	72	0,49	0,013	2,05	0,054	4,43	0,167
IV	72	0,48	0,016	2,09	0,046	4,62	0,155
Dzień laktacji / Day of lactation							
6	48	0,46 ^A	0,015	2,39 ^A	0,044	5,39 ^A	0,128
30	48	0,41 ^A	0,009	2,28 ^A	0,051	5,57 ^A	0,112
90	48	0,41 ^A	0,009	2,24 ^A	0,054	5,54 ^A	0,121
300	48	0,52 ^B	0,017	1,86 ^B	0,065	3,73 ^B	0,158
350	48	0,55 ^B	0,017	1,82 ^B	0,043	3,48 ^B	0,158
400	48	0,55 ^B	0,020	1,93 ^B	0,062	3,74 ^B	0,200
Ogółem Total	288	0,48	0,007	2,09	0,025	4,58	0,082

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

Analizując zawartość kwasów z rodzin n-6 i n-3 w badanych próbach (tab. 4), stwierdzono występowanie niewielkiej tendencji malejącej w przypadku kolejnych laktacji w obu grupach kwasów. Należy jednak podkreślić, że różnice statystycznie istotne nie wystąpiły. W badaniach własnych wykazano większą zawartość kwasów z rodziny n-6, a mniejszą z n-3 aniżeli w badaniach prowadzonych przez Nałęcz-Tarwacką [23].

Poddając analizie zawartość kwasów tłuszczowych w tłuszczu mleka w zależności od fazy laktacji stwierdzono występowanie różnic statystycznie istotnych ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$). Wykazano, że zawartość kwasów n-3 była najmniejsza w szczytowym okresie laktacji, natomiast w dalszych okresach laktacji zawartość ich była największa (0,55 g) w 400. dniu. Natomiast zawartość kwasów n-6 malała w kolejnych dniach laktacji, by na jej końcu osiągnąć wartość wynoszącą 1,93 g.

Reklewska i Bernatowicz [26] podają, że najkorzystniejszy stosunek kwasów n-6/n-3 powinien wynosić (4 - 10) : 1. W badaniach własnych wykazano, że stosunek ten wynosił średnio 4,58 : 1 w laktacji i był wyższy niż podawany przez Lindmark-Månsson [18] – 2,3 : 1 oraz Nałęcz-Tarwacką [23] – 2,2 : 1. Stwierdzono statystycznie istotny wpływ fazy laktacji na zawartość kwasów z rodzin n-6 oraz n-3. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi przez Carriquiry i wsp. [8], którzy również wykazali wzrastające stężenie EPA, DHA oraz LNA w kolejnych tygodniach laktacji. Stwierdzono, że najkorzystniej pod względem właściwości prozdrowotnych kształtował się skład mleka krów będących w początkowym okresie laktacji, tj. do 90. dnia, w którym stosunek omawianych kwasów wynosił ponad 5,5 : 1.

W tab. 5. przedstawiono zawartość kwasów tłuszczowych (C12:0, C14:0 i C16:0), którym przypisuje się niekorzystne oddziaływanie na układ krążenia człowieka [34]. Przeprowadzone analizy wykazały, że zawartość tych kwasów w tłuszczu mleka ulegała niewielkim zmianom w kolejnych laktacjach, osiągając najniższe wartości w mleku krów pierwiastek. Wystąpiły statystycznie istotne różnice przy $p \leq 0,05$ pod względem zawartości kwasu laurynowego i palmitynowego w mleku krów różniowanych wiekiem. Podobne wyniki uzyskała Nałęcz-Tarwacka [23].

Należy zauważyć, że zawartości wymienionych wyżej kwasów różniły się między sobą w sposób statystycznie istotny przy $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$ w poszczególnych fazach laktacji.

W tab. 6. podano średnią zawartość kwasów tłuszczowych, które uznaje się za korzystnie oddziałujące na organizm człowieka [34]. W odniesieniu do fazy laktacji największą zawartość kwasów C4:0 (BA), C18:1*cis* 9 (OA) oraz C18:2 (LA) stwierdzono w 6. dniu laktacji.

Tabela 5

Zawartość kwasów niekorzystnie wpływających na organizm człowieka [g/100 g tłuszczu].
Content of fatty acids with non-beneficial effects on human organism [g/100 g fat].

Wyszczególnienie Specification		n	C12:0		C14:0		C16:0	
			$\bar{x}$	s / SD	$\bar{x}$	s / SD	$\bar{x}$	s / SD
Laktacja Lactation	I	72	2,45 ^a	0,117	9,19	0,276	27,44 ^a	0,343
	II	72	2,74 ^b	0,104	9,85	0,252	27,76 ^a	0,369
	III	72	2,55 ^a	0,102	9,36	0,242	28,09 ^b	0,318
	IV	72	2,87 ^b	0,123	9,81	0,275	28,77 ^b	0,427
Dzień laktacji Day of lactation	6	48	1,63 ^A	0,125	6,50 ^A	0,278	26,22 ^{Aa}	0,316
	30	48	2,63 ^B	0,132	9,05 ^{Ba}	0,306	26,88 ^{Ba}	0,396
	90	48	3,18 ^C	0,122	10,65 ^{Bb}	0,208	30,20 ^{Cb}	0,460
	300	48	2,67 ^B	0,084	10,15 ^{Bb}	0,188	27,78 ^{Ac}	0,449
	350	48	2,83 ^B	0,125	10,35 ^{Bb}	0,226	28,68 ^{Dd}	0,467
	400	48	2,97 ^B	0,126	10,62 ^{Bb}	0,237	28,37 ^{Dd}	0,384
Ogółem / Total		288	2,65	0,057	9,55	0,131	28,02	0,185

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

Najmniejszą zawartość tych kwasów oznaczono w próbach mleka z 350. dnia laktacji. Z kolei w przypadku kwasów C18:1 *trans* 11 (TVA) oraz C18:2 *cis* 9 *trans* 11 (CLA) największą zawartość stwierdzono w 300. dniu laktacji. Najmniej tych kwasów zawierał tłuszcz mleka pobrany w 6. dniu laktacji.

W analizie obejmującej wpływ wieku krów (kolejne laktacje) największą zawartość CLA (0,88 g) stwierdzono w I laktacji, a najmniejszą w tłuszczu mleka krów najstarszych. Niezwykle właściwości zdrowotne tego kwasu przemawiają za jak największym jego udziałem nie tylko w tłuszczu, ale i w produktach z mleka. Jednakże zawartość CLA jest uwarunkowana przede wszystkim żywieniem przeżuwaczy, bowiem sprzężone dieny kwasu linolowego są pierwszym produktem pośrednim podczas biohydrogenacji wielonienasyconych kwasów w żwacu w wyniku działania enzymów bakterii *Butyrivibrio fibrisolvens* [4, 24].

T a b e l a 6

Zawartość wybranych funkcjonalnych kwasów tłuszczowych [g/100 g tłuszczu].
Content of selected functional fatty acids [g/100 g fat].

Kwasy tłuszczowe Fatty acid	Miara stat. Stat.	Laktacja / Lactation				Dzień laktacji / Day of lactation							Ogółem Total
		I	II	III	IV	6	30	90	300	350	400		
Liczebność Number of samples	n	72	72	72	72	48	48	48	48	48	48	48	288
C4:0 (BA)	$\bar{x}$	2,39	2,45	2,48	2,40	2,80 ^{Aa}	2,62 ^{Ab}	2,43 ^{Bc}	2,36 ^{Bc}	2,13 ^{Cd}	2,24 ^{Bc}	2,43 ^{Bc}	2,43 ^{Bc}
	s / SD	0,080	0,063	0,040	0,063	0,079	0,089	0,063	0,044	0,085	0,051	0,031	0,031
	$\bar{x}$	26,64 ^a	25,83 ^a	26,86 ^b	25,38 ^{ab}	31,36 ^A	27,95 ^B	24,88 ^{Ca}	25,30 ^{Cb}	23,11 ^{Cc}	24,46 ^{Cd}	26,18 ^D	26,18 ^D
C18:1 <i>cis</i> (OA)	s / SD	0,491	0,593	0,559	0,655	0,833	0,664	0,473	0,411	0,505	0,578	0,290	0,290
	$\bar{x}$	0,88 ^{Aa}	0,75 ^b	0,84 ^a	0,71 ^{Bb}	0,49 ^A	0,58 ^B	0,73 ^C	1,02 ^{Da}	0,99 ^{Da}	0,95 ^{Db}	0,80 ^C	0,80 ^C
	s / SD	0,035	0,034	0,041	0,037	0,020	0,023	0,029	0,038	0,043	0,048	0,019	0,019
C18:1 <i>trans</i> 11 (TVA)	$\bar{x}$	2,22 ^a	2,08 ^b	2,40 ^{Ac}	1,89 ^{Bd}	1,24 ^A	1,99 ^B	1,97 ^B	2,27 ^C	2,24 ^C	2,18 ^D	2,15 ^D	2,15 ^D
	s / SD	0,057	0,077	0,015	0,082	0,231	0,098	0,078	0,070	0,087	0,099	0,050	0,050
	$\bar{x}$	1,86	1,79	1,78	1,81	2,10 ^A	2,01 ^B	1,98 ^{Ca}	1,58 ^D	1,55 ^D	1,64 ^D	1,81 ^{Cb}	1,81 ^{Cb}
C18:2 (LA)	s / SD	0,048	0,051	0,052	0,044	0,040	0,049	0,053	0,059	0,042	0,058	0,024	0,024
	$\bar{x}$	0,43	0,41	0,42	0,41	0,38 ^A	0,35 ^A	0,36 ^A	0,45 ^B	0,48 ^B	0,48 ^B	0,42 ^C	0,42 ^C
	s / SD	0,011	0,013	0,012	0,015	0,012	0,008	0,008	0,015	0,015	0,018	0,006	0,006

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

Największą zawartością kwasów BA (2,48 g), OA (26,86 g) oraz TVA (2,40 g) charakteryzowało się mleko krów będących w III laktacji. Najmniej kwasu BA (2,39 g) stwierdzono w próbach pobranych w I laktacji, natomiast kwasu OA (25,38 g) i TVA (1,89 g) w próbach pobranych w IV laktacji. Wykonana analiza statystyczna wykazała różnice statystycznie istotne przy $p \leq 0,01$ oraz $p \leq 0,05$ w obrębie zmian zawartości tych kwasów w odniesieniu zarówno do poszczególnych faz laktacji, jak i kolejnej laktacji.

Wnioski

1. Spośród oznaczonych kwasów tłuszczowych mleka, najwyższy udział stanowiły kwasy: C16:0, C18:1 cis 9, C18:0 oraz C14:0, wśród nich kwasy, którym przypisuje się właściwości obniżające poziom cholesterolu w krwi (C18:1 cis 9) i (C18:0) stanowiły aż 37,35 g/100 g tłuszczu.
2. Największą zawartością SFA charakteryzowało się mleko krów będących w IV laktacji ($p \leq 0,05$) oraz w okresie okołoporodowym, tj. w 6. dniu laktacji.
3. Zawartość korzystnych dla organizmu człowieka nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) malała z wiekiem krów – w kolejnych czterech laktacjach ($p \leq 0,05$), a także w miarę trwania laktacji, osiągając największą wartość w 6. dniu i najniższą w 400. dniu ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$).
4. Mleko pochodzące od pierwiastek charakteryzowało się najwyższą koncentracją kwasów tłuszczowych PUFA i MUFA, a jednocześnie najmniejszą zawartością kwasów niekorzystnie wpływających na organizm człowieka, tj. C12:0, C14:0, C16:0. W miarę trwania laktacji zawartość MUFA malała, a PUFA wzrastała, co potwierdzają różnice statystycznie istotne przy $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$.
5. W okresie od 6. do 90. dnia laktacji najkorzystniejszy był stosunek kwasów n-6/n-3 oraz największa zawartość funkcjonalnych kwasów tłuszczowych, tj.: BA, OA, LA oraz SCFA i LCFA.
6. Zawartość kwasów CLA i TVA była największa w tzw. szczycie wydajności laktacyjnej i wzrastała w miarę upływu laktacji, osiągając największą wydajność w 300. dniu laktacji.

Praca została wykonana w Katedrze Hodowli Bydła i Oceny Mleka w ramach badań statutowych nr 528-0106-0801

Literatura

- [1] AOAC. Official methods of analysis 15th ed. Association of official analytical chemists. Inc. Virginia, USA, 1990.

- [2] Auldist M.J., Brian J.W., Thomson N.A.: Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *J. Dairy Res.*, 1998, **65**, 401-411.
- [3] Barłowska J., Grodzicki T., Topyła B., Wolańczuk A.: Production season influence on the fat acids profile of milk of the different cows' breeds. *Mat. LXXIII Zjazdu PTZ*, 2008.
- [4] Barłowska J., Litwińczuk Z., Topyła B.: Parametry fizykochemiczne tłuszczu mleka krów różnych ras z okresu żywienia wiosenno-letniego. *Med. Wet.*, 2005, **8**, 937-939.
- [5] Barłowska J., Litwińczuk Z.: Właściwości odżywcze i prozdrowotne tłuszczu mleka. *Med. Wet.*, 2009, **65** (3), 171-174.
- [6] Barłowska J.: Wartość odżywcza i przydatność technologiczna mleka krów 7 ras użytkowanych w Polsce Rozprawa habilitacyjna. Wyd. AR, Lublin 2007, s. 112.
- [7] Bodkowski R., Wasilewicz-Niedbalska W., Ramadani S., Patkowska-Sokoła B.: Kształtowanie się zawartości kwasów tłuszczowych oraz izomeru cis-9, trans-11 w tłuszczu mleka przeżuwaczy. *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu*, 2004, **51**, 31-35.
- [8] Brzóska F., Gąsior R., Sala K., Zyzak W.: Wpływ soli wapniowych kwasów tłuszczowych na wydajność i składniki mleka krów. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 1999, **26** (3), 143-157.
- [9] Carriquiry M., Weber W.J., Dahlen C.R., Lamb G.C., Baumgard L.H., Crooker B.A.: Fatty acid composition of milk from multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 2009, **92**, 4865-4875.
- [10] Cichosz G.: Prozdrowotne właściwości tłuszczu mlekowego. *Przegl. Mlecz.*, 2007, **5**, 4-8.
- [11] Dymnicka M., Klupeczyński J., Łozicki A., Miciński J., Strzetelski J.: Polyunsaturated fatty acids in *M. longissimus thoracis* of fattening bulls fed silage of grass or maize. *J. Anim. App. Sci.*, 2004, **13** (s2), 101 - 104.
- [12] Górska A., Mróz B., Rymuza K., Dębska M.: Zmiany w zawartości białka i tłuszczu w mleku krów czarno-białych w zależności od stadium laktacji i pory roku. *Rocz. Nauk. PTZ*, 2006, **2** (1), 113-119.
- [13] Grega T., Sady M., Forot A., Pustkowiak H.: Jakość tłuszczu mleka wybranych ras krów. *Techn. Żywn.*, 1998, **10**, 49-59.
- [14] Hanigan M., Baldwin R.: A mechanistic model of mammary gland metabolism in the lactating cow. *Agricult. Systems*, 1994, **45**, 369-419.
- [15] Jensen R.G.: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.*, 2002, **85** (2), 295-350.
- [16] Jensen R.G., Newburg D.S.: milk lipids. *Handbook of milk composition*. Jensen R.G.: Academic Press: London 1995, pp. 543-575.
- [17] Józwiak A., Strzałkowska N., Krzyżewski J., Bagnicka E., Horbańczuk J.: Wpływ czynników genetycznych i środowiskowych na zawartość składników bioaktywnych, wartość odżywczą i przydatność technologiczną mleka krów. *Przegl. Hod.* 2009, **11**, 6-11.
- [18] Kowalski I.M., Protasiewicz-Fałdowska H., Józwiak-Grabysa D., Kiebzak W., Zarzycki D., Lewandowski R., Szarek J.: Environmental factors predisposing to pain syndromes among adolescent girls with diagnosed idiopathic scoliosis. *J. Elementol.*, 2010, **15** (3), 517-530.
- [19] Lindmark-Mansson H.: Composition of Swedish dairy milk 2001. Report Nr 7025-P (In Swedish), 2003, Swedish Dairy Association.
- [20] Lindmark-Mansson H.: Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*, 2008, 1-3.
- [21] Mac Gibbon A.H.K., Taylor M.W.: Composition and structure of bovine milk lipids. *Advanced dairy chemistry*. Fox P.F., Mc Sweeney P.L.H.: Springer, New York 2006, s. 42.
- [22] Matwijczuk A., Król J.: Profil kwasów tłuszczowych w mleku krów różnych ras w okresie wiosenno-letnim. *Przegl. Hod.*, 2009, **7**, 3-6.
- [23] McGuire M.A., Bauman D.E.: Milk biosynthesis and secretion. *Encyclopedia of dairy science*. Roginsky H.F., Fox J.W., Fox P.F., Academic Press, New York 2003 pp. 1828-1834.

- [24] Nałęcz-Tarwacka T.: Wpływ wybranych czynników na zawartość funkcjonalnych składników tłuszczu mleka krów. Rozprawa habilitacyjna. Wyd. SGGW, Warszawa 2006, ss.1-108.
- [25] Parodi P.: Milk fat in human nutrition. Aust. J. Dairy Techn., 2004, **59**, 3-59.
- [26] Reklewska B., Bernatowicz E.: Bioaktywne składniki frakcji tłuszczowej mleka. Przegl. Hod., 2002, **11**, 1-6.
- [27] Reklewska B., Bernatowicz E.: Funkcjonalne składniki mleka - znaczenie dla organizmu oraz możliwości modyfikowania ich zawartości w mleku. Zesz. Nauk. Prz. Hod., 7, 47-69.
- [28] Statsoft. (2010). Data analysis software systems. ver. 9.0. [on-line] www.statsoft.pl/base.html.
- [29] Stoop W.M., van Arendonk J.A.M., Heck J.M.L., van Kalenberg H.J.F, Bovenhaus H.: Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. J. Dairy Sci., 2008, **91** (1), 385-394.
- [30] Thomson N.A., van Der Poel W.: Seasonal variations of the fatty acids composition of milk fat from Friesian cows grazing pasture. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 2000, **60**, 314-317.
- [31] Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., van Boekel M.A.J.S.: Dairy technology: principles of milk properties and processes. Inc: Marcel Dekker, New York 1999.
- [32] Walstra P., Jenness R.: Dairy chemistry and physics. John Wiley & Sons, New York 1984.
- [33] Wielgosz-Groth Z.: Efekty doskonalenia użyteczności krów rasy czarno-białej w regionie północno – wschodniej Polski. Rozprawy i monografie. Wyd. UWM, Olsztyn 2004, ss. 1-83.
- [34] Zwierzchowski G., Miciński J., Górecka-Ordon E., Goławski P.: Is food allergy a civilization-related disease? Pol. Ann. Med., 2011, **18** (1), 168-176.
- [35] Żegarska Z.: Tłuszcz mlekowy jako składnik diety człowieka. Przegl. Mlecz., 1998, **10**, 369-371.

CONCENTENT OF SELECTED FATTY ACIDS IN MILK FROM POLISH HOLSTEIN-FRIESIAN COWS WITH REGARD TO THEIR AGE AND STAGE OF LACTATION

Summary

The objective of the research study was to determine the content of fatty acids in milk from the Polish Holstein-Friesian cows with regard to the effect of successive lactations and stage of lactation.

The research study was performed on 48 selected cows of the Polish Holstein-Friesian breed, at their different ages: lactation I, II, III, and IV (12 cows in each lactation group). From each cow milk samples were taken and the stage of lactation was taken into consideration, i.e. the samples were taken on the following milking days: 6th, 30th, 90th, 300th, 350th, and 400th, (288 samples in total). Among all the fatty acids determined in milk, the contents of the following fatty acids were the highest: C16:0, C18:1 cis 9, C18:0, and C14:0 including those, which are believed to have a potential to reduce the cholesterol level in blood: oleic acid (C18:1 cis 9) and stearic acid (C18:0), and their total content was as high as 37.35 g/100 g of fat. The milk from cows at the lactation stage IV ($p \leq 0.05$) and from periparturient cows, i.e. collected on the 6th day of lactation, was characterized by the highest content of saturated fatty acids (SFA). The content of beneficial unsaturated fatty acids (UFA) decreased in the fat contained in the milk milked at the four successive stages of lactation ($p \leq 0.05$) as well as the lactation continued; their content was the highest on the 6th day and the lowest on the 400th day 400 ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$). The milk from primiparous cows was characterized by the highest concentration levels of polyunsaturated fatty (PUFA) and monounsaturated fatty (MUFA) acids, and, at the same time, by the lowest content of fatty acids with a less beneficial effect on human health, i.e. C12:0, C14:0, and C16:0. As the lactation continued, the content of MUFA in milk fat decreased and the content of PUFA increased; this fact was confirmed by statistical differences at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$. During a period from the 6th to the 90th day of lactation, the

ratio of n-6 to n-3 fatty acids was the most advantageous and the contents of functional fatty acids were the highest, i.e. of the butyric (BA), *cis* 9 oleic (OA), linoleic (LA), short-chain (SCFA), and long-chain (LCFA) fatty acids. The levels of *cis* 9 *trans* 11 conjugated linoleic (CLA) and *trans* 10+11 vaccenic (TVA) acids were the lowest during the lactation yield peak and they increased as the lactation continued to reach the highest values on the 300th day of lactation.

Key words: cows of Polish Holstein-Friesian breed, milk, cows' age, stage of lactation, fatty acids ☒

MAŁGORZATA DAREWICZ, PIOTR MINKIEWICZ, MARTA DZIUBA,
TOMASZ PANFIL

ZASTOSOWANIE DRUGICH I CZWARTYCH POCHODNYCH WIDM UV DO IDENTYFIKACJI NISKOCZĄSTECZKOWEJ FRAKCJI PRODUKTÓW HYDROLIZY KAZEINY- β PRZEZ PLAZMINĘ

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody identyfikacji frakcji niskocząsteczkowych produktów hydrolizy bydlęcej kazeiny- β przez plazminę za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (RP-HPLC) w połączeniu ze spektroskopią w nadfiolecie (UV). Bydlęcą kazeinę- β poddano hydrolizie przez plazminę. Supernatant pozostały po wytrąceniu nierozpuszczalnej frakcji hydrolizatu rozdzielono za pomocą ultrafiltracji na retentat zawierający polipeptydy i permeat zawierający peptydy o małej masie cząsteczkowej. Do identyfikacji frakcji permeatu wykorzystano parametry charakteryzujące ilościowo drugie i czwarte pochodne widm UV. Kształt pochodnych widm permeatu wskazywał na obecność niewielkich ilości tryptofanu, który nie został wykryty metodą spektrometrii mas. Wartości parametrów charakteryzujących pochodne widm UV niskocząsteczkowej frakcji hydrolizatu kazeiny- β różnią się w sposób istotny statystycznie (w granicach od $p < 0,05$ do $p < 0,001$) od analogicznych parametrów dla pochodnych widm pozostałych frakcji tego hydrolizatu oraz od pochodnych widm białka nie poddanego hydrolizie. Niskocząsteczkowa frakcja hydrolizatu kazeiny- β może być identyfikowana metodą spektroskopii UV.

Słowa kluczowe: kazeina- β , peptydy, plazmina, spektroskopia UV, wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwróconymi fazami

Wprowadzenie

Bydlęca kazeina- β (β -CN) jest fosfoproteiną, która stanowi ok. 35 % zawartości kazeiny. Masa cząsteczkowa tego białka wynosi około $24 \cdot 10^3$ Da, a punkt izoelektryczny – 4,5 [13, 16, 30]. Białko to jest opisane w bazie sekwencji białek UniProt (<http://www.expasy.org>) [19] pod numerem P02666. Kazeina- β jest znana jako prekursor licznych biologicznie aktywnych peptydów [2, 18]. Białko i jego fragmenty są też

*Prof. dr hab. inż. M. Darewicz, dr hab. P. Minkiewicz, prof. nadzw., dr inż. M. Dziuba, dr inż. T. Panfil,
Katedra Biochemii Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn*

przedmiotem zainteresowania ze względu na właściwości funkcjonalne np. zdolność stabilizacji pian i emulsji [3, 5, 8], a także jako alergen (Nr 11 w bazie danych białek alergennych i ich epitopów BIOPEP – <http://www.uwm.edu.pl/biochemia> [26] oraz nr 2736 w bazie Allergome – <http://www.allergome.org/> [24]).

Jednym z rodzimych enzymów mleka jest plazmina, która podobnie jak lipaza lipoproteinowa i kwaśna fosfataza, może brać udział w przemianach związków azotowych podczas dojrzewania sera [15, 17]. Plazmina (EC 3.4.21.7) jest odnotowana w bazie BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>) [12, 27] jako enzym nr 20 oraz w bazie enzymów proteolitycznych MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) [28] pod numerem S01.233. Głównymi produktami hydrolizy kazeiny- β przez plazminę są kazeiny- γ : γ_1 -CN (f 29-209), γ_2 -CN (f 106-209), γ_3 -CN (f 108-209), γ_4 -CN (f 114-209) oraz proteozo-peptony: PP5 (f 1-105/107, 5P), PP8S (f 29-105/107, 1P), PP8F (f 1-28, 4P). Po spełnieniu wymagań odnośnie czasu działania plazminy i pH środowiska reakcji, plazmina może hydrolizować wiązania peptydowe między Lys₁₁₃ i Tyr₁₁₄ oraz Arg₁₈₃ i Asp₁₈₄ [14]. Obecność fragmentu (f 29-105/107) kazeiny- β w mleku może wskazywać na zmiany proteolityczne w tym surowcu, informując jednocześnie o subklinicznych stanach *mastitis* u krów [20].

Jedną z metod analitycznych stosowanych w analizie białek i peptydów jest spektroskopia w nadfiolecie. Może ona być używana jako samodzielna metoda analityczna [21, 22] albo w połączeniu z wysokosprawną chromatografią cieczową [9, 25]. W tym ostatnim przypadku widma UV są otrzymywane za pomocą detektorów fotodiodowych. Widma UV białek i peptydów charakteryzują się dużym wzajemnym podobieństwem. Fakt ten powoduje konieczność użycia w badaniach tej grupy związków pochodnych widm [9, 21, 22, 25]. Obliczenie pochodnych pozwala na uwidocznienie niewielkich różnic spowodowanych różnym składem aminokwasowym bądź zmianami struktury. Pochodne widm były stosowane między innymi jako narzędzie identyfikacji kazeiny- β oraz polipeptydów powstałych w wyniku jej hydrolizy przez plazminę [6, 7, 10, 11].

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody identyfikacji frakcji niskocząsteczkowych produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami w połączeniu ze spektroskopią w nadfiolecie.

Materiał i metody badań

Materiałem do badań była bydlęca kazeina- β (90 % białka w przeliczeniu na suchą substancję; 95 % białka w przeliczeniu na azot; m/m), zakupiona w firmie Eurial (Rennes, Francja). Bydlęca plazmina i aprotynina pochodziły z firmy Sigma (St. Louis USA). Do sporządzenia roztworów, stanowiących fazę ruchomą podczas rozdzielów chromatograficznych, zastosowano acetonitryl (ACN) i kwas trifluorooctowy (TFA)

o analitycznej czystości (Baker, Holandia) oraz wodę dejonizowaną (Milli-Qsystem, Millipore).

Hydrolizę kazeiny- β przeprowadzano wg metodyki opisanej przez Darewicz i wsp. [4]. Parametry reakcji były następujące: 2,5 % m/v β -CN; enzym/substrat = 1/2400 m/v; pH 6,8; temp. 40 °C; czas 5 h. Podczas hydrolizy stale tworzył się osad. Począwszy od drugiej godziny hydrolizy, osad był oddzielany przez wirowanie (1500 $\times$ g, 10 min, 30 °C). Wirowanie powtarzano co 0,5 h, a otrzymane osady łączono razem i liofilizowano. Reakcję hamowano, dodając do hydrolizatu aprotyniny (9,7 TIU/ml w stosunku 1/200 v/v). Otrzymany supernatant poddawano ultrafiltracji (Filtron mini-ultra-set, membrana OMEGA, MWCO 5 kD; Pall Filtron Corp. USA). Frakcję permeatu otrzymaną po ultrafiltracji supernatantu liofilizowano i przechowywano w temp. -18 °C.

Próbki liofilizatu rozpuszczano w 300 μ l 0,1 M Bis-Tris, którego pH doprowadzono do 6,6 przy użyciu 0,1 M HCl, a następnie rozcieńczano za pomocą 700 μ l roztworu A (opisanego poniżej) z dodatkiem 6 M mocznika (pH = 2,2 uzyskane poprzez dodatek TFA) [29]. Końcowe stężenie liofilizatu wynosiło 3 mg/ml. Analizę metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (RP-HPLC) prowadzono przy użyciu zestawu firmy Shimadzu składającego się z dwóch pomp LC-10AD, autosamplera SCL-10AD, kontrolera SCL-10AD, termostatu do kolumn CTO-10AS i detektora fotodiodowego SPD-M10AW. Zastosowano kolumnę Jupiter C₁₈ (Phenomenex) o wymiarach 250 $\times$ 2,0 mm, średnicy ziaren 5 μ m i średnicy porów 300 Å. Do sterowania urządzeniem, przechowywania i przetwarzania danych zastosowano program Class-Vp 5.03 (Shimadzu). Analizy wykonywano w układzie dwóch rozpuszczalników A (ACN : H₂O : TFA; 100:900:1 v/v/v) oraz B (ACN : H₂O : TFA; 900:100:0,7 v/v/v) [29]. Do analizy stosowano następujący gradient: 10 % roztworu B w chwili startu, 30 % B po 10 min i 45 % B po 50 min. Po zakończeniu analizy stosowano następującą sekwencję płukania i równoważenia kolumny: 80 % B po 53 min, 80 % B po 58 min, 10 % B po 60 min i 10 % B po 80 min. Szybkość przepływu wynosiła 0,2 ml/min, objętość iniekcji – 50 μ l, a czas rejestracji danych – 65 min. Rejestracji danych pozyskiwanych co 1 nm dokonywano w zakresie długości fal 190 - 300 nm. W przypadku frakcji o określonym czasie retencji wyznaczano i analizowano widma UV oraz ich czwarte pochodne. Przebieg linii bazowej był obliczany automatycznie. Jako widmo tła stosowano widmo rozpuszczalnika (przy t = 0 min). Widmo to było automatycznie odejmowane od widma wierzchołka frakcji. Do opisu pochodnych widm UV kazeiny- β i składników jej hydrolizatu zastosowano parametry X, Y, Z, T [11] oraz W (nowy parametr) zdefiniowane w równaniach:

$$X = [(d^2A/d\lambda^2)_{283} - (d^2A/d\lambda^2)_{276}] / [(d^2A/d\lambda^2)_{288} - (d^2A/d\lambda^2)_{283}] \quad (1)$$

$$Y = [(d^2A/d\lambda^2)_{295} - (d^2A/d\lambda^2)_{290}] / [(d^2A/d\lambda^2)_{288} - (d^2A/d\lambda^2)_{283}] \quad (2)$$

$$Z = [(d^4A/d\lambda^4)_{284} - (d^4A/d\lambda^4)_{280}] / [(d^4A/d\lambda^4)_{291} - (d^4A/d\lambda^4)_{288}] \quad (3)$$

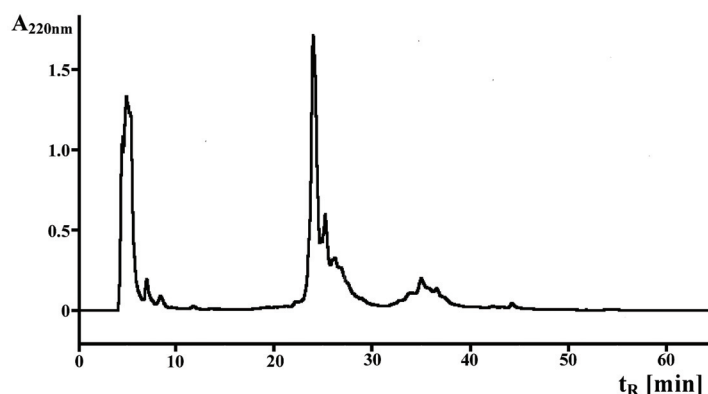
$$T = [(d^4A/d\lambda^4)_{291} - (d^4A/d\lambda^4)_{295}] / [(d^4A/d\lambda^4)_{291} - (d^4A/d\lambda^4)_{288}] \quad (4)$$

$$W = (d^4A/d\lambda^4)_{295} / (d^4A/d\lambda^4)_{291} \quad (5)$$

Statystyczną istotność różnic między wartościami średnimi poszczególnych parametrów permeatu oraz kazeiny- β , osadu i retentatu weryfikowano za pomocą testu t-Studenta (Statistica 8.0; StatSoft Inc.).

Wyniki i dyskusja

Przykładowy chromatogram permeatu zawierającego fragmenty kazeiny- β o małej masie cząsteczkowej przedstawiono na rys. 1. Piki o czasach retencji między 30 i 40 min odpowiadają proteozo-peptonom: PP5 (f 1-105/107) i PP8S (f 29-105/107), które są głównymi składnikami retentatu [10]. We frakcji permeatu wymienione polipeptydy stanowiły zanieczyszczenie. Czasy retencji kazeiny- β niepoddanej hydrolizie oraz osadu, oznaczane metodą RP-HPLC, są dłuższe niż czas retencji permeatu [6, 7, 10]. Gradient acetonitrylu stosowany w poprzednich eksperymentach [6, 7, 10] nie pozwalał na analizę niskocząsteczkowej frakcji hydrolizatu. Frakcja o najkrótszych czasach retencji zawierała wówczas składniki retentatu.

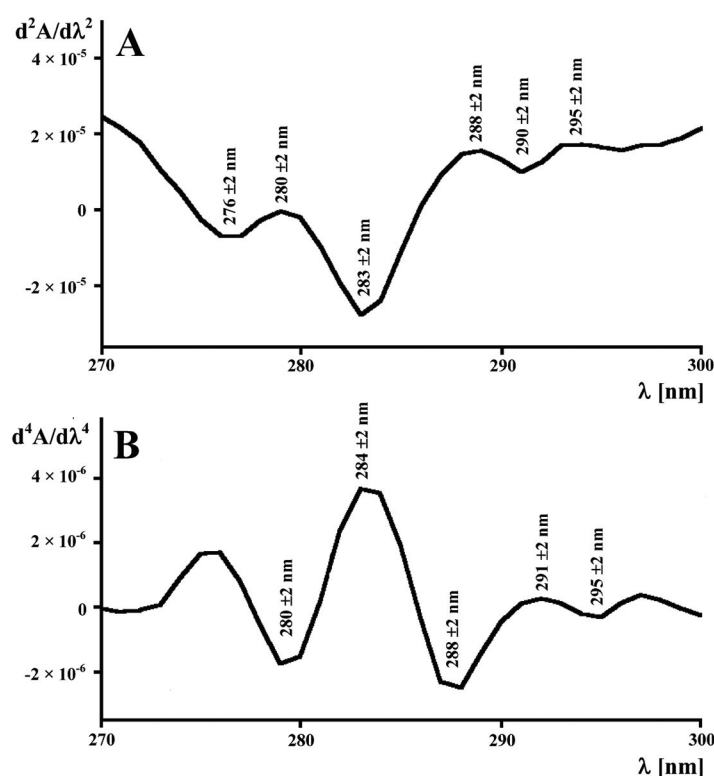


Rys. 1. Chromatogram niskocząsteczkowej frakcji hydrolizatu kazeiny- β otrzymanego po działaniu plazminy (permeatu). Analizowano widmo najwyższego piku ($t_R = 23,8$ min).

Fig. 1. Chromatogram of low-molecular weight fraction of β -casein plasmin-released hydrolysate (permeate). The spectrum of the highest peak ($t_R = 23.8$ min) was analyzed.

Przykładowe pochodne widm UV niskocząsteczkowych produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę przedstawiono na rys. 2. Zakres 270 - 300 nm jest polecany do identyfikacji analizowanych substancji, ponieważ widmo w tym zakresie nie zmienia się wraz z zawartością acetonitrylu i TFA [11, 25]. W tym zakresie można porównywać widma otrzymane za pomocą różnych gradientów stężenia acetonitrylu oraz

zmiennego składu fazy ruchomej. Kształt pochodnych widm UV wskazywał na obecność tyrozyny i tryptofanu w próbce. O obecności tryptofanu świadczyła obecność minimum przy długości fali 290 ± 2 nm w drugiej pochodnej widma UV oraz maksimum przy długości fali 291 ± 2 nm w czwartej pochodnej widma. Wymienione ekstrema nie występują w pochodnych widm peptydów, które nie zawierają tego aminokwasu [10, 25]. O obecności tyrozyny świadczyło minimum przy długości fali 283 ± 2 nm w drugiej pochodnej widma UV oraz maksimum przy długości fali 284 ± 2 nm w czwartej pochodnej widma [25].



Rys. 2. Pochodne widm UV niskocząsteczkowej frakcji produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę odnoszące się do wierzchołka najwyższego piku na chromatogramie (rys. 1): A) druga pochodna widma UV; B) czwarta pochodna widma UV. Na rysunku zaznaczono długości fali odpowiadające wartościom drugim i czwartym pochodnym widm wykorzystanym do obliczania parametrów ilościowych charakteryzujących widma (p. Materiał i metody badań).

Fig. 2. Derivatives of UV spectra of low-molecular weight fraction of β -casein plasmin hydrolysate referring to the apex of the highest peak at the chromatogram (Fig. 1.): A) the second derivative of UV spectrum; B) the fourth derivative of UV spectrum. IN this Fig., there are marked the wavelengths corresponding to the values of the second and fourth derivatives of spectra applied to calculate quantitative parameters that characterise spectra (vide Section 'Materials and Research Methods').

W efekcie analizy metodą spektrometrii mas (jonizacja za pomocą desorpcji laserowej w matrycy MALDI-MS) zidentyfikowano we frakcji permeatu peptydy pozbawione aminokwasów aromatycznych (fragmenty 1-28, 106-113 oraz 170-176 kazeiny- β) [10]. Jednak wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że permeat zawierał peptydy, których nie udało się wykryć i zidentyfikować tą metodą. Taki rezultat może być wyjaśniony na podstawie wniosków, które przedstawili Mallick i wsp. [23]. Wymienieni autorzy stwierdzili, że za pomocą różnych typów spektrometrów masowych (MALDI bądź spektrometrii mas z jonizacją za pomocą elektrorozpylania – ESI-MS), można wykryć różne zestawy peptydów w tej samej próbce, ale nie istnieje technika jonizacji gwarantująca identyfikację wszystkich składników dowolnej mieszaniny peptydów. Prawdopodobnie część peptydów zawartych w permeacie jest trudna do wykrycia za pomocą MALDI-MS. Chociaż spektrometria mas jest obecnie podstawową metodą identyfikacji peptydów (m.in. pochodzących z żywności) [1], to może być uzupełniona innymi metodami identyfikacji, takimi jak spektroskopia UV, mimo że ta ostatnia nie pozwala na identyfikację poszczególnych peptydów wchodzących w skład badanej frakcji.

Wartości poszczególnych parametrów charakteryzujących pochodne widm UV poszczególnych frakcji hydrolizatu kazeiny- β , a także białka niepoddanego hydrolizie przedstawiono w tab. 1. Wartości parametrów X, Y, Z i T permeatu są najbardziej zbliżone do analogicznych wartości uzyskanych we wcześniejszym eksperymencie [11] w przypadku kazeiny- κ , co sugeruje, że permeat będący mieszaniną peptydów charakteryzuje się stosunkiem zawartości Trp/Tyr zbliżonym do stosunku zawartości tych aminokwasów w powyższym białku. Wartość parametru W rośnie wraz ze stosunkiem Trp/Tyr. Najniższą wartość tego parametru wykazuje frakcja retentatu składająca się z polipeptydów niezawierających tryptofanu [6, 7, 10], natomiast najwyższą – frakcja osadu, w której stosunek Trp/Tyr wynosi 1/3. Wartość parametru W permeatu sugeruje małą zawartość tryptofanu.

Statystyczna istotność różnic pomiędzy wartościami parametrów X, Y, Z, T i W frakcji niskocząsteczkowych produktów hydrolizy kazeiny- β i wartościami powyższych parametrów innych badanych frakcji przedstawiono w tab. 2. Z przedstawionych danych wynika, że zastosowanie parametrów Y, Z, T i W pozwala na rozróżnienie widm UV poszczególnych frakcji plazminowego hydrolizatu kazeiny- β przy wyższym poziomie istotności statystycznej różnic niż zastosowanie parametru X. Strategia poszukiwania sposobów interpretacji widm UV powinna obejmować porównanie różnych algorytmów i wyboru najkorzystniejszego z nich. W niniejszej pracy użytym kryterium jest statystyczna istotność różnicy między wartościami poszczególnych parametrów charakteryzujących widma różnych frakcji hydrolizatu. Niniejsze wyniki są potwierdzeniem wcześniejszych rezultatów opisujących możliwość identyfikacji białek i peptydów rozdzielanych za pomocą RP-HPLC na podstawie pochodnych ich widm

Tabela 1

Wartości parametrów charakteryzujących drugie i czwarte pochodne widm UV (X, Y, Z, T, W) odnoszące się do permeatu zawierającego niskocząsteczkowe produkty hydrolizy kazeiny- β przez plazminę, a także osadu i retentatu oraz kazeiny- β niepoddanej hydrolizie.

Values of parameters to characterise the second and fourth derivatives of UV spectra (X, Y, Z, T, W) referring to the permeate containing low-molecular weight products of β -casein plasmin hydrolysate as well as to the sediment and retentate, and intact (non-hydrolyzed) β -casein.

Próbka / Sample	X $\pm$ s / SD	Y $\pm$ s / SD	Z $\pm$ s / SD	T $\pm$ s / SD	W $\pm$ s / SD
Permeat / Permeate n = 4	0,1701 $\pm$ 0,1211	0,2934 $\pm$ 0,0349	1,7073 $\pm$ 0,1749	0,2376 $\pm$ 0,1998	-0,0541 $\pm$ 0,1470
Kazeina- β / β -Casein n = 9	0,1117 $\pm$ 0,0326 ^a	0,7383 $\pm$ 0,0786 ^a	0,9332 $\pm$ 0,0986 ^a	0,8006 $\pm$ 0,0576 ^a	0,5708 $\pm$ 0,0079 ^b
Osad / Sediment n = 9	0,0618 $\pm$ 0,0864 ^a	0,9546 $\pm$ 0,0318 ^a	0,6795 $\pm$ 0,0287 ^a	0,8582 $\pm$ 0,026 ^a	0,7454 $\pm$ 0,0049 ^b
Retentat / Retentate n = 12	0,3177 $\pm$ 0,0533 ^a	-0,3709 $\pm$ 0,1327 ^a	5,8909 $\pm$ 0,9579 ^a	-3,2379 $\pm$ 0,5224 ^a	-0,2238 $\pm$ 0,0377 ^b

Objaśnienia: / Explanatory notes:

n – liczba pomiarów / number of measurements; s / SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

^a – dane z publikacji Dziuby i wsp. [10] / data from the paper by Dziuba and co-authors [10]; ^b – obliczone na podstawie danych uzyskanych w wyniku eksperymentu opisanego w pracy Dziuby i wsp. [10] / Calculated based on the data resulting from the experiment as described by Dziuba and co-authors [10].

Tabela 2

Wyniki statystycznej istotności różnic między parametrami X, Y, Z, T, W odnoszące się do kazeiny- β i składników jej hydrolizatu otrzymanego w wyniku działania plazminy.

Results of statistical significance of the differences between X, Y, Z, T, W parameters; those results refer to the β -casein and components of its plasmin-released hydrolysate.

Próbka Sample	Permeat Permeate	Kazeina- β β -Casein	Osad Sediment	Retentat Retentate
Permeat Permeate	–	X Y**** Z**** T**** W***	X Y**** Z**** T**** W****	X**** Y**** Z**** T**** W*
Kazeina- β β -Casein	X Y**** Z**** T**** W***	–	X**** Y**** Z**** T** W****	X**** Y**** Z**** T**** W****
Osad Sediment	X Y**** Z**** T**** W****	X**** Y**** Z**** T** W****	–	X**** Y**** Z**** T**** W****
Retentat Retentate	X**** Y**** Z**** T**** W*	X**** Y**** Z**** T**** W****	X**** Y**** Z**** T**** W****	–

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Różnice statystycznie istotne przy: * p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,01; **** p < 0,001 / Statistically significant differences at: * p < 0.05; ** p < 0.02; *** p < 0.01; **** p < 0.001.

w nadfiolecie [6, 7, 9, 10, 11, 25]. Ograniczeniem opisywanej metody jest konieczność stosowania do interpretacji pochodnych widm UV parametrów, które nie są uwzględnione w programie oferowanym przez producenta, a także możliwa zmiana wartości parametrów w zależności od programu użytego do obliczeń [25].

Podsumowanie

Podjęte w niniejszej pracy badania dotyczyły możliwości zarekomendowania parametrów spektroskopowych umożliwiających identyfikację kazeiny- β i składników jej hydrolizatu powstałych po działaniu plazminy. Uzyskane wyniki wskazują, że identyfikacja kazeiny- β i jej fragmentów peptydowych na podstawie parametrów spektroskopowych, charakteryzujących czwarte pochodne widm, jest korzystniejsza niż identyfikacja białek/hydrolizatów/peptydów tylko na podstawie czasów retencji.

Drugie i czwarte pochodne widm UV mogą służyć do rozróżniania poszczególnych produktów hydrolizy bydlęcej kazeiny- β przez plazminę różniących się stosunkiem zawartości tryptofanu do zawartości tyrozyny. Spektroskopia UV nie pozwala na identyfikację poszczególnych peptydów wchodzących w skład niskocząsteczkowej frakcji produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę, ale może służyć jako uzupełnienie spektrometrii mas.

Niniejsza praca była finansowana w ramach tematu statutowego UWM w Olsztynie nr 528-0712-809.

Literatura

- [1] Contreras M.D.M., López-Expósito I., Hernández-Ledesma B., Ramos M., Recio I.: Application of mass spectrometry to the characterization and quantification of food-derived bioactive peptides. *J. AOAC Int.*, 2008, **91**, 981-994.
- [2] Darewicz M., Dziuba B., Minkiewicz P., Dziuba J.: The preventive potential of milk and colostrum proteins and protein fragments. *Food Rev. Int.*, 2011, **27**, 357-388.
- [3] Darewicz M., Dziuba J.: Struktura a właściwości funkcjonalne białek mleka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2 (43)**, 47-60.
- [4] Darewicz M., Dziuba J., Caessens P.W.J.R., Gruppen H.: Dephosphorylation-induced structural changes in β -casein and its amphiphilic fragment in relation to emulsion properties. *Biochimie*, 2000, **82**, 191-195.
- [5] Darewicz M., Dziuba J., Dziuba M.: Functional properties and biological activities of bovine casein proteins and peptides. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2006, **15/56 (Suppl. 1)**, 79-86.
- [6] Darewicz M., Dziuba J., Minkiewicz P., Panfil T.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography on-line with the second derivative ultraviolet spectroscopy as a tool for the identification of β -casein. *Milchwissenschaft*, 2005, **60**, 14-17.
- [7] Darewicz M., Dziuba J., Panfil T.: Application of the second derivatives of UV spectra for the identification of β -casein hydrolysate components. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, 127-132.

- [8] Dickinson E.: Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 305-312.
- [9] Dziuba J., Darewicz M., Minkiewicz P., Dziuba B.: Milk Proteins. In: *Handbook of Dairy Foods Analysis*. Nollet L., Toldrá F., Eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London 2010, pp. 79-107.
- [10] Dziuba J., Darewicz M., Minkiewicz P., Panfil T.: Application of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on-line with the second and fourth derivatives UV spectroscopy in identification of β -casein and its peptide fractions. *Milchwissenschaft*, 2002, **57**, 497-502.
- [11] Dziuba J., Nałęcz D., Minkiewicz P.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography on-line with the second and fourth derivative ultraviolet spectroscopy as a tool for identification of milk proteins. *Anal. Chim. Acta*, 2001, **449**, 243-252.
- [12] Dziuba M., Dziuba B.: Bazy danych białek i bioaktywnych peptydów BIOPEP. W: *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. Red. J. Dziuba J., Ł. Fornal. WNT, Warszawa, 2009, ss. 141-175.
- [13] Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Swaisgood H.E.: Nomenclature of the proteins of cow's milk - sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 1641-1674.
- [14] Fox P.F., Law J.: Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnol.*, 1991, **5**, 239-262.
- [15] Fox P.F., Stepaniak L.: Enzymes in cheese technology. *Int. Dairy J.*, 1993, **3**, 509-530.
- [16] Imafiodon G.I., Farkye N.Y., Spanier A.M.: Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1997, **7**, 663-689.
- [17] Ismail B., Nielsen S.S.: Plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry. *J. Dairy Sci.*, 2010, **93**, 4999-5009.
- [18] Iwaniak A., Dziuba J.: Bioaktywne sekwencje w białkach żywności. W: *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. Red. J. Dziuba i Ł. Fornal. WNT, Warszawa, 2009, ss. 176-270.
- [19] Jain E., Bairoch A., Duvaud S., Phan I., Redaschi N., Suzek B.E., Martin M.J., McGarvey P., Gasteiger E.: Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinform.*, 2009, **10**, Article no. 136.
- [20] Kim Y., Atalla H., Mallard B., Robert C., Karrow N.: Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Res.*, 2011, **7**, Article no. 51.
- [21] Mach H., Arvinte T.: Addressing new analytical challenges in protein formulation development. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, 2011, **78**, 196-207.
- [22] Mach H., Middaugh C.R.: Ultraviolet spectroscopy as a tool in therapeutic protein development. *J. Pharm. Sci.*, 2011, **100**, 1214-1227.
- [23] Mallick P., Schirle M., Chen S.S., Flory M.R., Martin D., Ranish J., Raught B., Schmitt R., Werner T., Kuster B., Aebersold R.: Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nature Biotechnol.*, 2007, **25**, 125-131.
- [24] Mari A., Rasi C., Palazzo P., Scala E.: Allergen databases: current status and perspectives. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2009, **9**, 376-383.
- [25] Minkiewicz P., Dziuba J., Darewicz M., Nałęcz D.: Application of high-performance liquid chromatography on-line with ultraviolet/visible spectroscopy in food science. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2006, **15/56 (Suppl. 1)**, 145-153.
- [26] Minkiewicz P., Dziuba J., Gładkowska-Balewicz I.: Update of the list of allergenic proteins from milk based on local amino acid sequence identity with known epitopes from bovine milk proteins – a short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2011, **61**, 153-158.

- [27] Minkiewicz P., Dziuba J., Iwaniak A., Dziuba M., Darewicz M.: BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J. AOAC Int.*, 2008, **91**, 965-980.
- [28] Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A.: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 2010, **38**, D227-D233.
- [29] Visser S., Slangen C.J., Rollema H.S.: Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1991, **548**, 361-370
- [30] Wong D.W.S., Camirand W.M., Pavlath A.E. Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1996, **36**, 807-844.

APPLICATION OF SECOND AND FOURTH DERIVATIVES OF UV SPECTRA TO IDENTIFY LOW MOLECULAR WEIGHT PRODUCTS OF β -CASEIN HYDROLYSIS BY PLASMIN

S u m m a r y

The objective of the present research study was to develop a method to identify low-molecular weight fraction of bovine β -casein hydrolysis products by plasmin using a reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method on-line with an ultraviolet (UV) spectroscopy method. The bovine β -casein was hydrolysed by the plasmin. The supernatant left over after the precipitation of hydrolysate was separated *via* ultra-filtration into a retentate containing polypeptides and a permeate containing low molecular weight peptides. To identify the fraction of permeate, those parameters were used, which quantitatively characterised the second and fourth derivatives of UV spectra. The shape of the permeate derivatives indicated the presence of low amounts of tryptophane, which was not detected when using a mass spectrometry method. The values of parameters characterising the derivatives of UV spectra of low-molecular weight fraction of β -casein hydrolysate differ significantly (from $P < 0.05$ to $P < 0.001$) from the analogous parameters determined in respect to the derivatives of spectra of other fractions of hydrolysate and from the derivatives of spectra of intact (non-hydrolyzed) protein. Using the UV spectroscopy method, it is possible to identify the low-molecular weight fraction of β -casein hydrolysate.

Key words: β -casein, peptides, plasmin, UV spectroscopy, reversed-phase high-performance liquid chromatography 

ANETA BRODZIAK

WŁAŚCIWOŚCI ŻELUJĄCE I TEKSTURA ŻELI OTRZYMANYCH Z BIAŁEK SERWATKOWYCH POCHODZĄCYCH Z MLEKA KRÓW RÓŻNYCH RAS

Streszczenie

Celem podjętych badań było określenie wpływu pochodzenia mleka (rasa krów) i rodzaju zastosowanej soli (jony wapnia i sodu) na wybrane właściwości funkcjonalne białek serwatkowych, istotne w produkcji artykułów żywnościowych. Szczególną uwagę zwrócono na właściwości reologiczne (w tym właściwości żelujące i teksturę żeli – twardość, przylegalność i spójność), decydujące o przydatności białek serwatkowych jako składnika dodatkowego w produktach mlecznych oraz w dużym stopniu wpływające na wybór dokonywany przez konsumentów.

Oznaczono podstawowy skład chemiczny (zawartość białka ogólnego, tłuszczu, laktozy i suchej masy) oraz stężenie wybranych białek serwatkowych w serwatce, a następnie w permeatach i retentatach uzyskanych metodą mikro- i ultrafiltracji z poszczególnych etapów separacji i zagęszczenia roztworów białek serwatkowych. Twardość, przylegalność i spójność otrzymanych żeli określono w profilowej analizie tekstury, natomiast właściwości mechaniczne (wartości modułu zachowawczego i stratności oraz lepkość pozorną) zbadano stosując reometrię oscylacyjną. Wykazano różnice w wartościach analizowanych parametrów tekstury w zależności od rasy krów, od których pochodziło mleko. Żele z białek serwatkowych mleka krów rasy jersey, w porównaniu z białkami mleka krów polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, charakteryzowały się mniejszą twardością i przylegalnością oraz większą spójnością. Pochodzenie mleka związane z rasą krów i rodzaj użytej soli wpływały na wartości modułu zachowawczego i stratności analizowanych żeli białek serwatkowych.

Słowa kluczowe: białka serwatkowe, właściwości żelujące, tekstura żeli

Wprowadzenie

Serwatka, uboczny produkt w przemyśle mleczarskim przy produkcji serów, traktowana była dawniej jako odpad zanieczyszczający środowisko. W rzeczywistości stanowi ona jednak źródło cennych niewykorzystanych w pełni składników funkcjonalnych, w tym szczególnie bioaktywnych białek serwatkowych, o korzystnym udo-

kumentowanym oddziaływaniu na organizm człowieka [10, 13-16, 19, 20]. W Polsce w roku 2010 jej produkcja wyniosła 1,1 mln ton przy produkcji mleka towarowego – 8,7 mln ton [11, 22]. Dopiero od niedawna przemysł mleczarski dysponuje metodami umożliwiającymi pełniejsze zagospodarowanie serwatki lub poszczególnych białek z niej wyodrębnionych, np. przez filtrację membranową, wymianę jonową czy elektrodializę. Optymalne zagospodarowanie tych składników w istotny sposób wpływa na zmniejszenie kosztów produkcji serów i koncentratów z mleka. Rozwiązanie takie przyczynia się do zwiększenia opłacalności produkcji oraz zmniejszenia zagrożenia ekologicznego. Dodatek białek serwatkowych do żywności wpływa na wzbogacenie jej walorów żywieniowych i sensorycznych, a także właściwości funkcjonalnych i jest szczególnie istotnym wyróżnikiem jej jakości. Wpływa także na wzrost akceptacji konsumenckiej produktów [26, 29]. Obecnie uważa się, że zdolność do tworzenia żeli jest najważniejszą właściwością funkcjonalną białek serwatkowych. Znajduje zastosowanie w kształtowaniu pożądanej tekstury produktu żywnościowego, poprawia wodochłonność, a także zapobiega synerezie. W matrycy żelu zatrzymywane są i unieruchamiane cząsteczki wody i innych składników żywności [20].

Celem podjętych badań było określenie wpływu pochodzenia mleka (rasa krów) i rodzaju zastosowanej soli (jony wapnia i sodu) na wybrane właściwości funkcjonalne białek serwatkowych istotne w produkcji artykułów żywnościowych. Szczególną uwagę zwrócono na właściwości reologiczne (w tym właściwości żelujące i teksturę żeli – twardość, przylegalność i spójność), decydujące o przydatności białek serwatkowych jako składnika strukturalnego w produktach mlecznych.

Materiały i metody badań

Badaniami objęto reprezentatywne próbki mleka zbiorczego pozyskane od krów dwóch typowo mlecznych ras, tj. polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej (phf cb) i jersey. W celu oznaczenia podstawowych parametrów fizykochemicznych serwatki, separacji i zagęszczenia białek serwatkowych oraz zbadania ich właściwości żelujących, próbki mleka pobierano trzykrotnie (zgodnie z AOAC [2]), o objętości 25 dm³ każda. Bezpośrednio po dostarczeniu do laboratorium Katedry Towaroznawstwa i Przetwórstwa Surowców Zwierzęcych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie prowadzono oddzielnie enzymatyczną koagulację kazein za pomocą podpuszczki. Mleko odtłuszczano (wirując w temp. 4 °C przez 10 min przy 16000 × g), a następnie podgrzewano do temp. 30 - 32 °C w łaźni wodnej. Podpuszczkę (0,66 g·100 cm⁻³; Fromase ® 220TL Granulate, DSM Food Specialities, Francja) dodawano w ilości 0,25 cm³·25 cm⁻³ mleka. Uzyskaną serwatkę utrwalano 30 % perhydrolem (POCh, Polska), uzyskując stężenie 0,1 %, a następnie przechowywano w temp. 4 - 6 °C do momentu analizy oraz separacji i zagęszczania.

Oznaczano podstawowy skład chemiczny, tj. zawartość białka ogólnego, tłuszczu, laktozy i suchej masy, przy zastosowaniu Infrared Milk Analyzer (Bentley Instruments, USA) oraz pH (pH-metrem firmy Elmetron CP-401, Polska). W celu określenia stężenia wybranych białek serwatkowych, tj. α -laktoalbuminy (α -La) i β -laktoglobuliny (β -Lg), stosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (chromatograf cieczowy ProStar 210, detektor UV-Vis ProStar 325 oraz kolumna Nucleosil 300-5 C18 – Varian, USA). Wszystkie próbki przygotowywano metodą opracowaną przez Romero i wsp. [25] z modyfikacjami. Zawartość składników mineralnych, tj. Ca i Na oznaczano techniką płomieniową atomowej spektrometrii absorpcyjnej z wykorzystaniem spektrometru SpectrAA280FZ (Varian, USA) w Centralnym Laboratorium Analitycznym Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Separację i zagęszczanie serwatki podpuszczkowej prowadzono w laboratorium Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Do filtracji serwatki stosowano instalację pilotową do filtracji membranowej TMI16 (J.A.M. Inox Produkt, Kalisz, Polska). W pierwszym etapie przeprowadzano mikrofiltrację przez membranę ceramiczną o wielkości porów 1,4 μm . W ten sposób z prób odseparowywano tłuszcz i mikroorganizmy. Następnie dokonywano mikrofiltracji, stosując membranę 0,14 μm w celu oddzielenia cząsteczek kazeiny (Tami Industries, Intermasz, Września, Polska). Procesy prowadzono w temp. około 20 °C. Po każdym z procesów, jak również w przypadku znacznego zmniejszenia się wydajności, przeprowadzano procedurę mycia i regeneracji membran zgodnie z instrukcją obsługi wydaną przez producenta.

Uzyskany permeat poddawano ultrafiltracji przy zastosowaniu zestawu ultrafiltracyjnego Vivaflow 50 wyposażonego w membranę 10000 Da (MWCO) z polietersulfonu (Sartorius Spedim Biotech GmbH, Kostrzyń, Polska). Regeneracji membran również dokonywano zgodnie z instrukcją obsługi wydaną przez producenta.

Otrzymywane retentaty białek serwatkowych stosowano do sporządzenia roztworów o stężeniu białka 6 % w wodzie destylowanej (w powtórzeniu), poprzez mieszanie za pomocą mieszadła magnetycznego Heidolph MR 3002S (Schwabach, Niemcy) przez 30 min. Natomiast roztwory sporządzone w 0,05 M CaCl_2 i 0,2 M NaCl zawierały 12,46 % białka – z mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej i 12,58% – z mleka krów rasy jersey. Wartość pH przygotowanych roztworów doprowadzano do 7,0 za pomocą 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH i 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl (POCH, Polska). Roztwory (40 cm^3) rozlewano do zlewek i ogrzewano przez 45 min w łaźni wodnej w temp. 80 °C w celu rozfałdowania białek serwatkowych i ekspozycji grup tiolowych [3]. Próbki przygotowane w CaCl_2 i NaCl ulegały procesowi żelowania „na gorąco”. Natomiast do próbek sporządzonych w wodzie destylowanej, schłodzonych do temperatury pokojowej, dodawano odpowiednio stężony roztwór CaCl_2 lub NaCl,

inicjując w ten sposób żelowanie „na zimno”. Sporządzane żele przechowywano w zamkniętych naczyniach przez około 20 h w temp. 4 - 6 °C.

Twardość, przylegalność i spójność żeli indukowanych ogrzewaniem określano w profilowej analizie tekstury żeli wg modyfikacji Bonczar i wsp. [4]. Pomiarów dokonywano za pomocą teksturometru TA-XT2i (Stable Microsystems, Goaldming, Wielka Brytania) w temp. 20 ± 1 °C. Stosowano próbnik cylindryczny o średnicy 15 mm, zanurzany dwukrotnie sekwencyjnie na głębokość 15 mm przy prędkości przesuwu głowicy analizatora $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ z siłą 0,98 N. Zanurzenia przedzielano fazą relaksacyjną trwającą 30 s. Uzyskane wyniki rejestrowano w programie Texture Expert ver. 1.22. Badania przeprowadzano w trzech powtórzeniach.

Właściwości mechaniczne żeli indukowanych jonami sodu i wapnia badano za pomocą reometru dynamicznego Haake RS 300 (Haake, Karlsruhe, Niemcy). Pomiarów prowadzono w układzie płytka-płytkę z użyciem płytek ząbkowanych o średnicy 35 mm i szczelinie 1mm, w temp. 20 ± 1 °C. W badaniach z zakresu reologii oscylacyjnej wykonywano analizy spektrów mechanicznych przy częstotliwości drgań od 0,1 do 100 Hz i odkształceniu 0,1 %. Lepkość pozorną określano przy gradiencie prędkości 20 s^{-1} przez 120 s. Uzyskane wartości modułu zachowawczego i modułu stratności oraz lepkości pozornej rejestrowano w programie RheoWin. Wszystkie badania powtórzono trzykrotnie.

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie StatSoft Inc. (Statistica ver. 6, 2003). Dane przedstawiono jako wartość średnią poszczególnych cech $\pm$ błąd standardowy średniej.

Wyniki i dyskusja

Zgodnie z koncepcją żywności funkcjonalnej, oceniając właściwości funkcjonalne białek serwatkowych, nie należy pomijać właściwości odżywczych, o których decyduje zawartość podstawowych składników. Zawartość białka ogólnego i laktozy w suchej masie retentatu uzyskanego z ultrafiltracji wynosiła, odpowiednio: 71 i 25 % – z mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej oraz 72 i 24 % – z mleka krów rasy jersey. Ze względu na niepełny proces izolacji białek serwatkowych, otrzymane retentaty poultrafiltracyjne stanowiły bardziej koncentraty, a nie izolaty, czego efektem może być trudniejsza interpretacja uzyskanych wyników.

Analizując skład chemiczny próbek otrzymanych w trakcie kolejnych etapów filtracji (tab. 1) stwierdzono, że największym zmianom ulegała zawartość białka, w tym również głównych białek serwatkowych, tj. α -La i β -Lg. Ultrafiltracja z zastosowaniem membrany oddzielającej cząsteczki o wielkości 10000 Da powinna spowodować zatrzymanie ich w retentacie. Jak przewidywano, zawartość tych białek w retentatach poultrafiltracyjnych, w porównaniu z serwatką wytworzoną z mleka, okazała się większa, odpowiednio o: α -La – $1,17 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ i β -Lg – $4,91 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w przypadku mleka krów

rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej oraz α -La – $1,27 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ i β -Lg – $5,21 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w odniesieniu do mleka krów rasy jersey. W związku z uzyskaniem poziomu czystości roztworów otrzymanie wyższego stężenia omawianych białek w retentacie z ultrafiltracji nie było możliwe. Należy jednak zaznaczyć, że wykazano statystycznie istotnie ($p \leq 0,01$) większą zawartość β -laktoglobuliny w retentacie poultrafiltracyjnym uzyskanym z mleka krów rasy jersey. Potwierdzeniem tego są uzyskane stosunki α -La do β -Lg. Większa koncentracja głównych białek serwatkowych, a zwłaszcza β -laktoglobuliny, w serwatce i retentacie poultrafiltracyjnym uzyskanym z mleka krów rasy jersey potencjalnie może mieć wpływ na poprawę właściwości żelujących roztworów białek serwatkowych. Spośród białek serwatkowych, β -laktoglobulina wyróżnia się bowiem najlepszą zdolnością do żelowania. Natywna α -laktoalbumina wykazuje natomiast słabą zdolność do tworzenia żeli. Istnieje jednak możliwość jej poprawy poprzez niewielki dodatek β -laktoglobuliny lub BSA [17]. Przy niewielkich stężeniach białka agregacja powoduje jedynie wzrost lepkości roztworu.

Przed przystąpieniem do procesu żelowania pH retentatów poultrafiltracyjnych doprowadzano do wartości około 7,0: pH próbek pochodzących z mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej wyniosło 7,08, a z jersey – 6,95. Środowisko o pH zbliżonym do wartości punktu izoelektrycznego warunkowałoby powstawanie kleikowatych i mętnych lub o małej zwięzłości i elastyczności żeli białek serwatkowych, podatnych na synerезę. Obserwując przebieg procesu żelowania stwierdzono, że próbki przygotowane w roztworach soli i ogrzewane w łaźni wodnej w temp. 80°C uległy żelowaniu w ciągu 45 min, przy czym proces ten przebiegał najwolniej w roztworach białek serwatkowych, z mleka krów rasy jersey, z dodatkiem NaCl. Żel ten był również najmniej zwięzły po wyjęciu z naczynia. Wszystkie otrzymane żele były nieprzezroczyste.

Hongsprabhas i Barbut [9] wykazali, że zwiększenie stężenia białek serwatkowych (z 6 do 10 %), jak również CaCl_2 (z 5 do 150 mM) wpływało istotnie na wzrost siły żelowania.

Przeprowadzona analiza tekstury umożliwiła wykazanie wpływu rodzaju soli, z uwzględnieniem od rasy krów, od których pochodziło mleko, na wybrane parametry, tj. twardość, przylegalność i spójność żeli (rys. 1 - 3). Porównując wyniki oznaczeń twardości żeli stwierdzono większą wartość tego parametru w przypadku żeli utworzonych z roztworów białek serwatkowych otrzymanych z mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej – średnio 1,30 N, niezależnie od rodzaju soli. Najmniej twarde (0,26 N) okazał się żel z roztworu białek serwatkowych z mleka krów rasy jersey z dodatkiem CaCl_2 .

T a b e l a 1

Wartość pH, podstawowy skład chemiczny oraz zawartość wybranych białek serwatkowych i pierwiastków w poszczególnych próbkach podczas procesów filtracyjnych.

pH value, basic chemical composition, and content of selected whey proteins and elements in individual samples during filtration process.

Próbka Sample	Rasa krów Breed of cows	pH	Białko ogólne Total protein [%]	Tłuszcz Fat [%]	Laktoza Lactose [%]	Sucha masa Dry matter [%]	α -La [g·dm ⁻³]	β -Lg [g·dm ⁻³]	α -La/ β -Lg	Na [mg·dm ⁻³]	Ca [mg·dm ⁻³]
Serwatka Whey	Phf cb	6,30 ± 0,01	1,43 ± 0,01 ^A	0,05 ± 0,01	4,27 ± 0,02	6,63 ± 0,05	0,95 ± 0,01	2,87 ± 0,01	0,319 ± 0,004	403,5 ± 24,3 ^b	518,6 ± 24,4 ^a
	Jersey	6,34 ± 0,01	1,66 ± 0,01 ^B	0,06 ± 0,01	4,33 ± 0,03	6,72 ± 0,05	0,99 ± 0,01	3,06 ± 0,03	0,323 ± 0,003	315,1 ± 20,1 ^a	594,7 ± 17,8 ^b
Permeat z mikrofiltracji Permeate from micro-filtration	Phf cb	6,57 ± 0,08	1,91 ± 0,14 ^B	0,00	4,40 ± 0,06	6,73 ± 0,11 ^a	0,94 ± 0,01	2,91 ± 0,02 ^a	0,325 ± 0,005	431,5 ± 24,3	518,6 ± 24,4
	Jersey	6,52 ± 0,10	1,67 ± 0,09 ^A	0,00	4,33 ± 0,05	6,92 ± 0,09 ^b	0,99 ± 0,02	3,02 ± 0,04 ^b	0,328 ± 0,004	345,1 ± 20,1	594,7 ± 17,8
Retentat z ultrafiltracji Retentate from ultra-filtration	Phf cb	6,44 ± 0,09	12,46 ± 0,10	0,00	4,36 ± 0,07	17,63 ± 0,19	2,12 ± 0,09	7,88 ± 0,21 ^A	0,269 ± 0,011 ^A	753,0 ± 42,5 ^b	2300,6 ± 114,6 ^A
	Jersey	6,47 ± 0,12	12,58 ± 0,13	0,00	4,26 ± 0,05	17,59 ± 0,16	2,26 ± 0,14	8,27 ± 0,17 ^B	0,275 ± 0,009 ^B	682,0 ± 27,9 ^a	2620,1 ± 132,4 ^B

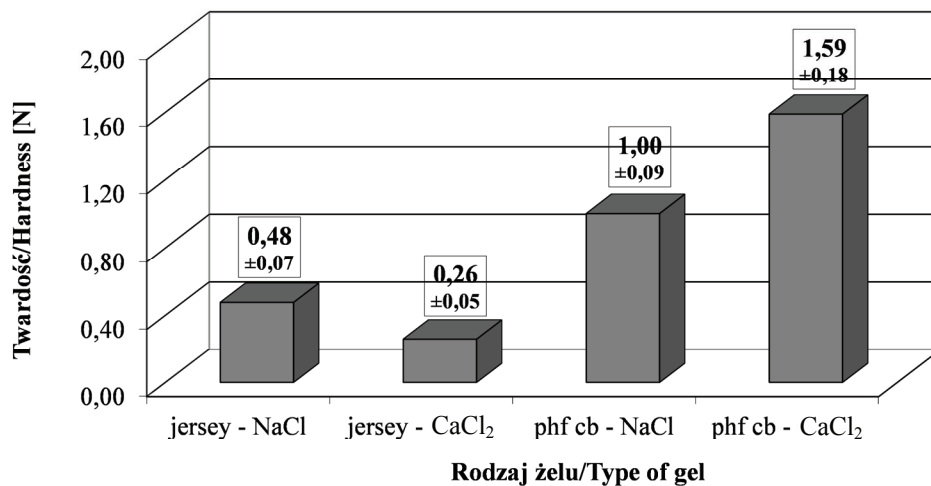
Objaśnienia: / Explanatory notes:

- Phf cb – rasa krów polska holsztyńsko-fryzjska odmiany czarno-białej / Phf cb – Black-White variety of Polish Holstein-Friesian breed of cows;

- α -La – α -laktoalbumina / α -La – α -lactalbumin; β -Lg – β -laktoalbumina / β -Lg – β -lactoglobulin;

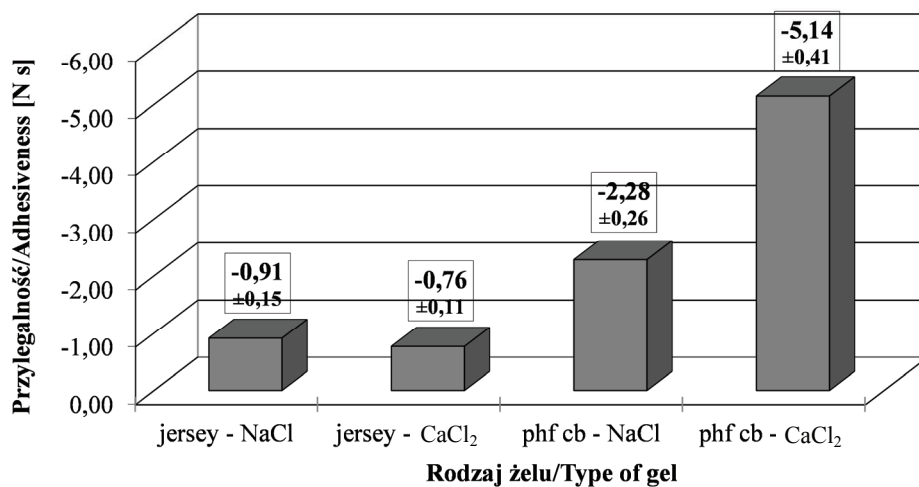
- wartość średnia ± błąd standardowy średniej / mean value ± standard error of mean; n = 3;

- wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się statystycznie istotnie: a, b – przy p ≤ 0,05; A, B – przy p ≤ 0,01 / Mean values denoted by various letters in columns differ statistically significantly: a, b – at p ≤ 0,05; A, B – at p ≤ 0,01.



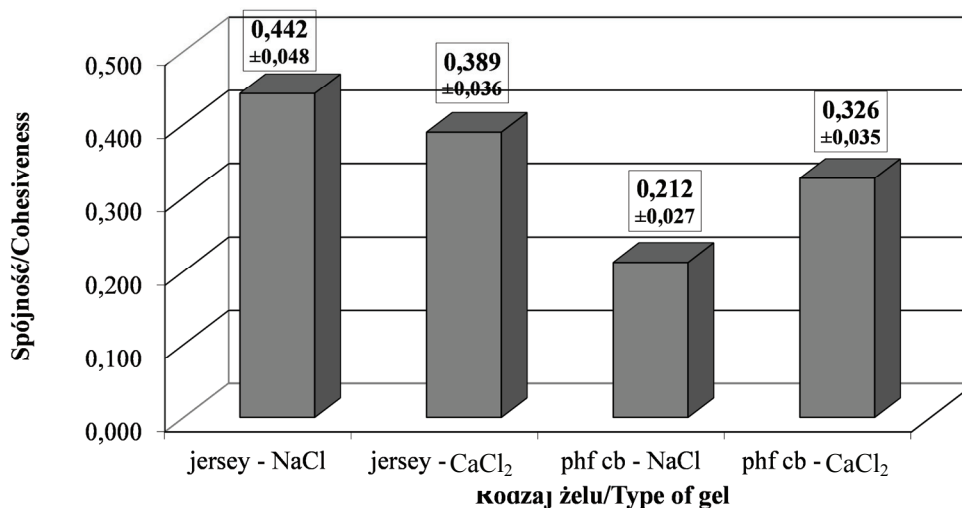
Rys. 1. Wpływ rodzaju soli na twardość otrzymanych żeli białek serwatkowych indukowanych ogrzewaniem, z uwzględnieniem pochodzenia mleka (rasa krów).

Fig. 1. Effect of salt type on hardness of heat-induced whey protein gels with regard to milk origin (breed of cows).



Rys. 2. Wpływ rodzaju soli na przylegalność otrzymanych żeli białek serwatkowych indukowanych ogrzewaniem, z uwzględnieniem pochodzenia mleka (rasa krów).

Fig. 2. Effect of salt type on adhesiveness of heat-induced whey protein gels with regard to milk origin (breed of cows).



Rys. 3. Wpływ rodzaju soli na spójność otrzymanych żeli białek serwatkowych indukowanych ogrzewaniem, z uwzględnieniem pochodzenia mleka (rasa krów).

Fig. 3. Effect of salt type on cohesiveness of heat-induced whey protein gels with regard to milk origin (breed of cows).

Gustaw [8], analizując zmiany właściwości reologicznych 14 % żeli uzyskanych z różnych komercyjnych preparatów białek serwatkowych w zależności od pH, wykazał, że najtwardsze okazały się żele WPI otrzymane w środowisku o pH = 6,3. Stwierdził ponadto wzrost twardości żeli, w tym zwłaszcza otrzymanych z WPC, wraz z upływem czasu ich przechowywania. Podobne zmiany zauważono podczas przechowywania twarogów, co prawdopodobnie było spowodowane wyciekaniem serwatki. Duży wyciek serwatki jest niekorzystny, ponieważ żel może stać się zbyt zwężły i suchy. Według Ju i Kilara [12] dodatek CaCl₂ istotnie wpływał na twardość żeli WPI indukowanych termicznie. Według Matsumodi i wsp. [17] największą twardością charakteryzowały się żele utworzone z BSA i β -Lg indukowane ogrzewaniem. Twardość żeli β -Lg osiągnęła najwyższą wartość przy dodatku 20 - 40 mM NaCl lub 2 mM CaCl₂, podczas gdy w przypadku żeli BSA przy 5 mM dodatku CaCl₂ i przy braku wpływu NaCl. Z kolei Puvanenthiran i wsp. [24] wykazali, że dodatek koncentratów białek serwatkowych do jogurtów powodował wzrost ich twardości, co można tłumaczyć korelacją pomiędzy zawartością kazeiny i białek serwatkowych. Twardość żelu jogurtowego wzrasta bowiem, jeżeli stosunek kazeiny do białek serwatkowych zmniejsza się. Należy przy tym zaznaczyć, że spośród właściwości reologicznych, twardość jest cechą najbardziej spostrzeganą i ocenianą przez konsumentów, czego dowiódł już Prentice [23], w dużym stopniu wpływająca na decyzję o zakupie danego produktu.

Przylegalność jest natomiast cechą pożądaną zwłaszcza w przypadku masel, margaryn i miksów. W badaniach własnych, najbardziej ujemną wartość przylegalności uzyskano w przypadku żeli (z białek serwatkowych mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej) z dodatkiem CaCl_2 (-5,14 N s). Należy przy tym podkreślić, że wartość ta była niemal siedmiokrotnie niższa w porównaniu z przylegalnością żeli z białek serwatkowych mleka krów rasy jersey o tym samym dodatku CaCl_2 .

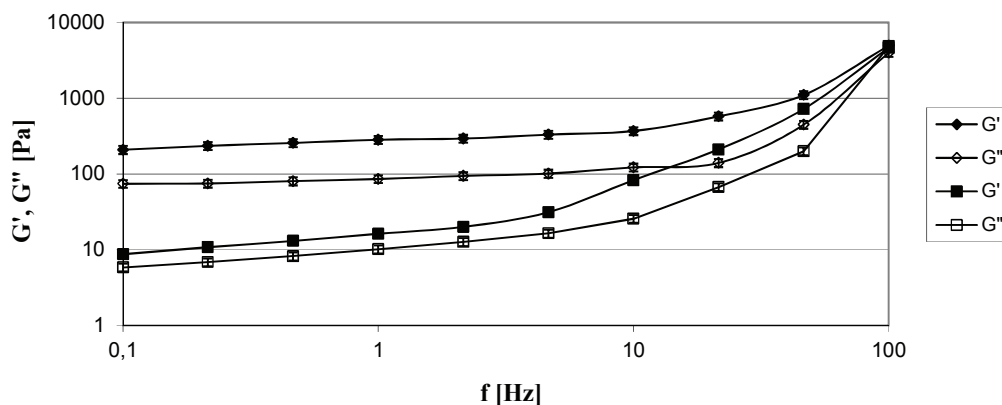
Jak podaje Glibowski [6], im wartość przylegalności zbliżona jest bardziej do zera, tym słabszą przylegalnością cechuje się układ. Przylegalność bliska zeru charakteryzuje przede wszystkim ciecze. Według Thapa i Gupta [30] zastąpienie kazeiny białkami serwatkowymi istotnie wpływało na wzrost przylegalności. Należy podkreślić, że wysoka przylegalność serów i analogów serów topionych do opakowania jest jedną z przyczyn ograniczających ich spożycie. Konsumenty nie akceptują bowiem produktów, które trudno oddzielić od opakowania. Sołowiej [27] stwierdził, że przylegalność analogów serów topionych ulega zwiększeniu wraz ze wzrostem stężenia białka.

Spójność otrzymanych żeli, opisująca siły wiązań wewnętrznych utrzymujących produkt jako całość, kształtowała się od 0,212 (białka serwatkowe mleka krów polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej – NaCl) do 0,442 (j.w. krów jersey – NaCl). Żele otrzymane z białek serwatkowych mleka krów rasy jersey charakteryzowały się większą spójnością w porównaniu z żelami z białek serwatkowych mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, odpowiednio o: 48 % (z NaCl) i 16 % (z CaCl_2).

Wartości spójności zawierają się w przedziale od 0 do 1, przy czym 0 świadczy o tym, że próbka po odkształceniu nie powraca do swojego pierwotnego kształtu, tak jak to ma miejsce w przypadku żeli, zaś 1 oznacza całkowitą odbudowę, np. w przypadku cieczy [6]. Odnosząc się do produktów mlecznych, spójność jest szczególnie istotna w projektowaniu i wytwarzaniu serów, w tym dojrzewających i topionych. Według Gupta i Reuter [7], dodatek koncentratów białek serwatkowych przyczyniał się do zmniejszania spójności analogów serów topionych. Z kolei Sołowiej i wsp. [28] wykazali, że próbki analogów serów topionych na bazie kazeiny kwasowej z dodatkiem koncentratów białek serwatkowych były bardziej spójne niż próbki otrzymane wyłącznie z kazeiny kwasowej, jednak ich spójność malała w miarę wzrostu stężenia białek serwatkowych.

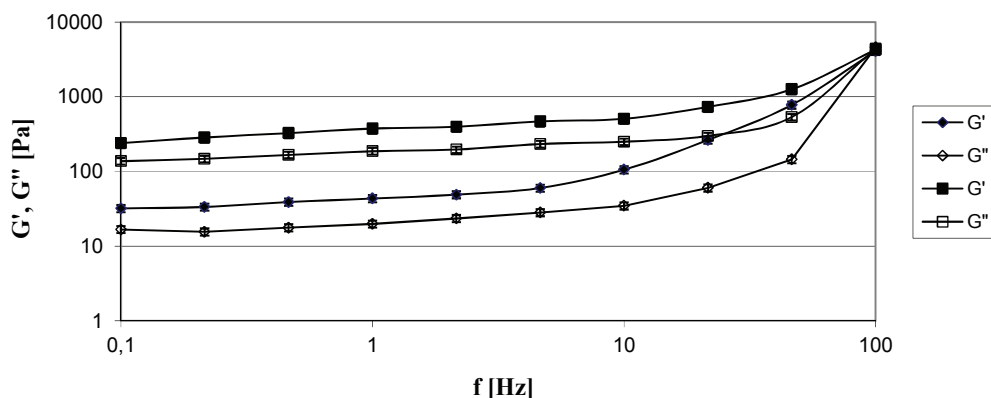
Właściwości żelujące przygotowanych żeli białek serwatkowych zbadano przy zmiennej częstotliwości drgań w zakresie od 0,1 do 100 Hz. Analizując uzyskane krzywe (rys. 4 i 5), zaobserwowano, niezależnie od rodzaju zastosowanej soli, wyraźny wzrost wartości modułu, zarówno zachowawczego (G'), jak i stratności (G''), wraz ze wzrostem częstotliwości. Różnice pomiędzy wartościami G' i G'' , zwłaszcza w przypadku próbek pochodzących z mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, świadczą o utworzeniu żeli. Zmniejszanie się wartości G' nie stwierdzono jedynie

w żelach indukowanych jonami sodu, uzyskanych z białek serwatkowych mleka krów rasy jersey. Należy również podkreślić, że uzyskane wyniki wskazują na wyraźny wpływ rodzaju soli na wartości modułu zachowawczego (G') i stratności (G'') żeli białek serwatkowych w przypadku obu ras krów, przy czym obserwowane tendencje są odmienne.



Rys. 4. Wpływ częstotliwości drgań na wartości modułu zachowawczego (G') i stratności (G'') żeli białek serwatkowych indukowanych jonami sodu otrzymanych z mleka krów rasy jersey ($\diamond$) i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej ($\square$).

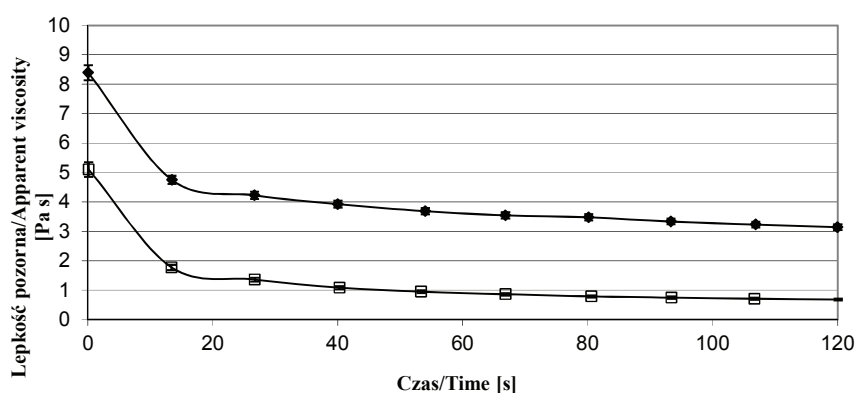
Fig. 4. Effect of vibration frequency on values of storage (G') and loss (G'') moduli of Na^+ -induced whey protein gels obtained from milk of Jersey ($\diamond$) and Black-White variety of Polish Holstein-Friesian ($\square$) cows.



Rys. 5. Wpływ częstotliwości drgań na wartości modułu zachowawczego (G') i stratności (G'') żeli białek serwatkowych indukowanych jonami wapnia otrzymanych z mleka krów rasy jersey ($\diamond$) i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej ($\square$).

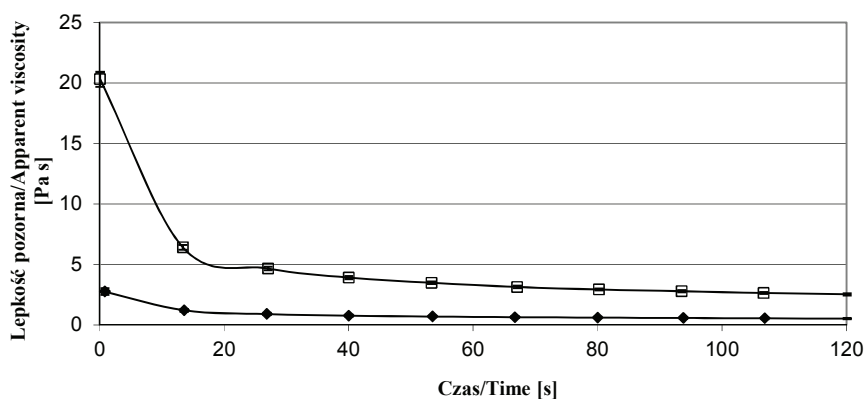
Fig. 5. Effect of vibration frequency on values of storage (G') and loss (G'') moduli of Ca^{2+} -induced whey protein gels obtained from milk of Jersey ($\diamond$) and Black-White variety of Polish Holstein-Friesian ($\square$) cows.

Wykazano różne wartości lepkości pozornej w poszczególnych żelach (rys. 6 i 7). Największe wartości lepkości pozornej stwierdzono w przypadku żelu z dodatkiem CaCl_2 w roztworach białek serwatkowych otrzymanych z mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, zaś najmniejsze w próbkach przygotowanych z białek serwatkowych pozyskanych z serwatki mleka krów rasy jersey, również z dodatkiem CaCl_2 . Należy przy tym zaznaczyć, że w zależności od rodzaju soli, wyższe wartości lepkości uzyskiwały żele z białek serwatkowych mleka krów rasy jersey (indukowane jonami sodu), ale także rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej (indukowane jonami wapnia).



Rys. 6. Lepkość pozorna żeli białek serwatkowych indukowanych jonami sodu.

Fig. 6. Apparent viscosity of Na^+ -induced whey protein gels.



Rys. 7. Lepkość pozorna żeli białek serwatkowych indukowanych jonami wapnia.

Fig. 7. Apparent viscosity of Ca^{2+} -induced whey protein gels.

Merin [18] analizował wpływ rasy i systemu utrzymania kóz na lepkość jogurtu wyprodukowanego z ich mleka. Stwierdził, że jogurty produkowane z mleka kóz różnych ras utrzymywanych w różnych gospodarstwach charakteryzowały się odmienną lepkością. Jogurty z mleka kóz korzystających z pastwiska, w porównaniu do otrzymanych z mleka kóz żywionych sianem i koncentratami, odznaczały się istotnie ($p \leq 0,01$) wyższą lepkością. W przypadku serów topionych pomiary lepkości mogą pośrednio określać ich topliwość, która umożliwia zastosowanie ich jako komponentów różnych dań, np. pizzy. Damodaran [5] zauważył, że wzrost lepkości roztworów białkowych następuje w miarę wzrostu koncentracji białka, co prawdopodobnie świadczy o zwiększonej interakcji ich uwodnionych cząsteczek. Andersen i wsp. [1] potwierdzili związek pomiędzy lepkością a stężeniem białka w roztworach α -laktoalbuminy, β -laktoglobuliny i koncentratów białek serwatkowych w zakresie 5 - 15 % (m/v). Roztwory β -laktoglobuliny odznaczały się większą lepkością w porównaniu z roztworami α -laktoalbuminy. Wykazali ponadto, że lepkość roztworów białkowych (10 % m/v) o różnych stosunkach α -La do β -Lg zwiększa się wraz ze wzrostem zawartości β -laktoglobuliny. W badaniach własnych mleko pozyskiwane od krów rasy jersey, jak również otrzymany z niego retentat poultrafiltracyjny, charakteryzowały się wyższą wartością stosunku α -La do β -Lg, odpowiednio: 0,342 i 0,275.

Wnioski

1. Żelowanie białek serwatkowych w dużej mierze zależy od techniki żelowania oraz zastosowanych jonów soli. Technika żelowania wpływała na uzyskanie różnych wartości analizowanych parametrów, tj. twardości, przylegalności i spójności, żeli przygotowanych z białek serwatkowych mleka obu ras krów.
2. Wykazano różnice w wartościach analizowanych parametrów tekstury w zależności od pochodzenia mleka (rasy krów). Żele z białek serwatkowych mleka krów rasy jersey charakteryzowały się mniejszą twardością i przylegalnością oraz większą spójnością.
3. Wartość modułu zachowawczego i stratności analizowanych żeli białek serwatkowych różniły się w zależności od rodzaju zastosowanych jonów soli oraz pochodzenia mleka (rasy krów, od której pozyskiwano mleko). Większe różnice pomiędzy wartościami G' i G'' stwierdzono w przypadku żeli białek serwatkowych przygotowanych z mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej w porównaniu z żelami serwatkowymi z mleka krów rasy jersey.

Literatura

- [1] Andersen J.G., Ipsen R., Karlsson A.O.: Relative influence of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on the viscosity of whey protein solutions. Annual Transactions of the Nordic Rheology Society, 2008, **16**, 141-144.
- [2] AOAC: Official Methods of Analysis. Sampling of dairy of milk from bulk tanks and other storage equipment. 970.26. AOAC Int., 2000, Chapter **33**, 2.
- [3] Barbut S., Foegeding E.A.: Ca^{2+} -induced gelation of pre-heated whey protein isolate. J. Food Sci., 1993, **58** (2), 867-871.
- [4] Bonczar G., Domagała J., Walczycka M.: The influence of ultrafiltration of ewe's milk on soft cheeses properties. EJPAU, 2002, **5** (1), #02.
- [5] Damodaran S.: Food proteins: an overview. In Damodaran S. & Paraf A. (Eds.). Food proteins and their applications. Marcel Decker Incorporation, New York 1997, pp. 1-24.
- [6] Glibowski P.: Wpływ olejów roślinnych na teksturę bezwodnego tłuszczu mlecznego. Acta Agrophys., 2007, **9** (3), 603-612.
- [7] Gupta V.K., Reuter H.: Processed cheese foods with added whey protein concentrates. Lait, 1992, **72** (2), 201-212.
- [8] Gustaw W.: Zmiany właściwości reologicznych żeli białek serwatkowych podczas przechowywania. Acta Agrophys., 2006, **8** (2), 347-356.
- [9] Hongprabhas P., Barbut S.: Protein and salt effects on Ca^{2+} -induced cold gelation of whey protein isolate. J. Food Sci., 1997, **62** (2), 382-385.
- [10] Hözer B., Kirmaci H.A.: Functional milks and dairy beverages. Int. J. Dairy Technol., 2010, **63** (1), 1-15.
- [11] Rynek mleka – stan i perspektywy. Analizy rynkowe – kwiecień 2011. IERiGŻ – PIB, Warszawa 2011.
- [12] Ju Z.Y., Kilara A.: Aggregation induced by calcium chloride and subsequent thermal gelation of whey protein isolate. J. Dairy Sci., 1998, **81**, 925-931.
- [13] Konrad G., Kleinschmidt T.: A new method for isolation of native α -lactalbumin from sweet whey. Int. Dairy J., 2008, **18**, 47-54.
- [14] Król J., Brodziak A., Litwińczuk A.: Podstawowy skład chemiczny i zawartość wybranych białek serwatkowych w mleku krów różnych ras i w serwatce podpuszczkowej. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2011, **4** (77), 74-83.
- [15] Litwińczuk Z., Król J., Brodziak A., Barłowska J.: Changes of protein content and its fractions in bovine milk from different cow breeds subject to somatic cell count. J. Dairy Sci., 2011, **94** (2), 684-691.
- [16] Livney Y.D.: Milk proteins as vehicles for bioactives. Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 2010, **15**, 73-83.
- [17] Matsudomi N., Rector D., Kinsella J.E.: Gelation of bovine serum albumin and β -lactoglobulin; effects of pH, salts and thiol reagents. Food Chem., 1991, **40** (1), 55-69.
- [18] Merin U.: Influence of breed and husbandry on viscosity of Israeli goat milk yogurt. Small Rumin. Res., 2000, **35**, 175-179.
- [19] Michaelidou A., Steijns J.: Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides. Int. Dairy Sci., 2006, **16**, 1421-1426.
- [20] Mleko S., Tomczyńska-Mleko M., Targoński Z.: Globular protein gels as carriers of active substances. Agro Food Ind. Hi-Tech, 2010, **21** (3), 14-16.
- [21] Pan Y., Lee A., Wan J., Coventry M.J., Michalski W.P., Shiell B., Roginski H.: Antiviral properties of milk proteins and peptides. Int. Dairy Sci., 2006, **16**, 1252-1261.

- [22] Wyniki oceny wartości użytkowej bydła ras mlecznych. Raport: Sytuacja na rynku mleka, PFHBiPM, Warszawa 2011.
- [23] Prentice J.H.: Rheology and texture of dairy products. *J. Texture Stud.*, 1972, **3**, 415-458.
- [24] Puvanenthiran A., Williams R.P.W., Augustin M.A.: Structure and visco-elastic properties of set yogurt with altered casein to whey protein ratios. *Int. Dairy Sci.*, 2002, **12**, 383-391.
- [25] Romero C., Perez-Andujar O., Jimenes S.: Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia*, 1996, **42**, 181-184.
- [26] Smithers G.W.: Whey and whey proteins – From 'gutter to gold'. *Int. Dairy Sci.*, 2008, **18**, 695-704.
- [27] Sołowiej B.: Analiza tekstury analogów serów topionych z dodatkiem preparatów serwatkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **5 (54)**, 292-300.
- [28] Sołowiej B., Mleko S., Gustaw W., Udeh K.O.: Effect of whey protein concentrates on texture, meltability and microstructure of acid casein processed cheese analogs. *Milchwissenschaft – Milk Sci. Int.*, 2010, **65 (2)**, 169-173.
- [29] Strohmaier W.: Chromatographic fractionation of whey proteins. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 2004, p. **389**.
- [30] Thapa T.B., Gupta V.K.: Rheology of processed cheese foods with added whey protein concentrates. *Indian J. Dairy Sci.*, 1992, **45**, 88-92.

GELLING PROPERTIES AND TEXTURE OF GELS OBTAINED FROM WHEY PROTEINS DERIVED FROM MILK OF DIFFERENT COW BREEDS

S u m m a r y

The objective of the study was to determine the effect of milk origin (breed of cows) and applied type of salt (calcium and sodium ions) on the selected functional properties of whey proteins essential while producing foods. Particular attention was given to the rheological properties (including the gel-forming properties and texture of gels: hardness, adhesiveness, and cohesiveness), which determine the usefulness of whey proteins as an additional component in dairy products and majorly impact the choices made by consumers.

There were determined the basic chemical composition (content of total protein, fat, lactose, and dry matter) and the concentration of some selected whey proteins contained in whey, and, next, in the permeates and retentates obtained, through the process of micro- and ultra-filtration, at different stages of separating and thickening the solutions of whey proteins. The hardness, adhesiveness, and cohesiveness of gels were determined using a texture profile analysis, whereas their mechanical properties (values of storage and loss moduli as well as apparent viscosity) were analyzed using oscillatory rheometry. Differences were proved to exist between the values of the analyzed texture parameters depending on the breed of cows the milk was from. The gels obtained from whey proteins derived from the Jersey cows' milk, compared to the gels from whey proteins from the milk of Black-White variety of the Polish Holstein-Friesian cows, were characterized by a lower hardness and a lower adhesiveness, and by a higher cohesiveness. The cow breed and the type of salt applied impacted the values of storage and loss moduli of the whey proteins gels analyzed.

Key words: whey proteins, gelling properties, gel texture ☒

ZYGMUNT LITWIŃCZUK, TOMASZ GRODZICKI, JOANNA BARŁOWSKA,
MARIUSZ FLOREK

WPLYW GENOTYPU I RODZAJU MIĘŚNIA NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH I ZAWARTOŚĆ CHOLESTEROLU W MIĘSIE MŁODEGO BYDŁA RZEŹNEGO

Streszczenie

Materiał badawczy stanowiły próby pobrane z mięśnia najdłuższego grzbietu (z odcinka lędźwiowego – *m. longissimus lumborum*) oraz mięśnia półścięgnistego uda (*m. semitendinosus*) z 46 tusz buhajków w wieku ok. 18 miesięcy. Zwierzęta reprezentowały dwa genotypy: rasę polską holsztyńsko-fryzyjską odmiany czarno-białej (21 sztuk) oraz mieszańce od krów cb i po buhajach rasy limousine (25 sztuk).

Wykazano istotny wpływ ($p \leq 0,01$) genotypu na udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), proporcję PUFA/SFA oraz zawartość CLA. Istotnie wyższy udział kwasów tłuszczowych nasyconych (SFA) stwierdzono w mięśniu *m. semitendinosus* obu analizowanych genotypów. Nie wykazano istotnego wpływu genotypu na zawartość cholesterolu ogólnego, natomiast na jego zawartość istotnie wpływał rodzaj mięśnia. Wyższy poziom cholesterolu stwierdzono w mięśniu *m. longissimus lumborum* w porównaniu z *m. semitendinosus*. Istotne interakcje genotyp $\times$ rodzaj mięśnia stwierdzono jedynie w przypadku zawartości kwasu $C_{18:2}$ i $C_{18:4}$ oraz udziału PUFA i proporcji PUFA/SFA.

Słowa kluczowe: mięso wołowe, kwasy tłuszczowe, cholesterol

Wprowadzenie

Tłuszcz zwierzęcy (w tym także tłuszcz mięsa wołowego) postrzegany jest bardzo jednostronnie jako źródło niekorzystnych dla zdrowia kwasów tłuszczowych i cholesterolu [2, 26]. Mięso wołowe jest jednak bogatym źródłem białka zwierzęcego, a zdaniem Domaradzkiego i wsp. [7] pewne jego cenne właściwości fizykochemiczne nie ulegają pogorszeniu nawet w warunkach 30-dniowego przechowywania zamrażalniczego.

Prof. dr hab. Z. Litwińczuk, Katedra Hodowli i Ochrony Zasobów Genetycznych Bydła, dr inż. T. Grodzicki, dr hab. J. Barłowska prof. nadz., dr hab. M. Florek, Katedra Towaroznawstwa i Przetwórstwa Surowców Zwierzęcych, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Zmienność składu chemicznego mięsa wołowego zależy między innymi od rodzaju mięśnia, rasy zwierząt czy płci [10]. Zdaniem wielu autorów [1, 5, 12] także udział kwasów tłuszczowych w mięsie wołowym mogą determinować czynniki środowiskowe i fizjologiczne, jak również rasa zwierząt.

Analizuje się również zawartość cholesterolu w mięsie wołowym oraz jego oddziaływaniu na zdrowie człowieka. Zdaniem Jimenez-Calmenero i wsp. [16] szczególnie czerwone mięso (w tym wołowina) jest jego znacznym źródłem w diecie. Duże spożycie cholesterolu, zwiększające jego stężenie w surowicy krwi, wpływa bezpośrednio na występowanie zawałów serca i udarów mózgu. W USA przyjmuje się, że zmniejszenie stężenia cholesterolu we krwi o 1 % powoduje 2 % obniżenie ryzyka wystąpienia niedokrwiennej choroby serca [14]. Jest on jednak ważnym steroidem, pełniącym w ustroju wiele istotnych dla zdrowia funkcji, w tym m.in.: stabilizuje membrany komórkowe, wchodzi w skład otoczki mielinowej, a także jest prekursorem kwasów żółciowych i hormonów sterydowych [23].

Celem pracy była ocena wpływu genotypu zwierząt oraz rodzaju mięśnia na skład kwasów tłuszczowych i zawartość cholesterolu ogólnego w mięsie młodego bydła rzeźnego.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły próby pobrane z mięśnia najdłuższego grzbietu (z odcinka lędźwiowego – *m. longissimus lumborum*) oraz mięśnia półścięgnistego (*m. semitendinosus*) z 46 tusz buhajków w wieku ok. 18 miesięcy. Zwierzęta reprezentowały dwa genotypy, tj. rasę polską holsztyńsko-fryzyjską odmiany czarno-białej (21 sztuk) oraz mieszańce od krów cb i po buhajach rasy limousine (25 sztuk).

Zwierzęta utrzymywano w systemie półintensywnym. Podstawową paszą dla zwierząt w okresie letnim była zielonka z traw oraz kiszonka z kukurydzy, natomiast w okresie zimowym kiszonka z kukurydzy. Uzupełnieniem dawki było siano łąkowe oraz śruta zbożowa.

W pobranych próbach mięsa oznaczano: udział kwasów tłuszczowych oraz zawartość cholesterolu ogólnego za pomocą chromatografu gazowego Varian CG 3900 z detektorem płomieniowo-jonizującym (FID) wykorzystując program Star GC Workstation, ver. 5.5.

Rozdział kwasów tłuszczowych prowadzono w kolumnie kapilarnej CP-Sil 88 o długości 50 m i średnicy wewnętrznej 0,25 mm. Analizę wykonywano w warunkach zmiennej temperatury. Początkowa temp. pieca kolumny wynosiła 120 °C, a czas jej utrzymania 3 min. Szybkość przyrostu temperatury wynosiła 2 °C/min, a czas trwania całej analizy 50 min. Inne parametry temperatury były następujące: temp. dozownika 270 °C, temp. detektora 300 °C, przepływ wodoru 25 ml/min, przepływ powietrza 350 ml/min, make-up 7 ml/min.

Oznaczenie zawartości cholesterolu ogólnego [mg/100 g tkanki] wykonywano z wykorzystaniem standardu wewnętrznego (5- α -cholestan) przy zastosowaniu kolumny kapilarnej VF-5ms, wykorzystując program Star GC Workstation, ver. 5.5. Analizę prowadzono w warunkach zmiennej temperatury. Początkowa temp. pieca kolumny wynosiła 250 °C, a czas jej utrzymania 2 min. Szybkość przyrostu temp. wynosiła 3 °C/min, a czas trwania całej analizy 16 min. Inne parametry analizy to: temp. dozownika 270 °C, temp. detektora 250 °C, przepływ wodoru 25 ml/min, przepływ powietrza 350 ml/min, make-up 7 ml/min.

Analizę zawartości kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu prowadzono po uprzedniej ekstrakcji tłuszczu wg metody podanej przez Follcha i wsp. [11]. Dalsze postępowanie prowadzono zgodnie z normą: PN-EN ISO 5509:2001 [22] oraz PN-EN ISO 5508:1996 [21].

Spśród oznaczonych kwasów tłuszczowych wyodrębniono następujące grupy: nasycone kwasy tłuszczowe (SFA), nienasycone kwasy tłuszczowe (UFA), w tym jednonienasycone (MUFA) i wielonienasycone (PUFA). Dodatkowo wyliczono proporcje pomiędzy poszczególnymi grupami kwasów tj.: UFA/SFA, MUFA/SFA i PUFA/SFA.

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu STATISTICA (StatSoft, Inc. 2003), wykorzystując dwuczynnikową analizę wariancji z interakcją określającą wpływ genotypu i rodzaju mięśnia. Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami ocenianych grup wyznaczono testem LSD Fishera.

Wyniki i dyskusja

W obu analizowanych mięśniach mieszańców po buhajach rasy limousine (tab. 1) stwierdzono istotnie wyższy ($p \leq 0,01$) udział kwasów tłuszczowych nasyconych, tj.: C_{14:0} (odpowiednio 3,04 % *m. longissimus lumborum* i 3,78 % *m. semitendinosus*) i C_{16:0} (odpowiednio 30,24 % i 31,65 %). Mięśnie tej grupy zwierząt zawierały również istotnie więcej ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) niektórych kwasów nienasyconych. Szczególnie wyraźnie tendencja ta występowała w przypadku jednonienasyconego kwasu C_{16:1} (3,18 % w *m. longissimus lumborum* i 3,75 % w *m. semitendinosus*) oraz kwasów wielonienasyconych, w tym: C_{18:3} (udział na poziomie 0,55 % i 0,45 %), C_{18:4} (0,32 % i 0,22 %), C_{20:4} (0,46 % i 0,38 %) oraz C_{22:5} (0,22 % i 0,38 %). Średnia zawartość tych kwasów była kilkakrotnie większa niż w mięsie buhajków czarno-białych. Natomiast tłuszcz mięśniowy buhajków czarno-białych wykazywał statystycznie istotnie większą (o kilka procent) zawartość kwasu stearynowego C_{18:0} (średni udział odpowiednio 23,15 % w *m. longissimus lumborum* i 26,74 % *m. semitendinosus*).

Bardzo zbliżony udział kwasów tłuszczowych (do wartości uzyskanych w przedstawionych badaniach) stwierdzili Morris i wsp. [18], oceniając mięso buhajków rasy angus ubijanych w różnych grupach wiekowych (od 7,5 do 25 miesięcy). Wykazali oni, że zawartość tłuszczu w *m. longissimus lumborum* wahała się od 2,9 do 5,2 %,

a udział poszczególnych kwasów tłuszczowych był następujący: $C_{14:0}$ od 2,4 do 6,7 %, $C_{16:0}$ od 25,0 do 30,5 %, $C_{16:1}$ od 2,2 do 3,2 %, $C_{18:0}$ od 19,6 do 26,7 % i $C_{18:1}$ od 36,4 do 40,5 %.

Grodzki i wsp. [13], oceniając wpływ rasy bydła na profil kwasów tłuszczowych, podają natomiast nieznacznie mniejszą niż uzyskaną w badaniach własnych zawartość kwasów $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ i $C_{18:1}$. Zawartość tych kwasów mieściła się odpowiednio w zakresie: od 22,54 do 24,37 %, od 11,31 do 16,87 % i od 30,93 do 35,77 %.

Genotyp zwierząt wpływał istotnie ($p \leq 0,01$) na zawartość PUFA, proporcję PUFA/SFA oraz udział CLA (tab. 2). Ponad trzykrotnie większą zawartość CLA stwierdzono w ocenianych mięśniach mieszańców (0,19-0,32 %) w porównaniu z mięśniami buhajków czarno-białych. Podobnie dużą średnią zawartość CLA (na poziomie 0,29-0,33 %) wykazali Florek i wsp. [10], analizując skład kwasów tłuszczowych w *m. longissimus lumborum* i *m. semitendinosus* młodego bydła rzeźnego z chowu masowego.

Tłuszcz mięśnia najdłuższego lędźwi cechował się istotnie mniejszym ($p \leq 0,05$) udziałem SFA (52,24 % w przypadku buhajków czarno-białych i 52,52% mieszańców) i większym UFA (odpowiednio 47,75% oraz 47,26%) w porównaniu z mięśniem półścięgnistym (odpowiednio SFA – 55,98 i 55,03% oraz UFA – 44,02 i 44,77%). Najwyższy udział MUFA ($p \leq 0,05$) stwierdzono w odcinku lędźwiowym mięśnia najdłuższego grzbietu buhajków czarno-białych (45,13%).

Enser i wsp. [9], a także Lengyel i wsp. [17] podają, że rodzaj mięśnia wpływa istotnie zarówno na zawartość tłuszczu wewnątrzmięśniowego, jak również na skład jego kwasów tłuszczowych. Podobnie Costa i wsp. [4] wykazali istotny wpływ rodzaju mięśnia na udział poszczególnych grup kwasów tłuszczowych oraz proporcje między nimi.

W mięśniach mieszańców stwierdzono korzystniejszą proporcję PUFA/SFA, a istotnie ($p \leq 0,01$) najwyższa wartość tej proporcji (0,10) odnosiła się do odcinka lędźwiowego mięśnia najdłuższego grzbietu. Wynikało to najprawdopodobniej z istotnie większej zawartości PUFA.

Istotne interakcje (genotyp $\times$ rodzaj mięśnia) na poziomie prawdopodobieństwa $p \leq 0,01$ stwierdzono w przypadku kwasu $C_{18:2}$ oraz udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) i stosunku PUFA/SFA, a także zawartości kwasu $C_{18:4}$ ($p \leq 0,05$).

Wykazana w badaniach własnych proporcja PUFA/SFA była zbliżona do uzyskanej przez Ensera i wsp. [9] wartości 0,11. Podobnie Jaturasitha i wsp. [15], określając profil kwasów tłuszczowych w *m. longissimus dorsi* (pomiędzy 6 a 12 żebrem) rodzimego bydła tajskiego opasanego na dwóch różnych typach pastwisk, wykazali wartość tej proporcji na podobnym poziomie tj.: od 0,10 do 0,11. Orellana i wsp. [19], analizując profil kwasów tłuszczowych w próbkach *m. longissimus dorsi* (pobranych pomię-

dzy 12 a 13 żebrem) wołców dwóch ras utrzymywanych w Argentynie wykazali wyższą proporcję PUFA/SFA wynoszącą odpowiednio 0,16 w przypadku rasy Cirollo Argentino i 0,15 w odniesieniu do rasy Bradford. Zdaniem De Smeta i wsp. [6] warunkiem osiągnięcia wysokiej wartości proporcji PUFA/SFA, a tym samym korzystnego i pożądanego składu kwasów tłuszczowych w mięsie wołowym jest mała zawartość tłuszczu w tuszy i w poszczególnych mięśniach.

Badania prowadzone przez Alfaia i wsp. [1], Chung i wsp. [3], Piironen i wsp. [20] oraz Rule i wsp. [24] nad zawartością cholesterolu ogólnego wskazują na dość szerokie granice jego zawartości w mięsie wołowym, jak również na fakt, że jego poziom może być determinowany wieloma czynnikami.

Wyniki badań Rule i wsp. [25] oraz Eichhorn i wsp. [8] nie potwierdzają jednoznacznego wpływu rasy bydła na zawartość cholesterolu w mięsie. Również wyniki badań własnych (tab. 2) nie potwierdziły wpływu genotypu buhajków na zawartość cholesterolu w ocenianych mięśniach. Pomimo braku istotnych różnic mniejszą jednak zawartość cholesterolu stwierdzono w obu mięśniach mieszańców po buhajach rasy limousine. Wykazana w badaniach własnych zawartość cholesterolu wynosiła od 43,33 do 57,93 mg/100 g. Taki poziom, zdaniem Rule i wsp. [24] oraz Alfaia i wsp. [1], można przyjąć za odpowiedni dla mięsa wołowego. Blisko dwukrotnie wyższy (tnz. 89,3 mg/100 g tkanki) poziom tego składnika w *m. longissimus thoracis* podają natomiast Chung i wsp. [3]. Twierdzą ponadto, że zawartość cholesterolu w mięsie pozostaje w ścisłym związku z masą przedubojową zwierząt.

Większą zawartość cholesterolu oznaczono w odcinku lędźwiowym mięśnia najdłuższego grzbietu obu ocenianych grup buhajków ($p \leq 0,01$) w porównaniu z mięśniem półścięgnistym uda. Podobnie stwierdzili Alfaia i wsp. [1], oceniając m.in. wpływ systemu produkcji, a także rodzaju mięśnia na zawartość cholesterolu. Wykazali oni większą zawartość cholesterolu ogólnego w *m. longissimus thoracis* niż w *m. semitendinosus*.

Istotny wpływ ($p \leq 0,01$) rodzaju mięśnia na zawartość cholesterolu potwierdzają również Costa i wsp. [4] w badaniach przeprowadzonych na buhajach rasy Mertolenga. Autorzy wykazali największą zawartość cholesterolu (w zakresie od 0,46 do 0,53mg/g) w *m. supraspinatus* spośród trzech analizowanych mięśni (*longissimus dorsi*, *supraspinatus* i *semitendinosus*).

T a b e l a 1

Profil kwasów tłuszczowych [% sumy kwasów tłuszczowych] w odcinku lędźwiowym mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longissimus lumborum* – MLL) i mięśniu pościęgnistym (*m. semitendinosus* – MST).

Fatty acid profile [% of total fatty acids] in *m. longissimus lumborum* (MLL) and *m. semitendinosus* (MST).

Wyszczególnienie Subject	Buhajki cb / BW young bulls n = 21		Buhajki mieszane / Crossbred bulls n = 25		Wpływ / Effect of		
	MLL	MST	MLL	MST	genotypu genotype	mięśnia muscle	interakcja genotyp × mięsień interaction genotype × muscle
C _{12:0}	0,04 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,23 ± 0,20	0,13 ± 0,10	ns	ns	ns
C _{14:0}	2,13 ^A ± 0,10	2,15 ^A ± 0,34	3,04 ^B ± 0,30	3,78 ^C ± 0,61	**	ns	ns
C _{16:0}	26,77 ^A ± 1,12	26,85 ^A ± 1,07	30,24 ^B ± 1,29	31,65 ^B ± 1,80	**	ns	ns
C _{16:1}	2,90A ^B ± 0,78	2,50 ^A ± 0,66	3,18A ^B ± 0,52	3,75 ^B ± 1,04	*	ns	ns
C _{18:0}	23,15 ^B ± 4,08	26,74 ^B ± 4,60	18,90 ^A ± 2,15	19,31 ^A ± 1,70	**	*	ns
C _{18:1}	42,11 ^C ± 3,30	38,18 ^{AB} ± 4,08	38,75 ^B ± 1,48	37,13 ^A ± 1,67	**	**	ns
C _{18:2}	1,95 ^A ± 0,46	2,46 ^A ± 0,61	3,32 ^B ± 0,26	2,07 ^A ± 0,87	*	ns	**
C _{20:0}	0,16 ± 0,05	0,19 ± 0,05	0,12 ± 0,09	0,16 ± 0,11	ns	ns	ns
C _{18:3}	0,36 ^a ± 0,03	0,40 ^a ± 0,06	0,55 ^b ± 0,10	0,45 ^b ± 0,18	*	ns	ns
C _{20:1}	0,12 ± 0,08	0,10 ± 0,10	0,13 ± 0,21	0,19 ± 0,26	ns	ns	ns
C _{18:4}	0,11 ^A ± 0,05	0,13 ^{AB} ± 0,08	0,32 ^C ± 0,10	0,22 ^B ± 0,10	**	ns	*
C _{20:4}	0,08 ^A ± 0,03	0,14 ^A ± 0,07	0,46 ^B ± 0,16	0,38 ^B ± 0,23	**	ns	ns
C _{22:5}	0,04 ^a ± 0,01	0,05 ^a ± 0,02	0,22 ^b ± 0,10	0,38 ^c ± 0,21	**	ns	ns

Objaśnienia: / Explanatory notes:

- wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation;

- a, b, c – średnie oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / means denoted by different letters in rows are significantly different at $p \leq 0,05$; A, B, C – średnie oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,01$ / means denoted by different letters in rows are significantly different at $p \leq 0,01$; * istotne przy $p \leq 0,05$ / significant at $p \leq 0,05$; ** istotne przy $p \leq 0,01$ / significant at $p \leq 0,01$; ns – nieistotne / not significant.

T a b e l a 2

Profil kwasów tłuszczowych [% sumy kwasów tłuszczowych] i zawartość cholesterolu [mg/100 g tkanki] w odcinku lędźwiowym mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longissimus lumborum*) i mięśni pścięgnistym (*m. semitendinosus*).
 Fatty acid profile [% of total fatty acids] and total cholesterol content [mg/100 g tissue] in *musculus longissimus lumborum* (MLL) and *musculus semitendinosus* (MST).

Wyszczególnienie Subject	Buhajki cb BW young bulls n = 21		Buhajki mieszane Crossbred bulls n = 25		Wpływ Effect of		
	MLL	MST	MLL	MST	genotypu genotype	mięśnia muscle	interakcja genotyp x mięsień interaction genotype x muscle
CLA	0,09 ^A ± 0,05	0,05 ^A ± 0,02	0,32 ^C ± 0,11	0,19 ^B ± 0,07	**	ns	ns
SFA	52,24 ^a ± 3,73	55,98 ^b ± 3,97	52,52 ^a ± 1,76	55,03 ^b ± 2,89	ns	**	ns
UFA	47,75 ^b ± 3,72	44,02 ^a ± 3,94	47,26 ^b ± 1,96	44,77 ^a ± 2,98	ns	**	ns
MUFA	45,13 ^b ± 4,09	40,78 ^a ± 4,63	42,06 ^a ± 2,65	41,08 ^a ± 2,32	ns	**	ns
PUFA	2,62 ^A ± 0,48	3,23 ^{AB} ± 0,70	5,20 ^C ± 0,60	3,69 ^B ± 0,95	**	ns	**
UFA/SFA	0,92 ^b ± 0,15	0,79 ^a ± 0,13	0,90 ^b ± 0,07	0,82 ^a ± 0,10	ns	**	ns
MUFA/SFA	0,87 ^b ± 0,15	0,73 ^a ± 0,14	0,80 ^{ab} ± 0,10	0,75 ^a ± 0,08	ns	**	ns
PUFA/SFA	0,05 ^A ± 0,02	0,06 ^A ± 0,03	0,10 ^B ± 0,03	0,07 ^A ± 0,02	**	ns	**
Cholesterol	57,93 ^B ± 5,31	44,30 ^A ± 6,80	51,05 ^B ± 3,78	43,33 ^A ± 6,06	ns	**	ns

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

Wnioski

1. Wykazano istotny wpływ genotypu ($p \leq 0,01$) ocenianych buhajków na udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), proporcję PUFA/SFA oraz zawartość CLA.
2. Istotnie wyższy udział kwasów tłuszczowych nasyconych (SFA) stwierdzono w mięśni *m. semitendinosus* obu genotypów.
3. Nie wykazano istotnego wpływu genotypu na zawartość cholesterolu ogólnego w ocenianym mięsie.
4. Rodzaj mięśnia różnicował istotnie zawartość cholesterolu ogólnego. Wyższy jego poziom stwierdzono w mięśni *m. longissimus lumborum* w porównaniu z *m. semitendinosus*.
5. Istotne interakcje genotyp $\times$ rodzaj mięśnia stwierdzono jedynie w przypadku zawartości kwasu linolowego ($C_{18:2}$) i stearydynowego ($C_{18:4}$) oraz udziału PUFA i proporcji PUFA/SFA.

Literatura

- [1] Alfaia C.M.M., Ribeiro V.S.S., Lourenco M.R.A., Quaresma M.A.G., Martins S.I.V., Portugal A.P.V., Fontes C.M.G.A., Bessa R.J.B., Castro M.L.F., Prates J.A.M.: Fatty acids composition, conjugated linoleic acids and cholesterol in beef from crossbreed bullocks intensively produced and from Alentajena purebred bullocks reared according to Carnalantajena-PDO specifications. *Meat Sci.*, 2006, **72**, 425-436.
- [2] Brisson G.J.: Dietary fat and human health. *Rec. Adv. Anim. Nutr.*, Haresign W. i Cole D.J.A. (eds), Butterworths, Boston, 1986, pp. 3-24.
- [3] Chung K.Y., Lunt D.K., Choi C.B., Chae S.H., Rhoades R.D., Adams T.H., Booren B., Smith S.B.: Lipid characteristics of subcutaneous adipose tissue and *m. longissimus thoracis* of Nagus and Wagu steers fed to US and Japanese endpoints. *Meat Sci.*, 2006, **73**, 432-441.
- [4] Costa P., Roseiro L.C., Bessa R.J.B., Padilha M., Partidário A., Marques de Almeida J., Calkins C.R., Santos C.: Muscle fiber and fatty acids profiles of Mertoleng-PDO meat. *Meat Sci.*, 2008, **79**, 502-512.
- [5] De Smet S., Raes K., Demeyer D.: Meat fatty acids composition as affected by fatness and genetic factors. A review. *Animal Res.*, 2004, **53**, 81-98.
- [6] De Smet S., Webb E.C., Claeys E., Uytterhaegen L., Demeyer D.I.: Effect of dietary energy and protein levels on fatty acid composition of intermuscular fat in double-muscled Belgian Blue bulls. *Meat Sci.*, 2000, **56**, 73-79.
- [7] Domaradzki P., Skąlecki P., Florek M., Litwińczuk A.: Wpływ przechowywania zamrażalniczego na właściwości fizykochemiczne mięsa wołowego pakowanego próżniowo. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **7 (77)**, 117-126.
- [8] Eichhorn J.M., Coleman L.J., Wakayama E.J., Blomquist G.J., Bailey C.M., Jenkins T.G.: Effect of breed type and restricted versus ad libitum feeding on fatty acid composition and cholesterol content of muscle and adipose tissue from mature bovine females. *J. Anim. Sci.*, 1986, **63**, 781-794.

- [9] Enser M., Hallett K.G., Hewitt B., Fursey G.A.J., Wood J.D., Harrington G.: Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Sci.*, 1998, **49**, 329-341.
- [10] Florek M., Litwińczuk Z., Kędzierska-Matysek M., Grodzicki T., Skąlecki P.: Wartość odżywcza mięsa z lędźwiowej części mięśnia najdłuższego i półścięgnistego uda młodego bydła rzeźnego. *Med. Wet.*, 2007, **63** (2), 242-246.
- [11] Folch J.M., Less M., Sloane-Stanley G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, **226**, 497-509.
- [12] Garacia P.T., Pensel N.A., Sancho A.M., Latimori N.J., Kloster A.M., Amigone M.A., Casal J.J.: Beef lipids in relation to animal breed and nutrition in Argentina. *Meat Sci.*, 2008, **79**, 500-508.
- [13] Grodzki H., Orłowska O., Kraszewska A.: The influence of a cattle breed on chemical composition of meat and fatty acids content. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2001, **10/51**, **3** (S), 113-115.
- [14] Gwiazda S., Pisula A.: Prozdrowotne tendencje w przetwórstwie mięsa. *Gosp. Mięs.*, 2006, **2**, 13-18.
- [15] Jaturasitha S., Norkeaw R., Vearasilp T., Wicke M., Kreuzer M.: Carcass and meat quality of Thai native cattle fattened of Guinea grass (*Panicum maxima*) or Guinea grass-legume (*Stylosanthes guianensis*) pastures. *Meat Sci.*, 2009, **81**, 155-162.
- [16] Jimenez-Calmenero F., Carballo J., Cofrades S.: Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci.*, 2001, **59**, 5-13.
- [17] Lengyel Z., Husveth F., Polgár P., Szabó F., Magyar L.: Fatty acid composition of intramuscular lipids in various muscles of Holstein-Friesian bulls slaughtered at different ages. *Meat Sci.*, 2003, **65**, 593-598.
- [18] Morris C.A., Kirton A.H., Hogg B.W., Brown J.M., Mortimer B.J.: Meat composition in genetically selected and control cattle from a serial slaughter experiment. *Meat Sci.*, 1995, **39**, 427-435.
- [19] Orellanna C., Peña F., Garcia A., Perea J., Martos J., Domenech V., Acero R.: Carcass characteristics, fatty acids composition, and meat quality of Cirollo Argentino and Bradford steers raised on forage in a semi-tropical region of Argentina. *Meat Sci.*, 2009, **81**, 57-64.
- [20] Piironen V., Toivo J., Lampi A.M.: New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland. *J. Food Comp. Anal.*, 2002, **15**, 705-713.
- [21] PN-EN ISO 5508:1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- [22] PN-EN ISO 5509:2001. Oleje i tłuszcze zwierzęce. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych.
- [23] Pospiech E., Borzuta K.: Rola surowca w kształtowaniu właściwości i jakości surowców mięsnych. Surowce, technologia i dodatki a jakość żywności. Wyd. AR Poznań, 1999, ss. 75-83.
- [24] Rule D.C., Broughton K.S., Shellito S.M., Maiorano G.: Comparison of muscle fatty acids profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk and chicken. *J. Anim. Sci.*, 2002, **80**, 1202-1211.
- [25] Rule D.C., MacNeil M.D., Short R.E.: Influence of sire growth potential, time on feed, and growing – finishing strategy on cholesterol and fatty acids of the ground carcass and longissimus muscle of beef steers. *J. Anim. Sci.*, 1997, **75**, 1525-1533.
- [26] Schaefer E.J.: Lipoproteins, nutrition and disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, **75**, 191-212.

EFFECT OF GENOTYPE AND MUSCLE TYPE ON FATTY ACIDS PROFILE AND CHOLESTEROL CONTENT IN MEAT OF YOUNG SLAUGHTER CATTLE

S u m m a r y

The research material consisted of samples collected from *musculus longissimus lumborum* and *musculus semitendinosus* muscles taken from 46 carcasses of ca. 18 month old young bulls. The animals represented two following genotypes: Polish Holstein-Friesian breed of Black and White variety (21 animals) as well as crossbreeds from Black and White cows and Limousine sires (25 animals).

A significant ($p < 0.01$) effect of the genotype was found on the percentage of PUFA, the PUFA:SFA ratio, and the CLA content. A significantly higher percentage of SFA was determined in the *musculus semitendinosus* of the two analyzed genotypes. It was proved that the genotype had no significant impact on the total content of cholesterol, which, however, was significantly impacted by the muscle type. A higher content of cholesterol was found in the *longissimus lumborum* muscle compared to the *semitendinosus* muscle. Significant interaction between genotype and muscle type were found only in the case of C_{18:2} and C_{18:4} acids, the PUFA content, and PUFA to SFA ratio.

Key words: beef, fatty acids, cholesterol 

ZOFIA SOKOŁOWICZ, JÓZEFA KRAWCZYK, EUGENIUSZ HERBUT

JAKOŚĆ JAJ Z CHOWU EKOLOGICZNEGO W PIERWSZYM I DRUGIM ROKU UŻYTKOWANIA NIOSEK

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu wieku niosek na kształtowanie się cech jakości jaj od kur rodzimej rasy Zielononóżka kuropatwiana (Z-11), utrzymywanych w chowie ekologicznym. Badano jakość jaj spożywczych pochodzących od niosek w wieku 36, 50 i 80 tygodni. Stwierdzono wpływ wieku niosek na zwiększenie masy jaj i masy żółtek oraz zwiększenie udziału żółtka i zmniejszenie udziału białka w jajach. Wraz z wiekiem niosek intensywność barwy żółtek zwiększała się. W żółtkach jaj od kur starszych zawartość witamin A i E była większa niż w żółtkach od niosek młodszych. Cechy fizyczne skorup jaj od niosek starszych wskazywały na ich dobrą jakość. Nie wykazano wpływu wieku na profil kwasów tłuszczowych w żółtkach jaj. Dobra jakość jaj od starszych niosek Zielononóżki kuropatwianej wskazuje na zasadność ich użytkowania w ekologicznym systemie chowu przez okres dwóch lat.

Słowa kluczowe: rodzima rasa kur Zielononóżka kuropatwiana, wiek kur, chów ekologiczny, jakość jaj

Wprowadzenie

W Polsce, podobnie jak w całej Europie, obserwuje się wzrost zainteresowania konsumentów nabywaniem jaj z chowu ekologicznego, którego wymogiem jest m.in. udostępnianie kurom zielonych wybiegów o odpowiedniej powierzchni. Taki system chowu kur nieśnych wpływa na modyfikację składu chemicznego treści jaj, zgodnie z oczekiwaniami konsumentów, tj. na zwiększenie intensywności barwy żółtek, zwiększenie zawartości witamin oraz zwiększenie poziomu nienasyconych kwasów tłuszczowych w żółtku [2, 5, 14]. Udostępnienie kurom wybiegów wpływa również na cechy fizyczne jaj, a szczególnie na wytrzymałość skorupy i masę jaj [13, 28]. Wymogiem ekologicznej produkcji jaj jest zapewnienie nioskom wybiegu oraz żywienie ptaków paszami wyprodukowanymi metodami ekologicznymi bez dodatku barwników syntetycznych, co podlega kontroli przez jednostkę certyfikującą. Taki system

Dr hab. Z. Sokółowicz, prof. nadzw., Zakład Produkcji Zwierzęcej i Oceny Produktów Drobiarskich, Wydz. Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, ul. M. Cwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów, dr hab. J. Krawczyk prof. nadzw., Dział Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt, prof. dr hab. E. Herbut, Dział Technologii, Ekologii i Ekonomiki Produkcji Zwierzęcej, Instytut Zootechniki – PIB, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

chovu jest kosztowny i generuje wzrost cen jaj, a to z kolei stanowi istotną barierę popytu na jaja z chowu ekologicznego.

W Polsce najbardziej popularnymi nioskami utrzymywanymi w gospodarstwach ekologicznych są kury rodzimej rasy Zielononóżka kuropatwiana, której jaja ze względu na dobrą jakość sensoryczną są chętnie nabywane przez konsumentów, mimo 3 - 4-krotnie wyższej ceny w porównaniu z jajami standardowymi [12]. Z badań prowadzonych na kurach wysokoprodukcyjnych wynika, że wraz z wiekiem niosek zwiększa się masa jaj, ale pogarszają się inne cechy [13, 28]. Cherian [3] stwierdził wysoko istotny wpływ wieku kur na kształtowanie się profilu kwasów tłuszczowych w żółtkach jaj. W fermach kur ras objętych programem ochrony ptaki utrzymywane są w jednorocznym cyklu i wszystkie badania związane z jakością jaj ograniczone są dotychczas do takiego właśnie wieku niosek. Tymczasem w ekologicznych systemach chowu kury Zielononóżki kuropatwiane najczęściej utrzymywane są przez 2 lata.

Celem podjętych badań było określenie kształtowania się cech fizykochemicznych jaj w 2-letnim cyklu chowu niosek Zielononóżki kuropatwianej, utrzymywanych w gospodarstwie ekologicznym.

Material i metody badań

Badaniami objęto jaja spożywcze pochodzące od kur polskiej rodzimej rasy Zielononóżka kuropatwiana (Z-11), objętej programem ochrony bioróżnorodności. W gospodarstwie ekologicznym, posiadającym stosowny certyfikat, utrzymywano po 200 kur w wieku 36 i 50 tygodni życia oraz 150 szt. 80-tygodniowych niosek. Kurom udostępniano zielone, trawiaste wybiegi o powierzchni 4 m²/szt. i żywiono *ad libitum* paszą ekologiczną sporządzaną w gospodarstwie z wykorzystaniem głównie zbóż własnej produkcji, której skład chemiczny przedstawiono w tab. 1.

Z każdej grupy wiekowej kur pobierano losowo po 39 jaj zebranych w jednym dniu; 25 jaj poddano ocenie cech fizycznych za pomocą elektronicznej aparatury EQM (Egg Quality Measurements), a 14 szt. analizie na zawartość kwasów tłuszczowych i witamin A oraz E w żółtkach, wykonanej w Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki-PIB. Indeks kształtu jaja wyrażano stosunkiem długości osi krótkiej do długiej, mierzonej suwmiarką. Wytrzymałość skorupy (N) określano aparatem Egg Crusher.

Podstawowa analiza chemiczna mieszanek paszowych została wykonana w Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki, zgodnie z metodyką AOAC [1]. Analizy żółtka jaj na zawartość witamin A i E były wykonywane według akredytowanej procedury zgodnie z normą PN-EN ISO 14565 (all-trans-retinol, witamina A) i PN-EN ISO 6867 (α - tokoferol, witamina E). Poziom cholesterolu w żółtkach badanych jaj oznaczano kolorymetryczną metodą wg Washburn i Nix [29].

Wyniki poddano obliczeniom statystycznym za pomocą analizy wariancji testem Duncana z wykorzystaniem pakietu Statgraphic Plus 5.0.

Wyniki i dyskusja

Pasza ekologiczna sporządzona w gospodarstwie ze zbóż wyprodukowanych metodami ekologicznymi, którą karmiono kury, charakteryzowała się niskim poziomem białka ogólnego oraz witamin A i E (tab. 1) w porównaniu do zaleceń zawartych w Normach Żywienia Drobiu [19].

Tabela 1

Skład chemiczny mieszanki paszowej stosowanej w żywieniu kur Zielononózek kuropatwianych w chowie ekologicznym.

Chemical composition of feed mixture used to feed Greenleg Partridge hens reared in organic system.

Wyszczególnienie Specification	Skład chemiczny paszy ekologicznej [%] Chemical composition of organic feed
Sucha masa / Dry matter	90,17
Białko ogólne / Total protein	12,99
Tłuszcz surowy / Crude fat	1,28
Włókno surowe / Crude fibre	2,98
Popiół (związki mineralne) / Ash (mineral compounds)	4,66
Witaminy / Vitamins:	
A [IU]	89,1
E [mg/kg]	5,1
Kwasy tłuszczowe [% sumy kwasów]: / Fatty acids [% of total acids]:	
C16:0	19,947
C16:1n-7	0,083
C18:0	3,012
C18:1n-9	19,860
C18:2n-6	50,124
C18:3n-3	5,521
C20:4n-6	0,000
C22:1n-3	0,149
SFA ²	23,975
MUFA ³	20,091
PUFA ⁴	55,934
PUFA n-6	50,124
PUFA n-3	5,521
MUFA/SFA	0,838
PUFA/SFA	2,333
PUFA n-6:n-3	9,079

Tabela 2

Indeks kształtu oraz jakość treści jaj.
Egg shape index and quality of egg content.

Wyszczególnienie Specification	Wiek kur [tygodnie] Age of hens [weeks]					
	36		50		80	
	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]
Indeks kształtu [%] Shape index [%]	74,73 $\pm$ 2,62	3,5	74,18 $\pm$ 3,88	5,2	74,03 $\pm$ 2,53	3,4
Masa jaja [g] Weight of egg [g]	51,74 $\pm$ 2,84 ^{aA}	5,5	55,08 $\pm$ 3,61 ^{bB}	6,5	56,51 $\pm$ 3,18 ^{bB}	5,6
Masa żółtka [g] Weight of yolk [g]	15,16 $\pm$ 1,30 ^{aA}	8,6	16,93 $\pm$ 1,72 ^{bB}	10,1	17,75 $\pm$ 1,86 ^{bB}	10,4
Zawartość w jajach [%]: Contents in egg [%]:						
- żółtka / of yolk	29,3 $\pm$ 1,94 ^{aA}	-	30,7 $\pm$ 2,33 ^b	-	31,4 $\pm$ 2,5 ^{bB}	-
- białka / of albumen	60,5 $\pm$ 1,78 ^a	-	59,3 $\pm$ 2,33 ^{ab}	-	58,9 $\pm$ 2,5 ^b	-
- skorupy / shell	10,1 $\pm$ 0,71 ^a	-	9,9 $\pm$ 0,82 ^{ab}	-	9,62 $\pm$ 0,88 ^b	-
Wysokość białka [mm] Albumen height [mm]	5,54 $\pm$ 0,96 ^a	13,3	4,86 $\pm$ 0,86 ^a	17,6	4,90 $\pm$ 1,11 ^b	22,6
Jednostki Haugha [JH] Haugh Units [HU]	75,63 $\pm$ 7,63 ^{aA}	10,1	68,61 $\pm$ 8,17 ^{aA}	11,9	67,67 $\pm$ 11,73 ^{bB}	17,3
Plamy krwawe [%] Blood spots [%]	0,0		0,0		12,0	
Plamy mięsne [%] Meat spots [%]	0,0		0,0		0,0	
Barwa żółtka [La Roche'a] Yolk colour [La Roche]	5,96 $\pm$ 1,17 ^{aA}	19,6	6,64 $\pm$ 1,19 ^{bA}	17,9	6,68 $\pm$ 0,99 ^{bA}	14,8
Witamina A [mcg/g żółtka] Vitamin A [mcg/g yolk]	4,51 $\pm$ 0,47 ^a	10,4	5,00 $\pm$ 0,20 ^{ab}	4,0	5,33 $\pm$ 0,18 ^b	3,4
Witamina E [mcg/g żółtka] Vitamin E [mcg/g yolk]	112,3 $\pm$ 31,3	27,8	119,2 $\pm$ 11,9	9,9	130,1 $\pm$ 10,6	8,1
Cholesterol [mg/g żółtka] Cholesterol [mcg/g yolk]	14,29 $\pm$ 0,42	2,9	14,02 $\pm$ 0,15	1,1	13,91 $\pm$ 0,63	4,5

Objaśnienie: / Explanatory notes:

n = 25; wartości w wierszach oznaczone różnymi małymi literami różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,05$, a dużymi literami różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,01$ / values in rows and denoted with different small letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$, and denoted with capital letters differ statistically at $p \leq 0.01$; wartości w wierszach nie oznaczone żadnymi literami nie różnią się statystycznie ($p \geq 0,05$) / values in rows not marked with any letters are no different ($p > 0.05$).

Stwierdzono, że wraz z wiekiem kur zmieniał się szereg cech fizycznych treści jaj, natomiast zasadniczej zmiany nie uległ kształt jaj ani cechy skorupy (tab. 2 i 3).

Kształt jaj ma istotne znaczenie w obrocie handlowym, ponieważ wpływa na ich odporność na zgniecenie w standardowych opakowaniach jednostkowych. Jest to cecha zależna od genotypu [26]. Na tę cechę wpływa także wiek kur, ale tylko w okresie do uzyskania przez nioski szczytu nieśności (u Zielononózek kuropatwianych do 32. tygodnia życia), bowiem w późniejszym okresie kształt jaj stabilizuje się [10].

Tabela 3

Jakość skorupy jaj.
Quality of egg shell.

Wyszczególnienie Specification	Wiek kur [tygodnie] Age of hens [weeks]					
	36		50		80	
	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]
Barwa [%] Colour [%]	65,84 $\pm$ 4,58	6,9	63,76 $\pm$ 4,44	6,9	64,96 $\pm$ 5,04	7,7
Masa [g] Weight [g]	5,24 $\pm$ 0,38	7,2	5,44 $\pm$ 0,47	8,6	5,42 $\pm$ 0,45	8,3
Gęstość [mg/cm ²] Density [g/cm ²]	73,95 $\pm$ 8,48	11,5	73,90 $\pm$ 8,43	11,4	72,57 $\pm$ 8,05	11,1
Grubość [μm] Thickness [μm]	0,34 $\pm$ 0,03	8,8	0,33 $\pm$ 0,03	9,1	0,33 $\pm$ 0,03	9,1
Wytrzymałość [N] Strength [N]	33,47 $\pm$ 9,34	27,9	30,95 $\pm$ 14,26	46,1	28,03 $\pm$ 8,52	30,4

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2; n = 25.

Masa jaj od 80-tygodniowych kur była większa w porównaniu z uzyskiwanymi od niosek 36-tygodniowych o 9,2 %, a masa żółtka o 17 % ($p \leq 0,01$), przy stosunkowo niskich współczynnikach zmienności obydwu cech (tab. 2). W jajach pochodzących od kur starszych (50- i 80-tygodniowych) stwierdzono wzrost zawartości żółtka w jajach ($p \leq 0,01$), a zmniejszony udział białka i skorup ($p \leq 0,05$) w porównaniu z jajami uzyskanymi od kur młodych, 36-tygodniowych. Zwiększona zawartość żółtek w jajach poprawia ich smak, co jest powszechnie znaną zależnością i cechą charakteryzującą tę rodzimą rasę kur [10]. Keshavarz i wsp. [8] stwierdzili istotny wpływ wartości pokarmowej (szczególnie poziomu białka) paszy na masę jaj, natomiast w badaniach własnych masa jaj z chowu ekologicznego była porównywalna z masą jaj od kur z chowu intensywnego [10], mimo żywienia ich paszą o małej zawartości białka (tab. 1). Mała masa jaj jest cechą charakterystyczną kur ras objętych programem ochrony, bowiem przyjęta metoda ich zachowania nie zakłada selekcji na tę i inne cechy użytkowe [11]. Co prawda na kształtowanie się masy jaj może wpływać również dostęp niosek do wybiegu, ale badania innych autorów nie potwierdzają jednoznacznie takiej zależności.

Sekeroglu i wsp. [24] przy żywieniu kur paszą pełnoporcjową zaobserwowali nieznacznie mniejszą masę jaj od kur utrzymywanych na wybiegach, podczas gdy Rossi [22] oraz van den Brand i wsp. [28] większą.

Badania własne potwierdziły znaną także w stadach towarowych kur zależność o obniżeniu wysokości białka i JH wraz z wiekiem niosek [10, 26].

W jajach niosek 2-letnich stwierdzono zwiększenie ich liczby z plamami krwawymi. Decuypere i Baerdemaeker [14] oraz Flock i wsp. [6] stwierdzili, że liczba plam krwistych i mięsnych jest większa w jajach o brązowych skorupach niż w jajach o białej barwie skorupy. Jaja kur Zielononózek kuropatwianych charakteryzują się jasno-kremową barwą skorupy, a w ich żółtkach, bez względu na system chowu, rzadko występują plamy krwawe lub mięsne [11].

W jajach od starszych kur zaobserwowano poprawę intensywności barwy żółtek (ok. 1 pkt w skali La Roche'a) oraz wzrost zawartości witamin A i E. Wraz z wiekiem kur zmniejszał się współczynnik zmienności dotyczący zawartości witamin.

Według wielu autorów dostęp niosek do trawiastych wybiegów wpływa korzystnie na intensywność barwy żółtka pozyskiwanych od nich jaj [20, 24, 28]. W paszy ekologicznej brak syntetycznych barwników, a więc barwa żółtek > 6 pkt w skali La Roche'a z tendencją wzrostową wraz z długością utrzymywania kur w tym systemie chowu jest dobrym wynikiem, porównywalnym do podobnych badań van den Brand i wsp. [28]. Czynnikiem sprzyjającym zwiększeniu intensywności barwy żółtka kur korzystających z wybiegu było prawdopodobnie uzupełnienie diety roślinami, które były źródłem ksantofili zawartych w żółtkach jaj.

Zawartość witamin w jaju zależy od ich zawartości w paszy [16, 17]. W badaniach własnych pasza ekologiczna, którą żywiono nioski, zawierała kilkakrotnie mniej witamin niż w paszach standardowych. Zatem można przyjąć, że dodatkowym źródłem witamin dla niosek były rośliny pobierane dodatkowo na wybiegu. Rośliny są zasobne w β -karoten, który jest prowitaminą A. Dlatego też w żółtkach jaj pochodzących od niosek utrzymywanych z dostępem do wybiegów stwierdzono większą zawartość witaminy A. Istotny wzrost zawartości witaminy A w żółtkach jaj kur, których paszę wzbogacono zielonkami lub koncentratami roślinnymi wykazano w badaniach Krawczyk i wsp. [14] oraz Mendonca i wsp. [18].

Według Simčič [25] zawartość cholesterolu w żółtku jaja jest stała, ale w niewielkim stopniu ulega zmianom wraz z wiekiem kur, co potwierdziły także niniejsze badania.

Wytrzymałość skorupy jest jednym z najważniejszych wskaźników jakości jaj. Zmniejszenie wytrzymałości skorupy wpływa na wzrost liczby jaj stłuczonych w czasie produkcji i obrotu, a to z kolei obniża opłacalność produkcji jaj metodami ekologicznymi. Z piśmiennictwa wynika, że w chowie intensywnym wraz z wiekiem kur obniża się wytrzymałość skorupy jaj, czego powodem jest najczęściej obniżenie przy-

swajalności wapnia i fosforu przez nioski oraz zmiana struktury skorupy [4, 21, 26, 28]. W przeprowadzonych badaniach również zaobserwowano tendencję do zmniejszania się wytrzymałości skorupy wraz z wiekiem niosek, ale różnic tych nie potwierdzono statystycznie (tab. 3). Być może duża aktywność ruchowa niosek oraz możliwość pobierania paszy i związków mineralnych (w tym wapnia) na wybiegu (dostępność roślin i bezkręgowców) ograniczyły tendencję malejącą wytrzymałości skorupy jaj składanych przez nioski w drugim roku użytkowania [9].

Tabela 4

Zawartość kwasów tłuszczowych w żółtkach jaj [% sumy kwasów tłuszczowych].
Content of fatty acids in egg yolks [% of fatty acids total].

Kwasy tłuszczowe Fatty acids	Wiek kur [tygodnie] Age of hens [weeks]					
	36		50		80	
	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]	$\bar{x} \pm s / SD$	V[%]
14:0	0,53 ± 0,03	5,6	0,58 ± 0,05	8,6	0,52 ± 0,04	7,7
16:0	30,04 ± 0,80	2,7	30,25 ± 1,29	4,3	30,06 ± 0,49	1,6
16:1n-7	4,37 ± 0,51	11,7	4,32 ± 0,15	3,5	4,27 ± 0,31	7,3
18:0	7,95 ± 1,06	13,3	8,15 ± 0,47	5,8	7,78 ± 0,14	1,8
18:1n-9	41,98 ± 1,27	3,0	40,56 ± 3,49	8,6	42,11 ± 0,64	1,5
18:2n-6	10,78 ± 1,14	10,6	11,56 ± 2,17	18,8	10,78 ± 0,24	2,2
18:3n-3	0,52 ± 0,09	17,3	0,59 ± 0,15	25,4	0,55 ± 0,06	10,9
20:4n-6	1,83 ± 0,06	3,3	1,75 ± 0,07	4,0	1,76 ± 0,13	7,4
DHA	1,29 ± 0,07	5,4	1,27 ± 0,14	11,0	1,28 ± 0,20	15,6
SFA	38,60 ± 0,67	1,7	39,00 ± 1,35	3,5	38,38 ± 0,55	1,4
MUFA	46,49 ± 0,76	1,6	45,19 ± 3,32	7,3	46,72 ± 0,23	0,5
PUFA	14,89 ± 1,28	8,6	15,73 ± 2,13	13,5	14,83 ± 0,31	2,1
PUFA n-6	12,67 ± 1,08	8,5	13,38 ± 2,12	15,8	12,61 ± 0,16	1,3
PUFA n-3	1,84 ± 0,13	7,1	1,89 ± 0,03	1,6	1,85 ± 0,17	9,2
MUFA/SFA	1,20 ± 0,02	1,7	1,16 ± 0,12	10,3	1,22 ± 0,02	1,6
PUFA/SFA	0,39 ± 0,04	10,2	0,40 ± 0,04	10,0	0,38 ± 0,01	2,6
PUFA n-6: n-3	6,87 ± 0,32	4,6	7,09 ± 1,11	15,6	6,86 ± 0,61	8,9

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2; n = 14.

Zawartość kwasów tłuszczowych w żółtkach jaj Zielononózek kuropatwianych, utrzymywanych przez 2 lata w warunkach chowu ekologicznego nie uległa statystycznie istotnym zmianom (tab. 4). Stwierdzono, że w żółtkach jaj pochodzących od starszych kur poziom kwasów tłuszczowych zarówno nasyconych, jak i nienasyconych był bardziej wyrównany ($V < 10\%$) niż w żółtkach jaj młodszych niosek.

Na profil kwasów tłuszczowych w żółtkach jaj wpływa głównie żywienie [15], ale jak wynika z badań Cherian [3] prowadzonych na nioskach w stadach reprodukcyjnych kur mięsnych, stwierdza się wysoko istotny wpływ wieku ptaków na tę cechę. Natomiast w przeprowadzonych badaniach własnych nie wykazano różnic w profilu kwasów tłuszczowych między jajami od kur młodych i starych, co potwierdzają także Scheideler i wsp. [23]. Stwierdzono natomiast, że niezależnie od wieku niosek w chowie ekologicznym, przy dostępie kur do zielonych wybiegów utrzymuje się korzystny, niski stosunek kwasów n-6 : n-3, a wynik ten jest zbliżony do uzyskanego w badaniach Krawczyk i wsp. [14]. Świadczy to o korzystnym wpływie utrzymywania kur w warunkach chowu ekologicznego na jakość jaj. We wszystkich jajach, niezależnie od wieku, podobnie jak w badaniach Hidalgo i wsp. [7] oraz Kirubakaran i wsp. [15] wykazano, że głównymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi żółtka jaj były kwas oleinowy (C18 : 1, 40,56 - 42,11 %) i linolowy (C18:2n-6, 10,78 - 11,56 %), natomiast wśród kwasów nasyconych dominował kwas palmitynowy (C16 : 0, 30,04 - 30,25 %) i stearynowy (C18 : 0, 7,78 - 8,15 %). W żółtkach kur rodzimej rasy Z-11, będącej przedmiotem badań, stwierdzono większy udział kwasu linolenowego (C18 : 3 n-3), ale mniej linolowego (18 : 2 n-6) w porównaniu z wynikami badań Kirubakaran i wsp. [15], prowadzonych na nioskach towarowych Leghorn. W żółtkach jaj badanych kur nie stwierdzono tendencji do zmniejszenia zawartości kwasu dekozaheksaenowego czy do zwiększenia zawartości kwasu arachidonowego wraz z wiekiem niosek, co zaobserwował Cherian [3], prowadząc podobne badania na kurach mięsnych.

Wnioski

1. Stwierdzono korzystny wpływ wieku niosek rodzimej rasy Zielononóżka kuropatwiana, utrzymywanych w chowie ekologicznym, na zwiększenie masy jaj i masy żółtek oraz zwiększenie udziału żółtka i zmniejszenie udziału białka w jajach.
2. Zielononóżka kuropatwiana w warunkach chowu ekologicznego składa jaja o intensywniejszej barwie żółtka i o większej zawartości witamin A i E.
3. Niezależnie od wieku niosek w chowie ekologicznym, przy dostępie kur do zielonych wybiegów utrzymuje się korzystny, niski stosunek kwasów tłuszczowych n-6 : n-3 w żółtkach jaj.
4. W warunkach chowu ekologicznego, wraz z wiekiem kur jakość skorupy jaj nie ulega obniżeniu.
5. Utrzymująca się dobra jakość jaj od kur w drugim roku użytkowania wskazuje na zasadność użytkowania kur rodzimej rasy Zielononóżka kuropatwiana w ekologicznym systemie chowu przez okres dwóch lat, co powoduje zmniejszenie kosztów produkcji o nakłady na odchów ptaków.

Praca wykonana w ramach programu wieloletniego, podzadanie nr 08-131.9

Literatura

- [1] AOAC - Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, 1990, 985.28, 15th Edition.
- [2] Castellini C., Perella F., Mugnai C., Bosco Dal A.: Welfare, productivity and quality traits of egg in laying hens reared under different rearing systems. XII Eur. Poultry Conf., Verona-Italy, 2006, 10-14 September, p.10705.
- [3] Cherian G.: Egg quality and yolk Polyunsaturated fatty acid status in relation to broiler breeder hen age and dietary n-3 oils. Poultry Sci., 2008, **87**, 1131-1137.
- [4] Decuypere E., Baerdemaeker De J.: Monitoring of eggshell breakage and eggshell strength in different production chains of consumption eggs. Poultry Sci., 2006, **85**, 1670-1677.
- [5] Egerer U., Grashorn M.A.: Integrated assessment of egg quality by biophoton measurement. Ganzheitliche Beurteilung der Lebensmittelqualität: Die Biophotonenmessung bei Hühnereiern. Tierärztliche Umschau, 2008, **63** (3); 150-158.
- [6] Flock D.K., Preisinger R., Schmutz M.: Egg quality - a challenge for breeders of laying hens. IX European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Kubadasý-Turcja, 2001, 9-12 September, p. 55-61.
- [7] Hidalgo, A., Rossi, M., Clerici, S., Ratti, S.: A market study on the quality characteristics of egg from different housing systems. Food Chem., 2008, **106**, 1031-1038.
- [8] Keshavarz K., Nakjima S.: The effect of dietary manipulations of energy, protein and fat during the growing and laying periods on early egg weight and egg components. Poultry Sci., 1995, **74**, 50-61.
- [9] Koreleski J., Świątkiewicz S.: Calcium from limestone meal and grit in laying hens diet – effect on performance, eggshell and bone quality. J. Anim. Feed Sci., 2004, **13**, 635-645.
- [10] Krawczyk J.: Effect of layer age and egg production level on changes in quality traits of eggs from hens of conservation breeds and commercial hybrids. Ann. Anim. Sci., 2009, **9** (2), 185-193.
- [11] Krawczyk J.: Quality of eggs from Polish native Greenleg Partridge chicken-hens maintained in organic vs. backyard production systems. Anim. Sci. Papers Reports, 2009, **27** (3), 227-235.
- [12] Krawczyk J., Cywa-Benko K., Wężyk S.: Effect of housing system on egg yolk cholesterol levels in native breeds of hens. Intern. Conf. "First international scientific poultry days", Słowacja – Nitra, 2005, 12-14 September, pp. 18-20.
- [13] Krawczyk J., Gornowicz E.: Quality of eggs from hens kept in two different free-range systems in comparison with barn system. Arch. Geflügelkd., 2010, **74** (3), 151-157.
- [14] Krawczyk J., Sokołowicz Z., Szymczyk B.: Effect of housing system on cholesterol, vitamin and fatty acid content of yolk and physical characteristics of eggs from Polish native hens. Arch. Geflügelkd., 2011, **75** (3), 151-157.
- [15] Kirubakaran A., Narahari D., Ezhil Valavan T., Sathish Kumar A.: Effects of flaxseed, sardines, pearl millet and holy basil leaves on production traits of layers and fatty acid composition of egg yolks. Poultry Sci., 2011, **90**, 147-156.
- [16] Leeson S., Caston L.J.: Vitamin Enrichment of eggs. J. Appl. Poultry Res., 2003, **12**, 24-26.
- [17] Meluzzi A., Sirri F., Manfreda G., Tallarico N.: Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n-3 long-chain fatty acids. Poultry Sci., 2000, **79**, 539-545.
- [18] Mendonça C.X. Jr., Almeida C.R.M., Mori A.V., Watanabe C.: Effect of dietary vitamin A on egg yolk retinol and tocopherol levels. J. Appl. Poultry Res., 2002, **11**, 373-378.
- [19] Smulikowska S., Rutkowski A. (red.): Normy Żywienia Drobiu. IFiZZ PAN, Warszawa 2005.
- [20] Nys Y.: Dietary carotenoids and egg yolk coloration-a revive. Arch. Geflügelkd., 2000, **64** (2), 45-54.

- [21] Rodriguez-Navarro A., Kalin O., Nys Y., Carcia-Ruiz J.M.: Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *Br. Poultry Sci.*, 2002, **45**, 390-415.
- [22] Rossi M.: Influence of the laying hen housing systems on table egg characteristics. *Proc. XVIII European Symp. On the Quality of Poultry Meat and XII Eur. Symp. on the Quality of Eggs and Egg products*. Prague, 2007, September 2-5, pp. 49-51.
- [23] Scheideler S.E., Jaroni D., Froning G.: Strain and age effects on egg composition from hens fed diets rich in n-3 fatty acids. *Poultry Sci.*, 1998, **77**, 192-196.
- [24] Sekeroglu A., Sarica M., Demir E., Ulutas Z., Tilki M., Saatci M.: The effects of housing system and storage length on the quality of eggs produced by two lines of laying hens. *Arch. Geflügelkd.*, 2008, **72**, 106-109.
- [25] Simčič, M., Stibilj, V., Holcman, A.: The cholesterol content of eggs produced by the Slovenian autochthonous Styrian hen. *Food Chem.*, 2009, **114**, 1-4.
- [26] Solomon S.E.: *Egg and eggshell quality*. Wolfe Publishing Ltd., 1991.
- [27] Suk Y.O., Park C.: Effect of breed and age of hens on the yolk to albumen ratio in two different genetic stocks. *Poultry Sci.*, 2001, **80**, 855-858.
- [28] Van den. H. Brand, Parmentier H., Kemp K.: Effect of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. *Br. Poultry Sci.*, 2004, **45** (6), 745-752.
- [29] Washburn K.W., Nix D.F.: A rapid technique for extraction of yolk cholesterol. *Poultry Sci.*, 1974, **53**, 1118-1122.

QUALITY OF EGGS FROM ORGANICALLY REARED LAYING HENS DURING THEIR FIRST AND SECOND YEAR OF PRODUCTION

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the effect of layers' age on the development of quality traits of eggs from native Greenleg Partridge [Z-11] hens reared under the organic breeding conditions. The quality of consumption eggs from layers aged 36, 50, and 80 weeks was investigated. It was found that the layers' age had an effect on the increased egg and yolk weight as well as on the increased content of egg yolk and the decreased content of egg albumen in the eggs analyzed. The intensity of yolk colour increased with age of the layers. In the egg yolks from older hens, the content of vitamins A and E was higher than in the egg yolk from the younger layers. The physical features of egg shells from older layers indicated their good quality. The age was found to have no effect on the profile of fatty acids in the egg yolks. The good quality of eggs from the older Greenleg Partridge layers proves that it is reasonably and practically to utilize them in the organic breeding system during a period of two years.

Key words: native breed of Greenleg Partridge hens, age of hens, organic breeding, egg quality 

MARIOLA FRIEDRICH, MAGDALENA KUCHLEWSKA

OCENA WPŁYWU WYBRANEJ MIESZANINY DODATKÓW DO ŻYWNOŚCI NA WSKAŹNIKI PRZEMIAN WĘGLOWODANOWO-LIPIDOWYCH

Streszczenie

Celem badań było określenie, na modelu zwierzęcym, czy i w jaki sposób mieszanina wybranych substancji dodatkowych do żywności, wraz ze zmianą składu diety na przetworzoną, oczyszczoną, wymagającą zastosowania tych dodatków, wpływają na metabolizm węglowodanowo-lipidowy ustroju.

Badania przeprowadzono na 48 samcach i 48 samicach (osobno dla każdej płci) szczura szczepu Wistar, podzielonych na cztery grupy. Do picia zwierzęta grupy I i III otrzymywały wodę. Zwierzętom z grupy II i IV podawano 5 ml roztworu wybranych dodatków do żywności: azotanu(V) potasu – E 252, azotanu(III) sodu – E 250, kwasu benzoowego – E 210, kwasu sorbowego – E 200 i glutaminianu sodu – E 621. Ilość podawanych dodatków wyliczono, biorąc pod uwagę średnie spożycie przez ludzi, w przeliczeniu na jednostkę masy ciała. Po wypiciu roztworu zwierzęta dopajano czystą wodą.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dodatek do diety mieszaniny wybranych dodatków do żywności powodował istotny wzrost stężenia glukozy, cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji LDL, co wskazuje, że zastosowane dodatki mogą sprzyjać powstawaniu lub nasilaniu zaburzeń lipidowych. Odpowiedź organizmu na zastosowane dodatki była istotnie związana z płcią badanych zwierząt, przy czym zmiany zachodzące w zakresie gospodarki węglowodanowo-lipidowej obserwowano również u samic, pomimo ochronnego wpływu estrogenów w tym zakresie. Niekorzystny charakter zmian zachodzących pod wpływem zastosowanej mieszaniny dodatków obserwowano zarówno u zwierząt karmionych paszą podstawową, jak i zmodyfikowaną. Jednak zmiany te występowały z różnym natężeniem, w zależności od badanego parametru.

Słowa kluczowe: dodatki do żywności, metabolizm węglowodanowo-lipidowy, szczur szczepu Wistar

Wprowadzenie

Problemy dotyczące zaburzeń gospodarki lipidowej należą do aktualnych obszarów badawczych specjalistów z wielu dziedzin. Związane jest to z faktem, że zaburzenia te uważa się za główny czynnik rozwoju miażdżycy – jednej z ważniejszych nieza-

Prof. dr hab. M. Friedrich, dr inż. M. Kuchlewska, Zakład Fizjologii Żywienia Człowieka, Wydz. Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin

każnych chorób przewlekłych, tzw. chorób cywilizacyjnych [20, 21]. Poszukiwane są zarówno metody leczenia, jak i zapobiegania dyslipidemii oraz miażdżycy. Istotne znaczenie w tym zakresie może mieć czynnik żywieniowy, tym bardziej że sposób żywienia może podlegać dość prostej interwencji i modyfikacji.

W Polsce na przestrzeni ostatnich lat zmieniły się upodobania żywieniowe konsumentów, którzy coraz częściej korzystają z żywności wysoko przetworzonej. Do jej produkcji wykorzystywane są zarówno nowoczesne procesy technologiczne, jak i wiele substancji dodatkowych, których obecność w diecie nie jest obojętna dla organizmu człowieka. Substancje dodatkowe do żywności mogą być stosowane tylko zgodnie z ich funkcjami technologicznymi, w dawkach, których wielkość jest uregulowana prawnie. Jednak ze względu na rosnące znaczenie globalizacji handlu artykułami spożywczymi konieczne jest prowadzenie ciągłej kontroli i badań nad bezpieczeństwem stosowania dodatków do żywności i ich oddziaływaniem na organizm. Ciągłe jeszcze niewielkie są dane informujące o synergistycznym wpływie mieszaniny różnych substancji dodatkowych do żywności na funkcje ustroju i podstawowe tory metaboliczne, których zmieniony przebieg może sprzyjać pojawianiu się nieprawidłowej odpowiedzi organizmu, niezwiązanej ze swoistą reakcją układu odpornościowego na spożyty pokarm lub związek dodany [16].

Celem podjętych badań było określenie, na modelu zwierzęcym, czy i w jaki sposób mieszanina wybranych, najczęściej stosowanych i spożywanych substancji dodatkowych, wraz ze zmianą składu diety na przetworzoną, oczyszczoną, wymagającą zastosowania tych dodatków, wpływają na metabolizm węglowodanowo-lipidowy ustroju.

Materiał i metody badań

Doświadczenie, po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej (nr zgody 31/2006), przeprowadzono na 48 samcach i 48 samicach (osobno dla każdej płci) szczura laboratoryjnego szczepu Wistar, w wieku 5 - 7 miesięcy, które umieszczono w indywidualnych klatkach, w klimatyzowanym wiwarium, w temp. $21 \pm 1^\circ\text{C}$, w cyklu jasność/ciemność 12 h/12 h.

Zwierzęta podzielono na 4 grupy żywieniowe, po 12 sztuk w każdej, i żywiono *ad libitum* granulowanymi mieszankami, wyprodukowanymi z tych samych, poza różnicującymi, komponentów, po wdrożeniu procedury 5.14.5 „Czyszczenie maszyn i urządzeń”, przez Wytwórnię Pasz i Koncentratów w Kcyni. Grupy I i II otrzymywały paszę podstawową, grupy III i IV – paszę zmodyfikowaną, w której, w stosunku do paszy podstawowej, część pełnych ziaren pszenicy zastąpiono mąką pszenną typu 500, a 50 % kukurydzy – sacharozą. Udział pozostałych składników w obu paszach był identyczny.

W celu ustalenia składu chemicznego zastosowanych w doświadczeniu pasz przeprowadzono podstawowe analizy chemiczne. Z przygotowanych prób, zgodnie

z zaleceniami [26], pobrano naważki (po 4 z każdej), w których oznaczano zawartość białka ogólnego, tłuszczu surowego, suchej masy i związków mineralnych w postaci popiołu ogólnego. Względną zawartość węglowodanów obliczano z różnicy pomiędzy suchą masą a sumą zawartości białka, tłuszczu i popiołu. Pełny skład zastosowanych w doświadczeniu pasz przedstawiono w tab. 1., a ich skład chemiczny w tab. 2. Pasze były izokaloryczne.

Tabela 1

Skład surowcowy pasz zastosowanych w doświadczeniu.

Ingredients contained in feedstuffs used in experiment.

Skład recepturalny Ingredients	Pasza podstawowa [%] Basic feedstuff [%]	Pasza zmodyfikowana [%] Modified feedstuff [%]
Pszennica /Wheat	36,4	6,0
Kukurydza / Corn grain	20,0	10,0
Otręby pszenne / Wheat bran	20,0	20,0
Śruta sojowa / Soya-bean grain	17,0	17,0
Serwatka suszona / Dry whey	3,0	3,0
Fosforan 2-CA / Phosphate 2-CA ¹	0,8	0,8
Kreda pastewna / Fodder chalk ²	1,5	1,5
Sól pastewna / Fodder salt ³	0,3	0,3
Premiks LRM / Premix LRM ⁴	1,0	1,0
Mąka pszenna typu 500 / Wheat flour type 500	–	30,4
Cukier biały / Saccharose	–	10,0

Objaśnienia: / Explanatory notes:

¹CaHPO₄; ²Mainly CaCO₃; ³Mainly NaCl; ⁴Vitamin-mineral composition used in animals feeds.

Tabela 2

Skład chemiczny pasz zastosowanych w doświadczeniu.

Chemical composition of feedstuffs used in experiment.

Składnik Component	Pasza podstawowa Basic feedstuff	Pasza zmodyfikowana Modified feedstuff
Białko ogólne / Total protein [%]	19,2	18,5
Tłuszcz surowy / Crude fat [%]	2,81	2,33
Węglowodany / Carbohydrates [%]	63,8	65,5
Sucha masa / Dry matter [%]	91,9	92,3
Popiół ogólny / Total ash [%]	6,09	6,00
Energia brutto / Gross energy		
[kcal/g]	3,99	3,98
[kJ/g]	16,7	16,7
Energia metaboliczna / Metabolic energy		
[kcal/g]	3,57	3,56
[kJ/g]	14,9	14,9

Do picia zwierzętom grup I i III podawano czystą, odstanną wodę wodociągową. Zwierzętom grup II i IV podawano, w porze wzmożonej aktywności, 5 ml wodnego roztworu wybranych dodatków do żywności: azotanu(III) sodu (E 250) w ilości 0,07 mg/kg masy ciała, azotanu(V) potasu (E 252) - 5,07 mg/kg masy ciała, kwasu benzoesowego (E 210) - 1,39 mg/kg masy ciała, kwasu sorbowego (E 200) - 0,51 mg/kg masy ciała i glutaminianu sodu (E 621) - 17,65 mg/kg masy ciała. Podawane ilości dodatków wyliczono, biorąc pod uwagę średnie spożycie przez ludzi, w przeliczeniu na kilogram masy ciała [6, 33, 35], co wynosiło: w przypadku azotanu(III) sodu - 11,7 % ADI, azotanu(V) potasu - 137,0 % ADI, kwasu benzoesowego - 27,8 % ADI, kwasu sorbowego - 2,0 % ADI [27]. Ponieważ ilość podawanych zwierzętom dodatków przeliczano na jednostkę masy ciała, dlatego co tydzień, po zważeniu zwierząt, ilość dodatków była aktualizowana. Po wypiciu roztworu dodatków, zwierzęta dopajano czystą, odstanną wodą wodociągową.

W trakcie 7-tygodniowego doświadczenia (po jednotygodniowym okresie kondycjonowania), codziennie, na bieżąco obliczano ilość pobranej przez zwierzęta wody i spożywanej przez nie paszy, a raz w tygodniu, zawsze o tej samej porze, kontrolowano masę ciała zwierząt. Na 12 h przed zakończeniem doświadczenia odstawiono paszę, a następnie zwierzęta uśpiono anestetykiem Ketanest podanym domięśniowo i pobrano od nich krew do analiz.

W surowicy krwi oznaczano stężenia:

- glukozy i triacylogliceroli – metodami enzymatycznymi, kolorymetrycznymi, przy użyciu zestawów odczynników firmy BioMaxima, w spektrofotometrze Metertech SP-8001;
- cholesterolu całkowitego – metodą enzymatyczną, kolorymetryczną, przy użyciu zestawu odczynników firmy BioSystems, w spektrofotometrze Metertech SP-8001;
- HDL-cholesterolu – metodą strąceniową, przy użyciu zestawu odczynników firmy Aqua Med, w spektrofotometrze Metertech SP-8001;
- LDL-cholesterolu – metodą strąceniową, przy użyciu zestawu odczynników firmy BioSystems, w spektrofotometrze Metertech SP-8001 oraz
- wykonywano rozdział elektroforetyczny lipoprotein na żelu agarozowym Paragon Elektrophoresis System Lipo i przy użyciu odczynników firmy Beckman Coulter oraz komory firmy Cormay.

Uzyskane wyniki, po stwierdzeniu normalności rozkładu, poddano obliczeniom statystycznym przy użyciu komputerowego programu Statistica® 8 firmy StatSoft, z zastosowaniem testu Duncana oraz trzyczynnikowej (dodatki × dieta × płeć) analizy wariancji dla zmiennych niezależnych.

Wyniki i dyskusja

Analizując wpływ zastosowanej w doświadczeniu mieszanki dodatków na spożycie paszy stwierdzono, że modyfikowała ona, zarówno u samców, jak i samic, wielkość jej pobrania (tab. 3).

U samców wpływ ten manifestował się zwiększonym spożyciem paszy, niezależnie od jej rodzaju, zarówno ogółem, jak i w przeliczeniu na jednostkę masy ciała. U samic wpływ zastosowanych dodatków do żywności zaznaczył się wzrostem ogólnego spożycia paszy przez samice żywione paszą podstawową oraz zmniejszeniem ogólnego spożycia paszy przez samice żywione paszą zmodyfikowaną. Biorąc jednak pod uwagę ilość spożytej paszy, w przeliczeniu na 100 g masy ciała stwierdzono, podobnie jak u samców, wzrost spożycia pod wpływem zastosowanych dodatków, niezależnie od rodzaju paszy, i był on statystycznie istotny (tab. 4).

Zastosowana w doświadczeniu mieszanka dodatków do żywności tylko u zwierząt żywionych paszą podstawową sprzyjała większym przyrostom masy ciała, natomiast u żywionych paszą zmodyfikowaną powodowała zmniejszenie przyrostów masy ciała, tak bezwzględnie, jak i w przeliczeniu na 100 g spożytej paszy (tab. 3).

Obserwowany efekt jest trudny do wyjaśnienia, ale pozwala domniemywać, że albo składniki paszy zmodyfikowanej, na skutek wpływu dodatków do żywności, nie były w pełni wykorzystywane, albo były wykorzystywane w sposób, który nie pozwalał na adekwatne, do ich wartości energetycznej, przyrosty masy ciała. Wydaje się, że mógłby to być objaw wpływu zastosowanych w eksperymencie azotanu(V) i azotanu(III). Bilczuk [3], stosując te dodatki, również obserwowała zmniejszone przyrosty masy ciała badanych zwierząt.

Biorąc pod uwagę wyniki analizy statystycznej badanych interakcji pomiędzy zastosowanymi dodatkami do żywności a dietą i płcią (tab. 4), trudno jednoznacznie określić, co było bezpośrednią przyczyną obserwowanych zjawisk. Mogły nią być różnice w wielkości spożycia paszy i związany z nimi dowóz substancji regulujących lub też sama zamiana składników paszy, która zubażała lub pozbawiała ją np. składników mineralnych, obecnych w okrywie owocowo-nasiennej ziarniaków. Obserwowane zależności mogły być też efektem wpływu hormonów płciowych na metabolizm ustroju [13, 34], których odmienne działanie wyraźnie już zaznaczyło się przy analizowaniu badanych parametrów gospodarki węglowodanowo-lipidowej (tab. 5 i 6).

T a b e l a 3

Pobieranie paszy oraz przyrosty masy ciała szczurów w zależności od składu diety i zastosowanej mieszaniny dodatków do żywności.
Feedstuff intake and gains in body mass in rats depending on diet composition and applied mixture of selected food additives.

Badany parametr Examined parameter	Płeć Gender	Pasza podstawowa Basic feedstuff (a)	Pasza podstawowa + dodatki Basic feedstuff + food additives (b)	Pasza zmodyfikowana Modified feedstuff (c)	Pasza zmodyfikowana + dodatki Modified feedstuff + food additives (d)	Istotność różnic Significance of differences
Spożycie paszy [g] Consumption of feedstuff [g]	Males Females	1348 ± 29,4 831 ± 47,7	1353 ± 48,6 892 ± 62,9	1224 ± 50,3 859 ± 43,0	1245 ± 72,9 840 ± 55,5	a – c**, d*; b – c, d** a – b**, b – d*
Spożycie paszy [g/100 g masy ciała] Consumption of feedstuff [g/100 g of body mass]	Males Females	276 ± 13,8 312 ± 15,4	278 ± 16,0 331 ± 16,6	254 ± 15,9 323 ± 19,2	265 ± 20,5 333 ± 21,9	a – c**, b – c** a – b*, d**
Przyrost masy ciała [g] Body mass gain [g]	Males Females	37,2 ± 12,84 13,5 ± 7,89	40,6 ± 9,17 14,8 ± 6,07	36,5 ± 8,75 12,0 ± 7,56	31,4 ± 10,92 6,84 ± 1,57	- d – a, b, c**
Przyrosty masy ciała [g/100 g masy ciała] Body mass gain [g/100 g of feedstuff]	Males Females	2,74 ± 0,493 1,61 ± 0,365	2,99 ± 0,720 1,65 ± 0,383	2,98 ± 0,746 1,39 ± 0,574	2,52 ± 0,837 0,81 ± 0,188	- d – a, b, c**, b – c*

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s$ / SD, n = 96; *, **, *** - różnica statystycznie istotna *p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01 / ***, *** - statistically significant difference *p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01.

Tabela 4

Wyniki analizy statystycznej wpływu mieszaniny wybranych dodatków do żywności i składu diety na spożycie paszy i przyrosty masy ciała szczurów.

Statistical analysis results of impact of mixture of selected food additives and diet composition on feedstuff intake and body mass gain in rats.

Badany parametr Examined parameter	Istotność różnic i interakcje Significance of differences and interactions						
	Dodatki Food additives (A)	Dieta Diet (D)	Płeć Sex (P)	A×D	A×P	D×P	A×D×P
Spożycie paszy [g] Consumption of feedstuff [g]	-	**	**	-	-	**	-
Spożycie paszy [g/100 g masy ciała] Consumption of feedstuff [g/100 g of body mass]	*	-	**	-	-	*	-
Przyrost masy ciała [g] Body mass gain [g]	*	**	**	**	-	-	-
Przyrosty masy ciała [g/100 g masy ciała] Body mass gain [g/100 g of feedstuff]	*	**	**	**	**	**	*

Objaśnienia: / Explanatory notes:

n = 96; *, ** - różnica statystycznie istotna *p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 / *, ** - statistically significant difference *p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01.

Zastosowane w doświadczeniu dodatki do żywności, zarówno u samców, jak i u samic spowodowały wzrost stężenia glukozy we krwi, niezależnie od rodzaju spożywanej paszy (tab. 5 i 6). Stężenie glukozy we krwi jest wypadkową składu diety, tempa wnikania glukozy do komórek i szybkości jej metabolizowania w komórkach. Szybkość metabolizmu glukozy w komórce zależy m.in. od aktywności enzymów biorących udział w jej przemianach. Aktywność ta może być modyfikowana obecnością lub brakiem określonych witamin z grupy B, pełniących w tych reakcjach rolę koenzymów. Biorąc powyższe pod uwagę wydaje się, że obserwowany efekt mógł wynikać z faktu, że zastosowane w doświadczeniu: azotan(V) i azotan(III) zmniejszają w produkcie, poprzez destrukcję, zawartość witamin z grupy B [18, 28]. Powstające niedobory nie tylko mogą zmieniać tempo metabolizmu glukozy w komórce, ale mogą również hamować proces jej wnikania do komórki [5, 15]. Mechanizm tego wpływu związany jest ze wzrostem, przy niedoborach witaminy B₆, stężenia kwasu ksantureninowego i tworzeniem kompleksów z insuliną, które wykazują niewielką aktywność hormonalną.

Tabela 5

Wartości wybranych parametrów gospodarki węglowodanowo-lipidowej u samców szczura w zależności od składu diety i zastosowanej mieszanki dodatków do żywności.

Values of selected parameters of carbohydrate-lipid metabolism in male rats depending on diet composition and applied mixture of selected food additives.

Badany parametr Examined parameter	Pasza podstawowa Basic feedstuff (a)	Pasza podstawowa + dodatki Basic feedstuff + food additives (b)	Pasza zmodyfikowana Modified feedstuff (c)	Pasza zmodyfikowana + dodatki Modified feedstuff + food additives (d)	Istotność różnic Significance of differences
Glukoza Glucose [mmol·l ⁻¹]	9,10 ± 0,98	9,60 ± 0,86	10,60 ± 0,89	11,38 ± 1,09	a – c, d** b – c*, d**
Triacyloglicerole Triacylglycerols [mmol·l ⁻¹]	0,69 ± 0,21	1,04 ± 0,31	1,01 ± 0,22	1,10 ± 0,27	a – b, c, d**
Cholesterol całkowity Total cholesterol [mmol·l ⁻¹]	2,51 ± 0,10	2,72 ± 0,24	2,77 ± 0,21	3,06 ± 0,10	a – b, c, d** b – d** c – d**
Cholesterol HDL HDL-cholesterol [mmol·l ⁻¹]	1,79 ± 0,17	1,76 ± 0,09	1,85 ± 0,15	1,88 ± 0,05	b – d*
Cholesterol LDL LDL-cholesterol [mmol·l ⁻¹]	0,43 ± 0,07	0,54 ± 0,06	0,46 ± 0,13	0,71 ± 0,14	a – b*, d** d – b, c**
α-lipoproteiny α-lipoprotein (HDL-) [%]	78,2 ± 5,46	72,7 ± 5,14	74,6 ± 6,17	75,9 ± 10,35	-
Pre-β-lipoproteiny Pre-β-lipoprotein (VLDL-) [%]	7,3 ± 2,54	11,9 ± 3,01	11,7 ± 3,07	9,2 ± 4,90	a – b, c**
β-lipoproteiny β-lipoprotein (LDL-) [%]	14,3 ± 2,51	15,0 ± 3,13	13,3 ± 3,42	14,4 ± 4,37	-

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s$, n = 12 w grupie / $\bar{x} \pm SD$, n = 12 in a group

*, ** - różnica statystycznie istotna *p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 / *, ** - statistically significant difference

*p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01.

Tabela 6

Wartości wybranych parametrów gospodarki węglowodanowo-lipidowej u samic szczura w zależności od składu diety i zastosowanej mieszanki dodatków do żywności.

Values of selected parameters of carbohydrate-lipid metabolism in female rats depending on diet composition and applied mixture of selected food additives.

Badany parametr Examined parameter	Pasza podstawowa Basic feedstuff (a)	Pasza podstawowa + dodatki Basic feedstuff + food additives (b)	Pasza zmodyfikowana Modified feedstuff (c)	Pasza zmodyfikowana + dodatki Modified feedstuff + food additives (d)	Istotność różnic Significance of differences
Glukoza Glucose [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]	9,05 ± 0,94	9,44 ± 0,93	10,7 ± 0,98	11,27 ± 0,80	a – c, d** b – c, d**
Triacyloglicerole Triacylglycerols [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]	0,85 ± 0,08	0,79 ± 0,09	1,05 ± 0,17	0,97 ± 0,25	a – c** b – c, d**
Cholesterol całkowity Total cholesterol [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]	2,64 ± 0,37	2,54 ± 0,36	2,77 ± 0,30	3,08 ± 0,26	d – a, b**, c*
Cholesterol HDL HDL-cholesterol [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]	1,89 ± 0,20	1,59 ± 0,18	1,86 ± 0,21	1,90 ± 0,23	b – a, c, d**
Cholesterol LDL LDL-cholesterol [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]	0,47 ± 0,12	0,64 ± 0,25	0,51 ± 0,19	0,79 ± 0,27	d – a, c**
α -lipoproteiny α -lipoprotein (HDL-) [%]	82,5 ± 2,92	78,2 ± 4,00	77,6 ± 4,69	79,0 ± 4,64	a – b, c**, d*
Pre- β -lipoproteiny Pre- β -lipoprotein (VLDL-) [%]	10,6 ± 3,38	11,7 ± 1,97	15,3 ± 4,88	11,1 ± 3,81	c – a, b, d**
β -lipoproteiny β -lipoprotein (LDL-) [%]	7,88 ± 2,63	10,58 ± 1,45	6,58 ± 2,55	10,06 ± 3,27	a – b**, d* c – b, d**

Objaśnienia: / Explanatory notes:

$\bar{x} \pm s$, n = 12 w grupie / $\bar{x} \pm \text{SD}$, n = 12 in a group;

*, ** - różnica statystycznie istotna *p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 / *, ** - statistically significant difference

*p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01.

Tabela 7

Wyniki analizy statystycznej wpływu zastosowanej mieszanki dodatków do żywności i składu diety na wybrane parametry gospodarki węglowodanowo-lipidowej badanych zwierząt.

Statistical analysis results of impact of mixture of selected food additives and diet composition on selected parameters of carbohydrate-lipid metabolism in animals studied.

Badany parametr Examined parameter	Istotność różnic i interakcje Significance of differences and interactions						
	Dodatki Food additives (A)	Dieta Diet (D)	Płeć Gender (P)	A×D	A×P	D×P	A×D×P
Glukoza Glucose [mmol·l ⁻¹]	**	**	**	-	-	**	-
Triacyloglicerole Triacylglycerols [mmol·l ⁻¹]	-	**	-	-	**	-	-
Cholesterol całkowity Total cholesterol [mmol·l ⁻¹]	**	**	-	*	-	-	-
Cholesterol HDL HDL-cholesterol [mmol·l ⁻¹]	-	**	-	**	-	-	-
Cholesterol LDL LDL-cholesterol [mmol·l ⁻¹]	**	**	-	-	-	-	-
α-lipoproteiny α-lipoprotein (HDL-) [%]	-	-	**	**	-	-	-
Pre-β-lipoproteiny Pre-β-lipoprotein (VLDL-) [%]	-	*	**	**	-	-	-
β-lipoproteiny β-lipoprotein (LDL-) [%]	**	-	**	-	-	-	-

Objaśnienia: / Explanatory notes:

n = 96; *, ** - różnica statystycznie istotna *p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01 / *, ** - statistically significant difference *p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01.

Na taki mechanizm wpływu może też wskazywać stwierdzenie najwyższego stężenia glukozy we krwi zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną i otrzymujących mieszankę dodatków do żywności. Obserwowany efekt byłby wypadkową składu diety zawierającej łatwo strawne i łatwo wchłaniane węglowodany, obniżonej, poprzez zamianę składników diety, ilości witamin z grupy B [11] oraz działania zastosowanych w doświadczeniu azotanu(V) i azotanu(III).

Obserwowane zjawisko nasilania, przez zastosowaną w doświadczeniu mieszankę dodatków, wzrostu stężenia glukozy w surowicy krwi jest o tyle ważne, że aktualny sposób żywienia, w którym dominują produkty przetworzone i oczyszczone, może w sposób zupełnie nieuświadomiony wpływać na stężenie glukozy we krwi, ze wszystkimi negatywnymi skutkami tego zjawiska, takimi jak insulinooporność, cukrzyca typu II, otyłość oraz zaburzenia lipidowe [8, 19, 24, 32].

W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano także wpływ zastosowanej mieszanki dodatków do żywności na stężenie triacylogliceroli we krwi badanych zwierząt. Niezależnie od rodzaju spożywanej paszy, wpływ ten zaznaczył się odmiennie w zależności od płci. U samców obserwowano wzrost, u samic zmniejszenie stężenia triacylogliceroli we krwi (tab. 5 i 6).

Biorąc pod uwagę omówiony wcześniej wzrost stężenia glukozy we krwi, jej prawie porównywalne wartości u samców i samic oraz metaboliczny związek tego ze stężeniem triacylogliceroli, można by przypuszczać, że efekt u obu płci będzie zbliżony.

Być może za stwierdzone różnice odpowiedzialne jest różne, u samców i samic, tempo usuwania triacylogliceroli z krwi. Wykazali to Sheorain i wsp. [30]. Biorąc jednak pod uwagę uzyskane wyniki, zastosowane dodatki musiały u samców jeszcze to tempo zwalniać, a u samic zwiększać. Wskazuje na to też stwierdzona wysoce istotna interakcja pomiędzy zastosowanymi dodatkami do żywności a płcią ($A \times P$) w odniesieniu do stężenia triacylogliceroli we krwi badanych zwierząt (tab. 7). W tym kontekście obserwowany efekt można też wiązać z ochronnym wpływem estrogenów na gospodarkę lipidową organizmu [29]. Wykazano już, że hormony płciowe, wpływając wielopłaszczyznowo na metabolizm lipidowy organizmu, regulują lipolizę i lipogenezę, modulują ekspresję czynników transkrypcyjnych i wpływają na proliferację adipocytów [31].

Stwierdzony wpływ zastosowanych w doświadczeniu dodatków do żywności na stężenie triacylogliceroli we krwi samców jest o tyle istotny, że aktualnie to triacyloglicerole, a nie cholesterol całkowity, obarcza się odpowiedzialnością za powstawanie miażdżycy [21].

Analizując zachodzące pod wpływem zastosowanej mieszanki dodatków do żywności zmiany stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy krwi, trudno uznać je tylko za pochodne zmian stężenia triacylogliceroli. Szczególnie u samic żywionych paszą zmodyfikowaną, u których zmniejszeniu stężenia triacylogliceroli towarzyszył istotny wzrost stężenia cholesterolu całkowitego. Taki efekt wskazuje na dodatkowy wpływ zastosowanych w doświadczeniu dodatków do żywności na jego stężenie (tab. 6).

Być może przyczyną wzrostu stężenia cholesterolu całkowitego była stymulacja jego endogennej syntezy, wymuszana uszkodzeniami struktury błon komórkowych, zachodzącymi m.in. podczas reakcji wolnorodnikowych [25]. Obserwowane zmiany mogły wynikać również ze zmniejszonej, w diecie zmodyfikowanej, ilości naturalnych antyoksydantów, obecności fruktozy i dodatkowo azotanów(III), których wpływ na zaburzenie metabolizmu lipidów bezpośrednio poprzez ich właściwości utleniające, jak i pośrednio poprzez działanie na witaminę A, został już opisany przez Bilczuk [2, 3]. Biorąc pod uwagę istotną interakcję zachodzącą pomiędzy dodatkami, składem diety

i stężeniem cholesterolu całkowitego w surowicy krwi (tab. 7), można zastanowić się, czy efekt ten nie był również spowodowany jego zmniejszonym usuwaniem z krążenia, związanym z zaburzonym przekształcaniem w związki pochodne, np. hormony steroidowe [12].

Również stwierdzony istotny wzrost stężenia frakcji LDL-cholesterolu u samców, pod wpływem zastosowanej w doświadczeniu mieszaniny dodatków do żywności, niezależnie od rodzaju paszy, poza nasiloną przez dodatki biosyntezą triacylogliceroli, mógł wynikać ze stwierdzonego we wcześniejszych badaniach, stymulującego wpływu zastosowanych dodatków do żywności na wzrost natężenia procesów wolnorodnikowych [25]. Natomiast stwierdzone równocześnie zmniejszenie stężenia frakcji HDL-cholesterolu u zwierząt karmionych paszą podstawową, nieistotny u samców i istotny u samic, wynikał z ujemnej korelacji jaka istnieje pomiędzy stężeniem we krwi frakcji HDL-cholesterolu a stężeniem cholesterolu całkowitego i frakcji LDL-cholesterolu [1].

Biorąc pod uwagę dane literaturowe nie można też wykluczyć udziału w tym efekcie wzrostu aktywności lipazy wątrobowej [14], która katalizuje reakcję hydrolizy fosfolipidów w remnantach lipoprotein i w HDL-cholesterolu oraz obniżenia syntezy apoAI odpowiedzialnej za kontrolowanie metabolizmu HDL-cholesterolu i warunkującej prawidłowe działanie zwrotnego transportu cholesterolu [9, 10, 17].

Obserwowane u samców żywionych paszą podstawową zmniejszenie stężenia frakcji HDL-cholesterolu, pod wpływem zastosowanych dodatków, przy równoczesnym wzroście stężenia cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL-cholesterolu, zmusza do zastanowienia się, jak silny musiał być wpływ zastosowanych dodatków, ponieważ u szczura główną rolę w transporcie cholesterolu spełnia frakcja HDL-cholesterolu, a genetyczny niedobór CEPT (cholesteryl ester transfer protein) uniemożliwia u niego wystąpienie miażdżycy [7].

Trudno natomiast wyjaśnić mechanizm zmian stężenia frakcji HDL-cholesterolu, pod wpływem zastosowanej mieszaniny dodatków, u zwierząt karmionych paszą zmodyfikowaną. I u samców i u samic stężenie tej frakcji nieznacznie wzrastało. Może wynikało to ze zdecydowanie większego wzrostu, niż w grupie zwierząt żywionych paszą podstawową, stężenia frakcji LDL-cholesterolu.

Analizując procentowy udział poszczególnych frakcji lipidowych w surowicy krwi badanych zwierząt stwierdzono, że zastosowane w doświadczeniu dodatki jedynie u samic wywarły istotny wpływ w tym zakresie. Wpływ ten bardziej niekorzystnie zaznaczył się u samic na paszy zmodyfikowanej, u których obserwowano istotny wzrost procentowego udziału β -lipoprotein. Biorąc pod uwagę rodzaj tych zmian i towarzyszący im wzrost stężenia glukozy, cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL-cholesterolu w surowicy krwi badanych samic, należy zdawać sobie sprawę, że jest to grupa składników, których wzrost stężenia wskazuje na zagrożenie insulinopornością i miażdżycą, ze wszystkimi następstwami z tym związanymi [4, 22, 23].

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że zastosowane w przeprowadzonym doświadczeniu rodzaj i ilości dodatków do żywności, odpowiadających ich najczęstszemu i, w przeliczeniu na jednostkę masy ciała, średniemu spożyciu przez ludzi, wpływały na wartości wybranych parametrów gospodarki węglowodanowo-lipidowej ustroju, a analiza zmian zachodzących pod ich wpływem potwierdza opinię innych autorów o bardzo indywidualnej reakcji organizmu na obecność dodatków w diecie. Dodatkowo przeprowadzona analiza statystyczna uzyskanych wyników pozwoliła na zdefiniowanie określonych związków pomiędzy zastosowanymi dodatkami a badanymi parametrami, mogących mieć istotny wpływ na funkcjonowanie organizmu.

Wnioski

1. Dodatek do diety mieszaniny wybranych dodatków do żywności powodował istotny wzrost stężenia glukozy, cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji LDL, co wskazuje, że zastosowane dodatki mogą sprzyjać powstawaniu lub nasilaniu zaburzeń lipidowych.
2. Odpowiedź organizmu na zastosowane dodatki była istotnie związana z płcią badanych zwierząt, przy czym zmiany zachodzące w zakresie gospodarki węglowodanowo-lipidowej obserwowano również u samic, pomimo ochronnego wpływu estrogenów.
3. Niekorzystny charakter zmian zachodzących pod wpływem zastosowanej mieszaniny dodatków obserwowano zarówno u zwierząt żywionych paszą podstawową, jak i zmodyfikowaną, z różnym jednak natężeniem, w zależności od badanego parametru, a nie grupy żywieniowej.

Praca współfinansowana przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego i Budżetu Państwa Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007-2013 w ramach projektu „Inwestycja w wiedzę motorem rozwoju innowacyjności w regionie”.

Literatura

- [1] Bigazzi F., Pino B.D., Forastiere F., Pistelli R., Rossi G., Simoni M., Baldacci S., Viegi G., Bionda A., Sampietro T.: HDL and clinical and biochemical correlates in Italian non-smoker woman. Clin. Chem. Lab. Med., 2004, **42**, 1408-1416.
- [2] Bilczuk L.: Próba oceny ochronnego wpływu witaminy A na organizm szczurów narażonych na przedłużone działanie azotynu sodowego. Bromat. Chem. Toksykol., 1980, **1** (13), 49-54.
- [3] Bilczuk L.: Wpływ przedłużonego podawania azotynu sodowego na niektóre wskaźniki biochemiczne u zwierząt doświadczalnych. Bromat. Chem. Toksykol., 1980, **1** (13), 41-47.

- [4] Chachaj A., Drożdż K., Szuba A.: Procesy transportu zwrotnego cholesterolu i ich rola w regresji miażdżycy. *Post. Bioch.*, 2008, **54**, 301-307.
- [5] Connick J.H., Stone T.W.: The role of kinurenines in diabetes mellitus. *Med. Hypotheses*, 1985, **18**, 371-376.
- [6] Dąbrowska M., Rutowicz A., Brzozowska A.: Oszacowanie pobrania z diety wybranych substancji konserwujących na podstawie danych o spożyciu żywności z badań budżetów gospodarstw domowych. *Żyw. Człow. Metab.*, 2003, **1-2 (30)**, 335-340.
- [7] de Grooth G.J., Klerx A.H., Stroes E.S., Anke H.E., Klerx M., Erik S., Stroes G., Anton F.H., Stalenhoef J.J., Kastelein P., Kuivenhoven J.A.: A review of CEPT and its relation to atherosclerosis. *J. Lipid Res.*, 2004, **11 (45)**, 1967-1974.
- [8] Figurska-Ciura D., Orzeł D., Styczyńska M., Leszczyński W., Żechałko-Czajkowska A.: Wpływ skrobi odpornej RS4 na metabolizm szczurów rasy *Wistar*. Wskaźniki biochemiczne i lipidowe. *Roczn. PZH*, 2007, **1 (58)**, 1-6.
- [9] Frank P.G., Marcel Y.L.: Apolipoprotein A-I: structure, function, relationship. *J. Lipid Res.*, 2000, **6 (41)**, 853-872.
- [10] Fredenrich A., Bayer P.: Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab.*, 2003, **3 (29)**, 201-205.
- [11] Friedrich M., Dolot A.: Assessment of effects of diet composition and vitamin B supplementation on free radical-related processes in the body. Contents of non-enzymatic components of antioxidation defence and lipid peroxidation products in rat tissues. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2009, **3 (59)**, 255-262.
- [12] Friedrich M., Goluch-Koniuszy Z.: Wpływ składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B na stężenie lipidów i lipoprotein we krwi szczura. *Żyw. Człow. Metab.*, 2007, **3/4 (34)**, 1052-1057.
- [13] Gołębiowska-Gągała B., Szewczyk L.: Regulacja hormonalna przemiany białkowo-aminokwasowej. *Endokrynol. Ped.*, 2005, **3 (12)**, 51-58.
- [14] Jansen H., Verhoeven A.J., Sijbrands E.J.: Hepatic lipase: a pro- or anti- atherogenic protein? *J. Lipid Res.*, 2002, **43**, 1352-1362.
- [15] Kotake Y., Ueda T., Mori T., Murakami E., Hattori M.: The physiological significance of the xanthurenic acid-insulin complex. *J. Biochem.*, 1975, **3 (77)**, 685-687.
- [16] Krygier K.: Problemy bezpieczeństwa dodatków do żywności. *Przem. Spoż.*, 2005, **8**, 42-46, 68.
- [17] Kuliszewicz-Janus M., Abdulrahman S.M.: Biologia lipoproteidy HDL i jej przeciwmiażdżycowe działanie. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2006, **60**, 307-315.
- [18] Lhuissier M., Suschetet H., Causeret J.: Influence des nitrites et des nitrates sur certains aspects de l'état de nutrition vitaminique. *Ann. Nutr. Alim.*, 1976, **30**, 847-858.
- [19] Ludwig D.S.: Dietary glycemic index and obesity. *J. Nutr.*, 2000, **130**, 280S-283S.
- [20] Mazur A., Ostąński M., Szymanik I., Kalina-Faska B., Januszek-Trzciakowska A.: Tkanka tłuszczowa nasierdziowa – nowy wskaźnik stanu metabolicznego ustroju? *Endor. Otyłość, Zaburz. Przem. Materii*, 2007, **3**, 29-32.
- [21] Mazurek T.: Aktywność prozapalna tkanki tłuszczowej – nowe spojrzenie na etiologię miażdżycy. *Kardiolog. Pol.*, 2009, **67**, 1119-1124.
- [22] Naruszewicz M.: Miażdżycorodne działanie małych gęstych cząsteczek LDL, ochronna rola HDL. *Med. Dypl.*, 2000, 3/4, 17-21.
- [23] Niebisz A.J., Jasik M., Karnafel W.: Insulinooporność a czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego. *Kardiologia na co Dzień*, 2007, **1 (2)**, 3-6.
- [24] Paśko P., Bartoń H., Fołta M., Krośniak M., Zachwieja Z., Gorinstein S.: Właściwości żywieniowe i zdrowotne szarłatu i komosy. Część II: Wpływ dodatku nasion szarłatu i komosy do pasz szczurów na wybrane wskaźniki biochemiczne tych zwierząt karmionych dietą wysokofruktozową. *Żyw. Człow. Metab.*, 2007, **3/4 (34)**, 1261-1268.

- [25] Radziszewska M.: Assessment of the effects of designated food additives on contents of non-specific components of antioxidation defense in blood of male's rats. *Mat. VI Krajowej Konferencji Adeptów Fizjologii*, Poznań 8-9.05.2009, 13.
- [26] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 6 marca 2006 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych. *Dz. U.* 2006 r. Nr 54, poz. 389.
- [27] Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K.: *Substancje dodatkowe i składniki funkcjonalne żywności*. Wyd. Agro & Food Technology, Czeladź 1997.
- [28] Saint-Blanquat G.: Aspects toxicologiques et nutritionnels des nitrates et des nitrites. *Ann. Nutr. Alim.*, 1980, **34**, 827-864.
- [29] Schneider J.G., Tompkins C., Blumenthal R.S., Mora S.: The metabolic syndrome in women. *Cardiol. Rev.*, 2006, **14**, 286-291.
- [30] Sheorain V.S., Mattock M.B., Subrahmanyam D.: Mechanism of carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: plasma lipid metabolism in mice. *Metabolism*, 1980, **10** (29), 924-929.
- [31] Siemińska L.: Tkanka tłuszczowa. *Patofizjologia, rozmieszczenie, różnice płciowe oraz znaczenie w procesach zapalnych i nowotworowych*. *Endokr. Pol.*, 2007, **4** (58), 330-342.
- [32] Szurkowska M., Szafraniec K., Gilis-Januszewska A., Szybiński Z., Huszno B.: Wskaźniki insulinooporności w badaniu populacyjnym i ich wartość predykcyjna w określeniu zespołu metabolicznego. *Prz. Epid.*, 2005, **59**, 743-751.
- [33] Traczyk I., Gielecińska I., Szponar L., Stachowska E., Rams M., Walkiewicz A.: Ocena wielkości pobrania kwasu benzoowego i butylohydroksyanizolu wśród dzieci i młodzieży. *Żyw. Człow. Metab.*, 2003, **1/2** (30), 556-560.
- [34] Vijayakumar A., Novosyadlyy R., Wu Y.J., Yakar S., LeRoith D.: Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Hormone & IGF Research*, 2010, **1** (20), 1-7.
- [35] Wawrzyniak A., Hamułka J., Pająk M.: Ocena pobrania azotanów (V) i azotanów (III) z żywnością w gospodarstwach domowych w Polsce w latach 1996-2005. *Roczn. PZH*, 2008, **1** (59), 9-18.

ASSESSING THE EFFECT OF SELECTED MIXTURE OF FOOD ADDITIVES ON CARBOHYDRATE-LIPID METABOLISM

S u m m a r y

The objective of this study was to verify, using an animal model, whether or not, and in what way, a mixture of some selected additional substances added to food had an effect on the carbohydrate-lipid metabolism of organism since the addition of those additives was required to enrich the changed diet composition containing processed and purified ingredients.

The experiment was carried out on 48 male and 48 female Wistar laboratory rats (separately for each gender); the animals were arranged into four groups. The animals from groups I and III received tap water to drink. The animals from groups II and IV received a 5 ml portion of the solution of selected food additives: sodium nitrite – E 250, potassium nitrate – E 252, benzoic acid – E 210, sorbic acid – E 200, and monosodium glutamate – E 621. The amount of food additives administered to the animals was computed on the basis of the average human consumption rate of those additives per 1 kg of body mass. After the animals had drunk the solution, they drank supplemental tap water.

Based on the experimental results obtained, it was found that the addition of those selected food additives to the animal diet caused the concentration rates of glucose, total cholesterol and its LDL fraction to

significantly increase; this increase indicated that the food additives could foster the development or the potentiation of lipid disorders. The organism response to the additives applied was significantly correlated with the gender of the animals examined; however, the changes occurring in the carbohydrate-lipid metabolism were also found in female rats despite the protective impact of estrogens herein. An undesirable character of the changes occurring owing to the effect of the applied mixture of food additives was found both in animals fed the basic and the modified feedstuffs. Yet, the intensity of the changes varied depending on the parameter studied.

Key words: food additives, carbohydrate-lipid metabolism, Wistar laboratory rats 

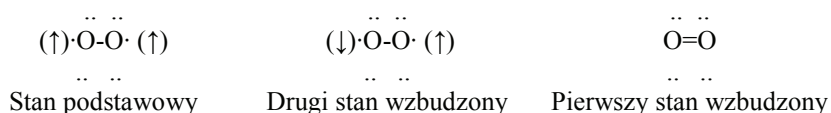
HENRYK KOSTYRA, ELŻBIETA KOSTYRA

INTERAKCJE SKŁADNIKÓW ŻYWNOŚCI

Prezentujemy 10. część cyklu nt.: „Interakcje składników żywności”. Druk materiałów z tego cyklu rozpoczęliśmy w Żywności nr 1 (74), 2011.

Pytanie: Czy cząsteczka tlenu jest szybko działającym utleniaczem?

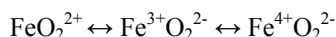
Cząsteczka tlenu może występować w stanie podstawowym, pierwszym stanie wzbudzenia i w drugim stanie wzbudzenia (rys. 1).



Rys. 1. Stany występowania tlenu.

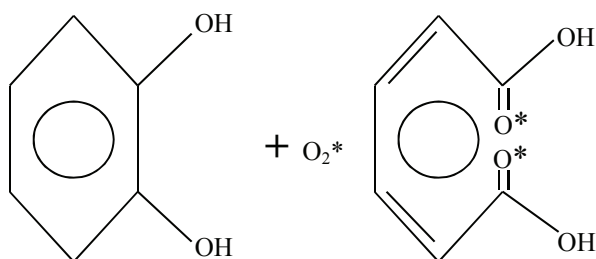
Drugi stan wzbudzony cząsteczki tlenu ma krótki okres półtrwania i tracąc energię przechodzi w pierwszy stan wzbudzony. W reakcje chemiczne wchodzi zwykle tlen singletowy, w pierwszym stanie wzbudzenia, o czasie półtrwania ponad 10^{-6} s. Tlen singletowy nawet w bardziej trwałej postaci jest jednak nietrwałym stanem wzbudzonym i jeżeli nie ulega przyłączeniu do reaktywnego substratu w tym samym naczyniu reakcyjnym, w którym jest wytwarzany, szybko wytraca energię na skutek emisji światła. Tak więc cząsteczka tlenu jest wolno działającym utleniaczem, ponieważ w większości reakcji utleniania silne wiązanie między atomami tlenu musi ulec rozerwaniu. W procesie redukcji tlenu na elektrodzie tlen najpierw ulega redukcji do H_2O_2 , a dopiero potem rozrywa się wiązanie O-O. Innym czynnikiem ułatwiającym rozerwanie wiązania O-O są jony żelaza. Jon żelazawy i jony innych metali umożliwiają mechanizm, w którego wyniku wiązanie O-O może zostać rozerwane podczas redukcji pierwszą parą elektronów. Jon żelazawy łączy się z cząsteczką tlenu, tworząc FeO_2^{2+} .

Jon FeO_2^{2+} , nazywany jonem nadferylowym, jest stabilizowany przez rezonans różnych jonowych struktur granicznych:



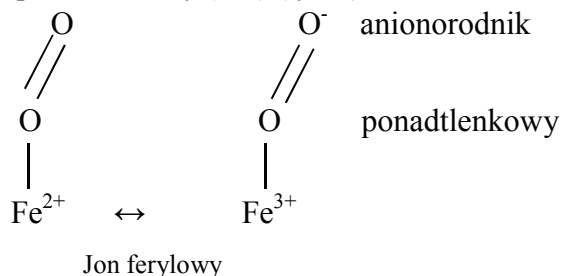
W jonie nadferylowym więź między atomami tlenu jest słabsza niż w cząsteczce tlenu, ponieważ elektrony zostały przekazane od żelaza do tlenu. Redukcja pierwszą parą elektronów może rozerwać wiązanie między atomami tlenu. Omówiony mechanizm utleniania tlenem wyjaśnia rolę jonów metali obecnych w żywności w procesie utleniania różnych związków organicznych.

W żywności utlenianie związków odbywa się również z udziałem enzymów. Istnieje wiele enzymów zawierających żelazo, w których reaktywnym czynnikiem wydaje się być jon nadferylowy. Tlen utlenia na przykład pirokatechinę (związek toksyczny) w obecności enzymu pirokatechazy do kwasu cis-cis-mukonowego, przy czym obydwie atomy tlenu cząsteczkowego pojawiają się w produkcie (rys. 2.)



Rys. 2. Utlenianie pirokatechiny tlenem.

Podczas redukcji pierwsza redukująca para elektronowa może rozerwać wiązanie między atomami tlenu w jonie nadferylowym i wówczas powstaje jon ferylowy FeO^{2+} . Jon ferylowy występuje również w układach biologicznych. Przykładem jest metmioglobina. Związaniu tlenu do żelaza w hemie towarzyszy częściowe przeniesienie elektronów z jonu żelazawego na tlen, czemu towarzyszy utworzenie kompleksu jon żelazowy (Fe^{3+}) i anionorodnik ponadtlenkowy ($\cdot\text{O}_2^-$) (rys. 3).



Rys. 3. Oddziaływanie między żelazem i tlenem w mioglobinie.

Dla prawidłowego działania mioglobiny ważne jest, aby tlen w momencie uwalniania go z białka miał postać tlenu cząsteczkowego, a nie ponadtlenku. Reaktywność ponadtlenku jest szkodliwa dla organizmu. Natomiast jego uwolnienie z mioglobiny pozostawia żelazo w postaci jonu żelazowego, co powoduje niemożność ponownego wiązania przez hemoglobinę tlenu. Tę postać hemoglobiny nazywa się methemoglobina. Stabilizacja kompleksu tlen-żelazo chroni ten układ przed uwalnianiem ponadtlenku z mioglobiny. Za stabilizację tego kompleksu odpowiedzialny jest składnik białkowy mioglobiny.

Podsumowując zagadnienie utleniania za pomocą tlenu trzeba stwierdzić, że proces ten przebiega wolno i wymaga nakładu energii. Jego szybkość może być znacznie przyspieszona katalitycznie z udziałem jonów metali i metaloenzymów. ☒

GRAŻYNA MORKIS

PROBLEMATYKA ŻYWNOŚCIOWA W USTAWODAWSTWIE POLSKIM I UNIJNYM

Publikujemy kolejny przegląd aktów prawnych, które ukazały się w Dzienniku Ustaw RP i Dzienniku Urzędowym UE. Poniższe zestawienie zawiera akty prawne dotyczące szeroko omawianej problematyki żywnościowej wg stanu na dzień 31 sierpnia 2012 r.

Polskie akty prawne

1. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 19 czerwca 2012 r. w sprawie wykazu laboratoriów referencyjnych (Dz. U. 2012 r., poz. 728).

Została ustalona lista laboratoriów referencyjnych, na której umieszczono następujące organizacje: Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie, Regionalne Laboratorium Badań Żywności Genetycznie Modyfikowanej w Tarnobrzegu, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny oraz Dział Laboratoryjny Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Warszawie – Pracownia Badania Pozostałości Pestycydów w Warszawie i Instytut Chemii i Techniki Jądrowej – Samodzielne Laboratorium Identyfikacji Napromieniania Żywności w Warszawie.

W załącznik do rozporządzenia zawarto dane dotyczące przedmiotu i rodzaju badań prowadzonych przez każde z wyżej wymienionych laboratoriów.

2. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 24 lipca 2012 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie nabywania uprawnień do wykonywania niektórych czynności związanych z oceną jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych oraz dokumentowania tych czynności (Dz. U. 2012 r., poz. 902).

W rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dn. 5 lutego 2003 r. w sprawie nabywania uprawnień do wykonywania niektórych czynności związanych z oceną jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych oraz dokumento-

wania tych czynności (Dz. U. Nr 35, poz. 300, z 2004 r. Nr 128, poz. 1345 oraz z 2005 r. Nr 181, poz. 1511) wprowadzono zmianę dotyczącą protokołu z ustalenia klas jakości tusz wołowych. Wzór protokołu zawiera załącznik do niniejszego rozporządzenia.

Unijne akty prawne

1. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) NR 728/2012z dn. 7 sierpnia 2012 r. rejestrujące w rejestrze chronionych nazw pochodzenia i chronionych oznaczeń geograficznych nazwę [Ser koryciński swojski (ChOG)] (Dz. Urz. UE L 2012 r., Nr 213, s. 7).

Na wniosek Polski została zarejestrowana w rejestrze chronionym nazw pochodzenia i chronionych oznaczeń geograficznych nazwa „Ser koryciński swojski” i umieszczona w rejestrze: Klasa 1.3. Sery. POLSKA. Ser koryciński swojski (ChOG).

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich. ☒

NOWE KSIĄŻKI

Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources

[Antyoksydacyjne właściwości przypraw, ziół i innych źródeł]

Charles D.J.

Wydawca: Wyd. Springer, 2012, ISBN 978-1-4614-4309-4, stron 580, cena 129,95 €

Zamówienia: www.springer.com

Znaczenie przeciwutleniaczy występujących w żywności zostało docenione za ich pozytywny wpływ na przedłużenie trwałości żywności, w której występują oraz działanie przeciwutleniaczy *in vivo*. Obecnie powszechnie przyjmuje się że dieta roślinna z wysokim spożyciem ziół, przypraw, owoców, warzyw i innych produktów roślinnych, bogatych w substancje odżywcze może pomóc w ograniczeniu ryzyka chorób związanych ze stresem oksydacyjnym. Rośliny posiadają wysoką zawartość przeciwutleniaczy tj.: polifenole, karotenoidy, tokoferole, tokotrienole, glutation, kwas askorbinowy i enzymy z przeciwutleniającymi właściwościami, które przyczyniają się do ochrony przed niebezpiecznym oksydacyjnym uszkodzeniem.

Oprócz ziół i przypraw istnieje wiele naturalnych produktów, które mogą służyć jako bogate źródło naturalnych przeciwutleniaczy. Można do nich zaliczyć m.in.: zboża, orzechy, rośliny oleiste, rośliny strączkowe, warzywa, owoce, produkty zwierzęce i produkty z pożytecznymi bakteriami, kawa, kakao, herbata.

Książka została podzielona na dwie części. W pierwszej zostały opisane różne metody wykorzystywane do pomiaru zawartości antyoksydantów oraz szczegółowo scharakteryzowano różne rodzaje przeciwutleniaczy pochodzących z różnych źródeł. W drugiej części książki omówiono ponad pięćdziesiąt przypraw i ziół, w tym uwzględniono ich historię, regiony uprawy, smak i aromat, części jadalne roślin, różne receptury ich przygotowania i spożycia oraz funkcjonalne i antyoksydacyjne właściwości.

Książka skierowana jest głównie do studentów i pracowników naukowych wydziałów technologii żywności, żywienia człowieka i towaroznawstwa itp. uniwersytetów/akademii rolniczych i uniwersytetów ekonomicznych.

Chocolate and Health

[Czekolada i zdrowie]

Paoletti, R., Poli, A., Conti, A., Visioli, F. (red.)

Wydawnictwo Springer, 2012, ISBN 978-88-470-2037-5, stron 188, cena 139,95 €

Zamówienia: www.springer.com

Kakao i czekolada są przedmiotem wielu badań naukowych z zakresu chemii żywności, technologii żywności i nauk o zdrowiu. Ziarno kakaowe zawiera wiele bioaktywnych składników tj.: polifenole, teobrominę, fenyloetyloaminę, anandamidy, fenyloalaninę i tyrozynę. Ziarno kakaowca ma wyższą zawartość flawanoli w porównaniu z innymi produktami roślinnymi. Dzięki tak bogatej zawartości tych substancji wykazuje bardzo silne działanie antyoksydacyjne.

Książka składa się z dwunastu rozdziałów. Zaprezentowano w niej najnowsze badania dotyczące różnych aspektów wpływu czekolady na zdrowie. Po omówieniu wstępnego tła historycznego, uwagę poświęcono rozwojowi technologicznemu, który przyczynił się do poprawy jakości zdrowotnej czekolady oraz biochemicznych i klinicznych eksperymentów prowadzonych na kakao i jego składnikach. W podręczniku dokładnie omówiono korzystne efekty zdrowotne kakao i czekolady, w tym skutki naczyniowe, wpływ na ciśnienie krwi, stężenie lipidów we krwi i liczbę płytek krwi. Autorzy wskazali również na czynniki psychologiczne skłaniające do spożycia czekolady.

Czytelnicy znajdą w tej książce bogate źródło podstawowych informacji na temat kakao i czekolady, właściwości zdrowotne oraz postępy jakie zostały dokonane w tej dziedzinie.

Książka skierowana jest głównie do studentów kierunków: technologia żywności, żywienie człowieka, nauki o żywności, towaroznawstwo żywności i itp.

Nutrition, Diet and Cancer

[Żywnienie, dieta i rak]

Shankar S., Srivastava, R.K. (red.)

Wydawnictwo Springer, 2012, ISBN 978-88-470-2037-5, stron 627, cena 149,95 €

Zamówienia: www.springer.com

Badania nad chemioprewencją raka były w centrum zainteresowania od ponad dwóch dekad. Chemioprewencja jest to ingerencja w możliwie najwcześniejsze etapy procesu nowotworowego, kiedy nie ma jeszcze żadnych symptomów. Koncepcja ta zakłada, że powinno się zahamować albo odwrócić proces chorobowy, bądź co najmniej go spowolnić przy pomocy syntetycznych albo naturalnych związków chemicznych. Prowadząc próby wygenerowania skutecznego leku na raka, naukowcy wypracowali koncepcję zapobiegania nowotworom w najwcześniejszych fazach jego powstawania.

Odpowiedniki rozwiązań farmakologicznych znaleziono w naturze m.in. w owocach i warzywach. Spożywając je dostarczamy substancje, które mogą mieć ogromne znaczenie dla ochrony organizmu przed rakiem. Wykazano, że odpowiednia dieta w ok. 35% zapobiega jego powstawaniu. Szeroki zakres składników pożywienia uznano za skuteczne narzędzie w zwalczaniu tej choroby. Zaliczyć do nich można np. polifenole (w tym m.in. resweratrol znajdujący się w skórce czerwonych winogron).

Wzrost zrozumienia wpływu żywienia, ćwiczeń fizycznych i diety w prewencji raka i hamowania jego rozwoju prowadzi do odkrycia i rozwoju nowych i efektywnych leków regulujących sieć wewnątrzkomórkowego sygnalizowania w organizmie. Te informacje są bardzo przydatne dla zbadania nowych i wysoce skutecznych strategii chemioprewencyjnych, wpływających na zmniejszenie obciążenia rakiem.

Książka składa się z 24 rozdziałów, zawiera najnowsze informacje w zakresie wpływu żywienia i diety w profilaktyce i terapii raka. Informacje te pochodzą m.in. z: nutrigenomiki, nutrigenetyki, epigenomiki żywienia, transkryptomiki żywienia, proteomiki i metaboliki.

Książka przeznaczona jest przede wszystkim dla pracowników naukowych i studentów kierunków tj. technologia żywności, żywienie człowieka, nauki o żywności, towaroznawstwo żywności i itp. oraz wszystkich zainteresowanych wpływem sposobu żywienia i rodzaju stosowanej diety w profilaktyce chorób nowotworowych.

Quantitative Thin-Layer Chromatography

[Ilościowa chromatografia cienkowarstwowa]

Shankar S., Srivastava, R.K. (red.)

Wydawnictwo Springer, 2012, ISBN 978-88-470-2037-5, stron 627, cena 149,95 €

Zamówienia: www.springer.com

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) jest najpopularniejszą metodą szybkiego sprawdzania postępu reakcji chemicznej i czystości produktu. Może być także wykorzystywana do identyfikacji związków zarówno organicznych jak i nieorganicznych. Stosowana jest szczególnie do analiz farmaceutycznych i żywności. W chromatografii cienkowarstwowej mieszanina substancji jest rozdzielana na poszczególne składniki ze względu na różnice w szybkości ich przemieszczania się na podłożu wykonanym z aktywnego adsorbenta stanowiącego fazę nieruchomą. Poszczególne składniki mieszaniny z różną siłą wiążą się z polarnym adsorbentem, a następnie wymywane są z niego rozpuszczalnikami stanowiącymi fazę ruchomą.

Istnieje wiele książek dotyczących jakościowej identyfikacji substancji chemicznych przy pomocy TLC. W książce skoncentrowano się na analizie ilościowej. Autorzy opisują wszystkie kroki procedury analitycznej stosowanej w tej technice, rozpoczynając od omówienia niezbędnego sprzętu, obróbki wstępnej próbki poddanej badaniu,

przykładowego zastosowania, rozwoju i barwienia, skanowania oraz statystyczną i chemometryczną analizę danych, jak również sprawdzanie poprawności. Rozdziały zostały ułożone w sposób modułowy, w celu ułatwienia znalezienia informacji na temat poszczególnych etapów proceduralnych.

Książka przeznaczona jest głównie dla studentów kierunków: technologia żywności, żywienie człowieka, nauki o żywności, towaroznawstwo żywności i itp. oraz wszystkich zainteresowanych ilościową chromatografią cienkowarstwową.

Introduction to Food Process Engineering

[Wprowadzenie do inżynierii procesowej żywności]

Smith P. G.

Wydawnictwo Springer, 2011, ISBN 978-1-4419-7661-1, stron 510, cena 69,95 €

Zamówienia: www.springer.com

W książce w naukowy sposób zaprezentowano zasady przetwarzania żywności. Problematyka została zaprezentowana z punktu widzenia ilościowego i matematycznego. Celem jest zapoznanie czytelników z możliwością wykorzystywania matematycznej i ilościowej analizy w produkcji żywności. Dla osiągnięcia tego celu, każdy rozdział zawiera dużą liczbę przykładów i problemów wraz z ich rozwiązaniami znajdującymi się na końcu książki. Znajomość matematyki niezbędnej do zrozumienia książki jest ograniczona do elementarnej znajomości rachunku różniczkowego i całkowego.

Drugie wydanie książki zawiera dwa dodatkowe rozdziały dotyczące: operacji wymiany masy oraz technologii minimalnego przetwarzania, jak również liczne nowe i poprawione rysunki.

Książka przeznaczona jest dla pracowników naukowych i studentów oraz osób pracujących w przemyśle spożywczym, którzy w większym stopniu pragną zrozumieć zasady dotyczące przetwarzania i produkcji żywności.

Opracowała: *Anna Florek-Paszkowska (dawniej Gręda)*

TWÓRCY POLSKIEJ NAUKI O ŻYWNOSCI

POLSCY UCZENI PO II WOJNIE ŚWIATOWEJ PROF. DR H.C. EUGENIUSZA PIJANOWSKI (1906–1974)



Profesor Eugeniusz Pijanowski urodził się w Warszawie, dnia 26 grudnia 1906 roku, w wielodzietnej rodzinie rzemieślniczej. Już jako uczeń odznaczał się niezwykłą inteligencją i wszechstronnością zainteresowań. Lata szkolne młodego Eugeniusza, to nie tylko zdobywanie wiedzy, ale także aktywny udział w pracach drużyny harcerskiej oraz realizacja zainteresowań z zakresu elektrotechniki, astronomii i nauk przyrodniczych.

W 1926 roku E. Pijanowski zdał egzamin maturalny i za wyniki osiągnięte w nauce otrzymał „Złoty Medal od Zarządu Miasta Warszawy”. W tym samym roku rozpoczął studia na Wydziale Rolniczym SGGW. Wybór studiów wynikał z przeświadczenia o potrzebie przebudowy polskiej wsi.

Już po ukończeniu drugiego roku studiów rozpoczął w 1928 roku swoją pierwszą pracę zawodową na stanowisku asystenta w Pracowni Chemicznej przy Muzeum Przemysłu i Rolnictwa, a od 1929 roku – w charakterze stypendysty w Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego. Jednocześnie kontynuował studia, specjalizując się w zakresie technologii rolnej, pod kierunkiem Profesora Wacława Dąbrowskiego, w Zakładzie Mikrobiologii i Przemysłu Rolnego SGGW. W tymże Zakładzie rozpoczął w 1930 roku pracę naukowo-dydaktyczną, którą kontynuował do 1939 roku. W 1931 roku uzyskał dyplom inżyniera rolnika z wyróżnieniem. Pracę doktorską wykonał pod kierunkiem Profesora Wacława Dąbrowskiego i w 1935 roku otrzymał stopień doktora nauk rolniczych z wyróżnieniem. Po odbyciu wymaganych etapów przewodu habilitacyjnego uzyskał w 1939 roku stopień naukowy docenta technologii rolnej.

W okresie drugiej wojny światowej okupant zawiesił działalność SGGW, a jej budynki zamienił na koszary wojskowe. Doc. E. Pijanowski podjął pracę w Liceum

Rolniczym przy ul. Opaczewskiej, co było ukrytą formą działalności SGGW, a jednocześnie znalazł zatrudnienie w Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego, na stanowisku kierownika Działu Analitycznego. Po klęsce powstania E. Pijanowski dostał się do obozu przejściowego w Pruszkowie.

Już w lutym 1945 roku Doc. E. Pijanowski brał udział w odbudowie SGGW oraz reaktywowaniu działalności dydaktycznej i naukowej Uczelni. W 1946 roku został mianowany profesorem nadzwyczajnym i w tym samym roku zorganizował Zakład Technologii Żywności, przekształcony w 1953 roku w Katedrę Przemysłu Rolno-Spożywczego. Jednocześnie objął funkcję kierownika tej Katedry i połączył ją z funkcją kierownika Zakładu Technologii Mleczarstwa, powołanego w tym samym roku. W 1954 roku mianowany został profesorem zwyczajnym i podjął działania, w wyniku których utworzony został Oddział Technologii Rolno-Spożywczej przy Wydziale Rolniczym. W 1961 roku został głównym twórcą i pierwszym dziekanem, pierwszego w Polsce Wydziału Technologii Rolno-Spożywczej, który w 1973 roku przemianowany został na Wydział Technologii Żywności, zaś w 2008 roku na Wydział Nauk o Żywności.

Działalność dydaktyczno-wychowawczą rozpoczął Profesor E. Pijanowski w 1930 roku i prowadził ją przez 45 lat aż do końca życia. Od 1946 roku obejmowała ona wykłady, seminaria i konwersatoria z technologii mleka, technologii owoców i warzyw, analizy żywności oraz ogólnej technologii żywności.

Nauczanie i wychowywanie młodzieży traktował Profesor jako najważniejszy obowiązek każdego pracownika naukowo-dydaktycznego. Uważał, że praca na uczelni to powołanie, a nie jeden ze sposobów zdobywania środków utrzymania. Wielką wagę przywiązywał do perfekcyjnego przygotowania swoich wykładów, ciągle je unowocześniając i uzupełniając o najnowsze informacje naukowe. Pomagała Mu w tym Jego głęboka wiedza nieustannie poszerzana poprzez studiowanie bieżącej literatury naukowej w kilku obcych językach. Zwracał także dużą uwagę na formę przekazywanych wiadomości. W rezultacie Jego wykłady przepełnione były bogatą treścią, a jednocześnie odznaczały się niezwykle jasnością i przejrzystością.

Będąc wzorem pracowitości Profesor starał się cechę tę zaszczerpić także swoim studentom i współpracownikom, gdyż uważał, że podstawą osiągania sukcesów, tak w nauce, jak i życiu zawodowym, jest rzetelna i systematyczna praca. Przypominała o tym sentencja wypowiedziana przez wielkiego poetę niemieckiego J. W. Goethego, zamieszczona na tablicy ogłoszeń przed gabinetem Profesora: „Nie wiem co to jest talent. Sukces osiągają ci, którzy umieją się zmusić”.

Profesor był nauczycielem wymagającym. Nie tolerował lekceważenia obowiązków, ale jednocześnie zawsze starał się pomagać w ich właściwym wypełnianiu. Pomimo bardzo wytężonej pracy, dla każdego studenta starał się znaleźć czas na indywidualną rozmowę lub konsultację. Był człowiekiem niezwykle życzliwym. W razie

trosk i kłopotów dla każdego znalazł współczucie, wyrozumiałość i pomoc. Nieustannie zachęcał Profesor swoich studentów do nauki języków obcych, nie tylko ze względu na konieczność korzystania z literatury obcojęzycznej przy realizacji prac dyplomowych, ale także z przeświadczenia, że każdy światły Polak powinien umieć posługiwać się co najmniej jednym obcym językiem.

Profesor fascynował wszystkich swoją erudycją i wszechstronnością zainteresowań. Zachęcał także swoich studentów do szerszego korzystania z dóbr kultury wzbogacających sferę duchową człowieka.

Profesor był promotorem 178 prac magisterskich i inżynierskich oraz 28 prac doktorskich. Spośród Jego magistrantów i doktorantów 25 uzyskało tytuł naukowy profesora. W kolejności alfabetycznej są to: Franciszek Bijok, Andrzej Brudzyński, Józef Budzłowski, Władysław Damicz, Mieczysław Dłużewski, Julian Gawęł, Adolf Horubała, Jadwiga Jakubowska, Tadeusz Jakubczyk, Jerzy Jakubowski, Andrzej Jarczyk, Jerzy Kączkowski, Mirosława Klepacka, Tadeusz Knaut, Franciszek Koj, Józef Korolczuk, Ryszard Kosson, Ewa Lipińska, Tadeusz Ogrusiewicz, Stefan Poznański, Jerzy Puchalski, Wiesław Rzędowski, Wiesław Wzorek, Jan Załęcki, Stanisław Zmarlicki.

Ze względu na bardzo bogatą działalność naukową Profesora Pijanowskiego, możliwe jest wyszczególnienie jedynie głównych kierunków prowadzonych przez Niego badań. Są one następujące:

- charakterystyka surowców owocowo-warzywnych i opracowanie metod ich przetwarzania oraz utrwalania,
- różne aspekty wykorzystywania mikroflory w przetwórstwie mleka oraz owoców i warzyw,
- badanie przemian chemicznych, mikrobiologicznych i enzymatycznych w mleku surowym, podczas jego przetwarzania oraz przechowywania gotowych przetworów mlecznych,
- badanie wpływu wybranych czynników technologicznych i jakości surowca na cechy jakościowe wybranych przetworów mlecznych,
- opracowanie nowych metod analitycznych stosowanych w badaniu żywności.

Warto nadmienić, że wyizolowany i po raz pierwszy scharakteryzowany przez Profesora Pijanowskiego i współpracowników (Jadwiga Supińska-Jakubowska, Tadeusz Matuszewski) szczep bakterii fermentacji mlekowej, określany obecnie jako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetilactis*, jest na całym świecie wykorzystywany w kulturach starterowych, stosowanych powszechnie w przemyśle mleczarskim. Łączna liczba publikacji naukowych Profesora oraz artykułów przeglądowych i techniczno-popularyzacyjnych obejmuje 356 pozycji.

Nieocenione są zasługi Profesora jako autora 28 skryptów i podręczników akademickich z różnych dziedzin analizy, chemii i technologii żywności. Należą tu m.in.:

unikalny, dwutomowy podręcznik pt. „Zarys technologii produktów owocowych i warzywnych”, „Zarys technologii winiarstwa”, „Metody analizy żywności”, „Zarys chemii i technologii mleczarstwa” – dwutomowe dzieło przetłumaczone na język czeski i „Ogólna technologia żywności” – podręcznik uznany za wybitne kompendium wiedzy z dziedziny technologii żywności.

Wyrazem uznania dla wielkich osiągnięć naukowych Profesora było nadanie zaszczytnego stopnia naukowego doktora *honoris causa* przez Akademię Rolniczą w Poznaniu oraz Akademię Rolniczo-Techniczną w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski).

Bardzo rozległa była działalność społeczna Profesora zarówno w kraju, jak i na arenie międzynarodowej. Jako członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk podjął działania, dzięki którym powstał Komitet Technologii i Chemii Żywności PAN. Przez 9 lat pełnił Profesor funkcję jego przewodniczącego, a także członka Prezydium PAN. Przez wiele lat świadczył pomoc na rzecz wielu krajowych instytutów badawczych lub innych instytucji i organizacji, zwykle jako przewodniczący rad naukowych lub komisji powoływanych do rozwiązywania określonych problemów.

Równie owocna była Jego działalność na arenie międzynarodowej, m.in. został wybrany wiceprzewodniczącym Międzynarodowej Federacji Mleczarskiej. Brał udział w organizacji naukowych kongresów międzynarodowych. Wielokrotnie wygłaszał referaty i doniesienia naukowe na międzynarodowych konferencjach i kongresach. Był członkiem rad programowych wielu czasopism krajowych i zagranicznych, a także założycielem i naczelnym redaktorem czasopisma naukowego „Roczniki Technologii i Chemii Żywności” (obecnie „Polish Journal of Food and Nutrition Sciences”). Aktywnie współpracował z przemysłem żywnościowym. Był jednym z założycieli Stowarzyszenia Naukowo-Technicznego Inżynierów i Techników Przemysłu Spożywczego NOT.

Gdybyśmy naukę o żywności w Polsce przyrównali do wielkiej budowli i chcieli uhonorować jej głównych, dotychczasowych budowniczych, to trzeba by sięgnąć do nazwisk wielu polskich uczonych, którzy w mniejszym lub większym stopniu przyczynili się do powstania tej budowli. Jednak Profesor Eugeniusz Pijanowski swoimi dokonaniem zasłużył sobie na miano głównego budowniczego, a tym samym także na miano twórcy współczesnego kształtu nauki o żywności w Polsce.

W uznaniu wielkich zasług, w każdej dziedzinie niezwykle owocnej działalności, był Profesor Pijanowski wielokrotnie nagradzany i odznaczany w tym m.in.: Krzyżem Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski, Francuskim Krzyżem Komandorskim: *Ordre du Mérite pour la Recherche et l'Invention*, Sztandarem Pracy I klasy, Medalem Komisji Edukacji Narodowej, Medalem Kopernika.

Należy tu także wymienić kilka innych przykładów wyrażania szacunku i wdzięczności dla Profesora Eugeniusza Pijanowskiego:

- nadanie Jego imienia audytorium Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz Zespołowi Szkół Gastronomicznych w Warszawie, a także nowej siedzibie dwóch Wydziałów SGGW: Nauk o Żywności oraz Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji;
- odsłonięcie płaskorzeźby Profesora w gmachu Jego imienia, w obecności Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej i otwarcie w tym gmachu stałej wystawy pamiątek związanych z działalnością Profesora;
- wystawienie popiersia Profesora w Pałacu Staszica w Warszawie.

Profesor Eugeniusz Pijanowski zmarł 25 listopada 1974 roku i został pochowany na Cmentarzu Powązkowskim w Warszawie.

Historia życia i twórczości Profesora Eugeniusza Pijanowskiego stanowi najlepsze potwierdzenie słuszności znanej od wieków sentencji: „*Per aspera ad astra*” – „Przez trudy do gwiazd”.

Stanisław Zmarlicki – uczeń i współpracownik Profesora

Z ŻAŁOBNEJ KARTY

PROF. DR HAB. INŻ. JERZY WARCHALEWSKI 1940 - 2012



*"Nie umiera ten, kto trwa w pamięci
i sercach naszych"*

W dniu 12 sierpnia 2012 roku zmarł prof. dr hab. Jerzy Ryszard Warchalewski, zasłużony nauczyciel akademicki, człowiek o dużym autorytecie naukowym, emerytowany profesor zwyczajny Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Profesor Warchalewski urodził się 9 lutego 1940 roku w Poznaniu. W 1958 roku rozpoczął studia w Wyższej Szkole Rolniczej w Poznaniu, uzyskując w 1963 roku dyplom magistra inżyniera technologii rolno-spożywczej. Bezpośrednio po ukończeniu studiów rozpoczął pracę w Katedrze Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu. W 1971 roku na podstawie dysertacji „Właściwości antyproteolityczne frakcji białkowych ziarna jęczmienia i kaszy jęczmiennej”, wykonanej pod kierunkiem doc. dr hab. Janusza Skupina, uzyskał stopień doktora nauk technicznych.

W latach 1972 - 1973 odbył staż naukowy w Grain Research Laboratory, Winnipeg, Manitoba, jako stypendysta National Research Council of Canada. W 1979 roku przebywał na 10-dniowej misji naukowej w Instytucie Superiore di Sanita w Rzymie, na zaproszenie rządu włoskiego, a w 1981 roku przez dwa miesiące przebywał w ośrodkach naukowych USA i Kanady celem konsultacji naukowych i wygłoszenia wykładów. W latach 1982-1985 pracował jako profesor kontraktowy na University of Maiduguri, Department of Food Science and Technology w Nigerii.

W 1988 roku po przedstawieniu rozprawy habilitacyjnej pt. „Purification and characterization of an endogenous α -amylase and trypsin inhibitor from wheat seeds” uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk rolniczych.

W 1992 roku Profesor Warchalewski w ramach stypendium IREX wizytował Brown University w Providence, Rhode Island i University of California, Davis. W 1996 r., realizując program Tempus, wyjeżdżał do Francji i Wielkiej Brytanii.

W 2000 roku prezydent RP nadał Jerzemu R. Warchalewskiemu tytuł profesora nauk rolniczych.

Główne zainteresowania naukowe Profesora związane były z aktywnymi biologicznie białkami zbożowymi, szczególnie o aktywności proteolitycznej, amylolitycznej oraz inhibitorowej, pod względem ich wpływu na kształtowanie przydatności technologicznej oraz naturalnej odporności ziarna zbóż na zagospodarowanie przez owadzie szkodniki magazynowe. Podejmował także badania nad wpływem ziarna poddanego działaniu promieniowania gamma i mikrofalowego na rozwój tych szkodników. Jego badania obejmowały też ocenę wartości odżywczej układów białkowych w różnych surowcach roślinnych oraz doskonalenie metod automatycznej analizy aminokwasów. Był współautorem książek i podręczników akademickich, autorem i współautorem 92 oryginalnych prac twórczych, w tym 23 z „listy filadelfijskiej”, 25 artykułów naukowych i popularnonaukowych, 85 prac i streszczeń konferencyjnych (krajowych i międzynarodowych).

Był członkiem rad programowych czasopism: *Die Nahrung-Food and Nutrition International Journal of Food Research* (1995 - 2004), *Więści Akademickich* (1997 - 2008) i *Przemysłu Spożywczego* (2003 - 2009).

Profesor Warchalewski aktywnie uczestniczył w działalności licznych towarzystw naukowych, m.in. Komitetu Agrofizyki PAN; Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, gdzie pełnił funkcję prezesa i redaktora wydawnictwa Oddziału Wielkopolskiego oraz członka Zarządu Głównego. Od 1989 roku był członkiem honorowym The International Biographical Centre, Advisory Council, Cambridge, Anglia, a od 1993 roku czynnym działaczem The New York Academy of Sciences.

W latach 1991 - 2009 Profesor kierował Zakładem Biochemii Żywności, a w latach 2003 - 2009 Katedrą Biochemii i Analizy Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Prof. Warchalewski był cenionym dydaktykiem o znaczących zasługach w kształceniu kadr. Był promotorem 15 prac magisterskich i czterech doktorskich. Prowadził zajęcia z Biochemii i Enzymologii Żywności głównie na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka. Był również recenzentem prac doktorskich, dorobków przy ubieganiu się o stopień doktora habilitowanego i o tytuł profesora.

To z inicjatywy Prof. Warchalewskiego w ramach Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, Oddział Wielkopolski, w 1991 roku uruchomiono działalność wydawniczą, której celem była popularyzacja wybranych dziedzin przetwórstwa żywności. Dzięki uporowi Pana Profesora ukazało się łącznie 21 popularnonaukowych broszur. Do ich opracowania zapraszał ekspertów z różnych dziedzin, pozyskiwał

sponsorów na wydanie opracowań i był ich redaktorem. Ponadto Pan Profesor był redaktorem 6-tomowej serii wydawniczej „Stan aktualny i perspektywy rozwoju wybranych dziedzin produkcji żywności i pasz”. Wydawnictwu temu towarzyszyły, organizowane głównie przez Pana Profesora w ramach międzynarodowych targów Polagra i Poleko, seminaria zatytułowane „Związki nauki z praktyką”. Wymienione wydawnictwa spotkały się z dużą życzliwością odbiorców i dodatkowo spełniają funkcje pomocy dydaktycznej nie tylko dla studentów wydziałów technologii żywności. Za tę szczególnie aktywną działalność na rzecz PTTŻ został w 2004 roku odznaczony Złotą Odznaką Towarzystwa.

W 2010 roku przyznano mu Medal Edukacji Narodowej, a w 1989 roku Złoty Krzyż Zasługi.

Na emeryturze przebywał od października 2010 roku, ale utrzymywał stały kontakt z Uczelnią, nawet podczas choroby, w ostatnich miesiącach życia. Ostatnia publikacja Jego współautorstwa ukazała się na kilka dni przed śmiercią.

Bez wątpienia praca naukowa była dla Pana Profesora pasją, jednak, co zawsze podkreślał, rodzina była najważniejsza. Dlatego rozumiał również problemy współpracowników. Jako człowiek był uczciwy i rzetelny. Nigdy nie zadowalał się półśrodkami, wszystko musiało być dopracowane w najdrobniejszych szczegółach, tego wymagał od siebie i od nas, jego uczniów i współpracowników. Stawiał jasne kryteria i przestrzegał ich, nie znosił kompromisów.

Pan Profesor Warchalewski był osobą wręcz pedantycznie uporządkowaną, studentów zaskakiwał, gdy już na początku semestru podawał im dokładną datę i godzinę egzaminu, a terminu tego zawsze dotrzymywał!

Będziemy też pamiętać Pana Profesora, jako osobę, która nie przechodziła obojętnie wobec żadnego problemu, miał zdanie na każdy temat. Był osobą obdarzoną olbrzymią kulturą, o dużym poczuciu humoru, potrafiąc się śmiać ze wszystkich, w tym również z siebie, do wszystkich i mimo wszystko.

Pogrzeb Pana Profesora odbył się 18 sierpnia 2012 roku na cmentarzu parafialnym w Puszczykowie pod Poznaniem.

Dorota Piasecka-Kwiatkowska

TECHNOLOG ŻYWNOSCI

INFORMATOR POLSKIEGO TOWARZYSTWA TECHNOLOGÓW ŻYWNOSCI

Rok 22 Nr 4

sierpień 2012

DZIAŁALNOŚĆ TOWARZYSTWA

Oddział Szczeciński i Zarząd Główny

W dniach 2 - 4 września 2012 r. w Szczecinie odbyła się konferencja zorganizowana przez Oddział Szczeciński PTTŻ pt. „Żywność ekologiczna i jej przetwórstwo”. Współorganizatorem i fundatorem konferencji był Urząd Marszałkowski Województwa Zachodniopomorskiego. W dniu 3.09.12 odbyła się sesja referatowa (6 referatów i panel dyskusyjny), natomiast 4.09.2012 r. zebranie Zarządu PTTŻ.

Zarząd Główny

Dnia 15.10.2012 r. w Ministerstwie Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej odbyło się spotkanie Rady ds. Racjonalnego Wykorzystywania Żywności, powołanej przy Federacji Polskich Banków Żywności (prezes PTTŻ, prof. Danuta Kołożyn-Krajewska jest wiceprzewodniczącą Rady). W spotkaniu, które poprowadził dyrektor IERiGŻ, prof. dr hab. Andrzej Kowalski, wziął udział Stanisław Kalemba, Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Prezes PTTŻ, prof. Danuta Kołożyn-Krajewska, przedstawiła w krótkim wystąpieniu definicję marnowania żywności i skali problemu w Polsce i w Europie, a przewodniczący Sekcji Ekonomicznej, dr Karol Krajewski, koncepcję badania marnotrawstwa i strat w łańcuchu mleczarskim.

W dniu 14.11.2012 r. w SGGW odbędzie się kolejne spotkanie grupy ds. badań dotyczące opracowania założeń do badań strat i marnowania żywności i przygotowania wniosku projektu.

Trwają przygotowania do Walnego Zebrania Delegatów PTTŻ kończącego kolejną kadencję władz Towarzystwa. Planowany termin zebrania – 14.12.2012 r. w Warszawie.

WAŻNIEJSZE MIĘDZYNARODOWE I KRAJOWE KONFERENCJE NAUKOWE W 2012 r.

Wrzesień

9 – 12 BERN, Switzerland = 5th European Conference on Sensory and Consumer Research.
Informacje: www.eurosense.elsevier.com

- 18 – 20 MOSKWA, Rosja = XIX INTERNATIONAL STARCH CONVENTION Kontakt: iscmosc2012@mail.ru
- 26 - 27 **POZNAŃ = Konferencja Naukowa nt.: „Współczesne trendy w technologii żywności. Od żywności tradycyjnej do prozdrowotnej”**
Organizatorzy: Koordynator Projektu Bioaktywna Żywność Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, KNoŻ PAN, Polskie Towarzystwo Nauk Żywnościowych - Oddział Wielkopolski, Polskie Towarzystwo Technologów Żywności - Oddział Wielkopolski.
Informacje: konferencjawnoziz@up.poznan.pl
www.wnozizpoznan.konferencja.org

Listopad

- 7 – 9 **ROGÓW = V Konferencja Naukowa nt. „Fizjologiczne uwarunkowania postępowania dietetycznego”.**
Organizatorzy: Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW
Informacje: <http://wnzck.sggw.pl/konferencje-2/>
e-mail: fizj_diet@sggw.pl

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY POLSKIEGO TOWARZYSTWA
TECHNOLOGÓW ŻYWNOCI

Przy Zarządzie Głównym: **TCHIBO – WARSZAWA Sp. z o.o. Marki, BUNGE POLSKA Sp. z o.o. Karczew, HORTIMEX Plus Spółka komandytowa Konin.**
Przy Oddziale Małopolskim: **ZAKŁADY PRZEMYSŁU TŁUSZCZOWEGO BIELMAR Sp. z o.o., Bielsko-Biała.**
Przy Oddziale Szczecińskim: **Hartim Szczecin**

Materiał zawarty w Nr 4 (83)/2012 Biuletynu podano według stanu informacji do 1 sierpnia 2012 r. Materiały do Nr 5 (84)/2012 prosimy nadsyłać do 1 października 2012 r. na adres Redakcji Czasopisma.

KOMUNIKAT

Informujemy P.T. Autorów, że od 1 stycznia 2012 roku uaktualnione zostały Informacje dla Autorów oraz wymagania redakcyjne, które publikujemy na stronie **www.pttz.org**

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

PREZES / ODDZIAŁ	ADRES
Prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska Prezes PTTŻ	SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA Tel.: 022 843 87 11 e-mail: danuta_kolozyn_krajewska@sggw.pl
Dr inż. Stanisław Kalisz Sekretarz PTTŻ	SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA e-mail: stanislaw_kalisz@sggw.pl
Dr hab. Maria Śmiechowska, prof. nadz. Oddział Gdański	AM, ul. Morska 81-87, 81-225 GDYNIA Tel.: 058 690 15 62; e-mail: smiemari@am.gdynia.pl
Dr inż. Joanna Stadnik Oddział Lubelski	UP, ul. Skromna 8, 20-704 LUBLIN Tel.: 081 462 33 41; e-mail: joanna.stadnik@up.lublin.pl
Dr hab. Joanna Leszczyńska Oddział Łódzki	PL, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 ŁÓDŹ e-mail: joanna.leszczynska@p.lodz.pl
Dr hab. inż. Lesław Juszcak Oddział Małopolski	UR, ul. Balicka 122, 30-149 KRAKÓW Tel. 012 662 47 78; e-mail: rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl
Dr inż. Janusz Pomianowski Oddział Olsztyński	UWM, Pl. Cieszyński 1, 10-957 OLSZTYN Tel: 89 523 36 17; e-mail: pomian@uwm.edu.pl
Dr inż. Arkadiusz Żych Oddział Szczeciński	ZUT, ul. Kazimierza Królewicza 3, 71-550 SZCZECIN Tel.: 091 449 66 00 wew. 6583; e-mail: arkadiusz.zych@zut.edu.pl
Dr inż. Dorota Nowak Oddział Warszawski	SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA Tel.: 022 593 75 62; e-mail: dorota_nowak@sggw.pl
Dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska Oddział Wielkopolski	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ e-mail: dorotapk@up.poznan.pl
Dr hab. inż. Agnieszka Kita, prof. nadz. Oddział Wrocławski	UP, ul. Norwida 25/27, 50-375 WROCŁAW Tel.: 071 320 50 38; e-mail: agnieszka.kita@wnoz.up.wroc.pl
SEKCJE	
Doc. dr hab. Renata Jędrzejczak Analizy i Oceny Żywności	IBPRS, ul. Rakowiecka 36, 02-532 WARSZAWA Tel. 022 849 02 24; 0606 38 76; Fax: 022 849 04 26
Dr Karol Krajewski Ekonomiczna	WSliZ, ul. Rakowiecka 32, 02-532 WARSZAWA Tel.: 022 646 20 60; e-mail: krajewski@wsiiz.pl
Prof. dr hab. Edward Pospiech Technologii Mięsa	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: 061 848 72 60; e-mail: pospiech@up.poznan.pl
Prof. dr hab. Krzysztof Krygier Chemii i Technologii Tłuszczów	SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 WARSZAWA Tel.: 022 847 58 17; E-mail: krzysztof_krygier@sggw.pl
Prof. dr hab. Wacław Leszczyński Technologii Węglowodanów	UP, ul. Norwida 25/27, 50-375 WROCŁAW Tel.: 071 320 52 21; Fax: 071 320 52 73
Dr hab. inż. Piotr Gębczyński Technologii Owoców i Warzyw	UR, ul. Balicka 122, 30-149 KRAKÓW e-mail: rrgebczy@cyf-kr.edu.pl
Mgr inż. Patrycja Komolka Młodej Kadry Naukowej	UP, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ e-mail: pkomolka@au.poznan.pl